

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gerd Plewig

**Semiquantitative und quantitative Charakterisierung der Zytokinantwort  
humaner Keratinozyten nach Stimulation mit *Propionibacterium acnes*  
und Koproporphyrin III**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Melitta Löwenstein  
aus Toljatti  
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gerd Plewig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher

PD Dr. med. U. Wintergerst

PD Dr. med. M. Mack

Mitbetreuung durch

promovierte Mitarbeiter: PD Dr. med. Martin Schaller

Dr. med. Claudia Borelli

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	Acne vulgaris	6
1.1.1	Pathophysiologie der Acne vulgaris	6
1.2	Therapie der Acne vulgaris	9
1.2.1	Topische Therapie der Akne	9
1.2.1.1	Benzoylperoxid	9
1.2.1.2	Vitamin-A-Säurederivate	10
1.2.1.3	Topische Antibiotika	11
1.2.1.4	Azelainsäure	11
1.2.2	Systemische Therapie der Akne	12
1.2.2.1	Antibiotika	12
1.2.2.2	Hormonelle Therapie	13
1.2.2.3	Retinoide	13
1.2.3	Physikalische Therapie der Acne vulgaris	14
1.3	Zusammensetzung der physiologischen Mikroflora in Follikeln und Komedonen	14
1.4	Genus <i>Propionibacterium</i>	15
1.4.1	Porphyrinproduktion von <i>Propionibacterium acnes</i>	17
1.5	Porphyrine	17
1.5.1	Biosynthese der Porphyrine	17
1.5.2	Fluoreszenzeigenschaften der Porphyrine	20
1.5.3	Nachweisverfahren der Porphyrine	20
1.5.3.1	Fluoreszenznachweis der Porphyrine	21
1.5.3.2	Chromatographische Analyse der Porphyrine	22
1.6	Zytokine	22
1.7	Ziel der Arbeit	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
2.1	Probengewinnung und mikrobiologische Verfahren	25
2.1.1	Entnahme und Lagerung der Komedonen	25
2.1.2	Anzüchtung vom <i>Propionibacterium acnes</i>	25
2.1.3	Keimzahlbestimmung	26

2.1.4	Typisierung der Propionibakterien	26
2.2	Porphyrindiagnostik	27
2.2.1	Porphyrinextraktion	27
2.2.2	Chromatographische Auftrennung der Porphyrine mittels HPLC	28
2.2.2.1	Festphasensäulen-Konditionierung	29
2.2.2.2	Probenvorbereitung	30
2.2.2.3	Festphasenextraktion	30
2.2.2.4	HPLC-Analyse	30
2.2.2.5	HPLC-Gradienten-Systeme	31
2.3	Keratinocyten-Zellkultur	32
2.3.1	Medien und Lösungen	33
2.3.2	Primärkultur	33
2.3.3	Subkultivierung	33
2.4	Versuchsablauf	34
2.5	Licht- und Elektronenmikroskopie	35
2.5.1	Fixierung und Einbettung	35
2.5.2	Semi-, Ultradünnschnitt und mikroskopische Analyse	36
2.6	RT-PCR	37
2.6.1	Gesamt-RNA-Extraktion	37
2.6.2	RNA-Gel-Elektrophorese	38
2.6.3	Photometrische Messung	38
2.6.4	DNase-Verdau und reverse Transkriptase	39
2.6.5	Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
2.6.7	Qualitative PCR-Analyse und verwendete Primer	40
2.6.8	cDNA-Ethidiumbromid-Gel-Elektrophorese	41
2.6.9	Quantitative PCR-Analyse und verwendete Primer	42
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
3.1	Spezies-Klassifizierung	52
3.2	Keimzahlbestimmung	52
3.3	Porphyrinproduktion von <i>P. acnes</i>	52
3.4	Zytokinexpression	55
3.4.1	RNA-Nachweis	55

3.4.2	Qualitative RT-PCR-Analyse	57
3.4.3	Quantitative RT-PCR-Analyse	59
3.5	Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen	71
3.5.1	Lichtmikroskopische Analyse der Keratinozytenmorphologie im Kontrollansatz und nach Interaktion mit aktiven und hitzeinaktivierten <i>P. acnes</i>	71
3.5.2	Elektronenmikroskopische Analyse der Interaktion von <i>P. acnes</i> und Keratinozyten	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>96</b>

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Acne vulgaris**

Acne vulgaris ist eine chronisch entzündliche, teils sehr schwer verlaufende, Hauterkrankung der talgdrüsenreichen Hautareale im Gesicht, an der Brust und am oberen Rücken, die aufgrund ihrer hohen Prävalenz enorme Auswirkungen auf die Lebensqualität der betroffenen Patienten haben kann. Das Krankheitsbild der Akne wurde bereits im Altertum beschrieben, aber die wesentlichen medizinischen Erkenntnisse wurden erst im 20. Jahrhundert gewonnen. Akne gehört zu den häufigsten Dermatosen. Das klinische Bild der Akne zeichnet sich durch Seborrhoe, eine folliculäre Verhornungsstörung mit Komedonenbildung sowie nachfolgenden entzündlichen Papeln, Pusteln, abszedierende Knoten und nach Abheilung Narben aus (Plewig und Kligman, 2000). Die höchste Prävalenz liegt in der Pubertät vor, wo sie bei 80-90 % der Jugendlichen auftritt, um im frühen Erwachsenenalter meist wieder spontan abzuklingen.

Die Erkrankung stellt durch die ästhetische Beeinträchtigung für die Betroffenen psychosozialen Stressfaktor dar (Cunliffe, 1993)

#### **1.1.1 Pathophysiologie der Acne vulgaris**

Die Ätiologie der Akne ist multifaktoriell. Zahlreiche ätiopathogenetische Faktoren bestimmen Ausprägung und Verlauf der Erkrankung. Dazu gehören die genetische Prädisposition, folliculäre Verhornungsstörung mit gesteigerter folliculäre Reaktionsbereitschaft (Komedogenese), Überfunktion der Talgdrüsen (Seborrhö), Hormone sowie die Mikroflora des Talgdrüsenfollikels, die sich aus Bakterien (*Propionibacterium*-Spezies, *Staphylococcus epidermidis*), Pilzen (*Pityrosporum*-Spezies) und Milben (*Demodex*-Spezies) zusammensetzt (Plewig und Kligman, 2000). Insbesondere mögliche Virulenzfaktoren der Propionibakterien (Allaker *et al.*, 1987; Burkhart *et al.*, 1999), die als anaerobe Keime zur residenten Follikelflora gehören, werden als ätiopathogenetisch relevant diskutiert.

Es besteht kein einheitlicher Vererbungsmodus. Bei Erkrankung beider Elternteile liegt die Wahrscheinlichkeit, dass auch das Kind an Pubertätsakne erkrankt bei über 50%. Man vermutet dabei einen autosomal-dominanten Erbgang mit unterschiedlicher Expressivität (Plewig und Kligman, 2000).

Die erste mikroskopisch wahrnehmbare Veränderung am Talgdrüsenfollikel ist eine infrainfundibuläre Proliferations- und Retentionshyperkeratose, die zur Bildung des Mikrokomedo führt (Melnik und Plewig, 1988). Darüber hinaus sind Keratinosomen, Membranverhältnisse der Keratinozyten, desmosomale Kontakte und physikochemische Eigenschaften der interkorneozytären lipidreichen Matrix an der verzögerten Korneozytendesquamation beteiligt, die die Entstehung der Komedonen fördert (Plewig und Kligman, 2000).

Die Talgdrüsenzellen tragen Androgenrezeptoren an der Zelloberfläche. Vor der Pubertät sind die Talgdrüsenfollikel klein. Die Vergrößerung der Talgdrüsenazini und Menge der Talgbildung werden hormonell unter dem Einfluss von Androgenen, insbesondere Testosteron aus Hoden und Ovar und Dehydroepiandrosteron aus den Nebennierenrinden, gesteuert. Testosteron selbst ist biologisch weitgehend inaktiv. Sowohl Sebozyten als auch Keratinozyten exprimieren 5- $\alpha$ -Reduktase Isoenzym Typ I und 17- $\beta$ -Dehydrosteroid-dehydrogenase und können so Androgene konvertieren (Plewig und Kligman, 2000). Es wird diskutiert, dass die durch Androgenstimulation in der Pubertät gesteigerte Sebumsekretion eine relative Ausdünnung der epidermalen Lipide des Follikelepithels bewirkt (Melnik und Plewig, 1988). Die hieraus resultierende Störung der intrazellulären Lipidmatrix führt zur erhöhten Korneozytenadhäsion und fördert die folliculäre Retentionshyperkeratose des Akroinfundibulums.

Die Hyperplasie der Talgdrüse und erhöhte Sebumsekretion führen zu einem Mangel an Linolsäure im Follikelausführungsgang, was einen Stimulus der Hyperkeratose zur Folge hat (Wertz *et al.*, 1985; Downing *et al.*, 1986). Auch im Tierversuch wurde beobachtet, dass ein Mangel an Linolsäure eine Schuppung und Störung der Barrierefunktion zur Folge hat (Wertz *et al.*, 1983)

Eine erhöhte Lipidsekretion begünstigt wiederum das Wachstum von *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), welches im Gegensatz zur übrigen Standortflora des Follikels an der Pathogenese der Akne maßgeblich beteiligt ist, und vor allem für die entzündliche Exazerbation der Akne verantwortlich

gemacht wird (Holland *et al.*, 1998). Propionibakterien bilden reichlich Lipasen (Reisner *et al.*, 1968), die durch die Abspaltung des Glycerolanteils der Talgdrüsentriglyzeride freie Fettsäuren, Glycerin, Mono- sowie Diglyzeride im Follikelkanal entstehen lassen. Die freien Fettsäuren sind wiederum für die Komedonenbildung und Entzündungsreize verantwortlich (Freinkel, 1969; Kanaar, 1971; Shaliata, 1974). In neueren Untersuchungen konnte eine 33 kDa extrazelluläre Lipase isoliert und das zugehörige Gen kloniert werden (Miskin *et al.*, 1997).

Ein weiteres Stoffwechselprodukt des *P. acnes* sind Porphyrine (Fanta *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1978; Romiti *et al.*, 2000). Ihr Vorkommen im Follikel wurde durch die ostiofollikuläre Rotfluoreszenz der talgdrüsenreiche Hautareale bei Betrachtung unter Wood-Licht im abgedunkelten Raum entdeckt (Niebauer *et al.*, 1973). Die Fähigkeit von *P. acnes*, Porphyrine zu synthetisieren und diese in gewissem Prozentsatz an das umgebende Medium abzugeben, lässt vermuten, dass in das perifollikuläre Bindegewebe abgegebene Porphyrine bei entzündlichen Akneläsionen eine Rolle spielen (Fanta *et al.*, 1981; Formanek *et al.*, 1977). Weiterhin wird die Möglichkeit, dass die Porphyrine die Oxidation der Squalene beschleunigen, diskutiert. Squalene sind hochwirksame sauerstoffbindende Substanzen. Diese werden im Follikelkanal der Talgdrüse oxidiert, wodurch die Sauerstoffspannung im Follikelkanal vermindert wird, was wiederum die Kolonisation mit *P. acnes* beschleunigt (Saint-Leger *et al.*, 1986). Neben der Produktion toxischer Porphyrine und der Lipolyse werden insbesondere die Sekretion von Proteinasen (Greenman *et al.*, 1983; Greenman *et al.*, 1985; Ingham *et al.*, 1983), Histamin (Allaker *et al.*, 1986; Allaker *et al.*, 1987), Tryptamin (Allaker *et al.*, 1987) und die Antigenität (Ashbee *et al.*, 1997; Burkhart *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 1993; Webster *et al.*, 1985) dieser Keime als wesentliche komedogene und entzündungsfördernde Faktoren angesehen. Zellwandbestandteile von *P. acnes* können Monozyten jedoch nicht Keratinozyten zur Expression von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF auf Proteinebene stimulieren (Vowels *et al.*, 1995; Ingham *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2002). *P. acnes* kann Lymphozyten (Jappe *et al.*, 2002), Makrophagen (Sljivic und Watson, 1977) und die Komplementkaskade aktivieren (Massey *et al.*, 1978, Webster *et al.*, 1978) sowie chemoattraktiven Substanzen (Webster *et al.*, 1980; Jain *et al.*, 2002; Gould *et al.*, 1979) und die Hydrolasesekretion in

Neutrophilen (Webster *et al.*, 1980) induzieren. Nach neuesten Untersuchungen wird die Immunantwort menschlicher Monozyten und peritonealer Mausmakrophagen nach Stimulation mit *P. acnes* über Toll-Rezeptor 2 (Kim *et al.*, 2002) vermittelt. Während die Zytokinantwort von Zellen des Immunsystems durch Stimulation mit *P. acnes* moduliert wird, ist die Sekretion von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF humaner Keratinozyten nach Stimulation mit *P. acnes* nicht erhöht (Ingham *et al.*, 1998; Vowels *et al.*, 1995; Walters *et al.*, 1995).

## **1.2 Therapie der Acne vulgaris**

Die Wahl der Therapie richtet sich nach dem Schweregrad und der Entwicklungsgeschwindigkeit der Acne vulgaris. Richtungweisend für die Art der Behandlung sind früher Beginn, positive Familienanamnese, und hohes Narbenrisiko. Man unterscheidet topische, systemische und physikalische Therapien.

### **1.2.1 Topische Therapie der Akne**

Die Hauptvertreter der lokalen Behandlung sind unter anderem Benzoylperoxid, topische Retinoide (Isotretinoin, Tretinoin, Adapalene), Azelainsäure und topische Antibiotika.

#### **1.2.1.1 Benzoylperoxid**

Benzoylperoxid (BPO) steht zur Behandlung der Akne seit über 20 Jahren zur Verfügung. Lokal angewandtes Benzoylperoxid wirkt antibakteriell, antiinflammatorisch, geringgradig keratolytisch und hemmt die Lipolyse, senkt jedoch nicht die Talgproduktion (Goldstein *et al.*, 1981; Cunliffe *et al.*, 1983; Fulton *et al.*, 1974). Der antibakterielle Effekt kommt durch die Freisetzung von Sauerstoff aus dem Peroxidmolekül zustande, das anaerobe Milieu wird zerstört und damit fehlen die Umgebungsvoraussetzungen für das Wachstum von *P. acnes*. Die lipolysehemmende Wirkung von Benzoylperoxid führt zur Reduktion der freien Fettsäuren auf der Hautoberfläche. Benzoylperoxid vermindert signifikant die Zahl sowohl der offenen wie der geschlossenen Komedonen

(Burke *et al.*, 1983; Fulton *et al.*, 1974). Diese Wirkung von Benzoylperoxid erfolgt möglicherweise sekundär, über den Abbau der kutanen Bakterienflora, besonders von *P. acnes* und *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) (Mills *et al.*, 1981). Weiterhin besitzt es eine direkte antiinflammatorische Wirkung, was sich schon früh nach dem Therapiebeginn durch eine deutliche Abnahme der Zahl und Größe entzündlicher Effloreszenzen zeigt (Becker *et al.*, 1981; Schutte *et al.*, 1982)

Benzoylperoxid gibt es weltweit in verschiedenen Zubereitungen. Um das Wirkungsspektrum zu erweitern, wird Benzoylperoxid häufig mit anderen Lokalthérapeutika kombiniert.

### **1.2.1.2 Vitamin-A-Säurederivate**

Seit 1932 ist die Wirkung von Vitamin A bekannt, es beeinflusst sowohl die Keratinisierung als auch die epitheliale Differenzierung. Tretinoin ist seit mehr als 20 Jahren in die Aknetherapie eingeführt. Der Wirkungsmechanismus von Retinoiden ist besonders in Hinsicht auf die Komedogenese untersucht worden (Kligman *et al.*, 1969; Pedace und Stoughton, 1971). Der komedolytische Effekt entsteht dadurch, dass die Korneozytenkohäsion durch Unterdrückung der Bildung von Tonofilamenten und Lösung der desmosomalen Bindungen aufgelockert wird. Die epidermalen Korneozyten werden verstärkt abgestoßen, es resultiert eine Ausdünnung des Stratum corneum. Die Auswirkungen auf die Proliferation zeigen sich durch einen Anstieg der mitotischen Aktivität, der Turnover-Rate, der Keratinozyten. Offene Komedonen werden abgestoßen, geschlossene Komedonen gehen in offene über und werden anschließend abgestoßen. Als sekundärer Effekt über die Komedogenese vermindern Retinoide auch die Zahl von *P. acnes* im Follikellumen, am ehesten durch eine Veränderung des duktales Mikromilieus, das die Wachstumbedingungen von Propionibakterien verschlechtert. In der Lokalthérapie der Acne vulgaris werden am häufigsten Tretinoin, Isotretinoin und Adapalen angewendet.

Im Vergleich zu Tretinoin zeigen Isotretinoin und Adapalen bei gleicher Wirksamkeit deutlich stärkere antiinflammatorische Wirkung bei geringerer Irritation (Shroot, 1998).

### 1.2.1.3 Topische Antibiotika

Von den Antibiotika werden am häufigsten Erythromycin (Dobson und Belknap, 1980), Tetrazyklinen und Clindamycin (Becker *et al.*, 1981) in der lokalen Therapie der Acne vulgaris angewendet. Die Wirkung topischer Antibiotika ist vorwiegend antimikrobiell. Dies gilt insbesondere für Clindamycin, das sowohl die intrafollikulären wie auch die Hautoberflächenkeime vermindert (Cunliffe *et al.*, 1980; Gloor *et al.*, 1978). Erythromycin, Tetrazykline und Clindamycin reduzieren die freien Fettsäuren in den Hautoberflächenlipiden (Becker *et al.*, 1981; Anderson *et al.*, 1976). Weiterhin führen die topische Antibiotika zur Abnahme der Komedonenzahl (Becker *et al.*, 1981). Einige topische Antibiotika lassen sich auch kombiniert einsetzen zum Beispiel mit Benzoylperoxid oder Zinkacetat.

### 1.2.1.4 Azelainsäure

Azelainsäure ist eine aliphatische, gesättigte Dikarbonsäure, gebildet von *Pityrosporum ovale*. Azelainsäure wurde 1991 als topisches Aknetherapeutikum in Europa eingeführt und führt zur Reduktion der nicht entzündlichen Akneeffloreszenzen (offene und geschlossene Komedonen). Die Besserung beruht zum Teil auf einer Normalisierung der vermehrten Keratohyalingranula im Infundibulum (Mayer da Silva *et al.*, 1987). Azelainsäure reduziert überdies die freien Fettsäuren. Als zweiter Effekt vermindert Azelainsäure die Keimdichte von *P. acnes* und *S. epidermidis* (Bladon *et al.*, 1986). Im weiteren wird der Azelainsäure auch antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben (Akamatsu *et al.*, 1991). Azelainsäure lässt sich gut mit hormonellen Kontrazeptiva und bei schweren Akne-Formen mit Tetrazyklinen zum raschen Wirkeintritt bei tieferreichende Effloreszenzen kombinieren. Das Externum zeigt keine systemische Toxizität und wird bei lokaler Applikation im Vergleich zu Benzoylperoxid oder Retinoiden besser toleriert (Graupe *et al.*, 1996).

## 1.2.2 Systemische Therapie der Akne

Eine systemische Behandlung ist dann angezeigt, wenn eine mittelschwere bis schwere Akne vorliegt, sowie auch bei Patienten mit milder Akne und psychischen Veränderungen wie reaktiver Depression und Patienten, die aufgrund ihrer beruflichen Exponiertheit Schwierigkeiten erfahren (Cunliffe, 1993). Die drei Hauptsäulen der systemischen Aknetherapie sind Antibiotika, Hormone und Retinoide.

### 1.2.2.1 Antibiotika

Der Einsatz von Antibiotika bei Akne beruht eher auf einem Zufall. Noch vor 20 Jahren herrschte die Meinung, dass die Akne eine Infektionskrankheit wäre, wodurch zufällig die Wirksamkeit von Tetrazyklinen festgestellt wurde. Als sich dann später diese Auffassung änderte, kam man auf die Idee, dass Tetrazykline möglicherweise nicht nur antibakteriell wirken (Marsden, 1985). Am häufigsten werden heute folgende Antibiotika eingesetzt: Erythromycin, Tetrazyklin, Minozyklin und Doxyzyklin. Tetrazykline sind die erste Wahl bei der systemischen Antibiotikatherapie der Akne. Erythromycin ist nach klinische Studien gleich wirksam wie Tetrazyklin (Greenwood, *et al.*, 1986). Minozyklin ist eine Variante der Tetrazykline, die im Vergleich zu den anderen Tetrazyklinen besser resorbiert wird und auch mit der Nahrung eingenommen werden kann (Leyden, 1985). Es ist noch lipophiler als andere Tetrazykline und hat eine bessere Gewebspenetration. Minozyklin hat einen stärkeren Einfluss auf die Hautoberflächenbesiedlung mit *P. acnes* als andere Tetrazykline (Leyden, 1985). Doxyzyklin ist eine weitere Alternative aus der Tetrazyklingruppe (Plewig *et al.*, 1970).

Die Wirkungsmechanismen der Antibiotika sind primär antimikrobiell. Sie supprimieren die Zahl von *P. acnes* und reduzieren die freien Fettsäuren in den Hautoberflächenlipiden (Cunliffe, 1987). Ein wichtiger zweiter Wirkungsmechanismus oraler Antibiotika ist ihre antiinflammatorische Wirkung. Sie bewirken eine Besserung der Akne durch Verminderung der Chemotaxis gegenüber *P. acnes*, modifizieren den alternativen und den klassischen

Komplementabbauweg (Esterly *et al.*, 1984) und sind potente Sauerstoffradikalfänger (Van Baar *et al.*, 1987).

### **1.2.2.2 Hormonelle Therapie**

Eine hormonelle Therapie ist besonders bei Frauen, die nicht ausreichend auf konventionelle Behandlung ansprechen angezeigt. Am häufigsten wird dabei die Kombination Östrogen plus Cyproteronazetat angewendet (Keller *et al.*, 1978). Die systemischen Effekte bewirken bei hormonellen Maßnahmen eine Abnahme der Plasmawerte von Testosteron und Dehydroepiandrosteron. Am deutlichsten macht sich die Wirkung in einer Abnahme der Sebumexkretionsrate bemerkbar.

### **1.2.2.3 Retinoide**

Isotretinoin (13-cis-Retinsäure) wird in der Therapie der schweren Akneformen eingesetzt. Isotretinoin hat verschiedene pharmakologische Angriffspunkte. Im Vordergrund steht die sebumsuppressive Wirkung (King *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1984). Das Medikament besitzt auch keratolytische Wirkung. Durch den komedolytischen Effekt verschwinden Mikrokomedonen, offene und geschlossene Komedonen und es kommt zur Verkleinerung der Follikelfilamente (Plewig und Kligman, 2000). Isotretinoin hat keine direkten Einflüsse auf *P. acnes*, obwohl sich eine deutliche Reduktion der Oberflächenbakteriendichte unter der Therapie findet (King *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1984; Leyden und McGinley, 1982). Diese Wirkung beruht auf einer Beeinträchtigung der Ernährungssituation von *P. acnes* im Follikellumen und einer Abnahme der Follikelweite. Weiterhin hat Isotretinoin eine deutliche antiinflammatorische Wirkung, indem es die Chemotaxis (Pigatto *et al.*, 1983) von Neutrophilen und Monozyten (Falcon *et al.*, 1986) und die Pustelbildung unterdrückt oder vermindert (Plewig und Wagner, 1985).

### 1.2.3 Physikalische Therapie der Acne vulgaris

Zu den physikalischen therapeutischen Ansätzen gehören Komedonenextraktion, flüssiger Stickstoff und die Phototherapie. Bei entzündlichen Akne-Formen wirkt sich die Bestrahlung mit UVA oder die kombinierte UVA-/UVB-Bestrahlung günstig aus (Kaminsky, 2003).

Neuere Studien zeigen eine deutliche Reduktion der Bakterienzahl sowie Abnahme der Porphyrinproduktion durch eine Blaulichtbestrahlung von *P. acnes* mit einer Wellenlänge von 407-420 nm (Ashkenazi *et al.*, 2003). In ersten Therapiestudien konnte eine Besserung der Akne nachgewiesen werden (Kawada *et al.*, 2002).

### 1.3 Zusammensetzung der physiologischen Mikroflora in Follikeln und Komedonen

Jeder Talgdrüsenfollikel ist dicht mit Pilzen, Bakterien und gegebenenfalls mit Milben besiedelt. Die drei wesentlichen Follikelbewohner hat Unna 1894 mittels histologischer Untersuchungen in Akneeffloreszenzen nachgewiesen (Unna, 1894). In der Diskussion standen ein Bakterium (*P. acnes*), das Komedonen auslöse, Staphylokokken, die für die Entzündung verantwortlich wären und ein Pilz (*Pityrosporum*-Spezies). Sabouraud kultivierte als erster 1897 Propionibakterien aus Akneeffloreszenzen und Gilchrist injizierte 1900 Propionibakterien in die Haut, wodurch Akne provoziert wurde (Sabouraud, 1897; Gilchrist, 1900). Die einzelnen Komponente der Mikroflora sind im Talgdrüsenfollikel unterschiedlich verteilt. Ganz oben, zwischen den oberflächlichsten Hornzelllamellen in den Akroinfundibulum liegen *Pityrosporum*-Spezies. Sie spielen offensichtlich in der Pathogenese der Akne keine Rolle. In der Mitte des Akroinfundibulums sind überwiegend Mikrokokken, vor allem *S. epidermidis*, vorhanden. Die tiefen mikroaerophilen Komedonen- und Follikelabschnitte (Abb. 1) sind reichlich mit Propionibakterien besiedelt (Wolff und Plewig, 1976).

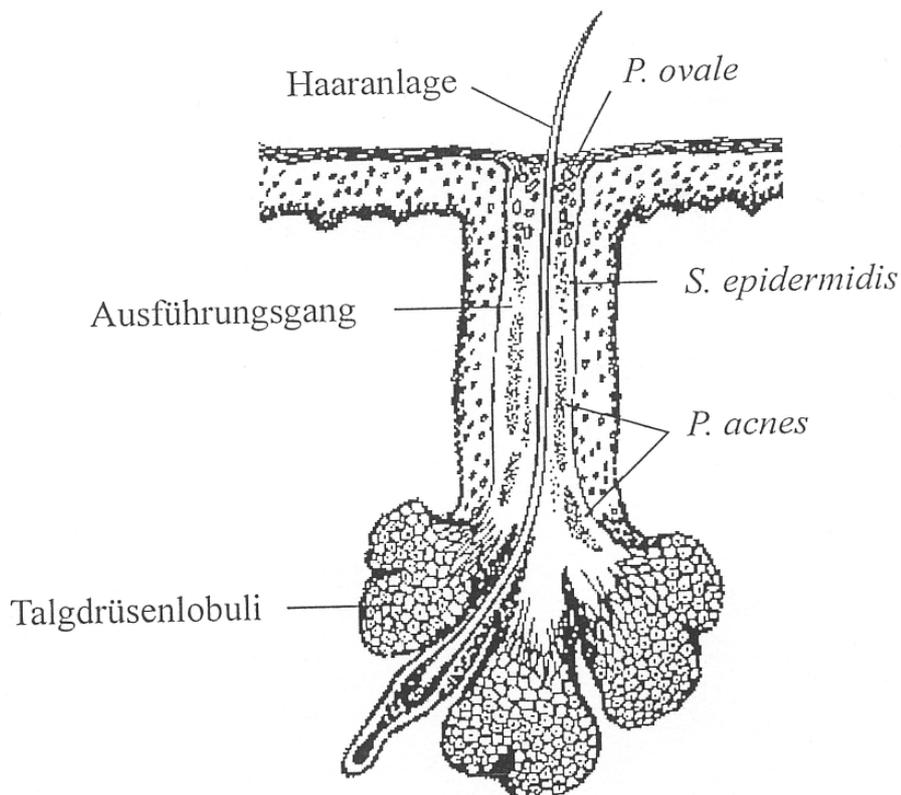


Abbildung 1. Verteilung der physiologischen Mikroflora im Haarfollikel (aus Wolff und Plewig, 1976).

#### 1.4 Genus *Propionibacterium*

Das Genus *Propionibacterium* gehört zusammen mit dem Genus *Eubacterium* der Familie *Propionibacteriaceae* an. Die Familie *Propionibacteriaceae* umfasst grampositive, nicht sporenbildende, pleomorphe und anaerobe Stäbchenbakterien.

Die meisten Vertreter sind saccharolytisch, wobei als wichtigste Stoffwechselprodukte Propionsäure oder Buttersäure entstehen (Köhler *et al.*, 2001).

Das Genus *Eubacterium* kommt bei Mensch und Tier vor. Über ihre physiologische Bedeutung weißt man wenig. Die Pathogenität der Eubakterien für den Menschen ist, wenn überhaupt vorhanden, sicherlich gering.

Die Nomenklatur *Propionibacterium* wurde 1909 von Orla-Jansen vorgeschlagen, da diese Bakterien in der Lage sind Propionsäure zu synthetisieren (Orla-Jansen *et al.*, 1909). Die Stäbchen sind stets unbeweglich und stark pleomorph. Neben der diphtheroïder Form können auch fädige

Elemente beobachtet werden (Wolff, 1976). Propionibakterien fermentieren Glukose, wodurch Propioni- und Essigsäuren entstehen (Holland *et al.*, 1981). Bei der Anzüchtung auf den Agar - Nährböden erscheinen die Bakterienkolonien weiß bis grauweiß oder bräunlich bis rötlich pigmentiert und kugelig gewölbt. Auf den bluthaltigen Nährböden kann eine  $\beta$ -Hämolyse auftreten (Gummins and Jonson, 1986). Alle Vertreter wachsen optimal bei 30-37°C, besondere Nährstoffansprüche liegen nicht vor.

Die „klassischen“ Propionibakterien, wie *P. freudenreichii*, werden in Milchprodukten und Käsezubereitungen nachgewiesen. Sie haben für die Humanmedizin keine Bedeutung.

Die kutanen Propionibakterien werden in drei Spezies unterteilt. *P. acnes*, *P. granulosum* und *P. avidum* (Johnson and Gummins, 1972), die aufgrund unterschiedlicher biochemischer, serologischer und lipolytischer Merkmale differenzierbar sind. Zwei unterschiedliche Zellwandtypen sind bekannt, basierend auf der Präsenz der drei Zucker Galaktose, Glukose und Mannose. *P. acnes* und *P. avidum* haben jeweils zwei Serotypen, abhängig von der An- oder Abwesenheit von Galaktose. Nur *P. acnes* reagiert sensitiv auf Bakteriophagen.

Insbesondere *P. acnes*, aber auch *P. granulosum* und *P. avidum* zählen zu den normalen Hautbewohnern gesunder Erwachsener und kommen in den Ausführungsgänge der Talgdrüsen und Haare vor. Propionibakterien benötigen als Nahrung die Triglyzeridfraktion des Talgs. Bei Komedonen und Aknepusteln ist die Anzahl von *P. acnes* etwa acht mal so hoch wie die von *P. granulosum*. In normalen Talgdrüsenfollikeln von Jugendlichen und Erwachsenen ist die Anzahl von *P. acnes* zwei bis drei mal höher als die von *P. granulosum* (Whiteside und Voss, 1973). Propionibakterien sind bei Kindern vor dem 12. Lebensjahr selten vorhanden. Erst mit dem Beginn der Pubertät erhöht sich die Anzahl der Keime (Matta, 1974), was durch die androgene Wirkung auf die Aktivität und Sekretion der Talgdrüsen zu erklären ist. *P. avidum* bevorzugt eher die feuchten Hautoberflächen und wird häufig vom Nasenvorhof, Perineum und den Achseln isoliert. Neben starker lipolytischer Aktivität verfügt zumindest *P. acnes* noch über eine ganze Reihe verschiedener Enzyme wie Lipasen, Proteinasen, Histamin, Tryptamin, Lezitinasen, Hyaluronidasen,

Neuroaminidasen und Phosphatasen. Außerdem produzieren diese Keime Porphyrine (Eaves *et al.*, 1979).

#### **1.4.1 Porphyrinproduktion von *Propionibacterium acnes***

Cornelius und Ludwig waren 1967 die ersten, die den Porphyringehalt einerseits direkt aus gepoolten Komedoexprimaten, andererseits aus der Kultur eines aus der Axilla gezüchteten *P. acnes*- Stammes analysierten. Sie stellten dabei überwiegend Koproporphyrin III sowie Portoporphyrin IX fest. Auch später folgenden Untersuchungen kamen zum gleichen Ergebnis (Fanta *et al.*, 1981; Formanek *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 1978; McGinley *et al.*, 1980), teilweise wurden auch noch polare Porphyrine gefunden.

### **1.5 Porphyrine**

Porphyrene sind farbige Verbindungen, die ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich auftreten. Ihr Name leitet sich aus dem griechischen Wort „porphura“ - Purpur ab und beschreibt deren Farbe. Der Begriff Porphyrin wurde von Hoppe-Seyler eingeführt (Hoppe-Seyler, 1871). Porphyrene besitzen ein charakteristisches Anregungsspektrum und weisen insbesondere bei langwelliger UV-Strahlung eine hellrote Fluoreszenz auf. Diese wurde erstmals von Thudichum beschrieben, der die blutrote Fluoreszenz bei der Purifikation von eisenfreiem Hämatin beobachtete (Thudichum, 1867).

#### **1.5.1 Biosynthese der Porphyrine**

Der Porphyrinkern besteht strukturell aus vier Pyrrolringen, die über Methinbrücken (=CH-) zu einem Tetrapyrrolsystem verbunden sind (Pastinszky und Răcz, 1974). Dieses konjugierte Ringsystem mit elf Doppelbindungen bildet leicht Komplexe mit Übergangsmetallen. Während im Pflanzenreich die Komplexbildung mit Magnesium (als Chlorophyll) überwiegt, tritt Porphyrin im Tierreich als Eisenkomplex auf, der als Häm bezeichnet wird. Diese Metallporphyrene stellen die posthetische Gruppe vieler im Stoffwechsel der

Zelle wichtiger Proteine, wie Katalasen, Peroxidasen und Zytochrome (Petrides, 1998).

Die Biosynthese von Häm (Abb. 2) verläuft bis zum Uroporphyrinogen III über die gleichen enzymatischen Schritte wie die Biosynthese von Chlorophyll, mitochondrialer und mikrosomaler Zytochrome, Katalasen und Peroxidasen (Gribbon *et al.*, 1994; Marples *et al.*, 1974; Voet und Voet, 1994).

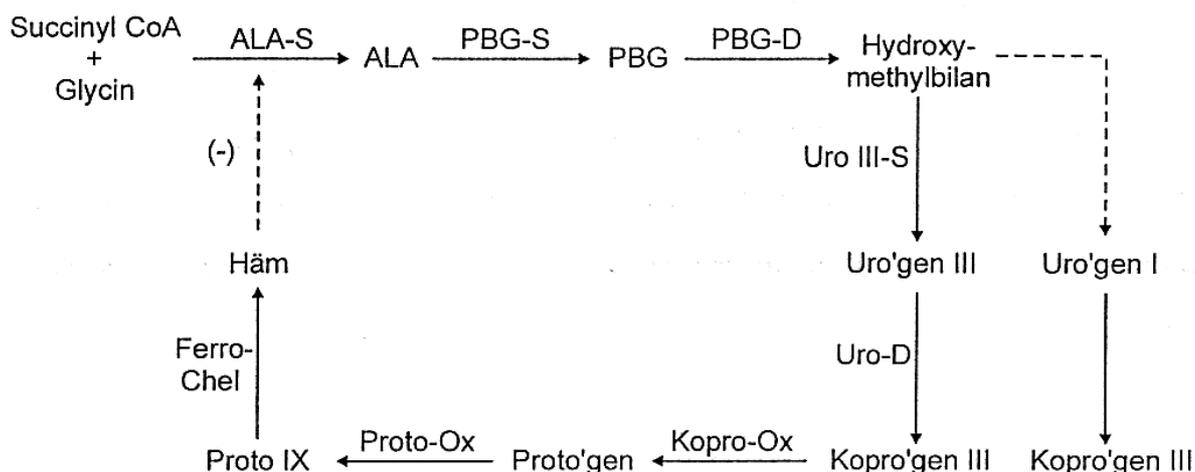


Abbildung 2. Stoffwechselschritte der Porphyrinbiosynthese (aus Jacob und Demant, 1998).

**Substrate** ALA:  $\delta$ -Aminolävulinsäure  
 PBG: Porphobilinogen  
 Uro'gen I,III: Uroporphyrinogen I,III  
 Kopro'gen I, III: Koproporphyrinogen I, III  
 Proto'gen: Protoporphyrinogen  
 Proto IX: Protoporphyrin IX

**Enzyme** ALA-S: ALA-Synthetase  
 PBG-S: PBG-Synthetase  
 PBG-D: PBG-Deaminase  
 Uro-III-S: Uro'gen-III-Synthetase  
 Uro-D: Uro'gen-Decarboxylase  
 Kopro-Ox: Kopro'gen-Oxidase

Proto-Ox: Proto'gen-Oxidase

Ferro-Chel: Ferro-Chelatase

Der erste Schritt der Porphyrinbiosynthese ist die Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin, es resultiert  $\delta$ -Aminolävulinsäure (Jordan, 1991). Über die Porphyrinvorstufen  $\delta$ -Aminolävulinsäure (ALA) und Porphobilinogen (PBG) entsteht das offenkettige Tetrapyrrolderivat Hydroxymethylbilan. Dieses wird enzymatisch über Uroporphyrinogen III, Koproporphyrinogen III und Protoporphyrinogen in Protoporphyrin IX umgewandelt. Alternativ kann durch die spontane Kondensation aus Hydroxymethylbilan auch Uroporphyrinogen I und weiter Koproporphyrinogen I entstehen, was als metabolisches Endprodukt nicht zur Häm-Biosynthese beiträgt.

Die Umwandlung von Uroporphyrinogen III, eine Porphyrinverbindung mit acht Carboxygruppen, zu Koproporphyrinogen III erfolgt durch die schrittweise Decarboxylierung der vier Essigsäurereste zu Methylgruppen.

Die Oxidation von Protoporphyrinogen zu Potoporphyrin IX erfolgt unter Katalyse der Protoporphyrinogen-Oxidase über eine sauerstoffabhängige Reaktion (Martin, 1987). Einige anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien können jedoch Zytochrome und Bakteriochlorophyll in der Abwesenheit von Sauerstoff produzieren. Es wird vermutet, dass in diesen Mikroorganismen Protoporphyrin durch einen alternativen Mechanismus synthetisiert wird (Ehteshamuddin, 1968; Jacobs *et al.*, 1970; Mori und Sano, 1972).

Der letzte Schritt der Häm-Biosynthese besteht im Einbau von Eisen in das Protoporphyrin. Diese Reaktion wird durch das Enzym Hämsynthetase oder Ferro-Chelatase katalysiert.

Die  $\delta$ -Aminolävulinsäure-Synthetase ist ein reguliertes Enzym, wobei Häm als negativer Regulator auf die Synthese des Enzyms wirkt.

Porphyrien sind seltene, meist angeborene und nur ausnahmsweise erworbene Störungen der Häm-Biosynthese, bei denen jeweils eines der acht Enzyme der Häm-Biosynthese gestört ist. Je nach dem welches Enzym bei einer Porphyrie gestört ist, kommt es jeweils zu einem Anstau jener Porphyrinvorstufen, die normalerweise durch das entsprechende Enzym metabolisiert werden. Die schädliche Wirkung der Porphyrine beruht einerseits auf ihrer Hepatotoxizität, andererseits auf ihrer photosensibilisierenden Wirkung, die durch die Bildung

von Lipidperoxyden zur Membranzerstörung führen (Murphy, 1999; Touart und Sau, 1998).

### **1.5.2 Fluoreszenzeigenschaften der Porphyrine**

Porphyryne zeigen ein starkes Fluoreszenzverhalten, das auf die konjugierten Doppelbindungen zurückzuführen ist. Die metabolisch aktiven porphyrinogene sind farblose Verbindungen.

Bei Untersuchungen von Porphyrinen oder Porphyrinderivaten sind die charakteristischen Absorptionsspektren sowohl im sichtbaren als auch im ultravioletten Bereich von großer Bedeutung. Die stärkste Absorptionsbande hat einen hohen Extinktionskoeffizienten und liegt bei 400 nm. Diese zeichnet den Porphyrinring aus und ist charakteristisch für alle Porphyrine, unabhängig von ihren Seitenketten (Rimington, 1960). Nach ihrem Entdecker Soret, einem französischen Radiologen, wird diese Absorptionsbande auch als Soret-Bande bezeichnet. Soret stellte bei der Untersuchung von Hämoglobin dieses typische Absorptionsspektrum fest (Soret, 1883).

### **1.5.3 Nachweisverfahren der Porphyrine**

Bei der Untersuchung von Porphyrinen muss deren Polarität und die sich daraus resultierende Löslichkeit in hydrophilen und hydrophoben Medien berücksichtigt werden. Während der Synthese von Häm aus  $\delta$ -Aminolävulinsäure nimmt die Hydrophobizität der verschiedenen Zwischenprodukte zu. Bei der klinisch-chemischen Porphyriediagnostik lassen sich die polaren Uroporphyrine im Urin nachweisen, während apolare Protoporphyrine ausschließlich über die Galle mit dem Stuhl eliminiert werden. Koproporphyrin erscheint aufgrund seiner mittleren Polarität sowohl im Urin als auch im Stuhl (Martin, 1987; Jacob und Demant, 1998).

Prinzipiell bieten sich zwei Möglichkeiten zur Trennung eines Porphyringemisches in seine Komponenten die Fraktionierung der Porphyrine als freie Säuren oder die Isolierung als Methylester (Doss, 1969; Doss 1974) an.

Die Koproporphyrine I, III und Protoporphyrine sind in Eisessig-Äthermischungen löslich, aus denen sie mit Salzsäure extrahiert werden können. Uroporphyrine sind dagegen in Eisessig-Äthermischungen unlöslich, lösen sich jedoch in Äthylazetat, aus dem sie ebenfalls mit Salzsäure extrahiert werden können (With, 1980).

Bei der Aufarbeitung biologisch vorkommender Porphyrine als Methylester ist es zweckmäßig, das gesamte Gemisch zu verestern und erst danach in die einzelnen Komponenten zu zerlegen. Nach der Auftrennung mit Chloroform kann der Methylesterextrakt dünnschichtchromatographisch differenziert werden. Eine Isomerentrennung ist hier nicht möglich, wobei eine Trennung in die einzelnen Komponenten, die in Bezug auf ihr Molekulargewicht einheitliche Verbindungen darstellen, erzielt wird (Doss, 1969).

Im Gegensatz dazu erlaubt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) sowohl die qualitative Analyse der verschiedenen Porphyrincarbonsäuren als auch die Differenzierung der natürlich vorkommenden Isomeren vom Typ I und III (Jacob, 1992).

#### **1.5.3.1 Fluoreszenznachweis der Porphyrine**

Durch die Absorption von Lichtquanten wird ein Elektron kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen wird die Energie in Form von Wärme und einer Sekundärstrahlung freigesetzt. Die visuell wahrnehmbare Fluoreszenzstrahlung kann mit Hilfe eines Fluorometers gemessen werden.

Die Wood-Lampe wurde 1903 durch den Physiker Robert W. Wood erfunden und wurde 1925 erstmals in der Dermatologie eingesetzt (Bommer, 1926).

Die Wood-Lampe emittiert langwelliges UVA-Licht in einem Spektralbereich von 340-400 nm mit einem Intensitätsmaximum von 365 nm. Das Wood-Licht wird durch einen Quecksilberdampfhochdruckstrahler erzeugt und nach Filterung kurzwelliger UV-Strahlung durch das Wood-Glas, ein Filter aus Bariumsilikatglas, emittiert.

Das Wood-Licht ist ein einfaches Hilfsmittel bei der Diagnose und Differenzialdiagnose zahlreicher Dermatosen. Die Besiedlung der Talgdrüsenfollikel mit *P.acnes* lässt sich durch die orangefarbene Fluoreszenz der Porphyrine nachweisen.

### **1.5.3.2 Chromatographische Analyse der Porphyrine**

Chromatographie ist ein Trennprozess, bei welchem das Probengemisch zwischen zwei Phasen im chromatographischen Bett (Trennsäule) verteilt wird. Eine Hilfsphase (stationäre Phase) ruht, die andere Hilfsphase (mobile Phase) strömt daran im chromatographischen Bett vorbei. Dadurch wird das Probengemisch in einer für seine jeweiligen Komponenten typische Weise aufgetrennt. Die Voraussetzung für Flüssigchromatographie ist, dass sich die Probe in einem Lösungsmittel löst, was für alle organischen und ionischen anorganischen Stoffe zutrifft.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine moderne und schnelle Technik. HPLC steht für High Performance/Pressure Liquid Chromatography bei der die mobile Phase mit bis zu 400 bar und Flussraten von 0,1 bis 5 ml pro Minute durch eine Trennsäule gepumpt wird. Dabei wird das zu trennende Gemisch mit Hilfe eines Lösungsmittels auf die Säule gebracht, die mit der stationären Phase gefüllt ist. Hier findet die Trennung statt. An der stationären Phase werden die zu trennenden Komponenten der Probe bei optimalen Bedingungen unterschiedlich lange aufgehalten und verlassen die Säule nach unterschiedlichen Zeiten. Die einzelnen Komponenten werden vom Detektor registriert, er gibt diese Information an die Auswerteinheit weiter, wo sie von einem Schreiber als Kurven registriert werden. Die Signale nennt man Peaks, ihre Gesamtheit Chromatogramm. Die Peaks liefern qualitative und quantitative Informationen über die untersuchte Mischung. Die Elutionszeit (Zeit, nach welcher das Signal auf dem Schreiber erscheint) ist unter den gewählten Bedingungen für jeden Stoff des Gemisches charakteristisch, und die Fläche jedes Signals ist die Menge des entsprechenden Stoffes proportional (Meyer, 1990).

## **1.6 Zytokine**

Zytokine sind wichtige Mediatoren einer Immunreaktion. Vom Knochenmark bis zu den Orten der Immunantwort bestimmen sie die Differenzierung und Aktivierung der Immunzellen. Als Zytokine werden induzierbare, wasserlösliche,

heterogene Proteinmediatoren mit einem Molekulargewicht von mehr als 5000 D definiert, die in Zielzellen oder den sie produzierenden Zellen spezifische, via Rezeptoren vermittelte Wirkungen ausüben (Murphy, 1996).

Der Wirkungsbereich der Zytokine umfasst einerseits die Regulation der Hämatopoese und die Kontrolle der Vorgänge, die der Entwicklung und Regeneration der Gewebe dienen. Andererseits regulieren die Zytokine den Funktionszustand der reifen Zellen; sie vermitteln Immun- und Entzündungsreaktionen und tragen zur Abwehr von Mikroorganismen und maligner Entartung bei. Die überwiegende Mehrzahl der Zytokine diffundiert nach ihrer Sekretion in die nähere Umgebung und beeinflusst die Funktionen der sie sezernierenden Zelle (autokriner Effekt) oder anderer Zellen (parakriner Effekt). Zytokine können nicht nur von den Zellen des Immunsystems, sondern von einer großen Anzahl von Zellsystemen gebildet werden; dazu gehören auch Fibroblasten und Keratinozyten. Zytokine können in proinflammatorische Zytokine, die vorwiegend von Makrophagen sezerniert werden, und in T-Lymphozyten-Zytokine unterteilt werden. Zu den proinflammatorischen Zytokinen gehören in erster Linie Interleukin (IL)-1 $\alpha$  IL-1 $\beta$ , Tumornekrosefaktor (TNF), Interferone (IFN) und die Chemokine IL-8, GM-CSF (die Kolonienbildung von Granulozyten und Makrophagen stimulierender Faktor) sowie IL-2, -3, -4, -5, -9, -10, -12 und -13.

## **1.7 Ziel der Arbeit**

Während die immunmodulatorische Aktivität von *P. acnes* gegenüber Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) in der Literatur gut charakterisiert wurde, fehlen bisher entsprechende Resultate für Untersuchungen mit Keratinozyten. Dies ist erstaunlich, da diese Zellen den unmittelbarsten Kontakt mit *P. acnes* haben und somit die initiale Richtung der Immunmodulation an nachgeordnete Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten und PMN vermitteln können. In den letzten Jahren konnte ferner gezeigt werden, dass Keratinozyten nach Stimulation mit Mikroorganismen ebenfalls zur Sekretion wichtiger Zytokine fähig sind (Schaller *et al.*, 2002). Da es in den wenigen bisher publizierten Arbeiten zu diesem Thema nicht gelang auf Proteinebene

immunmodulatorische Aktivität bei Keratinozyten durch Stimulation von *P. acnes* nachzuweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf den Nachweis der Genexpression gelegt. Neben der konventionellen RT-PCR, die nur eine semiquantitative Aussage über die Expressionstärke erlaubt, wurde mittels Echtzeit-PCR ein wesentlich empfindlicheres, quantitatives Verfahren etabliert.

Obwohl von *P. acnes* sezernierte Substanzen wie Proteinase als Virulenzfaktoren für die Schädigung von Keratinozyten postuliert wurden gibt es bisher nur wenige morphologische Studien zur Interaktion von Keratinozyten und *P. acnes* (Wolf und Plewig, 1976; Toyoda und Morohashi, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Interaktion von Keratinozyten und *P. acnes* licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Probengewinnung und mikrobiologische Verfahren

#### 2.1.1 Entnahme und Lagerung der Komedonen

Die Haut von Gesicht und Oberkörper von 10 Aknepatienten wurde auf Komedonen untersucht. Nach gründlicher Keimreduktion der Hautoberfläche wurden von jedem Patienten einige Komedonen exprimiert, wobei die geschlossenen Komedonen vorher mit einer sterilen Nadel punktiert wurden, um sie besser extrahieren zu können. Anschließend erfolgte die Messung des Gewichts der Komedonen auf einer BA 110 S-Analysewaage (Sartorius AG, Göttingen, D). Die Exprimatate wurden bis zur Verarbeitung in Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, D) in einem Kühlschrank bei 4°C gelagert, der Lichtschutz wurde durch Aluminiumfolie gewährleistet.

#### 2.1.2 Anzuchtung von *Propionibacterium acnes*

Die Komedonen wurden mit 2 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgeschwemmt und in einem Mörser homogenisiert. Komedonenhomogenisat wurde anschließend mit einer sterilen Öse angetippt und mittels fraktioniertem Ausstrich auf die mit gegossenem Nährmedium gefüllten Petri-Schalen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D) überimpft. Um nahezu anaerobe Kulturbedingungen zu erreichen wurden die Platten für 5 Tage in Gas-Pak 150 Anaerobiertöpfen (BBL, Heidelberg, D) mit zugehörigem Entwicklerkit bei 37°C inkubiert.

Als Kulturmedium für die Anzuchtung von *P. acnes* aus den entnommenen Komedonen wurde der Hirn-Herz-Infusionsagar (Difco Manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Difco Laboratories Detroit, USA, 10. Auflage, 1984, p 163,) mit folgender Zusammensetzung (g/l), verwendet:

Kalbshirninfusion	200,0
Rinderherzinfusion	250,0
Proteose-Pepton	10,0
Glukose	2,0

Natriumchlorid	5,0
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5
Agar	15,0

Der Ausgangs-pH-Wert betrug 7,4.

### 2.1.3 Keimzahlbestimmung

In einer Suspension bewirkt die Bakterienzahl eine Trübung, die von einem photoelektrischen Meßsystem registriert und ausgewertet werden kann. Anhand einer Keimzahlbestimmung wurde ermittelt, wie viele Keime in einer Propionibakterien-Suspension von 0,8 optischer Dichte bei 550 nm Wellenlänge vorhanden sind. Es wurde in Reagenzgläsern eine Verdünnungsreihe hergestellt, ausgehend von Glas 1, in dem sich eine Suspension aus *P. acnes* und 0,9% NaCl-Lösung befand, die im Spektrophotometer (Spectronik-20-Photometer, Bausch & Lomb, Unterhaching, D) auf eine optische Dichte von 0,8 bei 550 nm Wellenlänge eingestellt wurde. Aus diesem Glas brachte man 0,1 ml Propionibakterien-Suspension in Glas 2 ein, in dem sich 0,9 ml NaCl-Lösung befanden. Dieser erste Schritt bedeutete eine Verdünnung von 1:10. Folgend wurden aus Glas 2 wieder 0,1 ml Propionibakterien-Suspension in Glas 3 mit ebenfalls 0,9 ml NaCl-Lösung gegeben. Diese Reihe wurde bis zu einer Verdünnung von  $10^{-9}$  fortgesetzt. Mittels einer Pipette (Eppendorf) tropfte man aus jedem Reagenzglas dieser Versuchsreihe 0,1 ml Propionibakterien-Suspension auf die, mit gegossenem Hirn-Herz-Infusionsagar gefüllten Petrischalen. Nach dem Ausplattieren kamen die Nährböden in Gas-Pak-Töpfe unter anaeroben Verhältnissen bei 37°C in den Brutschrank. Eine Auswertung folgte nach 48 Stunden.

### 2.1.4 Typisierung der Propionibakterien

Zur allgemeinen Differenzierung wurden alle Reinkulturen auf Gram-Färbeverhalten, Koloniemorphologie im mikroskopischen Präparat getestet. Zur Abgrenzung gegenüber aeroben Bakterien wurden alle Reinkulturen für 48 Stunden auf Schafsblutagar unter Raumlufatmosphäre bebrütet. Die

Typisierung erfolgte mit dem API 20 A System (BioMérieux, Lyon, F) anhand von 21 biochemischen Reaktionen.

## **2.2 Porphyrindiagnostik**

### **2.2.1 Porphyrinextraktion**

Für die *In-vivo*-Bestimmung aus Komedonen wurden diese in 2 ml 0,9%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und in einem Mörser homogenisiert. Das Homogenisat wurde in zwei Eppendorf-Röhrchen übertragen, mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und auf die beiden Ansätze gleichmäßig verteilt. Die Komedonen-NaCl-Suspension wurde für 4 Minuten mit 2000 Umdrehungen/Minute in einer 5415 C Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 50 µl Celite® (Fluka, Paesel, D), ein Filterhilfsmittel, daß aus Kieselgur verschiedener Korngrößen besteht, und 250 µl Äthylazetat/Essigsäure (4:1) hinzugegeben. Anschließend wurde die Mischung für 10 Sekunden auf einem Vortex gemischt und dann für 1 Minute mit 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette in ein weiteres Eppendorf-Röhrchen übertragen und 250 µl 1,5 N HCl zugeführt. Die Lösung wurde für 10 Sekunden auf dem Vortexer gemischt. Schließlich wurden etwa 300 µl der unteren Phase, die die Porphyrine enthält, mit einer Pipette in ein weiteres Eppendorf-Röhrchen übertragen und mittels HPLC-Analyse untersucht.

Für die *In-vitro*-Porphyrinanalyse wurde nach den Angaben von Romiti verfahren (Romiti *et al.*, 2000). Die angezüchteten *P. acnes* wurden in Reagenzgläser mit je 4 ml 0,9% NaCl-Lösung inokuliert, bis bei einer Wellenlänge von 550 nm eine Trübung von 0,8 optischer Dichte im Spektrometer (Spectronic-20-Photometer, Bausch & Lomb) erreicht wurde, was einer Keimdichte von  $1,0 \times 10^6$  Keimen/ml entspricht. Die Porphyrinextraktion aus den angezüchteten *P. acnes*-Stämmen richtete sich im weiteren Verlauf nach den Angaben von Piomelli (1973). Nach Übertragung von 1 ml der Suspension in ein Eppendorf-Röhrchen wurde für 60 Sekunden mit 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 50 µl Celite® und 250 µl Äthylazetat/Essigsäure (4:1) wurde für 10

Sekunden auf dem Vortexer gemischt und dann 30 Sekunden mit 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und 250 µl 1,5 N HCl hinzugegeben. Nach nochmaligem Mischen für 10 Sekunden auf dem Vortexmischer wurden 300 µl der unteren Phase in ein neues Röhrchen für die HPLC-Analyse übertragen.

### **2.2.2 Chromatographische Auftrennung der Porphyrine mittel HPLC**

Die chromatographische Analysen der *in vivo* von *P. acnes* produzierten Porphyrine aus Komedonenmaterial und der aus kultivierten *P. acnes in vitro* synthetisierten Porphyrine erfolgten in dem Institut für Klinische Chemie am Klinikum der Universität, München, Großhadern (Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Dietrich Seidel).

Die HPLC-Anlage besteht aus einer Auswerteeinheit, einem Eluentenfördersystem (Pumpe), einem Injektor, einer Säule und einem Detektor (Abb. 3). Für die Analyse wurde das L-6200 Flüssigkeitschromatographmodell (Merck-Hitachi, Darmstadt, D), das mit einem F-1080 Spektrofluorometer-Detektor ausgestattet ist, verwendet. Als Datenprozessor und Systemkontroller diente ein D-2500 Integratormodell.

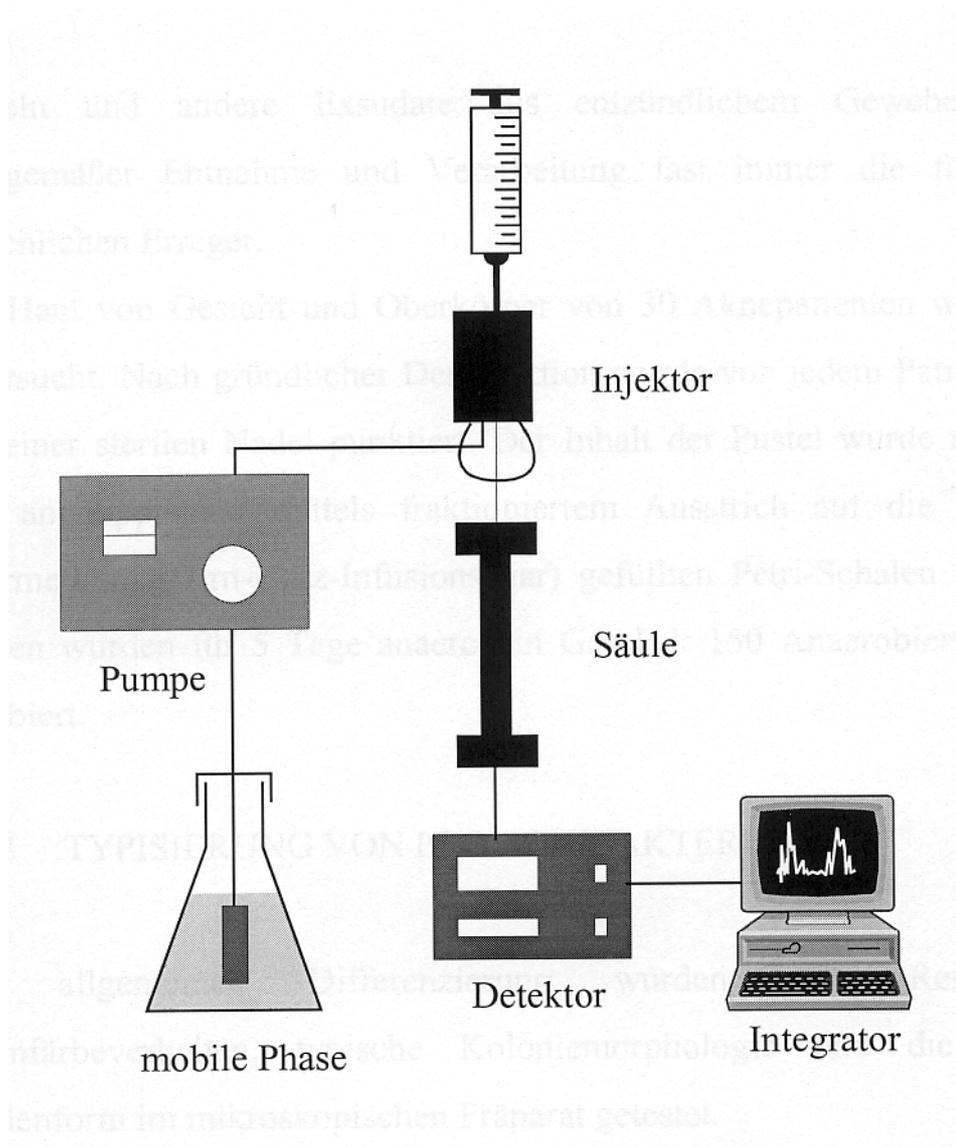


Abbildung 3. Aufbau einer HPLC-Einheit.

### 2.2.2.1 Festphasensäulen-Konditionierung

Die verwendete stationäre Festphasen-Extraktions-Säule-C18e (Separtis GmbH, Grenzach-Wyhlen, D) entspricht einem chemisch modifizierten Kieselgel. In diesem Fall arbeitet man mit einer Reverse-Phasen-Technik. Wenn nicht modifiziertes Kieselgel eingesetzt wird, spricht man von einer Normal-Phasen-Technik. Für die Porphyrintrennung das Ammoniumazetatsystem und das Ionenpaarsystem als zwei unterschiedliche Formen der Reverse-Phasen-HPLC-Technik möglich. Das Ionenpaar-Gradientenelutions-System mit anschließender Fluoreszenzdetektion ist besonders effektiv, weil das zugegebene Reagens Tetrabutylammonium-

phosphat mit den karboxylierten Porphyrinen neutrale Ionenpaare bildet. Die Porphyrinkarbonsäuren werden im organischen Solvens gelöst und die Affinität zu der nicht-polaren Hilfsphase gesteigert.

Die Festphasen-Extraktions-Säule C-18e wurde mit 3x1 ml Azeton/Methanol ( 1/1, v/v ) aktiviert. Danach wurden 3x1 ml 1,3 M Phosphorsäure ( $H_3PO_4$  ) auf die Säule gegeben.

#### **2.2.2.2 Probenvorbereitung**

2 ng Mesoporphyrin (in 20 ml 50 mM methanolische Tetrabutylammoniumphosphat-Lösung ((TBA- $PO_4$ ) Fluka) wurde als interner Standard zu 300  $\mu$ l Piomeli-Porphyrinextrakt gegeben. Nach Zugabe von 0,75 ml 1,3 M  $H_3PO_4$  wurde für 20 Sekunden gevortext.

#### **2.2.2.3 Festphasenextraktion**

Nach Zugabe der Probe auf die Festphasen-Extraktions-Säule wurde mit 5 mal mit 1 ml Wasser gewaschen und dann für 15 Sekunden trocken gesaugt. Danach wurde mit 2 mal 0,8 ml Azeton/Methanol (1/1, v/v) eluiert und das Extrakt am Trockenabdampfgerät unter Stickstoff (  $N_2$  ) abgeblasen. Der Rückstand wurde in 200  $\mu$ l 50 mM 50 mM TBPA (8,27 g Tetrabutylammoniumhydroxid 40%ig in  $H_2O$  + 200 ml Methanol + 600  $\mu$ l Orthophosphorsäure 85%ig + 50 ml  $H_2O$ , pH 7,3) für die HPLC aufgenommen.

#### **2.2.2.4 HPLC-Analyse**

Nach Aufnahme von 50  $\mu$ l Injektionsvolumen erfolgte das Trennverfahren in der HPLC-Anlage und die qualitative und quantitative Analyse der Ergebnisse des Auswertesystems.

### 2.2.2.5 HPLC-Gradienten-Systeme

Für die Analyse der verschiedenen Porphyrine waren zwei HPLC-Gradienten-Systeme erforderlich, da bei der Porphyrinbestimmung aus *P. acnes* neben unipolaren gelegentlich auch polare Porphyrine nachgewiesen worden sind. Der Gradient 1 diente dem Nachweis der unipolaren Porphyrine, Koproporphyrin I, Koproporphyrin III und Protoporphyrin. Zur Analyse der polaren Porphyrinisomere (Uro- bis Pentacarboxyporphyrin) wurde der Gradient 2 verwendet. Während der chromatographischen Auftrennung der Porphyrine wurden mehrere Lösungsmittel kontinuierlich gemischt und eingesetzt.

Für die HPLC-Gradienten 1 und 2 wurden folgende Substanzen und Reagenzien verwendet:

- Porphyrine (Paesel, Frankfurt, D)
- Tetrabutylammoniumhydroxid 40% in H<sub>2</sub>O (Fluka)
- Orthophosphorsäure 85%ig p.a. (Merck)
- Methanol (Merck)
- Aceton (Merck)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> p.a. (Merck)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> p.a. (Merck)
- I<sub>2</sub> p.a. (Merck)
- KI p.a. (Merck)
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> p.a. (Merck)

Als Lösungsmittel für die HPLC-Standards und HPLC-Proben diente 50 mM TBPA (8,27 g Tetrabutylammoniumhydroxid 40%ig in H<sub>2</sub>O + 200 ml Methanol + 600 µl Orthophosphorsäure 85%ig + 50 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,3).

Als Fließmittelsystem für Gradient 1 diente H<sub>2</sub>O 10 mM Phosphat-Puffer (1,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l H<sub>2</sub>O gelöst und 0,174 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst und durch

Mischen auf pH 5,4 eingestellt) und Methanol 5 mM TBPA (3,31 g Tetrabutylammoniumhydroxid 40%ig in H<sub>2</sub>O mit Methanol und 240 µl Orthophosphorsäure 85%ig) auf 1 l aufgefüllt, pH 7,3).

Für die Herstellung des Standardgradienten 1 wurden Uro-I, Kopro-I, Kopro-III, Meso- und Protoporphyrin in 10 ml 50 mM TBPA gelöst. Der so hergestellte externe Standard enthielt je 1 pmol Porphyrin/µl. Davon wurden 10 µl für die HPLC-Analyse injiziert.

Als Fließmittelsystem für Gradient 2 diente H<sub>2</sub>O 40 mM Phosphat-Puffer (10,88 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 2 l H<sub>2</sub>O gelöst und 0,69 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst und durch Mischen auf pH 5,4 eingestellt) und Methanol 12,5 mM TBPA (16,55 g Tetrabutylammoniumhydroxid 40%ig in H<sub>2</sub>O mit Methanol und 1,2 ml Orthophosphorsäure 85%ig) auf 2 l aufgefüllt, pH 7,3).

Für die Herstellung des Standardgradienten 2 wurden Uro-I, Kopro-I, Kopro-III, Uro-, Hepta-, Hexa-, Penta-, Kopro- (alle Isomer I) und Mesoporphyrin in 10 ml 50 mM TBPA gelöst. Der so hergestellte externe Standard enthielt je 1 pmol Porphyrin/µl. Davon wurden 10 µl für die HPLC-Analyse injiziert.

### **2.3 Keratinozytenzellkulturen**

Für die aus einem Organismus isolierten Zellen muss unter *In-vitro*-Bedingungen eine Umgebung geschaffen werden, die Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Ausübung von typischen Zellfunktionen erlaubt. Hierzu sollte einerseits ein einfacher und effektiver Versuchsaufbau gefunden werden, andererseits sollte das Zellkulturmedium den individuellen Wachstumsansprüchen der Keratinozyten gerecht werden. Für die Versuche wurden Monolayer-Zellkulturen aus menschlichen bukkalen Keratinozyten einer Tumorzelllinie (TR146) eines spinözellulären Karzinoms verwendet (Rupniak *et al.*, 1985). Je nach Dichte der Primärausaat der Keratinozyten entwickelte sich nach einer Woche ein subkonfluenten Zellmonolayer. Für die anstehende Versuche wurden die Zellen der zweiten Subkultur verwendet.

### **2.3.1 Medien und Lösungen**

Nachfolgend sind für die Keratinozytenkultivierung notwendigen Lösungen und Flüssigmedien dargestellt. Zu 500 ml RPMI 1640 Lösung (Gibco Life Technologies Inc., Grand Island, USA) wurden 50 ml FKS hitzeinaktiviert (Gibco), 5ml Nystatin (Gibco), 5 ml L-Glutamin (Gibco) und 0,5 ml Gentamycin Reagent Solution (ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, USA) hinzugefügt.

### **2.3.2 Primärkultur**

Sämtlich Arbeitsschritte wurden unter dem HA 2448 GS Lamin-Air-Flow (Heraeus) bei ausreichender chirurgischer Hände- und Instrumentendesinfektion durchgeführt. Die Medien und Lösungen wurden vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Dem RPMI 1640 Medium wurden wie oben beschrieben vor Gebrauch Gentamycin, Nystatin, Fetales Kälberserum und L-Glutamin zugefügt. Das Kälberserum begünstigt die Anheftung der Zellen am Boden der Gewebekulturflaschen.

Die Zellzahl der Keratinozyten wurde in der Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss, Oberkochen, D) bestimmt. Anschließend erfolgte das Aussäen der Keratinozyten in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  in die zuvor mit 25 ml Medium gefüllten 250 ml Zellkulturflaschen (Greiner Labortechnik).

Die Inkubation in einem Brutschrank (Heraeus) erfolgte bei 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung, 100%iger Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37°. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet werden, um Wachstum und Zelldichte zu beobachten. Nach einer Woche zeigt sich in der Regel ein Konfluieren zu einem Monolayer.

### **2.3.3 Subkultivierung**

Bei zu hoher Zelldichte sank die Proliferationsrate stark ab, was zum Absterben der Kultur führen kann (Lindl, 1989). Etwa eine Woche nach Aussaat der Keratinozyten zeigte der Zellrasen am Boden der Kulturflaschen „Subkonfluenz“, womit der günstige Zeitpunkt für die Subkultivierung der

Primärkultur erreicht war. Dies geschah durch das Passagieren der Zellen. Dadurch wurden die Zellen unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues Gefäß überführt. Das geschah nach Absaugen des Mediums und Spülung des Zellmonolayers mit phosphatgepufferter Salzlösung, PBS (Gibco) und durch die Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, D). Nach 2-3 Minuten hob sich die Mehrzahl der Zellen von der Unterlage ab und schwamm makroskopisch deutlich sichtbar in der Trypsinierungslösung. Durch die Zugabe von 5 ml fetalem Kälberserum wurde dieser Vorgang beendet und die abgelösten Zellen wurden bei 1000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach anschließender Resuspendierung im Medium und Bestimmung der Zellzahl wurden die Keratinozyten auf drei bis vier neue Gewebekulturflaschen verteilt.

Für die Versuche wurden grundsätzlich Zellen der zweiten Generation verwendet.

## **2.4 Versuchsaufbau**

Vor Beginn der Interaktionsversuche von *P. acnes* mit Keratinozyten wurden die Keratinozytenkulturen nochmals unter dem Lichtmikroskop auf deren intakten Zustand untersucht. Nach Absaugen des Mediums und Spülung des Zellmonolayers mit PBS wurde 5 ml neues Medium ohne Zusatz von Antibiotika und Antimykotika zugegeben, um die Aktivität der Propionibakterien nicht zu beeinflussen. Danach wurden die Zellkulturschalen für eine Stunde in Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100%iger Luftfeuchtigkeit gestellt.

Propionibakterien die aus Komedonenmaterial der Patienten angezüchtet worden waren, wurden in NaCl-Lösung resuspendiert und eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, bis die Bakterienkonzentration bei 10<sup>6</sup>/ml NaCl-Lösung lag. Für die Hitzeinaktivierung wurde 1 ml der Bakteriensuspension eine Stunde bei 99°C inkubiert. Für die Stimulation der Keratinozyten mit Koproporphyrin III Tetramethyl Ester (C<sub>40</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>) (Sigma) wurden Konzentrationen von 10 µM, 20 µM und 40µM durch Resuspendieren in PBS und Herstellung einer Verdünnungsreihe hergestellt. Für die Interaktionsversuche wurden die 10<sup>6</sup> Keratinozyten in 1 ml Zellkulturmedium in

beschichtete Petri-Schalen mit einem Durchmesser von 5 cm (Greiner) ausgesät. Nachdem subkonfluente Bedingungen erreicht waren wurde 1 ml der Zellkulturlösung abpipettiert und entweder aktive oder hitzeinaktivierten Bakteriensuspensionen ( $10^6$ /ml) hinzugegeben. Die Porphyrininkubation erfolgte ebenfalls in Petri-Schalen bei einer Endkonzentration von 10, 20 und 40  $\mu$ M Koproporphyrin III. Die Inkubationsdauer war 3 und 6 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100%iger Luftfeuchtigkeit. Zusätzlich umfaßte jeder Versuch entsprechende Kontrollwerte. Nach der jeweiligen Infektionszeit wurde das Medium abpipettiert und die Zellen wurden für die weiteren Untersuchungen (RT-PCR, Licht-, Elektronenmikroskopie) vorbereitet.

## **2.5 Licht- und Elektronenmikroskopie**

### **2.5.1 Fixierung und Einbettung**

Zur Charakterisierung der Interaktion von *P. acnes* mit Keratinozyten wurden licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Für die Fixierung und Einbettung wurden die mit *P. acnes* stimulierten Keratinozyten abtrypsiniert und nach Überführung in 2 ml Eppendorf-Gefäß durch Zentrifugation Pellets gewonnen. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes erfolgte die Vorfixierung in 2,5% Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg, D) in 0,05 M Phosphatpufferlösung (Merck) für 2 Stunden bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 7,3. Anschließend wurde jede Probe dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) für jeweils 15 Minuten gespült. Die Nachfixierung erfolgte gemäß der Methode nach Dalton für eine Stunde bei Zimmertemperatur (Dalton, 1955). Die Fixierungslösung enthielt 1% Osmiumtetroxid (Serva), 0,85% NaCl (Fluka) und 1%igen wäßrigen Chromatpuffer. Zur Herstellung des Chromatpuffers wurden 80 ml einer 5%igen wäßrigen Kaliumdichromat - Lösung (Merck) mittels einer 2,5 M KOH-Lösung (Merck) auf pH 7,2 eingestellt und anschließend mit Aqua destillata ad 100 ml aufgefüllt. Daraufhin wurden die Proben erneut dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) für jeweils 15 Minuten gespült. Die Entwässerung der Proben erfolgte im Anschluß mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 35-, 50-, 70-, und 90%igem sowie absoluten Ethanol (Apotheke

der Innenstadtkliniken, Klinikum der Universität München). Schließlich erfolgte Glyzideinbettung nach Luft (1961). Dafür mußte zunächst eine flüssige Kunstharz - Lösung hergestellt werden, die sich aus mehreren Bestandteilen zusammensetzte. Komponente A enthielt 62 ml Glyzidäther (Serva) und 100 ml Dodecanylbernsteinsäureanhydrid (Serva). Komponente B setzte sich aus einer Mischung von 100 ml Glyzidäther (Serva) und 89 ml Methylnadicanhydrid (Serva) zusammen. Nach intensiver Mischung von A und B im Verhältnis 2:3 wurde anschließend Polymerisationsbeschleuniger p-Dimethylaminomethylphenol (Serva) in 5%iger Konzentration zugesetzt. Die Proben mußten zuerst für etwa 1 Stunde in diese flüssige Kunstharz - Lösung, die zuvor 1:1 mit absolutem Ethanol (Apotheke der Innenstadtkliniken) verdünnt wurde, eingebracht werden. Daraufhin folgten für 2 Stunden ein Kunstharz-Alkoholgemisch im Verhältnis 2:1 und anschließend die reine Kunstharz-Lösung, die nach 2 weiteren Stunden erneuert werden mußte. Danach wurden die Proben über die Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag wurden die Hautstreifen unter der Lupe in 4-5 Streifen geschnitten und in mit flüssiger Kunstharz - Lösung gefüllte Einbettungsformen eingelegt. Zur Aushärtung des Harzes wurden die Formen für 7 Tage bei 60°C im Trockenschrank (WTB Binder, Tuttlingen) aufbewahrt. Anschließend wurden die einzelnen Kunstharzblöcke mit einem Ultratrimm-Gerät auf die optimale Größe getrimmt (Reichert, Wien, A).

### **2.5.2 Semi-, Ultradünnschnitt und mikroskopische Analyse**

Für die lichtmikroskopische Untersuchungen wurden zuerst mit Hilfe eines Ultracut-Ultramikrotoms (Reichert) und selbst hergestellten Glasmessern Semidünnschnitte (Dicke 1 µm) hergestellt. Die anschließende Färbung der Schnitte erfolgte mit einer Lösung aus 1% Pyronin G (Merk), 1% Toluidinblau (Merk), mit Natriumbikarbonat gepuffert. Beide Bestandteile wurden im Verhältniss 1:5 gemischt und filtriert. Mit dieser Farbmischung konnten die Schnitte für 5 Minuten bei 60° C auf einer Heizplatte (Medax, München, D) angefärbt werden. Danach wurden die histologischen Veränderungen mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss) bei 400facher Vergrößerung ausgewertet.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden zunächst von den getrimmten Kunstharzblöcken Ultradünnschnitte (Dicke 60-80 nm) mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Reichert) angefertigt. Anschließend erfolgte Kontrastierung der Schnitte bei 30°C mit 0,5%igem Uranylacetat (Leica, Bensheim, D) für 20 Minuten sowie 2,7%igem Bleizitrat (Leica) für 10 Minuten in einem Ultrastainer (Reichert). Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte mit einem EM 902-Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss) bei 80 kV und einer Vergrößerungsstufe zwischen x 2.400 und x 84.600.

## **2.6 RT-PCR**

### **2.6.1 Gesamt-RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion besteht aus den fünf Schritten Homogenisation, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen der RNA und Lösen der RNA. Zum Homogenisieren wurden die bei -80°C schockgefrorenen Proben mit 1 ml peqGOLD RNAPure (PeqLab, Erlangen, D) versetzt. Diese Lösung enthält Phenol und Guanidinisothiozyanat in einphasiger Lösung. Daraufhin wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Anschließend wurden 200 µl Chloroform dazugegeben und die Proben 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt, danach wurden sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine fünfminütige Zentrifugation bei 12000 x g in einer Biofuge fresco Kühlzentrifuge (Heraeus) bei 20°C führte zur Trennung der Probe in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wäßrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA reichert sich ausschließlich in der wäßrigen Phase an, während DNA und Proteine sich in der Interphase und der Phenol-Chloroform-Phase befinden. Die wäßrige Phase mit RNA wurde daraufhin in ein neues Gefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol (Sigma) und 10 µl Glykogen (Sigma) versetzt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 10 Minuten bei 12000 x g in der Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Dies führte zur Ausfällung der gelartigen RNA am unteren Ende des Röhrchens. Der Isopropanol - Überstand wurde verworfen und die RNA zweimal mit 1ml

75%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde anschließend leicht getrocknet und danach in 1 µl RNase Inhibitor (Gibco) und 8 µl Diethylpyrocarbonat (Sigma)-Wasser gelöst. DEPC und RNase-Inhibitor verhindern die Kontamination mit RNasen, das sind Enzyme, die RNA zersetzen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

### **2.6.2 RNA-Gel-Elektrophorese**

Mit Hilfe eines RNA-Gels wurde überprüft, ob nicht degradierte Gesamt-RNA isoliert wurde. Dazu wurden 2 µl RNA Lösung mit 5 µl RNA-Loading-Buffer (Sigma), der Ethidiumbromid enthält, versetzt. Die Mischung wurde 10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gelegt. Zugleich stellte man ein RNA-Gel aus 1,5 g Agarose (Sigma), 73 ml DEPC-Wasser, 10 ml 10fach konzentrierter MOPS-Lösung (41,8 g Morpholinpropansulfat (Sigma), 16,7 ml 3 M Natriumacetatlösung (Sigma), 20 ml 0,5 M EDTA pH 8 (Sigma) ad 1 l DEPC-Wasser) und 16,2 ml 37%igem Formaldehyd (Merck) her. Die gesamte Mischung konnte nun direkt in die Taschen des erstarrten Gels pipettiert werden. Das beladene Gel mußte 1 Stunde in einer Gelkammer (Biorad, München, D), die mit einfach konzentrierter MOPS-Lösung gefüllt war, bei 100 V entwickelt werden. Anschließend erfolgte die Auswertung der Banden mit einer UV-Lampe (Biometra, Göttingen, D) bei 311 nm.

### **2.6.3 Photometrische Messung**

Der RNA-Gehalt wurde mit einem Photometer (Bio Photometer, Eppendorf) gemessen. Dazu wurde 1 µl RNA-Lösung in eine Quarzküvette gegeben und die Probe bei 260 und 280 nm vermessen. Zuvor wurde ein Nullabgleich gegen DEPC-Wasser mit RNase-Inhibitor durchgeführt. Somit konnten die Proben um ihren entsprechenden Faktor verdünnt werden, da für die DNase-Verdau und anschließender RT-Reaktion jeweils nur 1 µg RNA eingesetzt werden sollten. Durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm/280 nm kann man untersuchen, ob die RNA mit Proteinen, Guanidinisothiocyanat oder Phenol kontaminiert ist, die die RT-Reaktion stören würden. Für eine optimale RNA-

Isolierung sollte das Verhältnis zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Ansonsten müsste noch ein weiterer Waschvorgang mit Ethanol durchgeführt werden.

#### **2.6.4 DNase-Verdau und reverse Transkriptase**

2 µg Gesamt-RNA wurden mit 1 µl DNase I (Gibco), 6 µl DEPC Wasser und 1 µl DNase-Puffer (Gibco) versetzt, um die eventuell noch vorhandene DNA zu zersetzen. Die Mischung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 µl 25 mM EDTA-Lösung versetzt, um die überschüssigen Metallionen zu binden. Durch Erwärmen des Gemischs auf 65°C wurde die DNase I inaktiviert. Anschließend wurde die Mischung gekühlt. Für die eigentliche RT-Reaktion wurden die Proben zunächst mit 1 µl 10 mM dNTP Mix (Gibco) und 1 µl Oligo-(dT)-Primer (Gibco) versetzt. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 65°C für 5 Minuten. Nach kurzer Abkühlung wurde den Proben 2 µl 10fach konzentrierter RT-Puffer (Gibco, 200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub> Lösung (Gibco), 2 µl 0,1 M DTT (Gibco) und 1 µl Reverse-Transkriptase (SuperScript II RT, Gibco) zugesetzt. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte bei 42°C für 50 Minuten. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten beendet. Die verbleibende RNA wurde durch Zugabe von 1 µl RNase H (Gibco) bei 37°C innerhalb von 20 Minuten abgebaut. Das entstandene cDNA-Gemisch konnte direkt für die PCR verwendet werden. Als Beweis für eine erfolgreiche RT-Reaktion wurde bei der RT-Reaktion immer auch Kontroll-RNA (Gibco) in cDNA umgewandelt. Um die Anwesenheit von genomischen DNA-Verunreinigungen auszuschließen, erfolgte die cDNA-Synthese ohne Zusatz der Reversen Transkriptase.

#### **2.6.5 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Methodik der PCR, die 1985 von Kary Mullis entwickelt worden war, und die aufgrund ihrer hohen Sensitivität bereits aus einer sehr kleinen Anzahl von Zellen einen positiven Nachweis von DNA ermöglicht, verläuft in drei charakteristischen Schritten. Zuerst wird die Ziel-DNA (template) durch Erhitzen (94-100°C) denaturiert und damit in Einzelstränge getrennt. Im nächsten Schritt hybridisieren die zugefügten einzelsträngigen Primer beim Abkühlen auf die

sogenannte annealing-Temperatur (45-65°C) mit den komplementären Enden des zu vervielfältigenden templates und bestimmen somit die Spezifität der PCR. Zuletzt verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase unter den vorgegebenen Reaktionsbedingungen (72°C) und in Gegenwart von Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTP's) die Primer entlang des templates. Diese drei Schritte bilden zusammen einen PCR-Zyklus, der ungefähr 30-60 mal wiederholt wird. In jedem Zyklus findet eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenzen statt, welche durch die 5'-Enden der Oligonukleotid-Primer definiert ist. Am Ende der PCR entstehen maximal  $2^n$  doppelsträngige DNA-Moleküle, die Kopien der ursprünglichen Zielregion zwischen den Primern darstellen.

### 2.6.7 Qualitative PCR-Analyse und verwendete Primer

Für die PCR wurde ein 50 µl Ansatz, bestehend aus 5 µl 5fach konzentriertem Puffer A (Gibco), 5 µl 5fach konzentriertem Puffer B (Gibco), 1 µl dNTP-Mix (Gibco), jeweils 2,5 µl des 5 µM Primerpaares, 1 µl cDNA, 32 µl DEPC-Wasser und 1 µl Elongase (Gibco), hergestellt. Elongase besteht aus einem Gemisch aus *Taq*- und *Pyrococcus*-Spezies-DNA-Polymerasen. Die Proben wurden für die PCR in einen iCycler-Thermocycler (Biorad) gestellt. Für alle Primer wurde das gleiche PCR-Protokoll mit 35 oder 40 Zyklen angewandt.

- Denaturierung: 1 Minute bei 95°C
- Hybridisierung: 1 Minute bei 65°C
- DNA-Synthese: 1 Minute bei 72°C

Um falsch positive Ergebnisse durch Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden die Primer so gewählt, das sie ein Intron umfassen. Dieser definierte Abschnitt des Genoms wird bei der Übersetzung aus cDNA in mRNA nicht mitübersetzt, was zu einer entsprechenden Größe des Amplifikationsproduktes führt. Bei Amplifikation aus genomischer DNA ist durch die Mitamplifikation des Introns die Bande zu groß für die PCR-Amplifikation. Um mit einer weiteren Methode eine Verunreinigung mit genomischer DNA in

den Testansätzen auszuschließen, erfolgten Parallelansätze ohne Zugabe der Reversen Transkriptase.

TNF 236 bp	Fwd 5'- GAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTG -3' Rev 5'- CAGATAGATGGGCTCATACCAGGG -3'
IL-1 $\beta$ 431 bp	Fwd 5'- CGATCACTGAACTGCACGCTCCG -3' Rev 5'- GGTGAAGTCAGTTATATCCTGGCCG -3'
IL-8 364 bp	Fwd 5'- GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAG -3' Rev 5'- GCATCTGGCAACCCTACAACAG -3'
Aldolase 571 bp	Fwd 5'- AGCTGTCTGACATCGCTCACCG -3' Rev 5'- CACATACTGGCAGCGCTTCAAG -3'
GAPDH 637 bp	Fwd 5'- GCACCACCAACTGCTTAGCACC -3' Rev 5'- GTCTGAGTGTGGCAGGGACTC -3'

Tabelle 1. Primersequenzen und erwartete Basenpaar-Länge (bp) der Amplifikationsprodukte für die konventionelle RT-PCR-Analyse

### 2.6.8 cDNA-Ethidiumbromid-Gel-Elektrophorese

Im Anschluß an die PCR mußten alle PCR-Produkte mit 10  $\mu$ l eines Gel Ladepuffers (LBIII-Farbstoff, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) versehen werden. Danach wurden jeweils 15  $\mu$ l der Proben und 7  $\mu$ l des DNA-Markers XIII (PeqLab) mit Fragmenten von 1353, 1078, 872, 602 und 310 Basenpaar-Größe in die Taschen eines 1%igen Agarose Gels (Invitrogen) pipettiert, das unter Verwendung von TAE (TRIS-Acetat-EDTA)-Lösung (Sigma) hergestellt worden war. Das beladene Gel wurde zunächst 1 Stunde lang bei 100 V in einer mit TAE-Lösung gefüllten Gelkammer (BioRad) entwickelt. Anschließend wurde das Gel für 30 Minuten in ein EtBr-TBE-(Tris-borat-EDTA)-Pufferbad, pH 8,1 (20 $\mu$ l 1%ige Ethidiumbromidlösung (Sigma), 180 g Trishydroxymethylaminomethan (Sigma), 55 g Borsäure (Fluka), 7,4 g EDTA (Sigma), 829,6 ml Aqua destillata) eingebracht. Die Auswertung der Banden erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe (Biometra) bei 311 nm.

### 2.6.9 Quantitative PCR-Analyse und verwendetet Primer

Die Echtzeit-PCR mit der LightCycler-Technologie (Roche, Karlsruhe, D) ist eine der exaktesten Methoden zur quantitativen Erfassung der Genexpression in einem einzigen Reaktionsansatz. Bei diesem Verfahren wird die Amplifikation (mit der in der PCR üblicherweise verwendeten hitzestabilen DNA-Polymerase) mit der quantitativen Detektion unmittelbar kombiniert. Dies geschieht mit einem Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) der sich in die minor groove (kleine Furche) von doppelsträngiger DNA einlagert. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt. Man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Im LightCycler wird diese emittierte Fluoreszenz nach jedem Zyklus (Verdoppelung der Menge an doppelsträngiger DNA) gemessen. Nach einer bestimmten Zahl von Zyklen (abhängig von der Zahl der Ausgangskopien) wird die Fluoreszenz schließlich meßbar. Der LightCycler besteht aus einer zylindrischen Kammer, die mit Luft geheizt wird. Als Reaktionsgefäße werden dünne Glaskapillaren mit einem Volumen von 20µl verwendet. Die Detektionseinheit besteht aus einer blauen LED (470 nm), Photozellen, die in den Kanälen F 1, F2 und F3 messen (F1 = grün = 515 nm; F2 = rot = 640 nm; F3 = tiefrot = 705 nm) und ist auf dem Boden der Reaktionskammer gebracht. Die Proben werden nacheinander über die Detektionseinheit gefahren und gemessen. Im LightCycler werden die Fluorophore mit einer Blau-Licht emittierenden Diode (470 nm) beleuchtet. Gelb-grüne Fluorophore wie SybrGreen werden dadurch spezifisch angeregt und die resultierende Emissionsfluoreszenz wird dann gemessen. DNase Verdau und Reverse Transkriptase erfolgten zuvor wie oben beschrieben. Zu den Primerpaaren wurden jeweils 0,8 µl MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 3 mM), 2,6 µl H<sub>2</sub>O, 1µl cDNA und 1µl SybrGreen pipetiert. Die Primerpaare lagen in 0,5 µM Konzentrationen zu je 1 µl vor. Für alle Primer wurde das gleiche PCR-Protokoll mit 45 Zyklen angewandt. Das Primer-Design erfolgte mit der Primer 3 Software ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)). Wesentlich für die Exaktheit und Effizienz der PCR-Analyse ist die Optimierung der Primer. Jedes Primerpaar wurde deshalb mit 4 unterschiedlichen Verdünnungsstufen genspezifischer DNA getestet. Diese externen Standardkurven sind bei

bekannter Konzentration des eingesetzten templates wesentlich, um die exakte Kopienzahl der Proben zu bestimmen. Da sich SybrGreen auch an unspezifischen Amplifikationsprodukte anlagert, wurden Schmelzkurven erstellt und die Schmelzpunkte bestimmt. Der Schmelzpunkt ist die Temperatur bei der die Hälfte der komplementären Sequenzen hybridisiert vorliegen. Er kann vorher theoretisch für jedes Primerpaar errechnet werden und soll mit der bestimmten Schmelzpunkttemperatur bei korrektem Amplifikationsprodukt übereinstimmen. Unspezifische Amplifikationsprodukte oder Primerdimere können aufgrund abweichender Schmelzpunkte identifiziert werden.

Zur genauen Berechnung der Template-Konzentration eines Ziel - Gens muß außerdem die Amplifikationseffizienz der Reaktion bekannt sein. Letztere wurde auch durch die Titrationsreihe berechnet. Theoretisch liegt die optimale Effizienz einer PCR Reaktion bei zwei – dies entspräche einer vollständigen Replikation des Templates pro Zyklus. Die Amplifikationseffizienz E läßt sich mit der Formel  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  bestimmen. In allen Amplifikationen war die Effizienz über 1,80.

Da Unterschiede in der Isolierung der RNA und der Transkription in cDNA die kompetitive RT-PCR stark beeinflussen, müssen alle Proben auf den gleichen mRNA/cDNA Gehalt eingestellt werden. Dies wurde durch die Verwendung von Housekeeping-Gene (Aldolase, GAPDH) erreicht.

GM-CSF 369 bp	Fwd 5'- GTG GCC TGC AGC ATC TCT GCA C -3' Rev 3'- CCT GGA CTG GCT CCC AGC AGT C -3'
IL-1 $\alpha$ 631 bp	Fwd 5'- CAC TCC ATG AAG GCT GCA TGG -3' Rev 3'- ACC CAG TAG TCT TGC TTT GTG G -3'
TNF 287 bp	Fwd 5'- GGG ACC TCT CTC TAA TCA GCC CTC TGG -3' Rev 5'- GAC GGC GAT GCG GCT GAT -3'
IL-1 $\beta$ 431bp	Fwd 5'- CGA TCA CTG AAC TGC ACG CTC CG -3' Rev 5'- GGT GAA GTC AGT TAT ATC CTG GCC G -3'
IL-8 365 bp	Fwd 5'- GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA G -3' Rev 5'- GCA TCT GGC AAC CCT ACA ACA G -3'
Aldolase 571 bp	Fwd 5'- AGCTGTCTGACATCGCTCACCG -3' Rev 5'- CACATACTGGCAGCGCTTCAAG -3'
GAPDH 637 bp	Fwd 5'- GCACCACCAACTGCTTAGCACC -3' Rev 5'- GTCTGAGTGTGGCAGGGACTC -3'

Tabelle 2. Primersequenzen und Länge der Amplifikationsprodukte der Echtzeit-RT-PCR-Analyse

Im Anschluß sind auf jeder Seite oben die Fluoreszenzkurven für die in Tabelle 2 aufgeführten Primerpaare bei Verwendung einer Titrationsreihe (1:10, 1:100; 1:1000, 1:10000) humaner cDNA als template sowie H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle aufgeführt. Über die errechneten Konzentrationen (calculated concentrations) und crossing points der Kurven wird im unteren Teil der obigen Tabelle eine Standardkurve erstellt aus der die Amplifikationseffizienz errechnet werden kann. Die Amplifikationseffizienz E läßt sich mit der Formel  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  bestimmen. Der Slope bezeichnet die Steigung der Gerade. Intercept die Zyklusanzahl, bei der die Gerade die y-Achse schneidet. Error den Standardfehler der unter 0,1 liegen sollte. Die Amplifikationseffizienz war für alle verwendeten Primer > 1,80.

Die untere Tabelle zeigt die Schmelzkurvenanalyse mit Angabe der Schmelztemperatur der Produkte. Die Schmelztemperaturen (peaks) der spezifischen Produkte müssen übereinstimmen und deutlich von dem peak der Wasserkontrolle (rot) unterscheidbar sein.

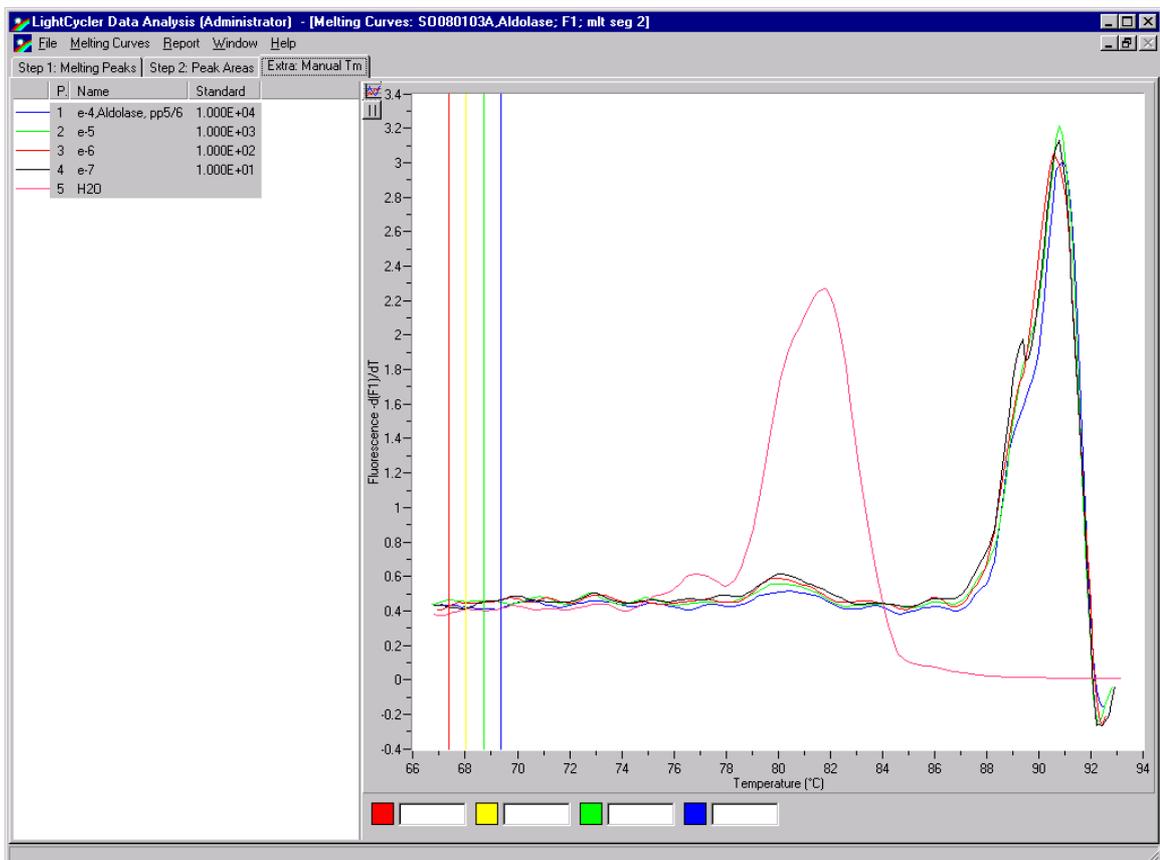
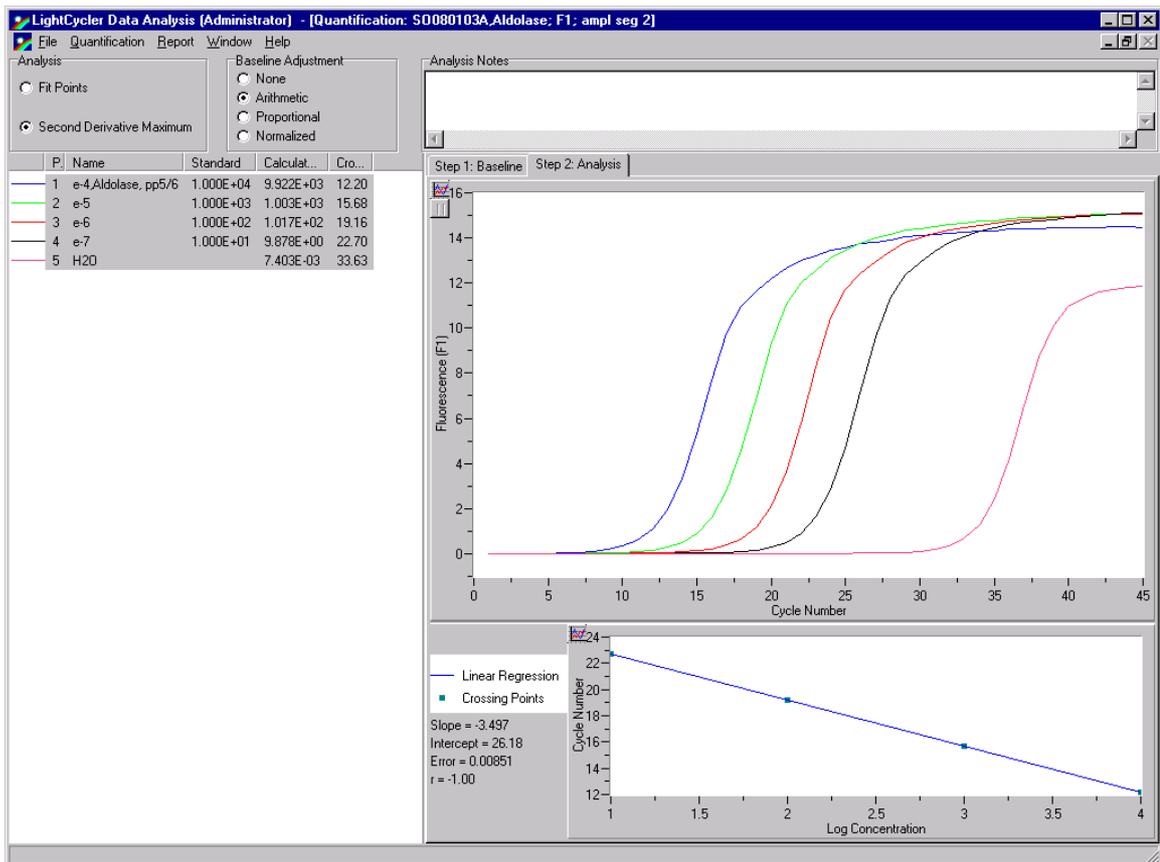


Tabelle 3. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von Aldolase-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

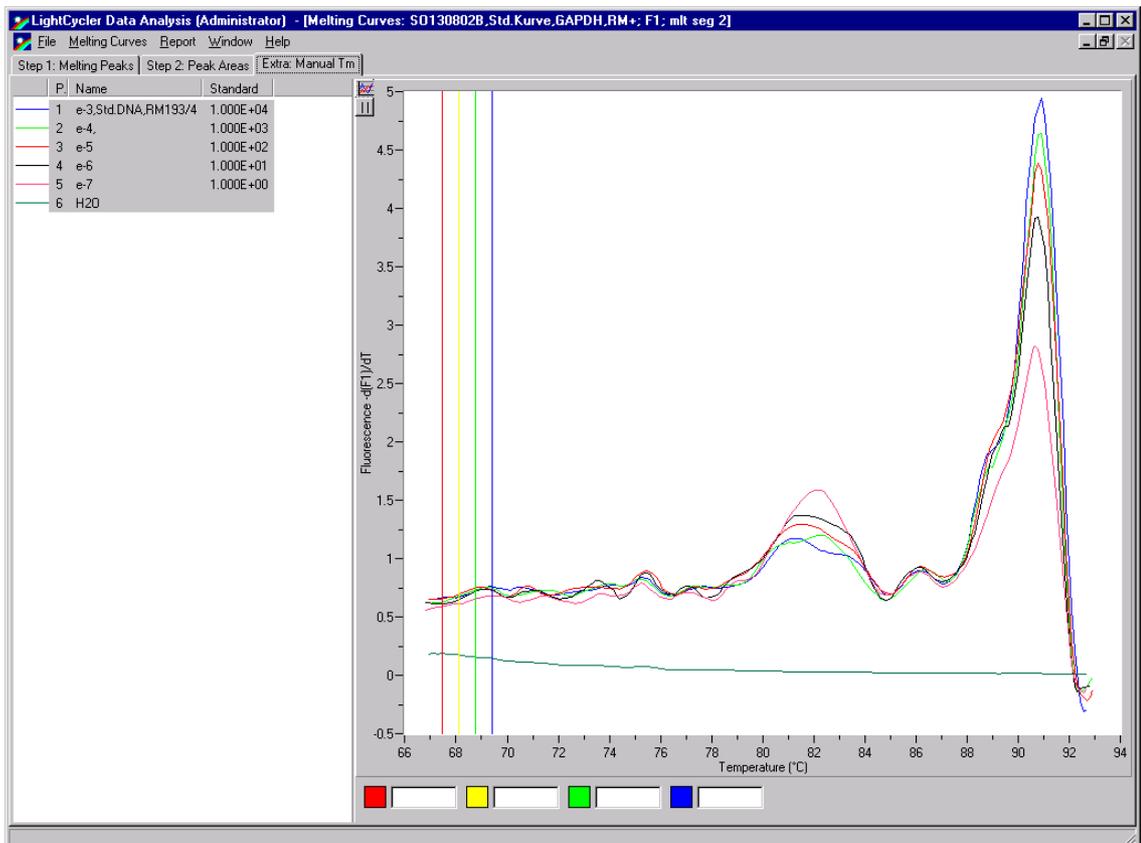
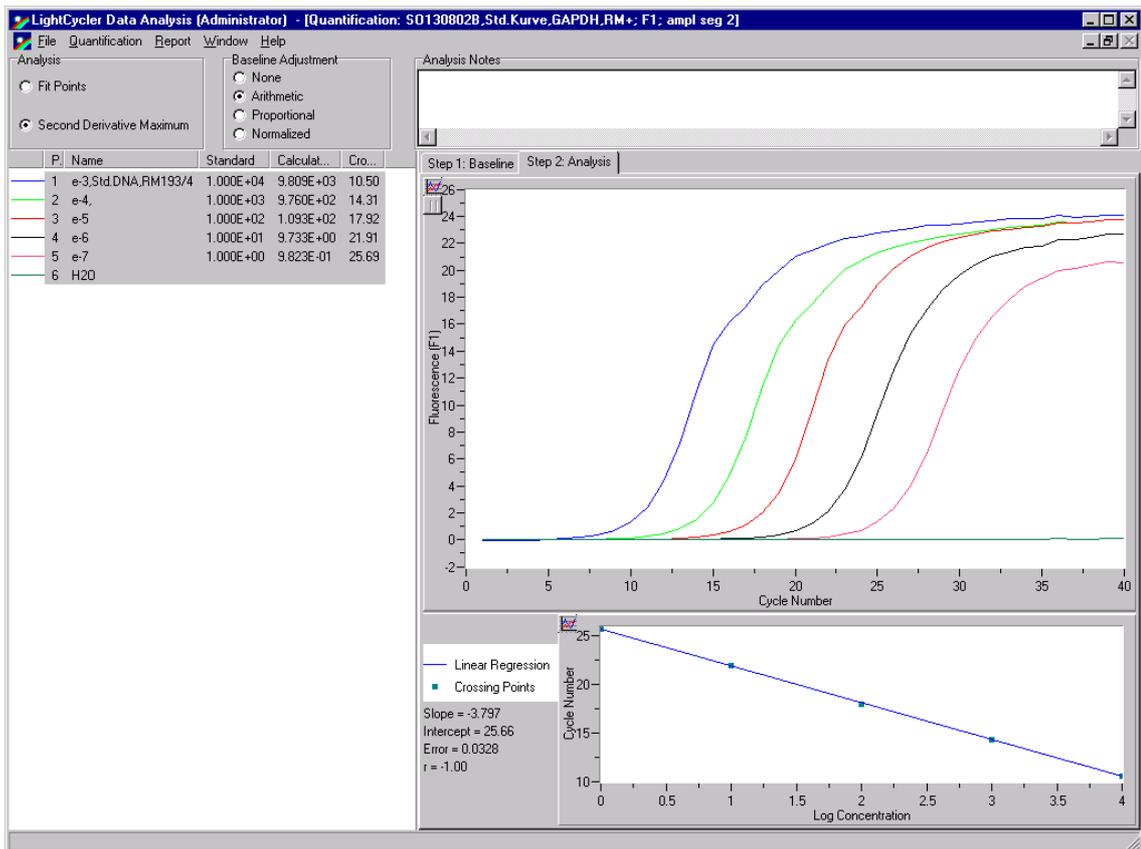


Tabelle 4. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von GAPDH-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

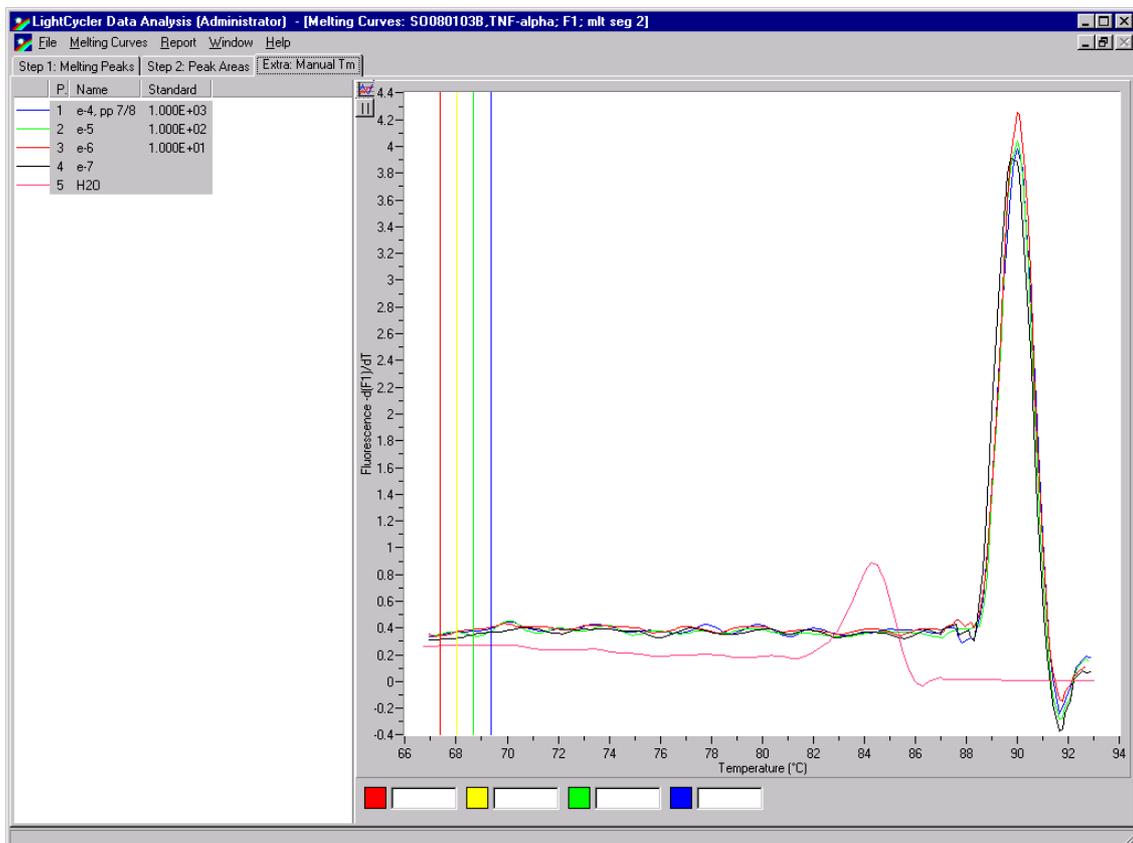
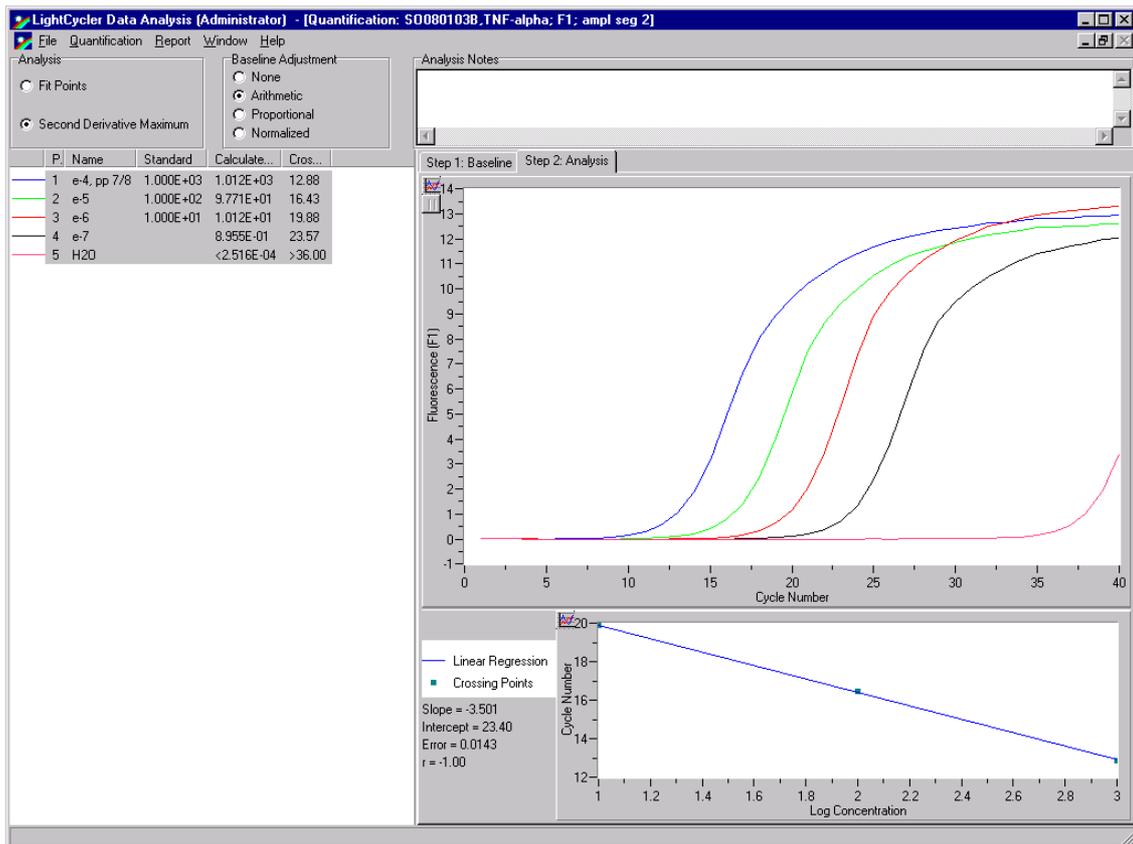


Tabelle 5. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von TNF-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

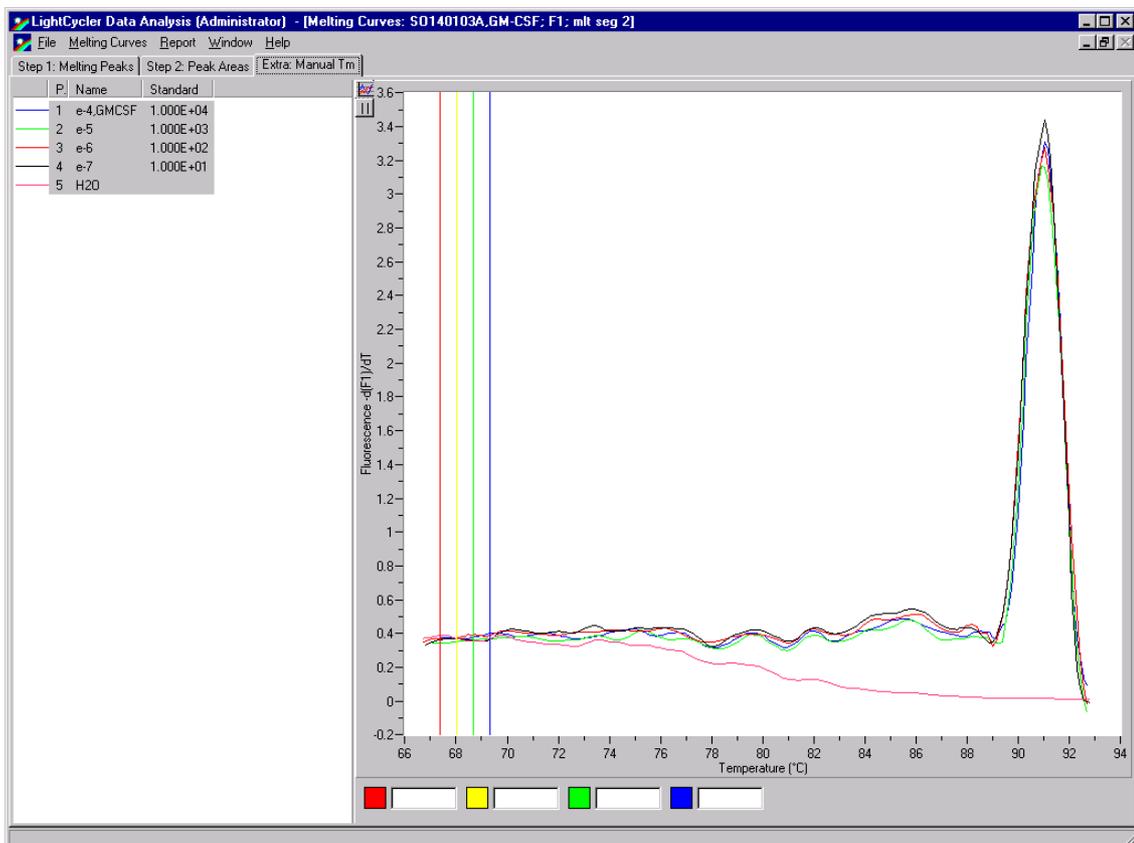
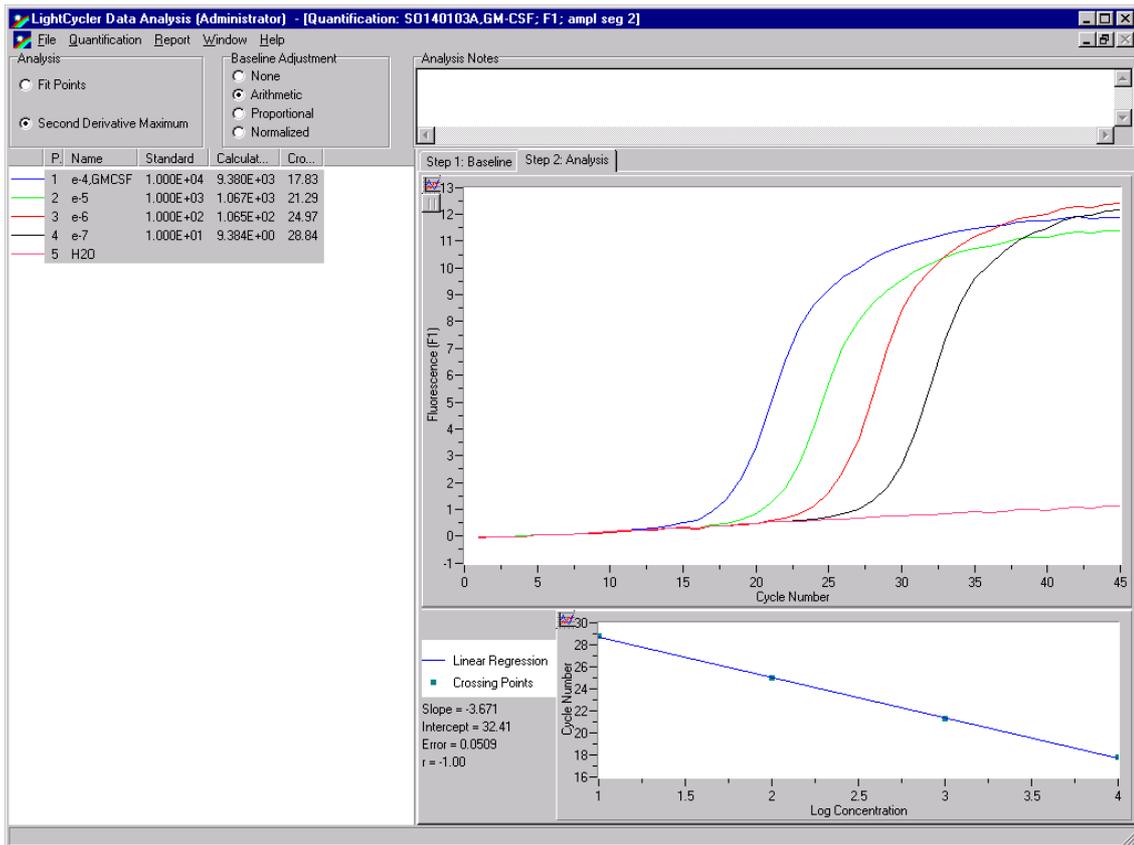


Tabelle 6. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von GM-CSF-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

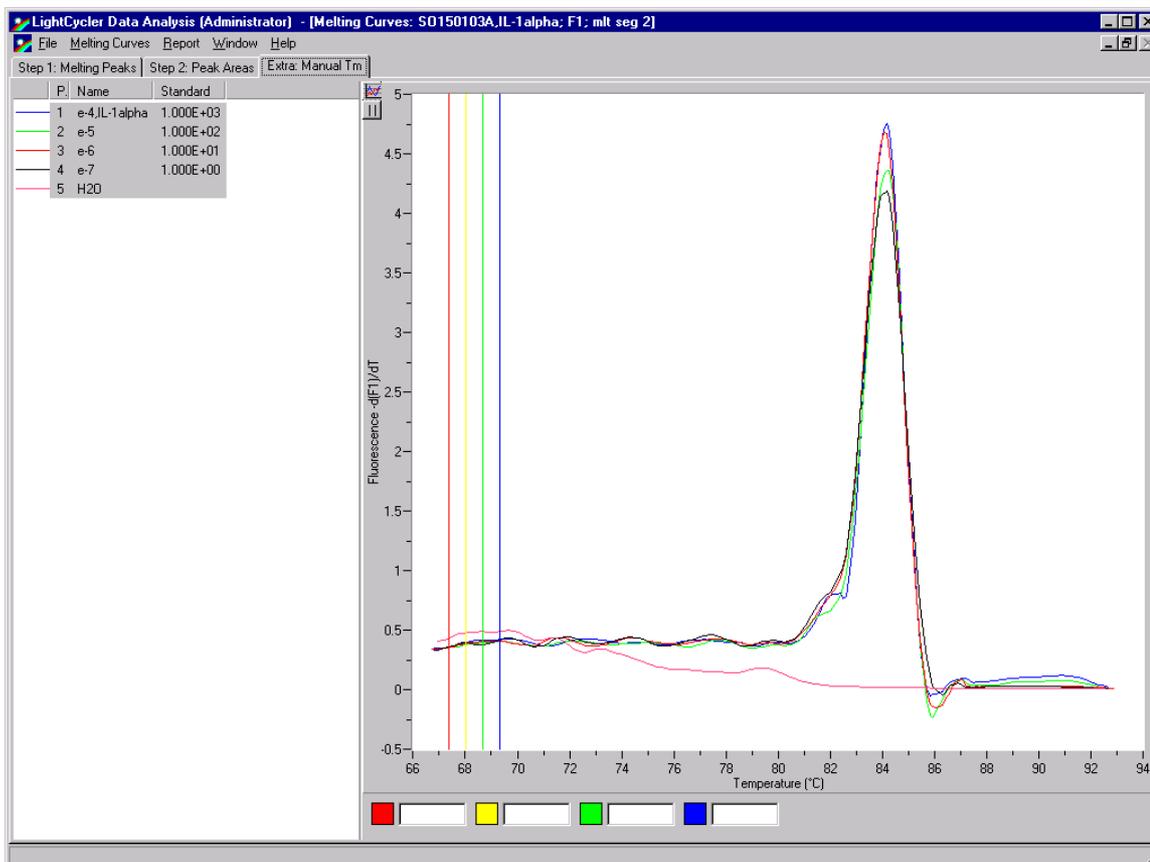
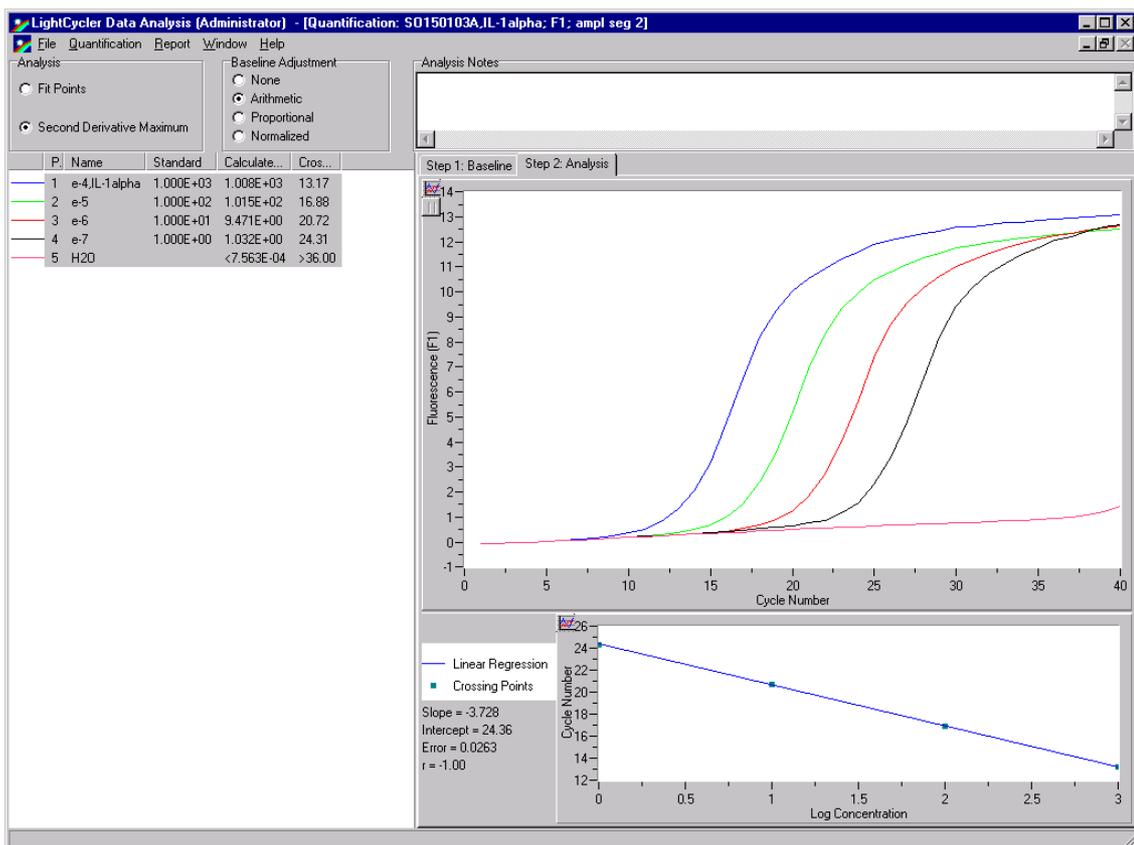


Tabelle 7. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von IL-1 $\alpha$ -Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

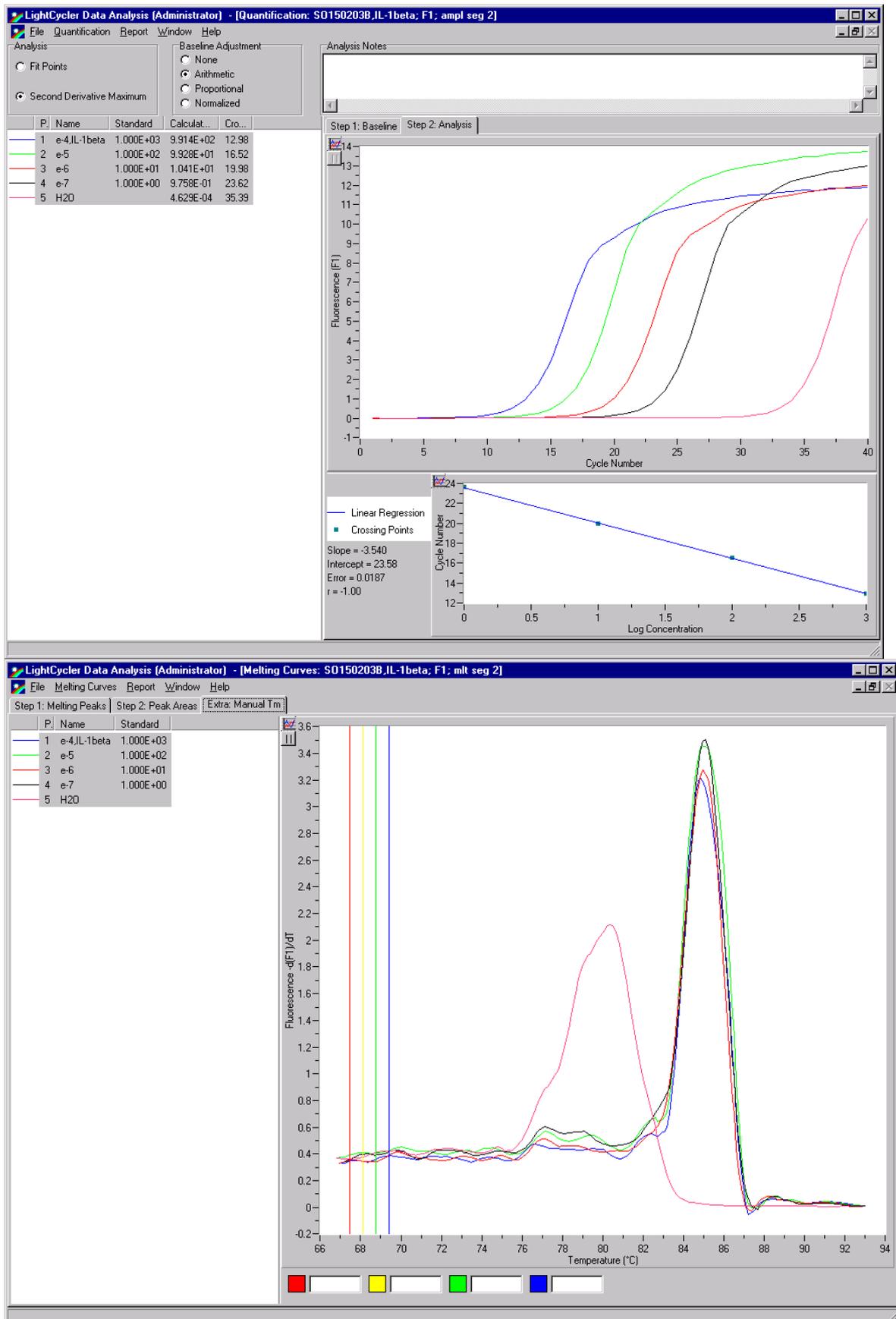


Tabelle 8. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von IL-1 $\beta$ -Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

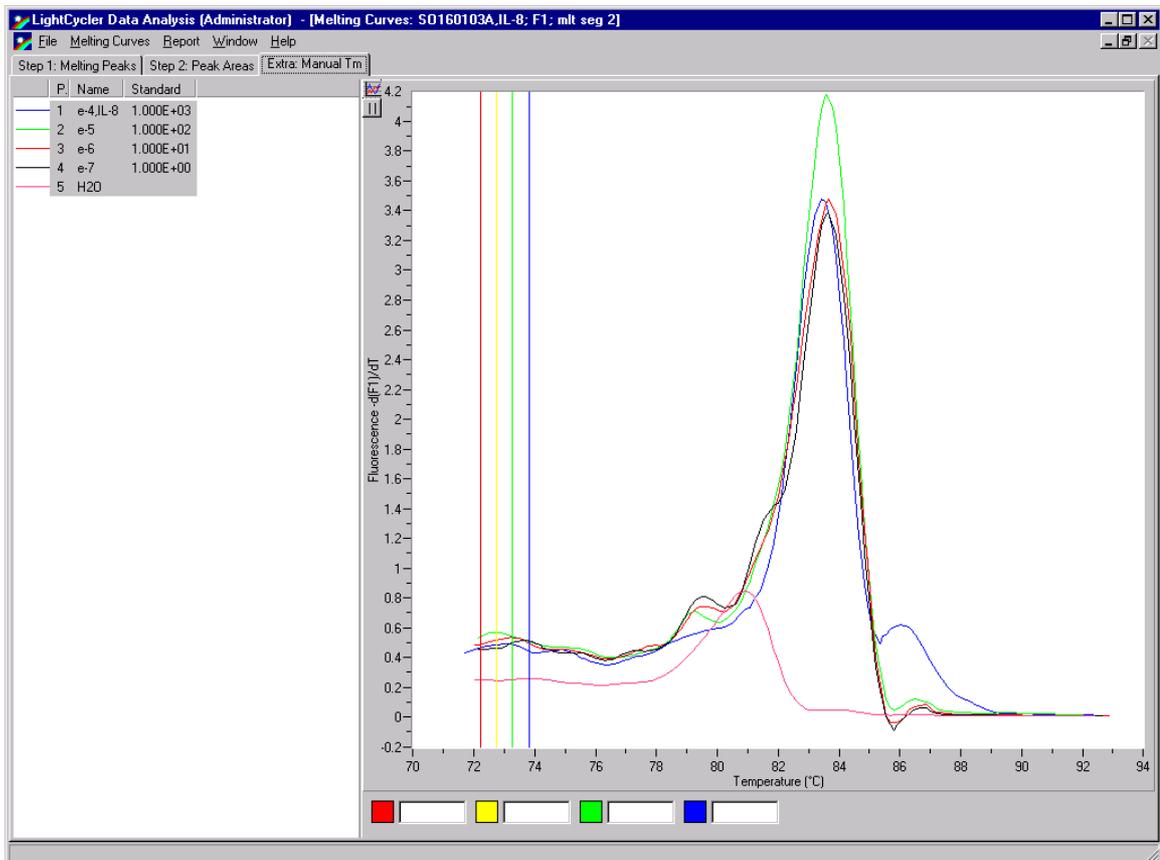
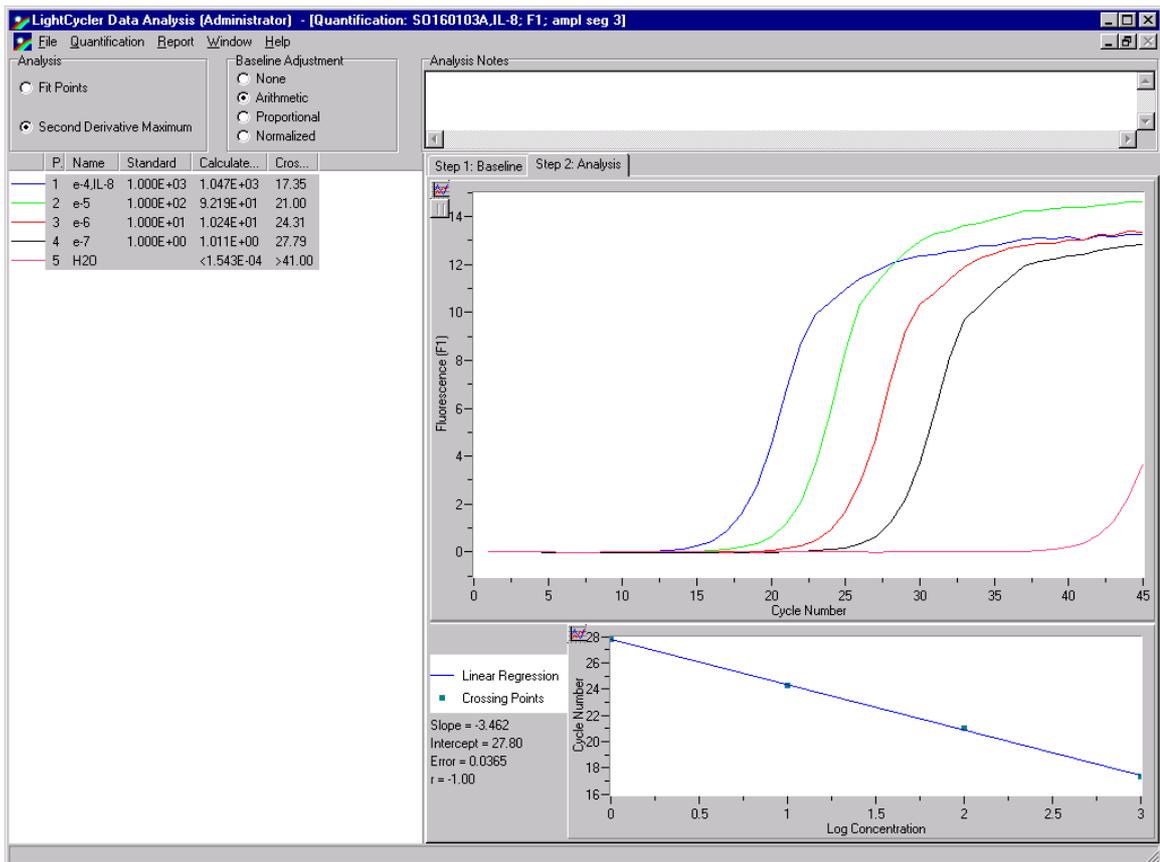


Tabelle 9. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von IL-8-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Spezies-Klassifizierung**

Aus den zehn Abstrichen der zehn unbehandelten Aknepatienten konnten unter anaeroben Bedingungen Bakterien angezüchtet. Die zehn Stämme wurden mittels dem API 20 A System mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % eindeutig als *P. acnes* identifiziert werden.

Die Anwesenheit von Galaktose als Zellwandzucker in allen untersuchten Stämmen ermöglichte wiederum die Typisierung der 10 Propionibakterien-Spezies als *P. acnes* Serotyp I. Die Keime wurden isoliert um sie für die Stimulation der Keratinozyten zur Analyse der Zytokinexpression zu verwenden.

#### **3.2 Keimzahlbestimmung**

Nach 48 Stunden Bebrütung wurden die sichtbaren kolonienbildenden Einheiten ausgezählt und die Mittelwerte aus den Ergebnissen bestimmt. Bei einer optischen Dichte der Batersuspension von 0,8 bei 550 nm Wellenlänge konnte davon ausgegangen werden das in der Lösung  $1 \times 10^6$  Keime/ml vorhanden sind. Damit konnte über die einfache Bestimmung der optischen Dichte die Keimzahl ermittelt werden ohne die Bakterien auszählen zu müssen.

#### **3.3 Porphyrinproduktion von *P. acnes***

Die Porphyrinanalyse erfolgte aus Komedonenmaterial von Hautexprimatzen zehn Patienten der Klinik. Alle Patienten waren unbehandelt. Parallel dazu wurde aus den Komedonen *P. acnes* angezüchtet. Nach siebentägiger Inkubation auf Hirn-Herz-Infusionsagar wurden die Stämme unter Wood-Licht betrachtet. Bei allen Bakterienkulturen war eine rot-lila Fluoreszenz wahrnehmbar. Die Porphyrinextraktion wurde, wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Für jeden Versuch wurden Doppelansätze angefertigt.

Anschließend fand die HPLC-Analyse statt. Die *In-vivo*-Ergebnisse sind in der Tabelle 10 A, B und Abbildung 4 zusammengefaßt. Die *P. acnes*-Stämmen in

den Komedonen bildeten nahezu ausschließlich das unpolare Koproporphyrin III. Polare Porphyrine (Uro- bis Pentacarboxyporphyrin) konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 10 A. Porphyrinbestimmung aus *P. acnes*

Porphyrikkonzentration in ng/mg

Ansatz	P1	P1'	M1	P2	P2'	M2	P3	P3'	M3	P4	P4'	M4	P5	P5'	M5
Uro I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uro III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepta I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepta III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penta I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kopro I	<0,01	<0,01	<b>&lt;0,01</b>	0,02	0,01	<b>0,015</b>	0,01	0,01	<b>0,01</b>	0,02	0,04	<b>0,03</b>	0,01	0,02	<b>0,015</b>
Kopro III	0,02	0,03	<b>0,025</b>	0,31	0,2	<b>0,255</b>	0,25	0,19	<b>0,22</b>	0,35	0,55	<b>0,45</b>	0,24	0,34	<b>0,29</b>
Proto	<0,01	<0,01	<b>&lt;0,01</b>												
% WF Meso	76	81	<b>78,5</b>	97	80	<b>88,5</b>	90	92	<b>91</b>	93	95	<b>94</b>	96	98	<b>97</b>

Tabelle 10 B. Porphyrinbestimmung aus *P. acnes*

Porphyrikkonzentration in ng/mg Bakterien

Ansatz	P6	P6'	M6	P7	P7'	M7	P8	P8'	M8	P9	P9'	M9	P10	P10'	M10
Uro I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uro III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepta I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepta III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penta I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kopro I	0,01	0,01	<b>0,01</b>	0,19	0,16	<b>0,175</b>	0,1	0,08	<b>0,09</b>	0,01	0,01	<b>0,03</b>	<0,01	<0,01	<b>&lt;0,01</b>
Kopro III	0,1	0,11	<b>0,105</b>	3,49	2,86	<b>3,175</b>	1,21	0,96	<b>1,085</b>	0,42	0,31	<b>0,365</b>	0,8	0,9	<b>0,85</b>
Proto	<0,01	<0,01	<b>&lt;0,01</b>												
% WF Meso	86	80	<b>83</b>	100	100	<b>100</b>	99	101	<b>100</b>	90	89	<b>89,5</b>	91	88	<b>89,5</b>

#### Abkürzungen

Uro I, III: Uroporphyrin I, III; Hepta I,III: Heptacarboxyporphyrin I, III; Penta I: Pentacarboxyporphyrin I; Kopro I, III: Koproporphyrin I, III; Proto: Protoporphyrin; %WF Meso: Wiederfindungsrate (%) von Mesoporphyrin.

Px und Px': Doppelwertbestimmung; Mx: Mittelwertbestimmung

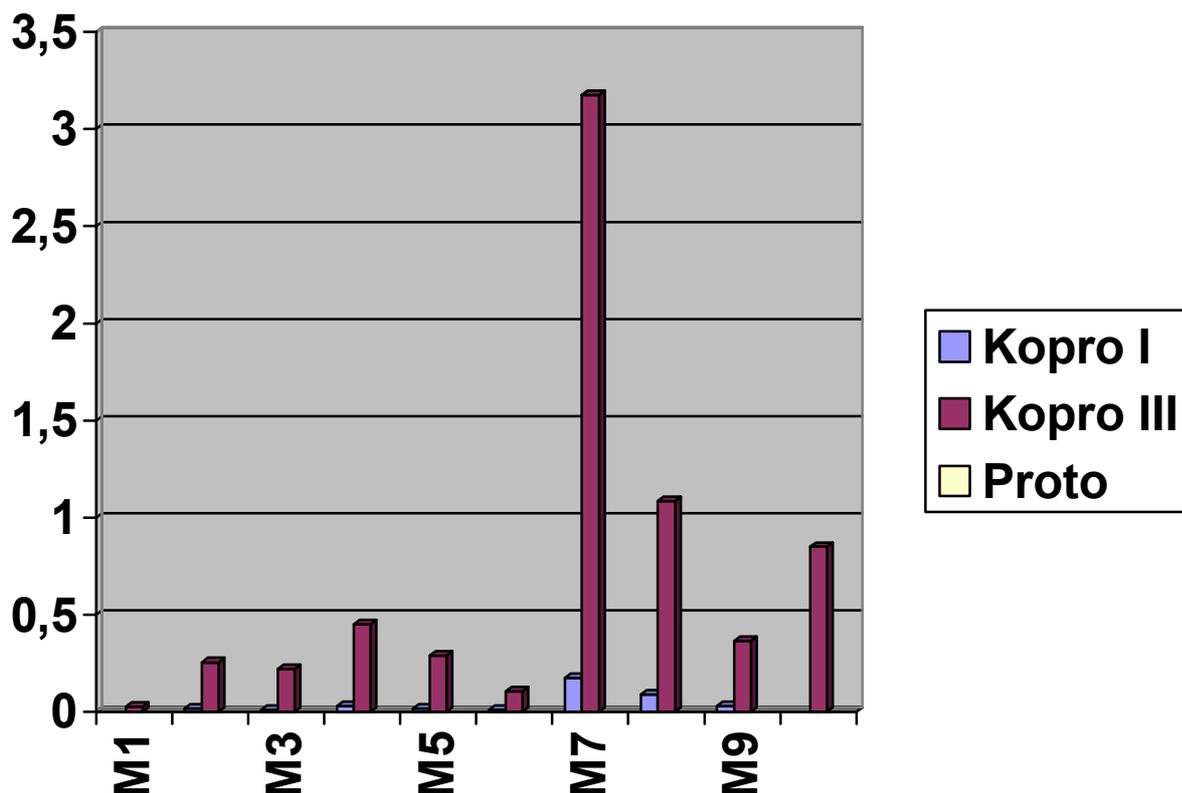


Abbildung 4. Chromatographische Auftrennung der Porphyrinfraktionen von *P. acnes*-Stämmen aus Komedonenmaterial isoliert

In weiteren, im Rahmen einer anderen Dissertation durchgeführten, Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch unter *In-vitro*-Bedingungen, das bedeutet sieben Tage nach Kultivierung von *P. acnes*, ein sehr ähnliches Porphyrinsekretionsmuster nachzuweisen war. Koproporphyrin III war unter diesen Bedingungen das am stärksten sezernierte Porphyrin (Bessenroth L (2003) *In vivo*-Bestimmung der Porphyrinproduktion aus *Propionibacterium acnes* unter lokaler Aknetherapie. Dissertation München).

Die Analyse der Porphyrinmuster erfolgte um die Hauptporphyrinfraktion von *P. acnes in vivo* zu charakterisieren. Da Porphyrine als Virulenzfaktor für die Induktion einer entzündlichen Antwort diskutiert werden, erfolgten auch Stimulationsexperimente der Keratinozyten mit Koproporphyrin III.

### **3.4 Zytokinexpression**

Während die immunmodulatorische Aktivität von *P. acnes* gegenüber Zellen des Immunsystems gut charakterisiert wurde, fehlen entsprechende Ergebnisse für Keratinozyten. Dies ist erstaunlich, da Keratinozyten immunmodulatorisch aktiv sein können und den primäre Kontaktaufnahme des Erregers mit dem Wirt vermitteln.

Für die Induktion der Zytokinexpression wurde einer der aus Komedonenmaterial isolierten Stämme verwendet

#### **3.4.1 RNA-Nachweis**

Wie unter 2.6.1 beschrieben wurde RNA 3 Stunden und 6 Stunden nach Stimulation der Keratinozyten mit vitalen und hitzeinaktivierten *P. acnes* isoliert. Zum Nachweis der extrahierten Gesamt-RNA wurde eine RNA-Gel-Elektrophorese durchgeführt. In der Gel-Aufnahme (Abb. 5) sind für die Inkubationszeiten 3 Stunden und 6 Stunden die Untereinheiten der extrahierten Gesamt-RNA dargestellt. Aufgrund der umschriebenen Banden ist von einer nicht degradierten und intakten RNA auszugehen. Oberhalb dieser Banden ist eine weitere Bande zu erkennen, deren Inhalt wahrscheinlich genomischer DNA ist, die bei der Extraktion mitisoliert wurde. Aus diesem Grund war es wichtig einen DNase-Verdau durchzuführen, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen.

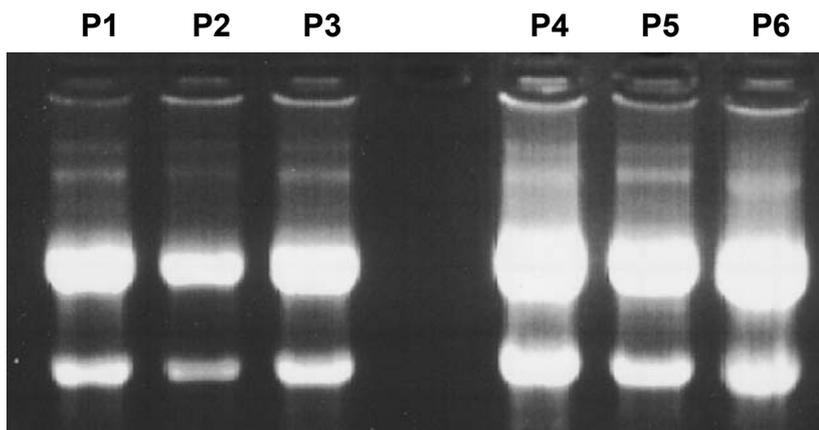


Abbildung 5. Nachweis intakter RNA

- P1 Keratinozyten 3 Stunden nach Stimulation mit *P. acnes* aktiv  
 P2 Keratinozyten 3 Stunden nach Stimulation mit *P. acnes* hitzeinaktiviert  
 P3 Kontrollwert Keratinozyten 3 Stunden  
 P4 Keratinozyten 6 Stunden nach Stimulation mit *P. acnes* aktiv  
 P5 Keratinozyten 6 Stunden nach Stimulation mit *P. acnes* hitzeinaktiviert  
 P6 Kontrollwert Keratinozyten 6 Stunden

Px: Probenbezeichnungen

Anschließend wurde die RNA-Menge bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm in einem Biophotometer (Eppendorf) gemessen. Um Verunreinigungen mit Proteinen und DNA auszuschließen wurde die Reinheit der Proben anhand eines 260/280-Ratio  $> 1,8$  gesichert. Für die Umwandlung in cDNA wurden jeweils 1  $\mu\text{g}$  eingesetzt.

Tabelle 11. RNA-Analyse der Proben

Probenbezeichnungen	Gemessene RNA-Menge ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Ratio 260/280
P1	18,18	1,87
P2	18,84	1,80
P3	22,21	1,85
P4	20,98	1,87
P5	22,18	1,83
P6	18,44	1,85

Px: Probenbezeichnungen

### 3.4.2 Qualitative RT-PCR-Analyse

Die Zytokin-Genexpressionsmuster der Keratinozyten wurde 3 Stunden und 6 Stunden nach Versuchsbeginn untersucht. Neben Aldolase und GAPDH als konstitutiv exprimierte Gene (Abb. 6) wurde die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF untersucht. Die Auswertung erfolgte nach 35 und 40 PCR-Zyklen und zeigte ähnliche Ergebnisse.

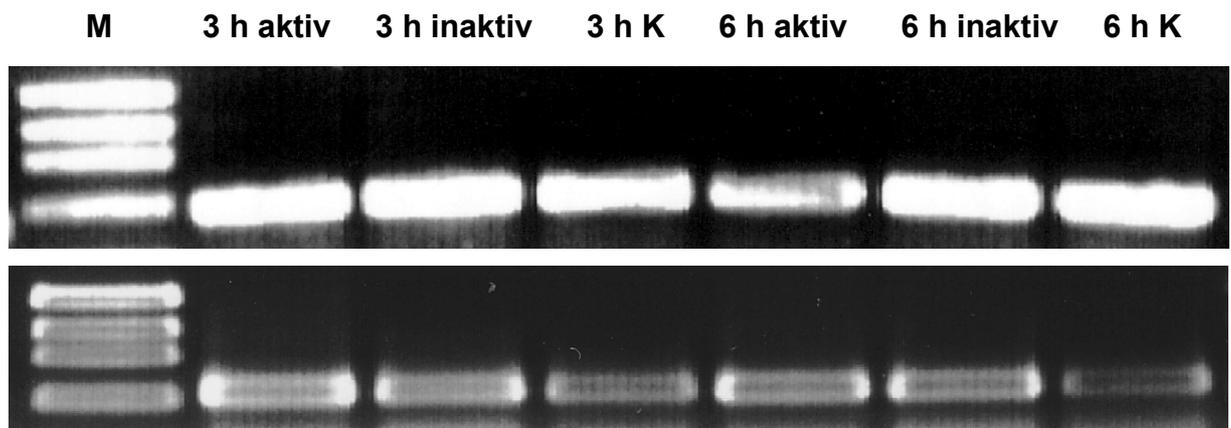


Abbildung 6. Konstitutive Expression von GAPDH (oben) und Aldolase (unten) 3 Stunden (3 h), 6 Stunden (6 h) nach Stimulation von Keratinozyten mit aktiven und hitzeinaktivierten (inaktiv) *P. acnes* und bei unstimulierten Keratinozyten als Kontrolle (K). 35 PCR-Zyklen. Marker XIII (PeqLab) mit Fragmenten von 1353, 1078, 872 und 602 Basenpaar-Größe (M).

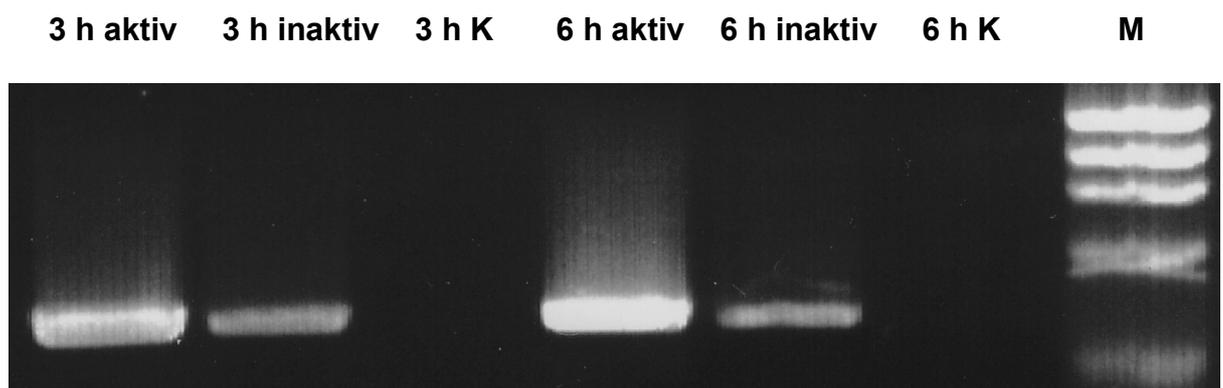


Abbildung 7. Induktion einer IL-1 $\beta$ -Expression 3 Stunden (3 h) und 6 Stunden (6 h) nach Stimulation von Keratinozyten mit aktiven und hitzeinaktivierten *P. acnes*. Keine IL-1 $\beta$ -Expression im Kontrollansatz mit unstimulierten Keratinozyten (K). 35 PCR-Zyklen. Marker XIII (PeqLab) mit Fragmenten von 1353, 1078, 872, 602 und 310 Basenpaar-Größe (M).

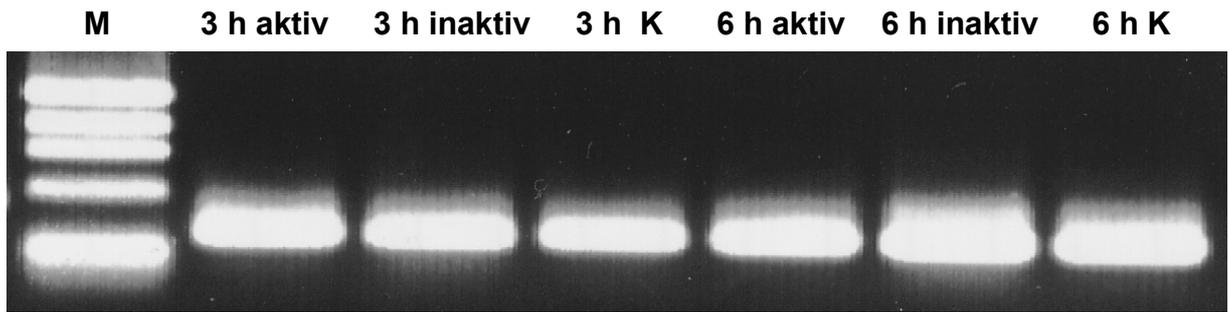


Abbildung 8. Expression von IL-8 unstimulierter Keratinozyten des Kontrollansatzes (K), 3 Stunden (3 h) und 6 Stunden (6 h) nach Stimulation der Keratinozyten mit aktiven und hitzeinaktivierten *P. acnes*. 35 PCR-Zyklen. Marker XIII (PeqLab) mit Fragmenten von 1353, 1078, 872, 602 und 310 Basenpaar-Größe (M).

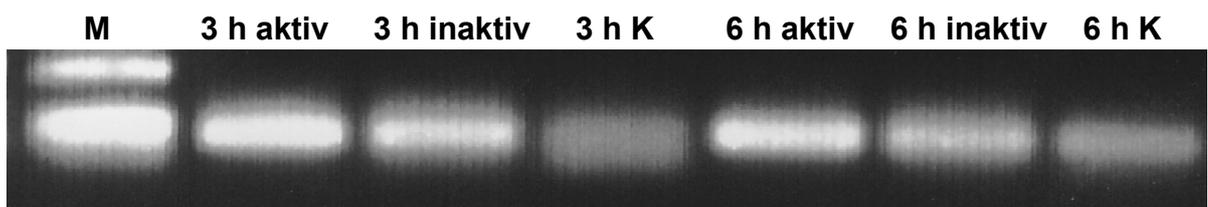


Abbildung 9. Expression von TNF unstimulierter Keratinozyten des Kontrollansatzes (K) und 3 Stunden (3 h) und 6 Stunden (6 h) nach Stimulation der Keratinozyten mit aktiven und hitzeinaktivierten *P. acnes*. 35 PCR-Zyklen. Marker XIII (PeqLab) mit Fragmenten von 310 und 234 Basenpaar-Größe (M).

Aufgrund der qualitativen RT-PCR-Ergebnisse zeigte sich eine Neuexpression von IL-1 $\beta$  nach Stimulation von Keratinozyten mit vitalen und hitzeinaktivierten *P. acnes* (Abb. 7). Aufgrund der unterschiedlichen Bandenstärken der IL-1 $\beta$ -Transkripte konnte vermutet werden, dass diese Hochregulation von IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit aktiven *P. acnes* stärker war als nach Stimulation mit nicht vitalen hitzeinaktivierten Keimen.

Bei den Untersuchungen zur IL-8- (Abb. 8) und TNF-Expression (Abb. 9) war auch schon in den unstimulierten Keratinozyten eine Expression beider Gene nachweisbar. Aufgrund der stärkeren Banden unter Einfluß von *P. acnes* bei gleichen experimentellen Bedingungen konnte auch hier eine Hochregulation nach Stimulation mit *P. acnes* vermutet werden.

Aufgrund der Ergebnisse war von einer eindeutigen Stimulation von IL-1 $\beta$  durch *P. acnes* auszugehen. Als interne RNA-Kontrolle dienten die konstitutiv exprimierten Gene GAPDH und Aldolase die unter beiden Stimulationsbedingungen und im Kontrollansatz vergleichbare Expressionsstärken aufwiesen (Abb. 6). Weiter konnte eine Hochregulation der Expressionstärke von IL-8 und TNF in Anwesenheit von *P. acnes* vermutet werden. Vitale *P. acnes* schienen in allen Experimenten einen stärkeren Stimulationsreiz darzustellen als inaktive Keime. Aufgrund der verwendeten Methode können aber nur bedingt quantitative Aussagen über die Expressionstärke gemacht werden. Um die Untersuchungsergebnisse zu verifizieren und exakte Vergleiche der Expressionsstärken anzustellen wurde eine Echtzeit-RT-PCR Analyse der Stimulationsexperimente angeschlossen.

### 3.4.3 Quantitative RT-PCR Analyse

Mittels konventioneller RT-PCR konnte eine Zytokin-Genexpression in der Keratinozyten nachgewiesen. Allerdings war die Quantifizierung zwischen den einzelnen Proben und Zytokinen selbst bei dieser Methode schwierig. Für die quantitative PCR-Analyse wurden neben IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF mit IL-1 $\alpha$  und GM-CSF weitere Zytokine in die Untersuchungen einbezogen. Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde Aldolase amplifiziert.

Weiter erfolgten Untersuchungen zur Zytokinexpression nach Stimulation der Keratinozyten mit unterschiedlichen Koproporphyrin III - Konzentrationen. Koproporphyrin III war in den oben beschriebenen Untersuchungen als die von *P. acnes* am stärksten sezernierte Porphyrinfraktion *in vitro* und *in vivo* identifiziert worden.

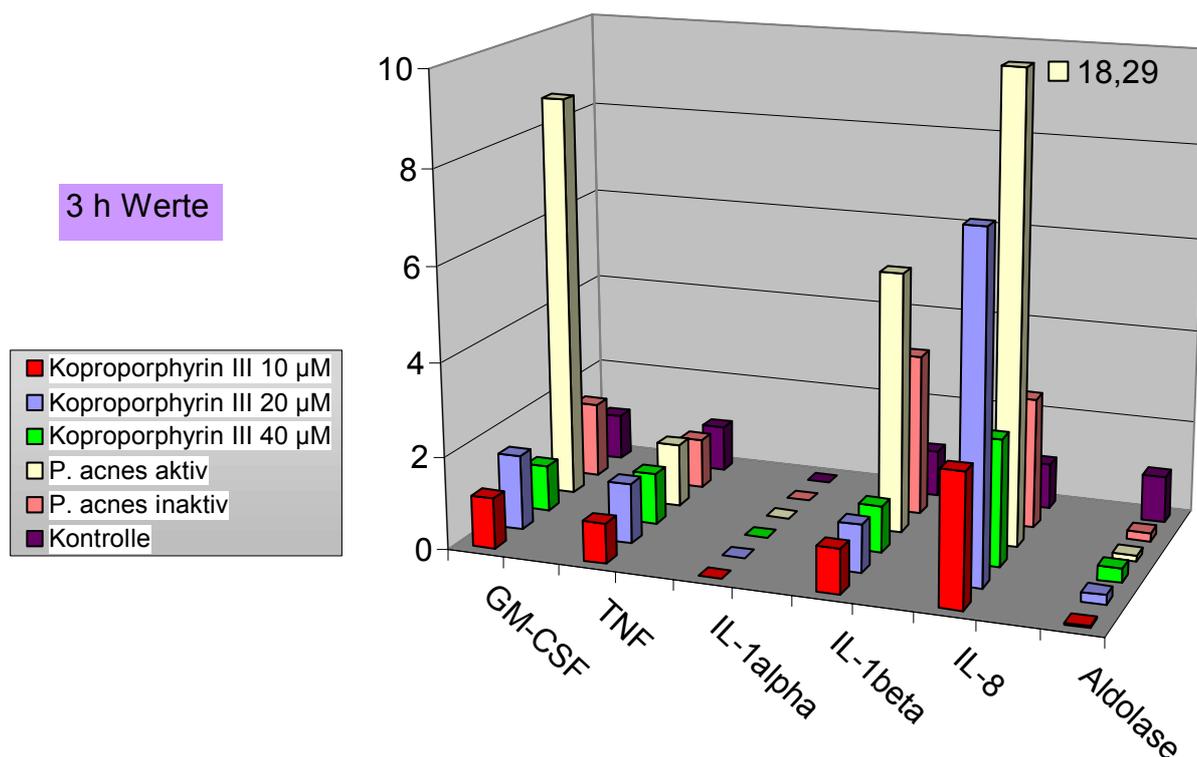


Abbildung 10. Quantitative RT-PCR-Analyse 3 Stunden nach Stimulation von Keratinozyten

3 Stunden nach Beginn der Inkubation mit vitalen *P. acnes* zeigte sich eine deutliche Hochregulation von GM-CSF, IL-1 $\beta$  und IL-8 (Abb. 10). Nach Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. acnes* war die Hochregulation deutlich geringer ausgeprägt. Einwirkung von Koproporphyrin 20  $\mu$ M führte zu einer IL-8 Aktivierung (Abb. 10).

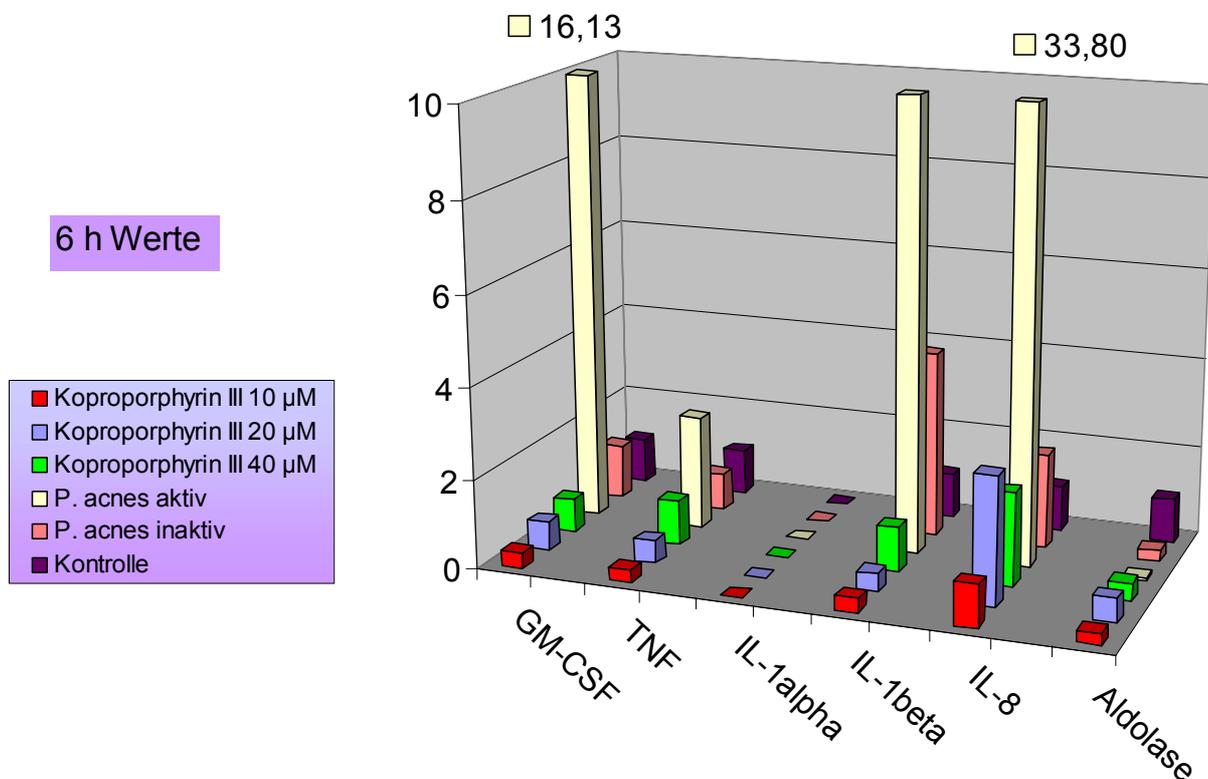


Abbildung 11. Quantitative RT-PCR Analyse 6 Stunden nach Stimulation von Keratinozyten

In der quantitativen Analyse der Genexpression nach 6 Stunden bestätigte sich die deutliche Hochregulation von IL-1 $\beta$  und der Chemokine IL-8 und GM-CSF nach Stimulation mit vitalen *P. acnes*. Demgegenüber war die Zytokinantwort nach Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. acnes* wiederum deutlich geringer. Eine signifikante Immunantwort 6 Stunden nach Stimulation mit Koproporphyrin III war nicht nachweisbar (Abb. 11).

Im Anschluß sind auf jeder Seite oben die Fluoreszenzkurven einer externen Standardkurve (1), der Proben 6 Stunden nach Stimulation mit Koproporphyrin III 10 µM (2), 20 µM (3), 40 µM (4), aktiven *P. acnes* (5), hitzeinaktivierten *P. acnes* (6) und unstimulierten Keratinozyten (8) aufgeführt. Im unteren Teil der obigen Tabelle die Standardkurve. Die untere Tabelle zeigt die Schmelzkurvenanalyse mit Angabe der Schmelztemperatur der Produkte.

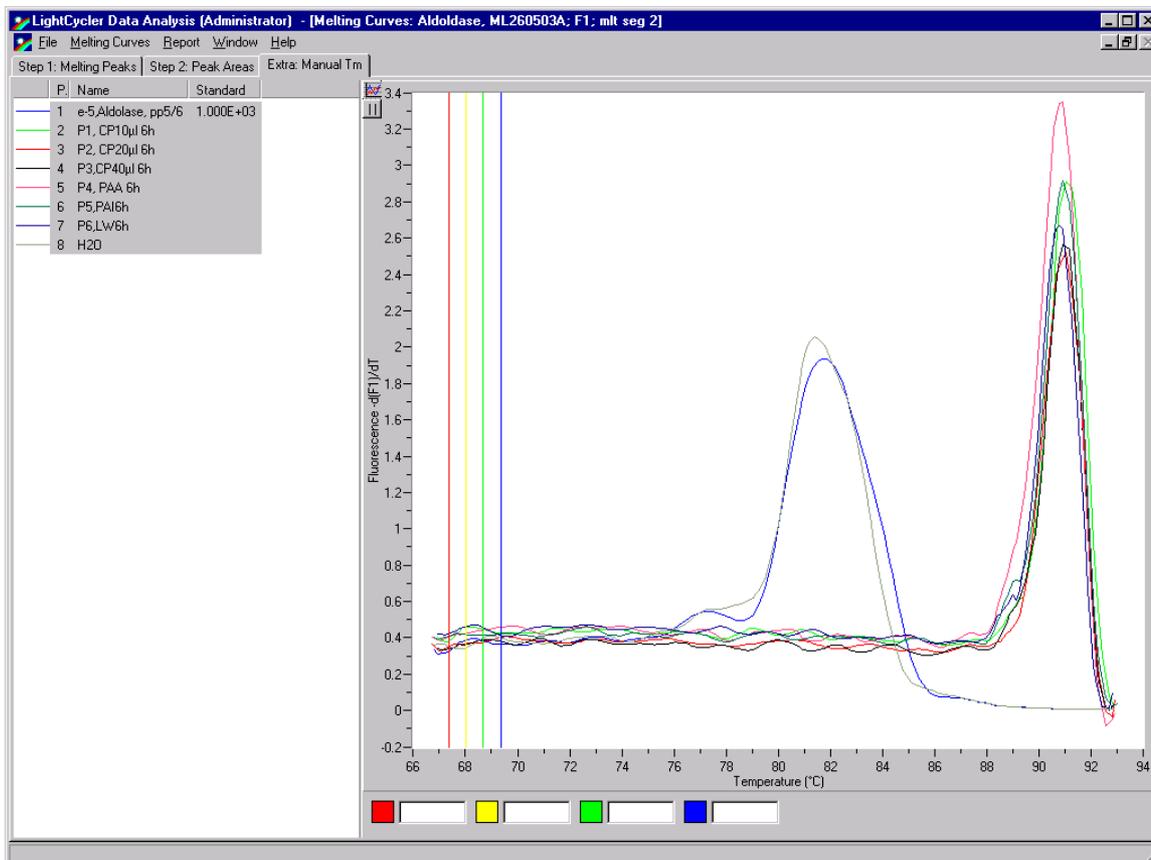
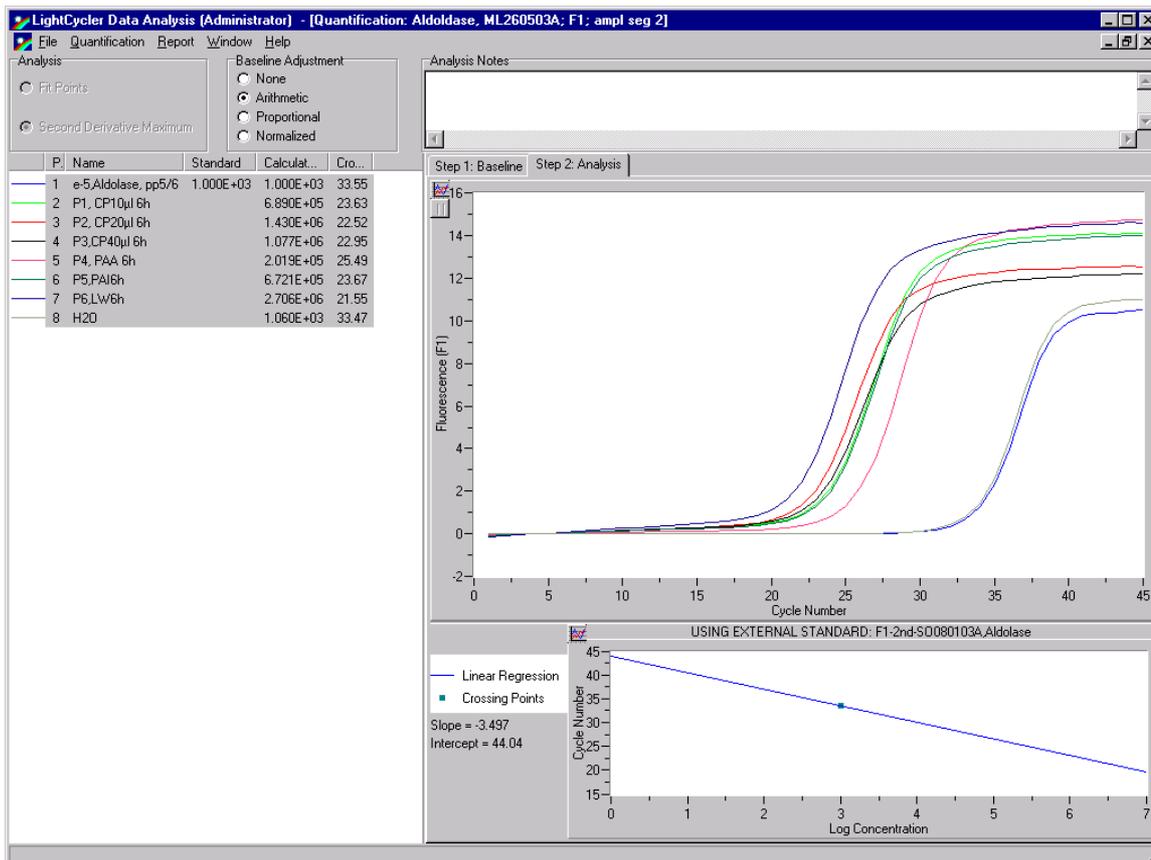


Tabelle 12. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von Aldolase-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

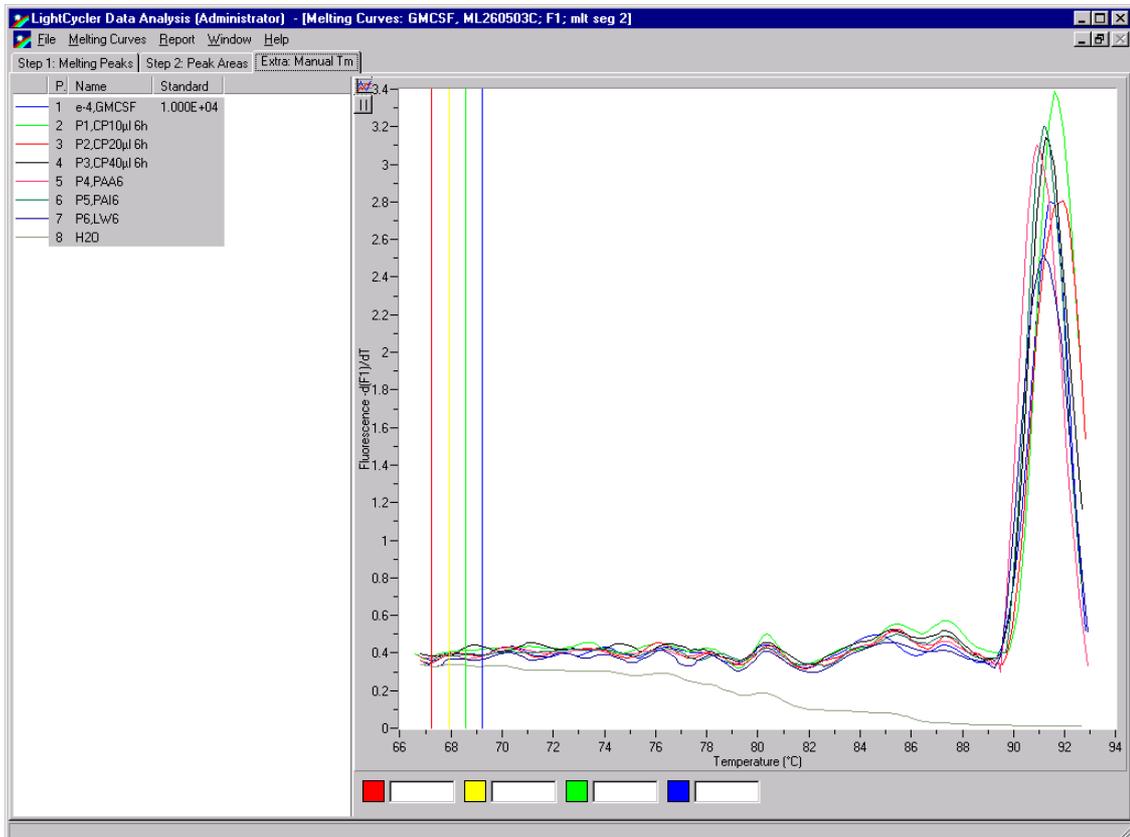
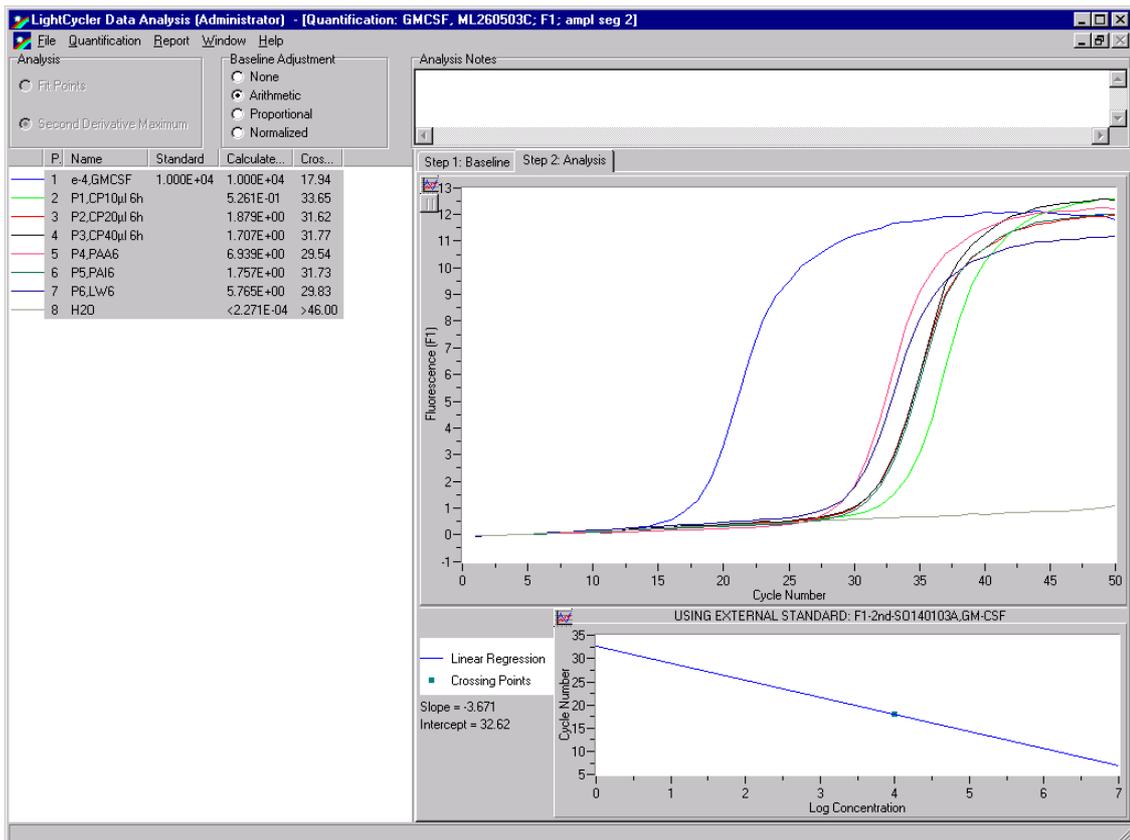


Tabelle 13. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von GM-CSF-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

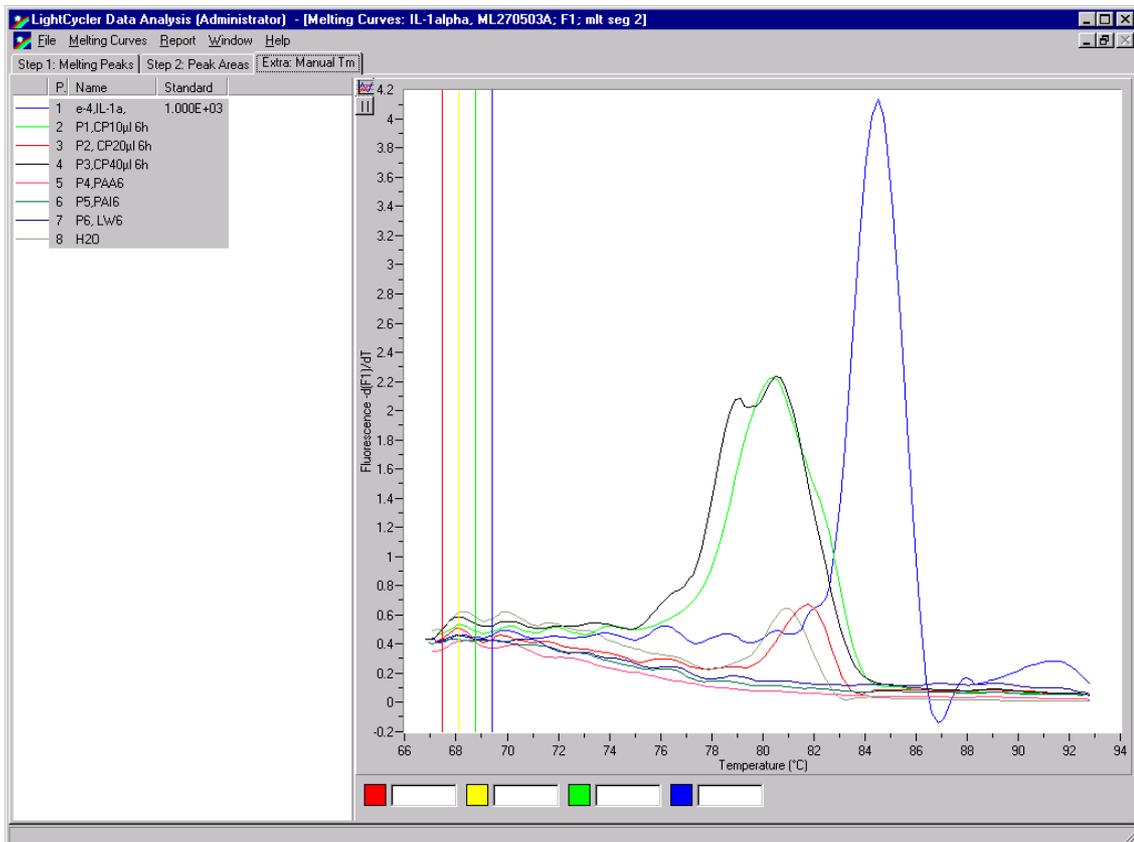
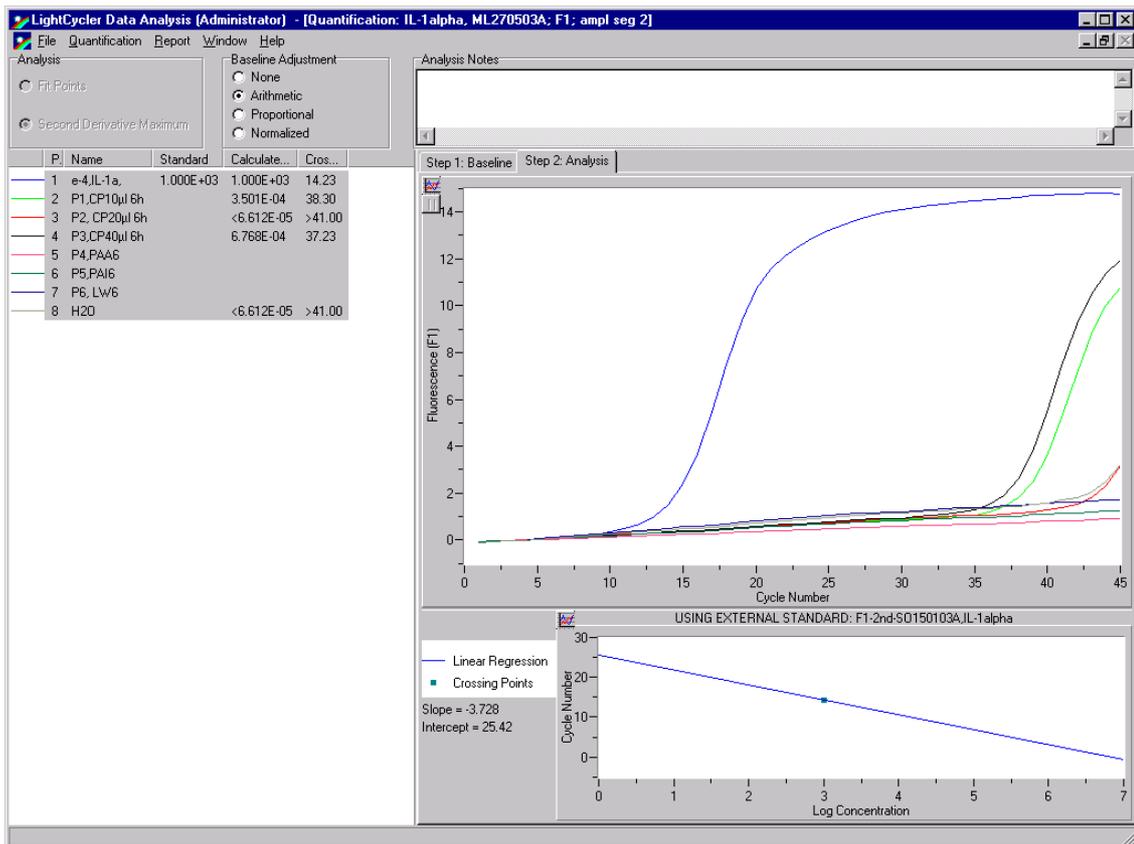


Tabelle 14. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von IL-1 $\alpha$ -Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

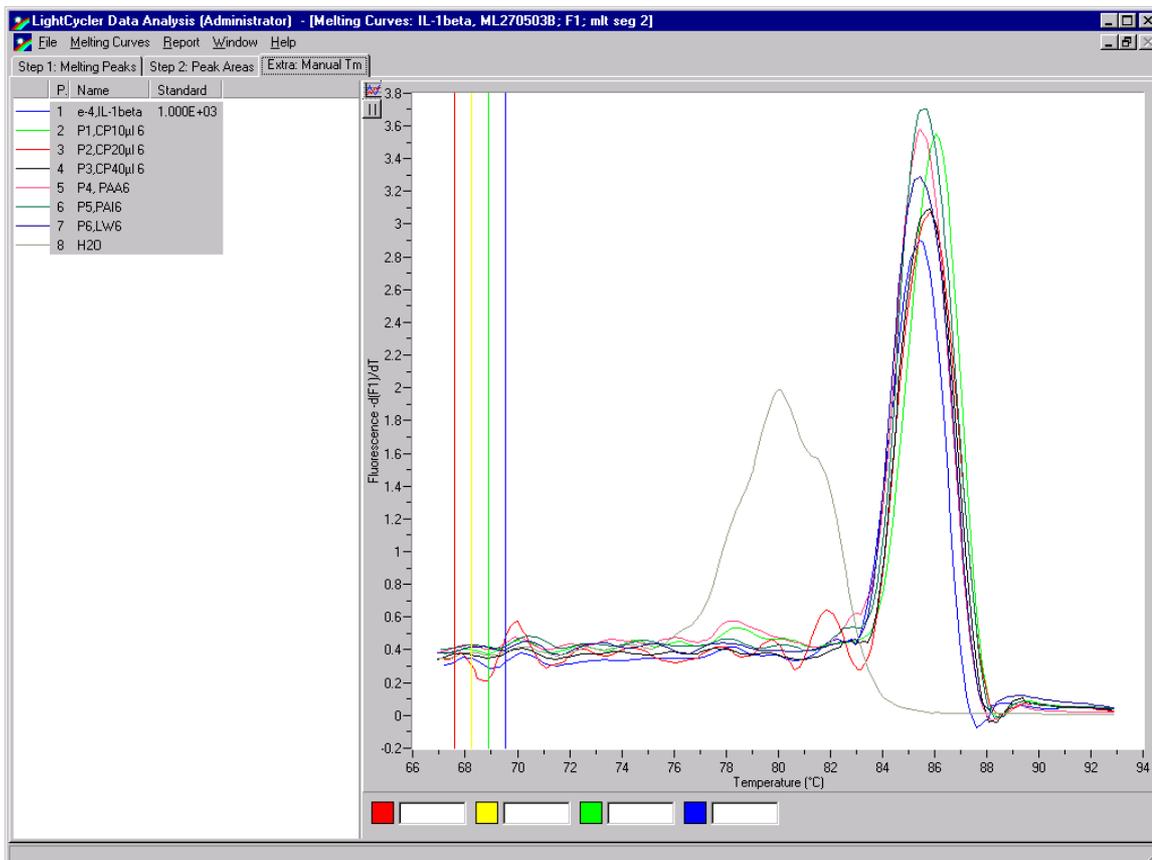
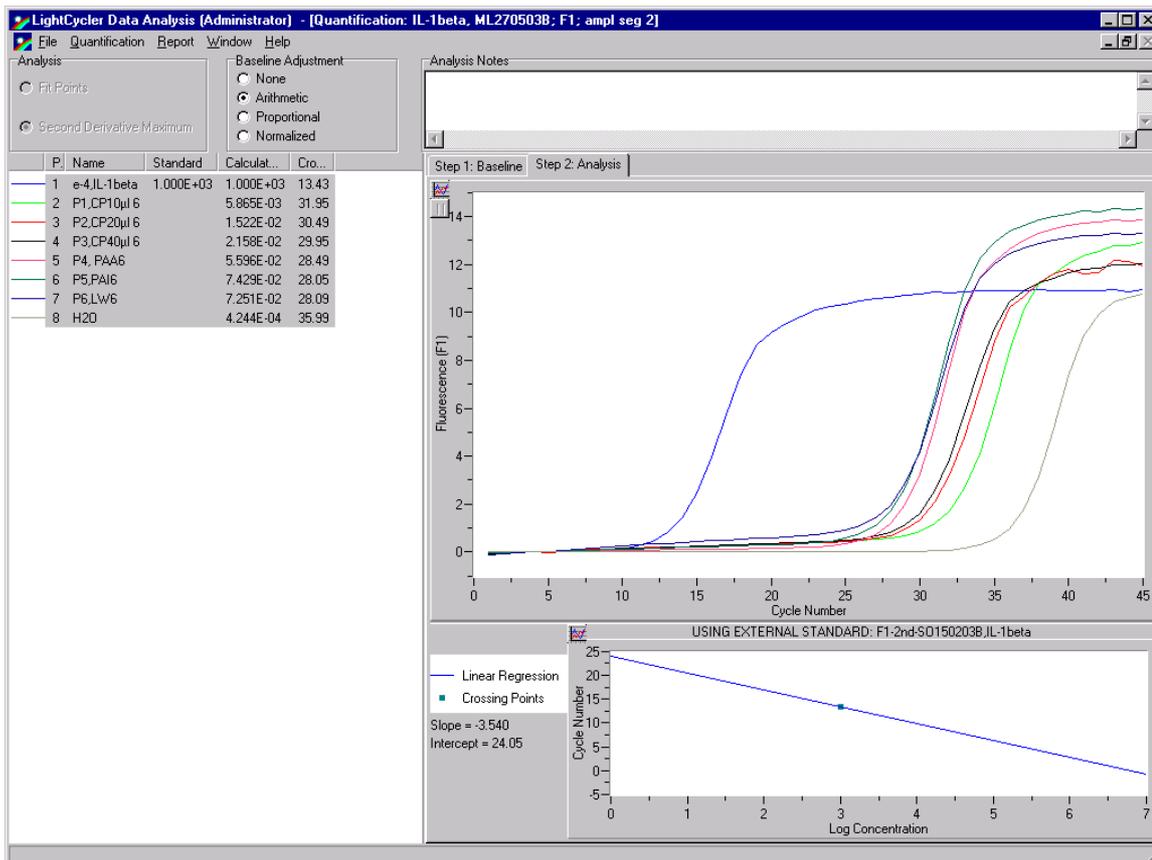


Tabelle 15. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von IL-1 $\beta$ -Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

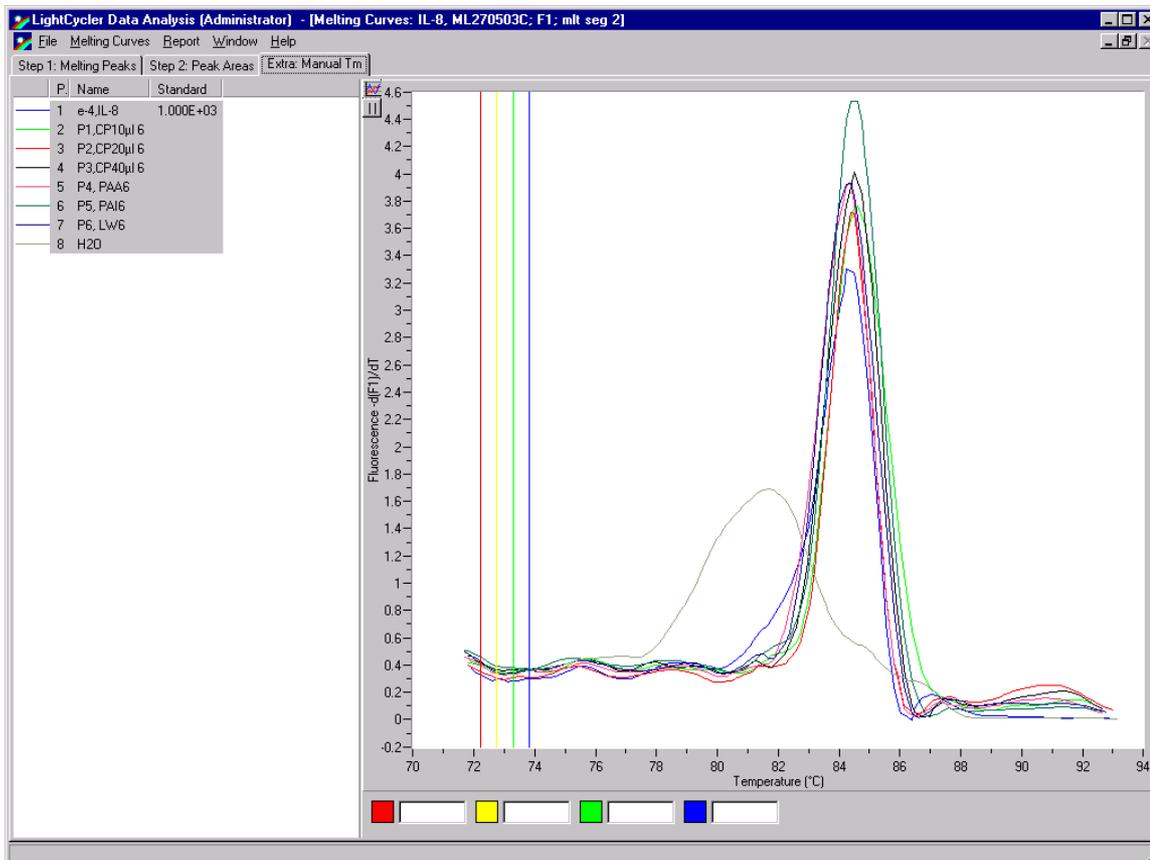
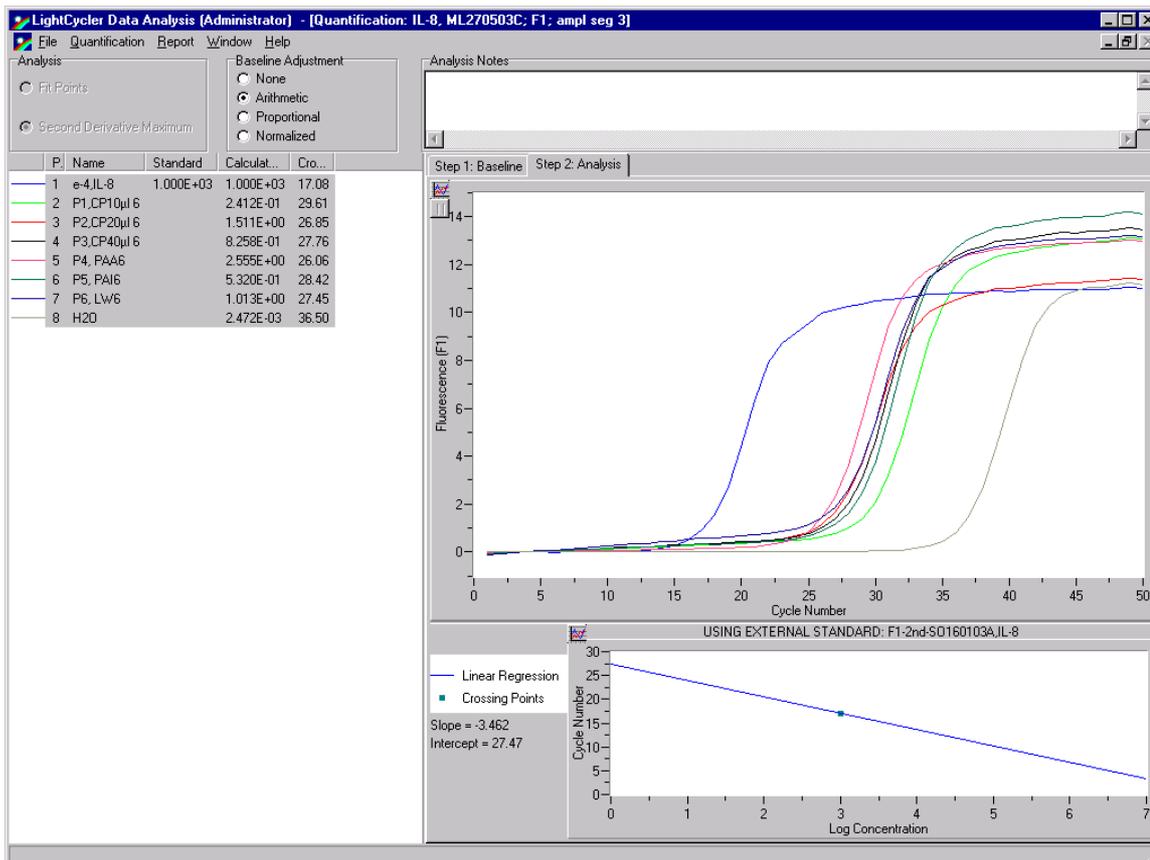


Tabelle 16. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von IL-8-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

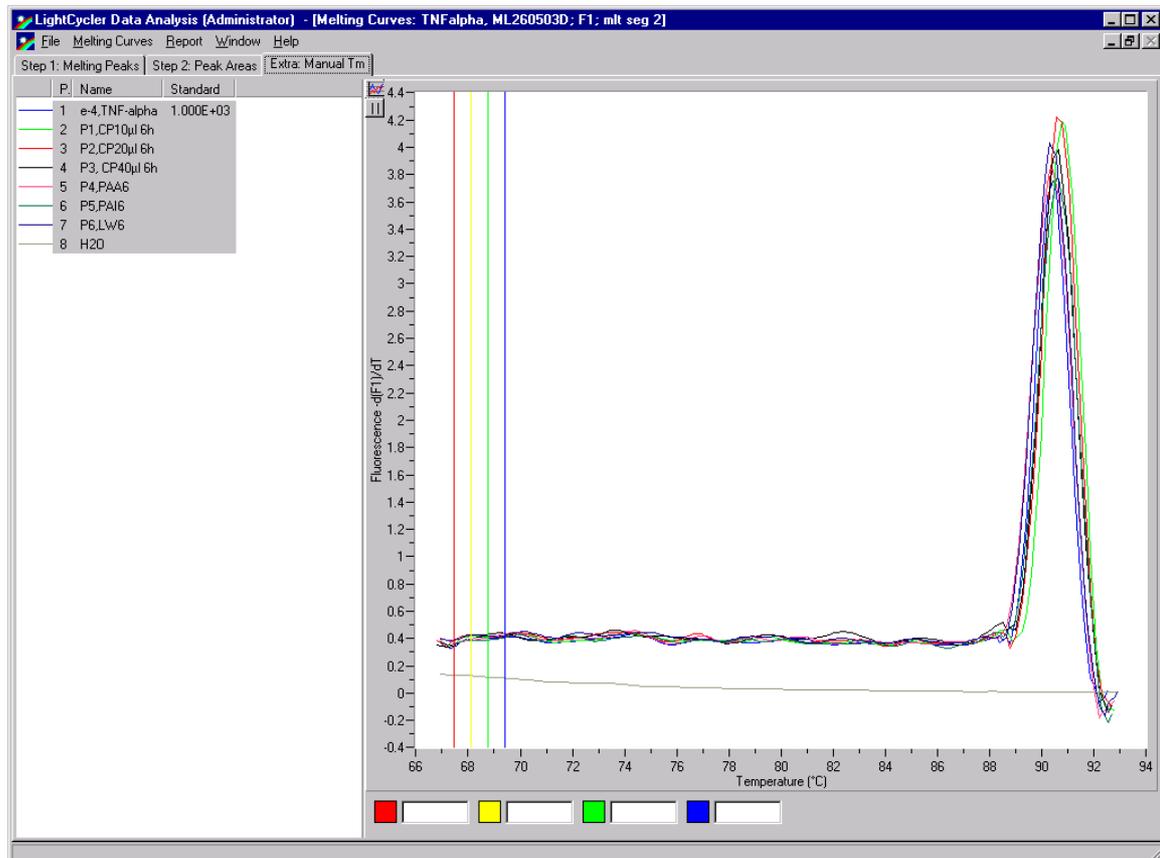
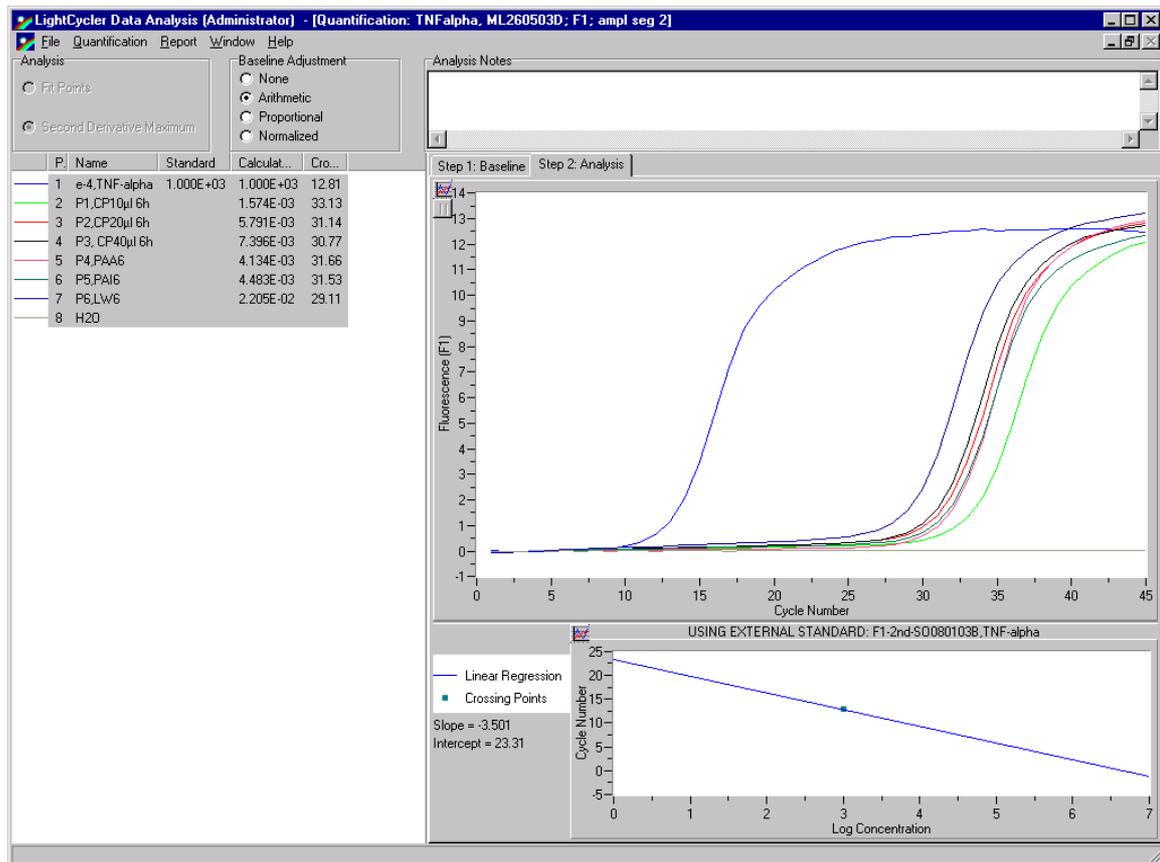


Tabelle 17. Oben Fluoreszenzkurven und errechnete Standardkurve bei Verwendung von TNF-Primern. Unten Schmelzkurvenanalyse mit Schmelztemperaturen.

Aus der relativen Kopienanzahl bei Verwendung von Aldolase-Primern wird nun für die einzelnen Proben der Abgleichfaktor errechnet, um Unterschiede in der Qualität und Quantität der cDNA berücksichtigen zu können (Tabelle 18). Ausgehend vom Leerwert also der Kopienanzahl der Keratinozyten ohne Stimulation (100 %) werden die ermittelten Zytokin-Kopienzahlen der einzelnen Probenwerte mit dem Faktor aus Tabelle 18 multipliziert und dann in Relation zum Leerwert gesetzt (Tabelle 19 – 23). In Tabelle 24 sind die relativen mRNA-Mengen nach Abgleich zusammengefaßt.

Position	Kapillare	cDNA 1 µl	Kommentar	Kopienzahl	Prozent der Kopienzahl	<b>Faktor für Abgleich Aldolase</b>	Schmelz- temperatur	Crossing point
1	16	e-5	s.SO191202A	1000	-	-	90,87	33,55
2	17	P1	Koproporphyrin III 10 µM 6h	689000	25,5 %	<b>3,93</b>	81,66	23,63
3	18	P2	Koproporphyrin III 20 µM 6h	1430000	52,8 %	<b>1,89</b>	81,66	22,52
4	19	P3	Koproporphyrin III 40 µM 6h	1077000	39,8 %	<b>2,51</b>	81,66	22,95
5	20	P4	<i>P. acnes</i> aktiv 6 h	201900	7,5 %	<b>13,40</b>	81,66	25,49
6	21	P5	<i>P. acnes</i> inaktiv 6 h	672100	24,8 %	<b>4,03</b>	81,66	23,67
7	22	P6	Leerwert	2706000	100,0 %	<b>1,00</b>	81,66	21,55
8	23	H <sub>2</sub> O	Wasserkontrolle	1060	-	-	90,87	33,47

Tabelle 18. Berechnung des Abgleichfaktors aus der unterschiedlichen Kopienanzahl für das Housekeeping – Gen Aldolase

Position	Kapillare	cDNA 1 µl	Kommentar	Kopienzahl	<b>Nach Ab- gleich mit Aldolase</b>	Schmelz- temperatur	crossing point
1	32	e-4	s.SO191202A	1000	-	91,26	17,94
2	33	P1	Koproporphyrin III 10 µM 6h	0,5261	<b>0,36</b>	91,26	33,65
3	34	P2	Koproporphyrin III 20 µM 6h	1,879	<b>0,62</b>	91,26	31,62
4	35	P3	Koproporphyrin III 40 µM 6h	1,707	<b>0,74</b>	91,26	31,77
5	36	P4	<i>P. acnes</i> aktiv 6 h	6,939	<b>16,13</b>	91,26	29,54
6	37	P5	<i>P. acnes</i> inaktiv 6 h	1,757	<b>1,23</b>	91,26	31,77
7	38	P7	Leerwert	5,765	<b>1</b>	91,26	29,83
8	39	H <sub>2</sub> O	Wasserkontrolle	0,0002271	-	-	>46

Tabelle 19. Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für GM-CSF nach Aldolase-Abgleich

Position	Kapillare	cDNA 1 µl	Kommentar	Kopienzahl	Nach Ab- gleich mit Aldolase	Schmelz- temperatur	crossing point
1	48	e-4	s.SO191202A	1000	0	84,38	14,23
2	49	P1	Koproporphyrin III 10 µM 6h	0,0003501	0	80,29	38,3
3	50	P2	Koproporphyrin III 20 µM 6h	6,612 -5	0	-	>41
4	51	P3	Koproporphyrin III 40 µM 6h	6,768 -4	0	80,29	37,23
5	52	P4	<i>P. acnes</i> aktiv 6 h	-	0	-	-
6	53	P5	<i>P. acnes</i> inaktiv 6 h	-	0	-	-
7	54	P6	Leerwert	-	0	-	-
8	55	H2O	Wasserkontrolle	6,612 -5	0	-	>41

Tabelle 20. Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-1 $\alpha$  nach Aldolase-Abgleich

Position	Kapillare	cDNA 1µl	Kommentar	Kopienzahl	Nach Ab- gleich mit Aldolase	Schmelz- temperatur	crossing point
1	23	e-4	s.SO191202A	1000		85,5	13,43
2	24	P1	Koproporphyrin III 10 µM 6h	0,005865	0,32	85,5	31,95
3	25	P2	Koproporphyrin III 20 µM 6h	0,01522	0,40	85,5	30,49
4	26	P3	Koproporphyrin III 40 µM 6h	0,02158	1	85,5	29,95
5	27	P4	<i>P. acnes</i> aktiv 6 h	0,05596	10,34	85,5	28,49
6	28	P5	<i>P. acnes</i> inaktiv 6 h	0,07429	4,13	85,5	28,05
7	29	P6	Leerwert	0,07251	1	85,5	28,09
8	30	H <sub>2</sub> O	Wasserkontrolle	0,0004244	-	80	35,99

Tabelle 21. Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-1 $\beta$  nach Aldolase-Abgleich

Position	Kapillare	cDNA 1µl	Kommentar	Kopienzahl	Nach Ab- gleich mit Aldolase	Schmelz- temperatur	crossing point
1	23	e-4	s.SO191202A	1000	-	84,47	17,08
2	24	P1	Koproporphyrin III 10 µM 6h	0,2412	0,94	84,47	29,61
3	25	P2	Koproporphyrin III 20 µM 6h	1,511	2,82	84,47	26,85
4	26	P3	Koproporphyrin III 40 µM 6h	0,8258	2,05	84,47	27,76
5	27	P4	<i>P. acnes</i> aktiv 6 h	2,555	33,80	84,47	26,06
6	28	P5	<i>P. acnes</i> inaktiv 6 h	0,532	2,11	84,47	28,42
7	29	P6	Leerwert	1,013	1	84,47	27,45
8	30	H <sub>2</sub> O	Wasserkontrolle	0,002472	-	81,37	36,5

Tabelle 22. Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-8 nach Aldolase-Abgleich

Position	Kapillare	cDNA 1µl	Kommentar	Kopienzahl	Nach Abgleich mit Aldolase	Schmelztemperatur	crossing point
1	40	e-4	s.SO191202A	1000	-	90,55	12,81
2	41	P1	Koproporphyrin III 10 µM 6h	0,001574	<b>0,280</b>	90,55	33,13
3	42	P2	Koproporphyrin III 20 µM 6h	0,005791	<b>0,50</b>	90,55	31,14
4	43	P3	Koproporphyrin III 40 µM 6h	0,007396	<b>1</b>	90,55	30,77
5	44	P4	<i>P. acnes</i> aktiv 6 h	0,004134	<b>2,51</b>	90,55	31,66
6	45	P5	<i>P. acnes</i> inaktiv 6 h	0,004483	<b>0,82</b>	90,55	31,53
7	46	P6	Leerwert	0,02205	<b>1</b>	90,55	29,11
8	47	H <sub>2</sub> O	Wasserkontrolle	-	-	-	-

Tabelle 23. Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für TNF nach Aldolase-Abgleich

	Koproporphyrin III 10 µM	Koproporphyrin III 20 µM	Koproporphyrin III 40 µM	<i>P. acnes</i> aktiv	<i>P. acnes</i> inaktiv	Kontrolle
GM-CSF	0,36	0,62	0,74	16,13	1,23	1
TNF	0,28	0,50	1,00	2,51	0,82	1
IL-1α	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0
IL-1β	0,32	0,40	1,00	10,34	4,13	1
IL-8	0,94	2,82	2,05	33,80	2,11	1
Aldolase	0,25	0,52	0,40	0,07	0,24	1

Tabelle 24. Relative mRNA-Menge der untersuchten Zytokine 6 Stunden nach Stimulation mit 10, 20, 40 µM Koproporphyrin III, aktiven und inaktiven *P. acnes* im Vergleich zum Leerwert (1)

### 3.5 Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um die Interaktionen von *P. acnes* mit Keratinozyten während der Induktion einer Immunantwort charakterisieren zu können wurden 3 Stunden und 6 Stunden nach der Beginn der Inkubation morphologische Untersuchungen angestellt.

#### 3.5.1 Lichtmikroskopische Analyse der Keratinozytenmorphologie im Kontrollansatz und nach Interaktion mit aktiven und hitzeinaktivierten *P. acnes*

Unstimulierte Keratinozyten zeigte eine regelrechte Morphologie ohne Anzeichen von Ödem oder Nekrose (Abb. 12 A). Ein ähnliches Bild fand sich auch nach Interaktion mit inaktivierten *P. acnes* (Abb. 12 B). Deutliche nekrotische Zeichen fanden sich sowohl 3 Stunden und 6 Stunden nach Stimulation mit aktiven *P. acnes* (Abb. 13).

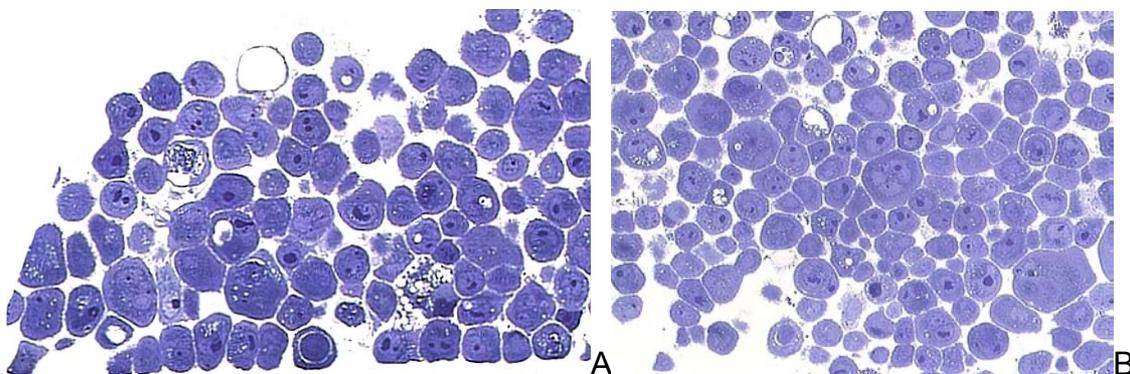


Abbildung 12 A, B. Intakte Morphologie von unstimulierten Keratinozyten und Keratinozyten 6 Stunden nach Stimulation mit inaktivierten *P. acnes*

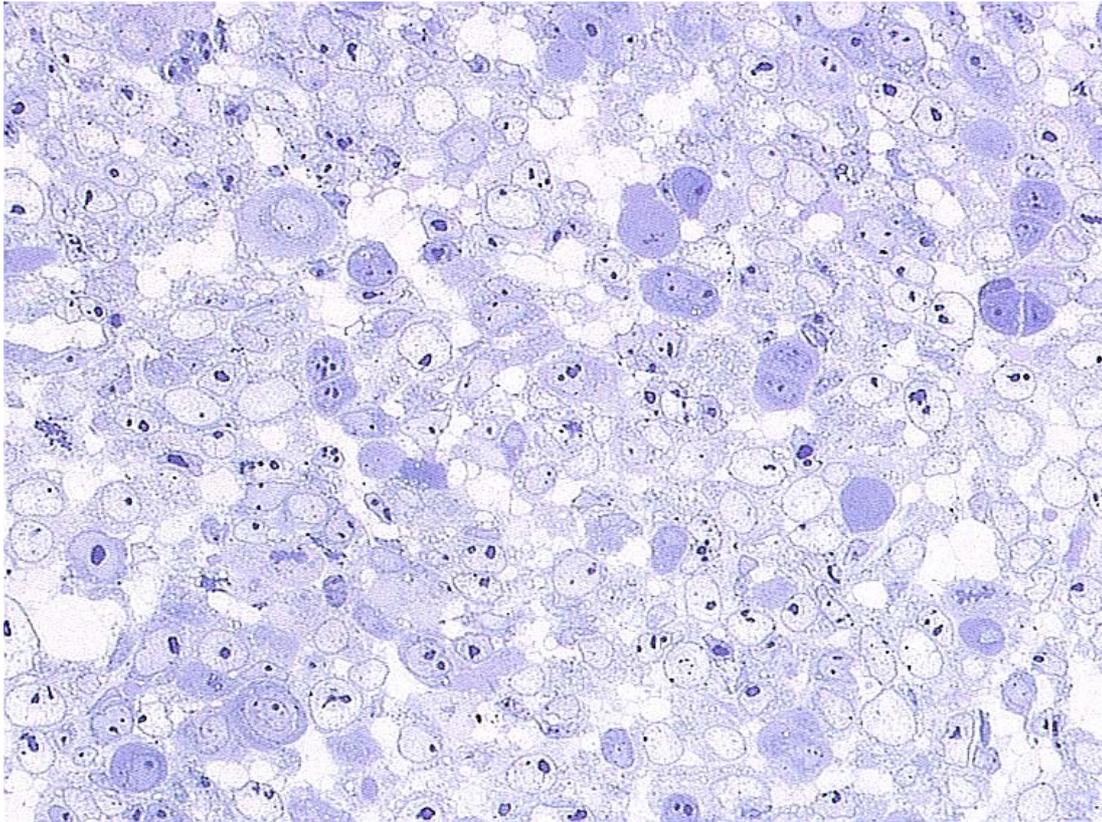


Abbildung 13. Deutliche Zeichen von Nekrose mit Ödem und Vakuolen 6 Stunden nach Stimulation mit aktiven *P. acnes*

### 3.5.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Interaktion von *P. acnes* und Keratinozyten

Ultrastrukturell bestätigten sich die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen. Unstimulierte Keratinozyten und Keratinozyten nach Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. acnes* zeigten morphologisch keine wesentliche Schädigung (Abb. 14, 15). Aktive *P. acnes* führten zu deutlichen nekrotischen Veränderungen der Keratinozyten. Die Struktur der Zellorganellen war verschwunden. Es fanden sich multiple Vakuolen und eine deutliche ödematöse Schwellung (Abb. 16). Insgesamt waren die Veränderungen nach 6 Stunden ausgeprägter als nach 3 Stunden.

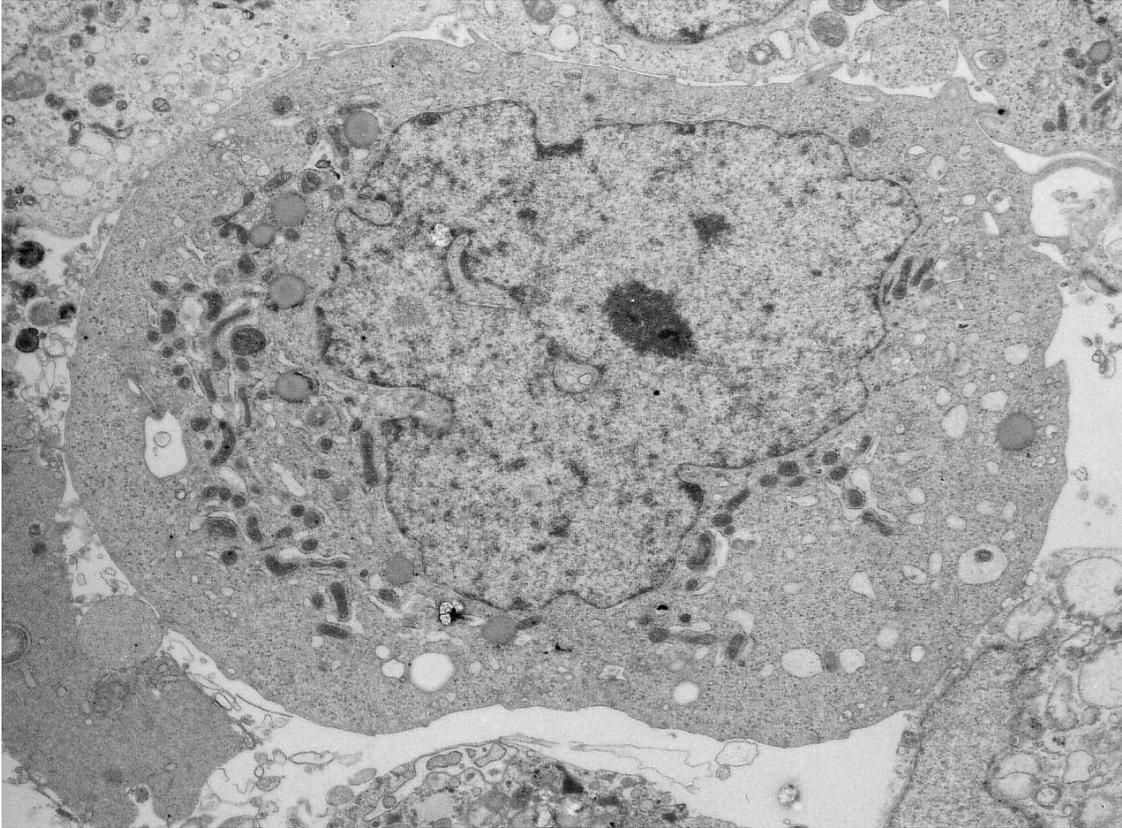


Abbildung 14. Intakte Morphologie eines unstimulierten Keratinozyten nach 6 Stunden mit deutlich sichtbaren Zellorganellen

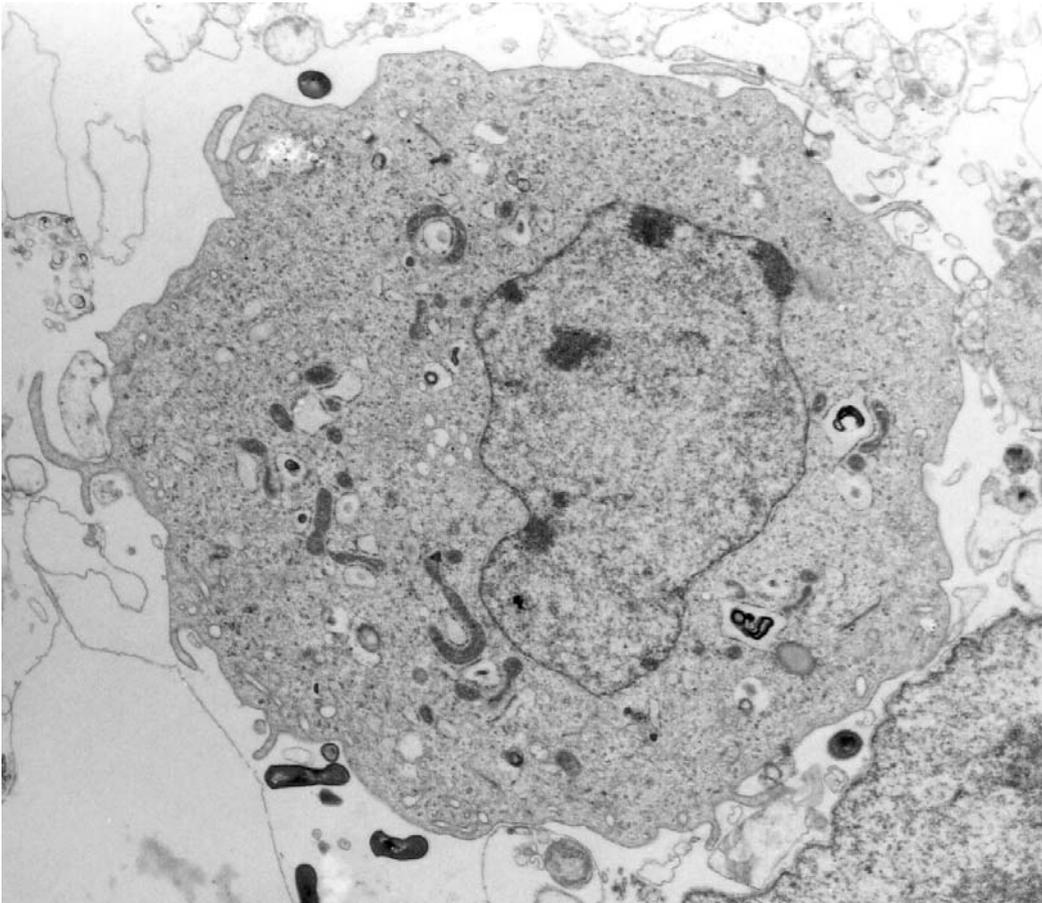


Abbildung 15. Intakte Morphologie der Keratinozyten 6 Stunden nach Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. acnes*. Keine Adhärenz oder Invasion durch die inaktivierten *P. acnes*

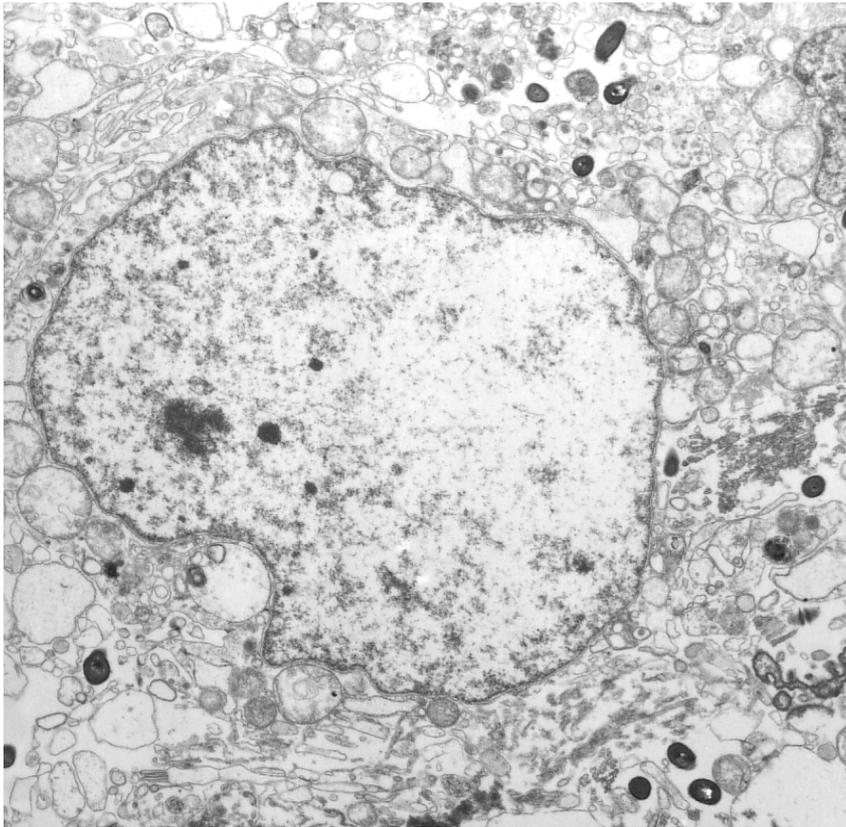


Abbildung 16. Deutliche Zeichen von Nekrose mit Ödem und Vakuolen 6 Stunden nach Stimulation mit aktiven *P. acnes*. Zahlreiche intrazelluläre Bakterien

#### 4 DISKUSSION

Neben den nicht entzündlichen Akneläsionen, den offenen und geschlossenen Komedonen, stehen klinisch als entzündlichen Effloreszenzen Papeln und Pusteln im Vordergrund. Für die entzündliche Exazerbation der Akne werden verschiedenen Faktoren und insbesondere von *P. acnes* produzierte Lipasen, Proteinasen und toxische Porphyrine verantwortlich gemacht (Plewig und Kligman; 2000). Für Auslösung einer Entzündungsreaktion sind immunmodulatorische Vorgänge wesentlich. Dies ist für die Interaktion von *P. acnes* mit Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen gut untersucht und nachgewiesen worden. So konnten Zellwandbestandteile von *P. acnes* Monozyten jedoch nicht Keratinozyten zur Expression von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF auf Proteinebene stimulieren (Vowels *et al.*, 1995; Walters *et al.*, 1995; Ingham *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2002). *P. acnes* führte zur Aktivierung von Lymphozyten (Jappe *et al.*, 2002), Makrophagen (Slijivic und Watson, 1977) und Komplement (Massey *et al.*, 1978, Webster *et al.*, 1978). Interaktion mit *P. acnes* führt ferner zur Sekretion chemoattraktiver Substanzen (Webster *et al.*, 1980; Gould *et al.*, 1979) und stimuliert die Hydrolasesekretion von Neutrophilen (Webster *et al.*, 1980). Nach neuesten Untersuchungen wird die Immunantwort menschlicher Monozyten und peritonealer Mausmakrophagen nach Stimulation mit *P. acnes* über Toll-Rezeptor 2 (Kim *et al.*, 2002) vermittelt. Während die Induktion einer Zytokinantwort für die Interaktion von Zellen des Immunsystems mit vitalen und hitzeinaktivierten *P. acnes* bestätigt wurde, konnte dies bisher für humaner Keratinozyten nach Stimulation mit *P. acnes* nicht nachgewiesen werden (Ingham *et al.*, 1998; Vowels *et al.*, 1995; Walters *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit war es erstmals möglich eine immunmodulatorische Aktivität während der Interaktion von *P. acnes* mit Keratinozyten auf Genebene nachweisbar. Mittels konventioneller RT-PCR fanden sich deutliche Hinweise für eine *P. acnes* vermittelte Aktivierung von IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF. In der Echtzeit-RT-PCR konnte diese immunmodulatorische Aktivität während der Interaktion von Keratinozyten und *P. acnes* für IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF bestätigt und exakt quantifiziert werden. Ferner wurde eine differentielle Expression auch

für das Chemokin GM-CSF nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war eine Stimulation der IL-1 $\alpha$  Genexpression von Keratinozyten durch die Interaktion mit *P. acnes* in der vorliegenden Arbeit ebenso wie in der Studie von Ingham *et al.* nicht nachweisbar (Ingham *et al.*, 1998). Die verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF und GM-CSF von Keratinozyten nach Interaktion mit *P. acnes* induziert die Expression vaskulärer und dermaler Adhäsionsfaktoren, führt zur Anlockung von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten und zur Expression anderer inflammatorischer Mediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten sind schon bei initialen entzündlichen Aknestadien in großer Zahl vorhanden (Norris *et al.*, 1988). In den vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals nachgewiesen werden, dass neben Makrophagen und peripheren mononukleären Zellen auch Keratinozyten einen wesentlichen Beitrag zur Anlockung von Lymphozyten und PMN und somit zur entzündlichen Immunantwort leisten. Die durch *P. acnes* stimulierte keratinozytäre Zytokinexpression moduliert die Qualität und Quantität der nachfolgenden Zytokinantwort immunogener Zellen wie Monozyten und Makrophagen und erweitert damit die pathogenetische Bedeutung des Keims für die Entstehung entzündlicher Akneeffloreszenzen (Holland *et al.*, 1998). Desweiteren weisen die Ergebnisse auf eine Mitbeteiligung des angeborenen Immunsystems an der Pathogenese der Akne hin (Koreck *et al.*, 2003). In den bisher publizierten Studien war die immunmodulatorische Aktivität von *P. acnes* nach Stimulation von Immunzellen unabhängig von der Vitalität und der Konzentration der Keime (Vowels *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit war nach Interaktion mit inaktiven *P. acnes* die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-8, GM-CSF und TNF von Keratinozyten im Vergleich zur Stimulation mit lebenden Keimen deutlich abgeschwächt. Dies deutet darauf hin, dass im Gegensatz zur Interaktion mit Monozyten oder Makrophagen beim Kontakt mit Keratinozyten auch aktiv produzierte Stoffwechselprodukte von *P. acnes* immunmodulatorisch von Bedeutung sein könnten. Die unterschiedlichen Induktionsmechanismen bei Keratinozyten und Monozyten/Makrophagen sind nachvollziehbar. So wäre es nicht sinnvoll, wenn die bloße Anwesenheit von *P. acnes* als Besiedelungskeim des Talgdrüsenfollikels unabhängig von Faktoren wie seiner Keimzahl oder Virulenz zu einer Immunantwort führen würde. Kommt

es jedoch zu einer starken Keimvermehrung und einer Anhäufung von extrazellulär sezernierten Proteinen so müssen Abwehrmechanismen eingeleitet werden. Die Zytokinexpression der Keratinozyten führt dann zur Anlockung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Im Gegensatz dazu bewirkte in der Literatur eine Interaktion von *P. acnes* mit Monozyten/Makrophagen eine sofortige Zytokinexpression unabhängig von der Vitalität oder Virulenz der Keime, da in diesem Stadium der fortgeschrittenen Infektion sofort Abwehrmechanismen notwendig sind. Die von *P. acnes* aktiv sezernierten Stoffwechselprodukte umfassen neben hydrolytischen Enzymen wie Lipasen und Proteinase auch Porphyrine. In vergleichenden Untersuchungen von *P. acnes* aus nicht entzündlicher seborrhoischer Haut und entzündlichen Akneläsionen zeigten *in vitro* die *P. acnes*-Stämme aus Akneläsionen sowohl eine höhere Porphyrinproduktion, insbesondere von Koproporphyrin III, als auch eine stärkere prozentuelle Abgabe von Porphyrinen an die Umgebung (Fanta *et al.*, 1978). Es wird diskutiert, dass Porphyrine, die durch die geschädigte Follikelwand von Komedonen ins Gewebe gelangen, in der Pathogenese der Acne vulgaris als Entzündungsfaktoren eine Rolle spielen. Sowohl unter *In-vivo*- als auch unter *In-vitro*-Bedingungen war *P. acnes* in der vorgelegten Arbeit in der Lage Porphyrine zu sezernieren mit Koproporphyrin III als der am stärksten sezernierten Fraktion. Diese Ergebnis entspricht dem der Mehrzahl der bisher vorliegenden mittels Fluorometrie und Papierchromatographie durchgeführten Analysen zur Porphyrinproduktion von *P. acnes* (Cornelius und Ludwig, 1967, McGinley *et al.*, 1980; Johnsson *et al.*, 1987). Auch in weiteren dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen wurde aus *P. acnes*-Kulturen und *in vivo* überwiegend Koproporphyrin III analysiert (Fanta *et al.*, 1978, Fanta *et al.*, 1981, Lee *et al.*, 1978; Melo und Johnson, 1982).

Die toxische Wirkung von Porphyrinen mit Ausbildung von Ödem, Entzündung und Blasen ist als klinisches Bild bei den kutanen Porphyrien gut bekannt. Da auch bei dem Krankheitsbild der Acne vulgaris entzündliche Aktivitäten vorhanden sind, war es naheliegend die entzündungsinduzierende Wirkung von Koproporphyrin III auf Keratinozyten zu untersuchen. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse induziert von *P. acnes* sezerniertes

Koproporphyrin III die Expression von IL-8 und trägt zur Anlockung von neutrophilen Granulozyten und damit zur Entzündungsreaktion bei.

Interaktion von *P. acnes* mit Keratinozyten führte zur Invasion und zu einer deutlichen Nekrose der Keratinozyten. *P. acnes* ist also in der Lage Keratinozyten zu schädigen und kann so nach Ruptur des Follikelepithels perifollikulär Porphyrine sezernieren und auch auf diesen Weg zur Entzündungsaktivität beitragen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

*P. acnes* wird als ein pathogenetischen Faktor für die Entzündungsinduktion innerhalb der multifaktoriellen Ätiologie der Acne vulgaris diskutiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass *P. acnes* die Zytokinexpression von Keratinozyten modulieren kann und so die Qualität und Quantität der frühen Immunantwort wesentlich mitbeeinflusst. Während im späteren zeitlichen Ablauf der Erreger-Wirts-Interaktion die immunmodulatorische Aktivität von *P. acnes* gegenüber Monozyten und Makrophagen schon früher gezeigt werden konnte (Ingham *et al.*, 1998; Ingham, 1999; Vowels *et al.*, 1995; Walters *et al.*, 1995) gelang dies erstmals bei Keratinozyten in der vorliegenden Arbeit. Durch die Stimulation der keratinozytären Expression von IL-1 $\beta$ , IL-8, GM-CSF und TNF können zu einem frühen Zeitpunkt der Interaktion mit dem Wirt wichtige entzündungsfördernde und chemoattraktive Reize gesetzt werden. Dadurch ist die Anwesenheit von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten und die schwere Entzündungsreaktion in Akneläsionen erklärbar. Die Abhängigkeit von Gen - Expressionsstärke und Keimvitalität legt eine Mitbeteiligung aktiv sezernierter Stoffwechselprodukte des Erregers an der immunmodulatorischen Aktivität nahe. Die Fähigkeit der Porphyrinproduktion von *P. acnes* ist als ein entzündungsfördernder Faktor in der Pathophysiologie der Acne vulgaris zu erwägen ist, da die hauptsächlich sezernierte Koproporphyrin III - Fraktion Keratinozyten zur Chemokinexpression (IL-8) stimuliert. Die Anwesenheit von *P. acnes* und der Porphyrine ermöglicht aber auch einen Ansatz in der Aknetherapie, da Porphyrine als photosensibilisierende Zusätze nach Bestrahlung Zellzerstörung induzieren können (Girotti, 1983) und somit eine potente zytotoxische Aktivität besitzen. Diese Eigenschaft kann zur photodynamischen Zerstörung von *P. acnes* genutzt werden und hat in ersten Studien mit Blaulicht auch eine klinische Wirksamkeit gezeigt (Kawada *et al.*, 2002; Ashkenazi *et al.*, 2003). Diese bakterizide Therapiealternative ist vor dem Hintergrund steigender Antibiotikaresistenzen von *P. acnes* in der Aknetherapie von besonderem Interesse (Ross *et al.*, 2001). Die morphologischen Untersuchungen zeigen eine deutliche nekrotischen Wirkung von *P. acnes* gegenüber Keratinozyten und unterstützen so die pathogenetische Bedeutung

dieses Keims für die Ruptur des Follikeleithels, die perifollikuläre Sekretion inflammatorisch wirksamer Substanzen und somit eine direkte Beteiligung an der Entstehung entzündlicher Akneläsionen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Akamatsu H, Komura J, Asada Y, Miyachi Y, Niwa Y (1991) Inhibitory effect of azelaic acid on neutrophil functions: a possible cause for its efficacy in treating pathogenetically unrelated diseases. *Arch Dermatol Res* 283: 162-166

Allaker RP, Greenman J, Osborne RH (1986) Histamine production by *Propionibacterium acnes* in batch and continuous culture. *Microbios* 48: 165-172

Allaker RP, Greenman J, Osborne RH (1987) The production of inflammatory compounds by *Propionibacterium acnes* and other skin organisms. *Br J Dermatol* 117: 175-183

Anderson RL, Cook CH, Smith DE (1976) The effect of oral and topical tetracycline on acne severity and on surface lipid composition. *J Invest Dermatol* 66: 172-177

Ashbee HR, Muir SR, Cunliffe WJ, Ingham E (1997) IgG subclasses specific to *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* in patients with acne vulgaris. *Br J Dermatol* 136: 730-733

Ashkenazi H, Malik Z, Harth Y, Nitzan Y (2003) Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35: 17-24

Becker LE, Bergstresser PR, Whiting DA, Clendenning WE, Dobson RL, Jordan WP, Abell E, LeZotte LA, Pochi PE, Shupack JL, Sigafos RB, Stoughton RB, Voorhees JJ (1981) Topical clindamycin therapy of acne vulgaris. *Arch Dermatol* 117: 482-485

Bommer S (1926) Hautuntersuchung in gefiltertem Quarzlicht. *Dermatol Wochenschr* 19: 637-643

Burke B, Eady EA, Cunliffe WJ (1983) Benzoyl peroxide versus topical erythromycin in the treatment of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 108: 199-204

Burkhart CG, Burkhart CN, Lehmann PF (1999) Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. *Postgrad Med J* 75: 328-331

Chen Q, Koga T, Uchi H, Hara H, Terao H, Moroi Y, Urabe K, Furue M (2002) Propionibacterium acnes-induced IL-8 production may be mediated by NF-kappaB activation in human monocytes. *J Dermatol Sci* 29: 97-103

Cornelius CE, Ludwig GD (1967) Red fluorescence of comedones: Production of porphyrins by *Corynebacterium acnes*. *J Invest Dermatol* 49: 368-370

Cunliffe WJ, Burke BM, Dodman B (1980) Chloramphenicol and benzoyl peroxide in acne. *Practitioner* 224: 952-954

Cunliffe WJ, Stainton C, Forster RA (1983) Topical benzoyl peroxide increases the sebum excretion rate in patients with acne. *Br J Dermatol* 109: 577-579

Cunliffe WJ (1987) Evolution of a strategy for the treatment of acne. *J Am Acad Dermatol* 16: 591-599

Cunliffe WJ (1993) Mikrobiologie der Akne. In: Cunliffe WJ. Akne. Hippokrates GmbH, Stuttgart, pp 179-200

Dalton AJ (1955) A chrome-osmium fixative for elektron microscopy. *Anat Rec* 121: 281

Dobson RL, Belknap BS (1980) Topical erythromycin solution in acne. *J Am Acad Dermatol* 3: 478-482

Doss M (1969) Trennung, Isolierung und Bestimmung von Proto-, Korpo-, Pentacarboxy-, Hexacarboxy-, Heptacarboxy- und Uroporphyrin. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 350: 499-502

Doss MO (1974) Porphyrins and porphyrin precursors. In: Curtius HC, Roth M (eds) Clinical biochemistry – principles and methods. Walter de Gruyter, Berlin, pp 1323-1371

Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Strauss JS (1986) Essential fatty acids and acne. J Am Acad Dermatol 14: 221-225

Eaves G, Greenman J, Holland KT (1979) Decay rates of exocellular enzymes produced by bacteria – correction of production rates in chemostat cultures. FEMS Microbiol Lett 6: 333-336

Ehteshamuddin AFM (1968) Anaerobic formation of protoporphyrin IX from coroporphyrinogen III by bacterial preparations. Biochem J 107: 446-447

Esterly NB, Koransky JS, Furey NL, Trevisan M (1984) Neutrophil chemotaxis in patients with acne receiving oral tetracycline therapy. Arch Dermatol 120: 1308-1313

Fanta D, Formanek I, Poitschek Ch, Thurner J (1978) Die Porphyrinproduktion des *Propionibacterium acnes* bei Acne und Seborrhoe. Arch Dermatol Res 261: 175-179

Fanta D, Formanek I, Poitschek Ch, Thurner J (1981) Die Porphyrinproduktion der Propionibakterien in Abhängigkeit von externen Einflüssen. Arch Dermatol Res 271: 127-133

Formanek I, Fanta D, Poitschek Ch, Thurner J (1977) Porphyrinproduktion des *Propionibacterium acnes*. Arch Dermatol Res 259: 169-176

Freinkel RK (1969) Pathogenesis of acne vulgaris. N Engl J Med 280: 1161-1163

Fulton JE Jr, Farzad-Bakshandeh A, Bradley S (1974) Studies on the mechanism of action of topical benzoyl peroxide and vitamin A acid in acne vulgaris. J Cutan Pathol 1: 191-200

Gilchrist TC (1900) A bacterial and microscopical study of over three hundred vesicular and pustular lesions of the skin with a research upon the etiology of acne. Johns Hopkins Hosp Rep IX: 408-430

Girotti AW (1983) Mechanism of photosensitization. Photochem Photobiol 38: 745-751

Gloor M, Kraft H, Franke M (1978) Effectiveness of topically applied antibiotics on anaerobic bacteria in the pilosebaceous duct. Dermatologica 157: 96-104

Goldstein JA, Pochi PE (1981) Failure of benzoyl peroxide to decrease sebaceous gland secretion in acne. Dermatologica 162: 287-281

Gould DJ, Ingham E, Gowland G, Cunliffe WJ (1979) Leukocyte chemotaxis in acne vulgaris: The role played by *Propionibacterium acnes* and host factors. Br J Dermatol 101: 104

Graupe K, Cunliffe WJ, Gollnick HP, Zaumseil RP (1996) Efficacy and safety of topical azelaic acid ( 20 percent cream ): An overview of results from European clinical trials and experimental reports. Cutis 57: 20-35

Greenman J, Holland KT, Cunliffe WJ (1983) Effects of pH on biomass, maximum specific growth rate and extracellular enzyme production by three species of cutaneous propionibacteria grown in continuous culture. J Gen Microbiol 129: 1301-1307

Greenman J, Holland KT (1985) Effects of dilution rate on biomass and extracellular enzyme production by three species of cutaneous *Propionibacteria* grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 131: 1619-1624

Greenwood R, Burke B, Cunliffe WJ (1986) Evaluation of a therapeutic strategy for the treatment of acne vulgaris with conventional therapy. *Br J Dermatol* 114: 353-358

Gribbon EM, Shoesmith JG, Cunliffe WJ, Holland KT (1994) The Microaerophily and photosensitivity of *Propionibacterium acnes*. *J Appl Bacteriol* 77: 583-590

Gummins CS, Jonson JL (1986) The Genus *Propionibacterium*. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, pp 1894-1902

Holland KT, Ingham E, Cunliffe WJ (1981) The Microbiology of Acne. *J Appl Bacteriol* 51: 195-215

Holland KT, Holland DB, Cunliffe WJ, Cutcliffe AG (1993) Detection of *Propionibacterium acnes* polypeptides which have stimulated an immune response in acne patients but not in normal individuals. *Exp Dermatol* 2: 12-16

Holland KT, Aldana O, Bojar RA, Cunliffe WJ, Eady EA, Holland DB, Ingham E, McGeown C, Till A, Walters C (1998) *Propionibacterium acnes* and acne. *Dermatology* 196: 67-68

Hoppe-Seyler F (1871) Das Hämatin. *Tübinger Med-Chem Untersuchungen* 4: 523-533

Ingham E, Holland KT, Gowland G, Cunliffe WJ (1983) Studies of the extracellular proteolytic activity produced by *Propionibacterium acnes*. *J Appl Bacteriol* 54: 263-271

Ingham E, Walters CE, Eady EA, Cove JH, Kearney JN, Cunliffe WJ (1998) Inflammation in acne vulgaris: failure of skin micro-organisms to modulate keratinocyte interleukin 1 alpha production in vitro. *Dermatology* 196: 86-88

Ingham E (1999) The immunology of *Propionibacterium acnes* and acne. *Curr Opin Infect Dis* 12: 191-197

Jacob K (1992) Porphyrins. In: Heftmann E (ed) *Chromatography, fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods*. Elsevier, Amsterdam, pp 336-359

Jacob K, Demant T (1998) Diagnostik und Klinik der Porphyrinen. *Münch Med Wochenschr* 140: 52-57

Jacobs NJ, Jacobs JM, Brent P (1970) Formation of protoporphyrin from Coproporphyrinogen in extracts of various bacteria. *J Bacteriol* 102: 398-403

Jain A, Sangal L, Basal E, Kaushal GP, Agarwal SK (2002) Anti-inflammatory effects of erythromycin and tetracycline on *Propionibacterium acnes* induced production of chemotactic factors and reactive oxygen species by human neutrophils. *Dermatol Online J* 8: 2

Jappe U, Ingham E, Henwood J, Holland KT (2002) *Propionibacterium acnes* and inflammation in acne; *P. acnes* has T-cell mitogenic activity. *Br J Dermatol* 146: 202-209

Johnson JL, Cummins CS (1972) Cell wall composition and desoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria and strains of *Arachnia propionica*. *J Bacteriol* 109: 1047-1066

Johnsson A, Kjelstad B, Melo TB (1987) Fluorescence from pilosebaceous follicles. *Arch Dermatol Res* 279: 190-193

Jordan PM (1991) The biosynthesis of 5-aminolaevulinic acid and its transformation into uroporphyrinogen III. In: Jordan PM (ed) *Biosynthesis of tetrapyrrools*. Elsevier, New York, pp 1-59

Kanaar P (1971) Lipolysis of skin-surface lipids of acne vulgaris patients and healthy controls. *Dermatologica* 143: 121-129

Kawada A, Aragane Y, Kameyama H, Sangen Y, Tezuka T (2002) Acne phototherapy with a high-intensity, enhanced, narrow-band, blue light source: an open study and in vitro investigation. *J Dermatol Sci* 30: 129-135

Keller PJ, Fetz A, Schar A, Floersheim Y (1978) The treatment of acne and seborrhoea with anti-androgens. *Schweiz Med Wochenschr* 108: 1640-1642

King K, Jones DH, Daltrey DC, Cunliffe WJ (1982) A double-blind study of the effects of 13-cis-retinoic acid on acne, sebum excretion rate and microbial population. *Br J Dermatol* 107: 583-590

Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, Brightbill HD, Holland D, Cunliffe WJ, Akira S, Sieling PA, Godowski PJ, Modlin RL (2002) Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol* 169: 1535-1541

Köhler W, Eggert HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (2001) Die Familie der Propionibacteriaceae. In: Köhler W, Eggert HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie*. Urban & Fischer, München Jena, pp 406-407

Koreck A, Pivarcsi A, Dobozy A, Kemeny L (2003) The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. *Dermatology* 206: 96-105

Lee WS, Shalita AR, Poh-Fitzpatrick MB (1978) Comparative studies of porphyrin production in *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum*. J Bacteriol 133: 811-815

Leyden JJ, McGinley KJ (1982) Effect of 13-cis-retinoic acid on sebum production and *Propionibacterium acnes* in severe nodulocystic acne. Arch Dermatol Res 272: 331-337

Leyden JJ (1985) Absorption of minocycline hydrochloride and tetracycline hydrochloride. Effect of food, milk and iron. J Am Acad Dermatol 12: 308-312

Lindl T, Bauer J (1989) Zell- und Gewebekultur. In: Lindl T, Bauer J. (Hrsg) Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer, Stuttgart, 2. Auflage

Marples RR, McGinley KJ (1974) *Corynebacterium acnes* and other anaerobic diptheroids from human skin. J Med Microbiol 7: 349-357

Marsden JR (1985) Evidence that method of use, dose and duration of treatment with benzoyl peroxide and tetracycline determines response of acne. J R Soc Med 78: 25-28

Martin DW (1987) Porphyrine und Gallenpigmente. In: Harper HA, Grodsky GM, Nestle M (Hrsg) Medizinische Biochemie . Springer, Berlin, pp 364-371

Massey A, Mowbray JF, Noble WC (1978) Complement activation by *Corynebacterium acnes*. Br J Dermatol 98: 583-587

Matta M (1974) Carriage of *Corynebacterium acnes* in school children in relation to age and race. Br J Dermatol 91: 557-561

Mayer da Silva A, Gollnick H, Imcke E, Orfanos CE (1987) Acelaic acid vs placebo: effects on normal human keratinocytes and melanocytes. Acta Dermato Venereol (Stockh) 67: 116-123

McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ (1980) Facial follicular porphyrin fluorescence: Correlation with age and density of *Propionibacterium acnes*. Brit J Dermatol 102: 437-441

Melnik B, Plewig G (1988) Neue lipidbiochemische Aspekte in der Pathogenese der folliculären Verhornungsstörung bei Acne vulgaris. Z Hautkr 63: 591-596

Melo TB, Johnson M (1982) *In vivo* porphyrin fluorescence from *Propionibacterium acnes*. A characterization of the fluorescing pigments. Dermatologica 164: 167-174

Meyer VR (1990) Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie. Sale, Frankfurt am Main, pp 1-36

Mills OH, Marples RR, Kligman AM (1981) Acne vulgaris. Oral therapy with tetracycline and topical therapy with Vitamin A acid. Arch Dermatol 106: 200-203

Miskin JE, Farrell AM, Cunliffe WJ, Holland KT (1997) *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. Microbiology 143: 1745-1755

Mori M, Sano S (1972) Studies on the formation of protoporphyrin IX by anaerobic bacteria. Biochim Biophys Acta 264: 252-262

Niebauer G, Gschwandtner WR, Reichel K, Münzberger H (1973) Vortrag anlässlich der 1. Jahressitzung der ADF, Düsseldorf

Orla-Jensen S (1909) Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infekt Hyg Abt II 22: 305-346

Pastinszky I, Rácz I (1974) Die Hautsymptome der Stoffwechselkrankheiten. In: Pastinszky I, Rácz I (Hrsg) Hautveränderungen bei inneren Krankheiten. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 529-540

Pedace FJ, Stoughton R (1971) Topical retinoic acid in the treatment of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 84: 465-469

Petrides PE (1998) Häm und Gallenfarbstoffe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, pp 602-619

Piomelli S (1973) A micromethod for free erythrocyte porphyrins: The FEP test. *J Lab Clin Med* 81: 932-940

Plewig G, Petrozzi J, Berendes U (1970) Double-blind study of Doxycycline in acne vulgaris. *Arch Dermatol* 101: 435-438

Plewig G, Wagner A (1981) Anti-inflammatory effects of 13-Cis-retinoic acid. An in vivo study. *Arch Dermatol Res* 270: 89-94

Plewig G, Kligman AM (2000) *Acne and Rosacea*. 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin

Reisner PM, Silver Z, Puvel M, Sternberg H (1968) Lipolytic activity of *Corynebacterium acnes*. *J Invest Dermatol* 51: 190-196

Romiti R, Schaller M, Jacob K, Plewig G (2000) High performance liquid chromatography analysis of porphyrins in *Propionibacterium acnes*. *Arch Dermatol Res* 292: 320-323

Ross JI, Snelling AM, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Leyden JJ, Collignon P, Dréno B, Reynaud A, Fluhr J, Oshima S (2001) Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia. *Br J Dermatol* 144: 339-346

Rupniak HT, Rowlatt C, Lane EB, Steele JG, Trejdosiewicz LK, Laskiewicz B, Povey S, Hill BT (1985) Characteristics of four new human cell lines

derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. J Nat Cancer Inst 75: 621-635

Saint-Leger D, Bague A, Cohen E, Chivot M (1986) A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. I. *In vitro* study of squalene oxidation. Br J Dermatol 114: 535-542

Sabouraud PR (1897) La seborrhée grasse et le pelade. Ann Inst Pasteur Microbiol 11 : 134-159

Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC (2002) Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. J Invest Dermatol 118: 652-657

Shroot B (1998) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of topical adapalene. J Am Acad Dermatol 39: 17-24

Schutte H, Cunliffe WJ, Forster RA (1982) The short-term effects of bezoyl peroxide lotion on the resolution of inflamed acne lesions. Br J Dermatol 106: 91-94

Shalita AR (1974) Genesis of free fatty acids. J Invest Dermatol 62: 332-335

Sljivic VS, Watson SR (1977) The adjuvant effect of *Corynebacterium parvum*: T-cell dependence of macrophage activation. J Exp Med 145: 45-57

Soret JL (1883) Recherches sur l'absorption des rayons ultraviolets par diverses substances. Arch Sci Phys Nat 10: 430-485

Stewart ME, Benoit AM, Downing DT, Strauss JS (1984) Suppression of Sebum secretion with 13-cis-retinoic acid: effect on individual skin surface lipids and implications for the anatomic origin. J Invest Dermatol 82: 74-78

Thudichum JDW (1867) Report on researches intended to promote an improved chemical identification of disease. 10<sup>th</sup> Report of the Medical Officer, Privy Council, Appendix 7: 152-195, 200, 227-233, HMSO, London

Unna PG (1894) Die Histopathologie der Hautkrankheiten. Hirschwald, Berlin, pp 348-361

Van Baar HMJ, Van der Kerkhof PCM, Mier PD, Happle R (1987) Tetracyclines are potent scavengers of the superoxide radical. Br J Dermatol 117: 13-14

Voet D, Voet JG (1994) Aminosäurestoffwechsel. In: Voet D, Voet JG (Hrsg) Biochemie. VCH, Weinheim, SS 704-709

Vowels BR, Yang S, Leyden JJ (1995) Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. Infect Immun 63: 3158-3165

Webster GF, Leyden JJ, Normann ME, Nilson UR (1978) Complement activation in acne vulgaris: in vitro studies with *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum*. Infect Immun 22: 523-529

Webster GF, Leyden JJ, Tsai CC, Baehni P, McArthur WP (1980) Polymorphonuclear leukocyte lysosomal release in response to *Propionibacterium acnes* in vitro and its enhancement by sera from inflammatory acne patients. J Invest Dermatol 74:398-401

Webster GF, Indrisano JP, Leyden JJ (1985) Antibody titers to *Propionibacterium acnes* cell wall carbohydrate in nodulocystic acne patients. J Invest Dermatol 84: 496-500

Wertz PW, Cho ES, Downing DT (1983) Effect of essential fatty acid deficiency on the epidermal sphingolipids of the rat. Biochim Biophys Acta 753: 350-355

Wertz PW, Miethke MC, Long SA, Strauss JS, Downing DT (1985) The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J Invest Dermatol* 84: 410-412

Whiteside JA, Voss JG (1973) Incidence and lipolytic activity of *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium acnes* Group I) and *Propionibacterium granulosum* (*Corynebacterium acnes* Group II) in acne and in normal skin. *J Invest Dermatol* 60: 94-97

With TK (1980) A short history of porphyrins and the porphyrias. *Int J Biochem* 11: 189-200

Wolff HH, Plewig G (1976) Ultrastruktur der Mikroflora in Follikeln und Komedonen. *Hautarzt* 27: 432-440

## 7 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Gerd Plewig möchte ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Leitung und fachliche Unterstützung danken. Zusätzlich möchte ich mich für die Ermöglichung der vorliegenden Promotion durch die Bereitstellung der Forschungsstätte und Forschungsmittel bedanken.

Herrn Professor. Dr. med. Karl Jacob danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und die gute Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Frau Dr. Claudia Borelli und Herrn Oberarzt Privatdozent Dr. med. Martin Schaller danke ich sehr herzlich für die gute Betreuung, die fachliche Unterstützung und die anregende Kritik bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Ich danke Frau Barbisch-Syr, Medizinische Kosmetikerin der Klinik, für ihre Hilfe und Mitarbeit bei der Sammlung der Proben und Herrn Egeler, Medizinisch-technischer Assistent, für die Verarbeitung der Proben im Institut für Klinische Chemie.

Mein Dank gilt auch den Medizinisch-technischen Assistentinnen aus dem elektronenmikroskopischen und bakteriologischen Laboratorien der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Klinikum der Universität München für die freundliche Unterstützung.

Allen Probanden, die sich für die Untersuchungen zur Verfügung stellten, ein besonderes Dankeschön.

## 8           LEBENS LAUF

### Personalien

Name	Melitta Löwenstein
Geburtsdatum	01. Oktober 1974
Geburtsort	Toljatti
Familienstand	ledig
Vater	Alexander Löwenstein Elektroinstallateur
Mutter	Klaudia Löwenstein, geb. Kostina KFZ-Mechanikerin

### Schulischer Werdegang

1981-1991	Mittelschule, Toljatti
-----------	------------------------

### Universitärer Werdegang

1991-1994	Lomonosow Universität, Moskau Studium der Humanmedizin Fachkommunikationsstudium mit Schwerpunkt Wirtschaft, Geschichte, Kultur und Politik Deutschlands
1995-2001	Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität München
24.03.1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.03.2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24.04.2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Berufstätigkeit

seit 01.03.2002 Ärztin im Praktikum in  
der Praxis Prof. Dr. med. Jost von  
Mayenburg, München