

ulm university universität
uulm

Propionibacterium acnes: Einfluss von Lipiden und aktiven Inhaltsstoffen auf Wachstum und Expression von Pathogenitätsfaktoren sowie Konstruktion von Deletionsmutanten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von
Thomas Rimpf
aus Giengen/Brenz

Ulm, April 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Dürre durchgeführt.

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Axel Groß
1. Referent:	Prof. Dr. Peter Dürre
2. Referent:	Prof. Dr. Bernhard Eikmanns

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

2 Material und Methoden **5**

2.1 Chemikalien, Enzyme, Materialien und Geräte 5

2.1.1 Chemikalien 5

2.1.2 Spezielle Chemikalien und Enzyme 5

2.1.3 Molekularbiologische Hilfsmittel 7

2.1.4 Geräte und Materialien 7

2.2 Mikroorganismen, Plasmide und Oligodesoxynukleotide 11

2.2.1 Mikroorganismen 11

2.2.2 Plasmide 12

2.2.3 Oligodesoxynukleotide 12

2.3 Puffer und Lösungen 19

2.4 Zellanzucht 25

2.4.1 Nährmedien 26

2.4.2 Medienzusätze 30

2.4.3 Stammhaltung 33

2.4.4 Kultivierungsbedingungen 33

2.4.5 Bestimmung von Wachstumsparametern 35

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren 35

2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus Mikroorganismen 36

2.5.1.1 Isolierung chromosomaler DNA 36

2.5.1.2 RNA-Isolierung aus *P. acnes* 36

2.5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 37

2.5.2 Reinigung von Nukleinsäuren 38

2.5.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 38

2.5.2.2 Reinigung von DNA-Fragmenten 38

2.5.2.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen 39
2.5.3 Fällen und Konzentrieren von Nukleinsäuren 39
2.5.3.1 Fällung mit Alkohol 39
2.5.3.2 Trocknen von Sedimenten in einer Vakuumzentrifuge . . 39
2.5.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 40
2.5.4 Färben von Nukleinsäuren in Agarosegelen 40
2.5.5 Trennung von Nukleinsäurefragmenten 40
2.5.5.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese 40
2.5.5.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese 41
2.5.6 Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion . . . 41
2.5.6.1 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) 41
2.5.6.2 „Touch-Down“-PCR 42
2.5.6.3 Gradienten-PCR 43
2.5.6.4 „PuReTaq^{TM} Ready To Go beads“ 43
2.5.6.5 „Cross-over“-PCR 43
2.5.6.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion 44
2.5.6.7 quantitative „Real-Time“-Polymerasekettenreaktion . . . 45
2.5.7 Enzymatische Modifikation von DNA 46
2.5.7.1 Restriktionsspaltung von DNA 46
2.5.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten 47
2.5.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten 47
2.5.7.4 TA-Klonierung 47
2.5.8 Sequenzierung von DNA 48
2.6 „Northern blot“-Verfahren 49
2.6.1 Herstellung markierter DNA-Sonden 49
2.6.1.1 Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten („DIG“-Markierung) 49
2.6.1.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten 49
2.6.2 Vakuumtransfer von RNA auf Nylonmembranen 49
2.6.3 Hybridisierung von RNA 50
2.6.3.1 Hybridisierung von RNA mit Digoxigenin-markierten Sonden 50
2.6.3.2 Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten Sonden 50
2.6.4 Detektion von RNA 51
2.6.4.1 Detektion von Digoxigenin-markierten Sonden 51

2.6.4.2 Detektion von radioaktiv markierten Sonden 51
2.7 „Dot blot“-Verfahren 52
2.8 DNA-Transfer in Bakterien 52
2.8.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* K12 DH5α-Zellen 52
2.8.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* K12 HB101-Zellen 52
2.8.3 Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen 53
2.8.4 Herstellung elektrokompetenter *P. acnes*-Zellen 53
2.8.5 Transformation elektrokompetenter *P. acnes*-Zellen 54
2.9 α-Komplementation (Blau-Weiß-Selektion) 54
2.10 Hämolysetest 55
2.11 Konstruktion von Deletionsmutanten in *P. acnes* 55
2.12 AMES-Test 56
2.12.1 Anzucht des Teststamms 56
2.12.2 Vorinkubation der zu testenden Substanzen 57
2.12.3 Plattierung und Inkubation 57

3 Ergebnisse **59**
3.1 Sequenzierung 59
3.2 Wachstum von *P. acnes* 60
3.2.1 Wachstum von *P. acnes* allgemein 60
3.2.2 Einfluss aktiver Inhaltsstoffe 61
3.2.2.1 vollständige Hemmung des Wachstums 62
3.2.2.2 kein bzw. geringer Einfluss auf das Wachstum 62
3.2.2.3 Hemmung des Wachstums mit steigender Konzentration 62
3.3 Einfluss aktiver Inhaltsstoffe auf das Wachstum von *P. acnes* und weiterer Hautkeime 65
3.3.1 Wachstum von *P. acnes* 67
3.3.2 Wachstum von *S. aureus* 68
3.3.3 Wachstum von *S. epidermidis* 69
3.3.4 Wachstum von *C. xerosis* 70
3.3.5 Wachstum von *M. furfur* 71
3.4 Minimale Hemmkonzentration 72
3.5 AMES-Test 74
3.6 Transkriptionsstudien 78
3.6.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)-Studien 78

3.6.2 Quantitative „Real-Time“-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)-Studien (LightCycler®) . . . 87
3.7 „Northern-/Dot blot“-Analysen . . . 106
3.8 Deletionsmutanten in *P. acnes* . . . 107
3.8.1 Wachstum von *P. acnes* unter verschiedenen Bedingungen . . . 107
3.8.2 Konstruktion der Plasmide . . . 107
3.8.3 Transformation von *P. acnes* . . . 110
3.8.4 Charakterisierung von Deletionsmutanten in *P. acnes* . . . 112
3.8.4.1 Etablierung der Deletion in *P. acnes* . . . 112
3.8.4.2 Wachstum der Deletionsmutanten . . . 113
3.8.4.3 Transkriptionsstudien der Deletionsmutanten . . . 115
3.8.4.4 Hämolysetest der Deletionsmutanten . . . 115

4 Diskussion **117**
4.1 Akne . . . 118
4.1.1 Krankheitsbild der Akne . . . 118
4.1.2 Therapie der Akne . . . 119
4.1.3 Hautflora . . . 119
4.2 Sequenzierungen . . . 121
4.3 Wachstumsversuche . . . 122
4.3.1 Eigenschaften der Substanzen . . . 122
4.3.2 Wachstum von *P. acnes* . . . 125
4.3.3 Wachstum weiterer Hautkeime . . . 126
4.4 Minimale Hemmkonzentration . . . 126
4.5 AMES-Test . . . 127
4.6 Transkriptionsanalysen potentieller Pathogenitätsfaktoren . . . 129
4.6.1 Eigenschaften der potentiellen Pathogenitätsfaktoren . . . 129
4.6.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)-Studien 130
4.6.3 Quantitative „Real-Time“-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)-Studien (LightCycler®) . . . 131
4.7 „Northern blot“- /„Dot blot“-Analysen . . . 133
4.8 Erstellung von Deletionsmutanten in *P. acnes* . . . 133
4.8.1 Konstruktion der Plasmide für die Deletion potentieller Pathogenitätsfaktoren . . . 134
4.8.2 Transformationseffizienz von *P. acnes* . . . 135

4.8.3 Charakterisierung der Deletionsmutanten in *P. acnes* 136
4.9 Ausblick 138

5 Zusammenfassung **139**

6 Summary **141**

7 Literaturverzeichnis **143**

8 Anhang **157**
8.1 Einfluss aktiver Inhaltsstoffe auf das Wachstum von *P. acnes* 157
8.1.1 Vollständige Hemmung des Wachstums 157
8.1.2 Kein bzw. geringer Einfluss auf das Wachstum 159
8.1.3 Hemmung des Wachstums mit steigender Konzentration 164
8.2 Daten und Grafiken der Transkriptionsstudien 168
8.2.1 Wachtumsversuche zu den RT-PCR-Studien 168
8.2.2 Wachtumsversuche zu den qRT-PCR-Studien 169
8.2.3 cp-Werte qRT-PCR-Studien 170
8.3 Weitere Informationsquellen 172
8.4 Größenstandards 172

9 Danksagung **173**

Akronyme

Abkürzungen

A	Adenin, eine der vier Basen der DNA; Absorption
aA	auf Aktien
AG	Aktiengesellschaft
Ap^{r}	Ampicilinresistenz
ASE	Acetat-SDS-EDTA-Puffer
ATP	Adenosintriphosphat
BHIS	*Brain-Heart-Infusion-Sorbitol*, ein Komplexmedium
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, eine der vier Basen der DNA
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Petersen
cDNA	komplementäre DNA (*complementary DNA*)
Co.	Kompanie (*Compagnie*)
cp	*crossing point*
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro(l,2-dioxethan-3,2′-(5′-chloro)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dekan)-4-yl)phenylphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin-11-2′-deoxyuridin-5′-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5′-triphosphat

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Braunschweig
DTT	1,4-Dithiothreit
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetat)
et al.	und andere (*et alii*)
F	Feldstärke
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s) (*gravity*)
G	Guanin, eine der vier Basen der DNA
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Inc.	Aktiengesellschaft (*incorporated*)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KG	Kommanditgesellschaft
Km^r	Kanamycinresistenz
λ	Wellenlänge
LB	*Luria Broth*, ein Komplexmedium
MAE	MOPS-Acetat-EDTA-Puffer
MHK	minimale Hemmkonzentration
M-MuLV	reverse Transkriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus*)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (*messenger RNA*)
$NADP^+$	Nicotinsäureamidadenindinukleotid-Phosphat
n. g.	nicht gewachsen
OD	optische Dichte
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (*Organisation for Economic Co-operation and Development*)
ori	Ursprung (z. B. *origin of replication*)
Oy	Aktiengesellschaft (*Osakeyhtiö*)
p	Plasmid
PCR	Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PYG	*Peptone-Yeast-Glucose*, ein Komplexmedium

qRT	quantitative „Real-Time“
®	eingetragenes Warenzeichen (*registered*)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rrs	RNA Anteil der kleinen Untereinheit der Ribosomen (*ribosomal RNA small*)
RT	Reverse Transkriptase
SAP	alkalische Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase*)
SDS	Natriumdodecylsulfat (*Sodiumdodecylsulfate*)
SOC	*Super Optimal Broth C*, ein Komplexmedium
SSC	Natrium-Saline-Citrat-Puffer (*Sodium Saline Citrate*)
T	Thymin, eine der vier Basen der DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	*Thermus aquaticus*-Polymerase
TB	*Terrific Broth*, ein Komplexmedium
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
T_m	Schmelztemperatur
™	Warenzeichen (*trademark*)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	*Trypticase Soy Broth*, ein Komplexmedium
U	Uracil
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
z. B.	zum Beispiel

Einheiten

A	Ampere, Einheit der elektrischen Stromstärke
Bq	Becquerel, Einheit der Aktivität
Bp	Basenpaare

°C	Grad Celsius, Einheit der Temperatur
F	Farad, Einheit der elektrischen Kapazität
g	Gramm
J	Joule, Einheit der elekrischen Energie
l	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
mol	Mol ($6{,}022 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
Ω	Ohm, Einheit des elektrischen Widerstandes
Pa	Pascal, Einheit des Drucks
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (*potentia Hydrogenii*)
s	Sekunde(n)
U	Einheit (*unit*), Aktivitätsangabe bei Enzymen
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt, Einheit der elektrischen Spannung
W	Watt, Einheit der elektrischen Leistung

Einheitenpräfixe

k	kilo	10^{3}
c	centi	10^{-2}
m	milli	10^{-3}
µ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
p	piko	10^{-12}

1 Einleitung

Die Gattung *Propionibacterium* gehört mit der Gattung *Eubacterium* zur Familie *Propionibacteriaceae*, die der Gruppe der Actinomyceten zugeordnet wird. 1863 beschrieb Unna ein coryneformes Bakterium, welches aus Akne-Patienten isoliert wurde, und bezeichnete es als Aknebacillus. 1897 gelang Sabouraud erstmalig die Kultivierung dieses Bakteriums in einer Kultur. 1923 nannten Bergey *et al.* das Aknebacillus aufgrund morphologischer Eigenschaften *Corynebacterium parvum*. 1946 erfolgte durch Douglas und Gunter aufgrund der Fähigkeit, Propionsäure zu fermentieren, die bis heute gültige Namensgebung als *Propionibacterium acnes* (Funke *et al.*, 1997). Bei *P. acnes* sind die drei Gruppen I (mit den Untergruppen Ia und Ib), II und III bekannt und können aufgrund serologischer, biochemischer und phylogenetischer Analysen unterschieden werden (McDowell *et al.*, 2008, McDowell *et al.*, 2005).

P. acnes wurde aus Hautproben von Akne-Patienten isoliert. Es sitzt in den Ausführungsgängen der Talgdrüsen und der Haare, wurde jedoch auch in der Bindehaut, Mundschleimhaut und auf Gelenkprothesen nachgewiesen. Auch an anderen Krankheiten wie Herzinnenhautentzündung, Infektion der Augenkammer, Knochenmarksentzündung, Entzündungen des Zentralnervensystems oder bei bakteriellen Infektionen von Gelenkprothesen ist *P. acnes* beteiligt (McDowell *et al.*, 2005).

P. acnes KPA171202 (DSMZ 16379) ist ein Gram-positives, nicht sporenbildendes, unbewegliches Stäbchen. Es ist opportunistisch pathogen, da es sich um einen normalen Hautbewohner handelt. Es ist ungefähr 0,5 µm breit und 1 µm lang. Es wird als obligat anaerobes Bakterium bezeichnet und wächst auch unter microaerophilen Bedingungen, da alle Komponenten der aeroben Atmungskette im Genom kodiert sind. Es verwertet eine Reihe von Zuckern wie Glucose, Ribose, Fructose, Mannit, Erythrit, Trehalose, Mannose, Sorbit, Glycerin und N-Acetylglucosamin. Über den Methylmalonyl-CoA-Weg bildet *P. acnes* Propionsäure, Acetat und Kohlenstoffdioxid. *P. acnes* ist nicht in der Lage, 20 der 22 essentiellen Aminosäuren zu synthetisieren. Nur Glutamat und Aspartat, die zwei sauren Aminosäuren, kann es selbst synthetisieren. Auch ist bekannt, dass es

aufgrund seiner komplexen Nährstoffanforderungen nur langsam wächst (Ferguson und Cummins, 1978). Aufgrund serologischer und biochemischer Eigenschaften wird *P. acnes* KPA171202 in die Untergruppe Ib eingeordnet, was auf der Fähigkeit beruht, Erythrit, Sorbit und Ribose zu verwerten (Valenne *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass *P. acnes* durch die Produktion von Propionat auf der Haut eine Schutzfunktion ausübt und somit den niedrigen pH-Wert (4-6) der Haut konstant hält.
Das Genom von *P. acnes* KPA171202 (DSMZ16379) ist seit 2004 vollständig sequenziert (Brüggemann *et al.*, 2004). *P. acnes* besitzt ein zirkuläres Chromosom mit 2 560 265 Bp, einen (G+C)-Gehalt von 60 % und 2 333 kodierte Gene. Für 1 587 Gene konnte über Vergleiche mit Datenbanken ein Genprodukt vorhergesagt werden. 468 Genprodukte sind für *P. acnes* spezifisch, während 278 Genprodukte nur geringe Ähnlichkeiten zu Proteinen unbekannter Funktion aufweisen. Das vollständig sequenzierte Genom eröffnet nun die Möglichkeit, potentielle Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren. Im Genom konnten 30 potentielle Pathogenitätsfaktoren gefunden werden, die in Verdacht stehen, an der Entzündungsreaktion der Akne beteiligt zu sein (Tabelle 1.1). Bisherige Studien zeigen den Einfluss von *P. acnes* auf das menschliche Immunsystem (Trivedi *et al.*, 2006), nicht aber, welche Faktoren für das pathogene Potential von *P. acnes* verantwortlich sind.
Ein Teil dieser 30 Gene kodiert für Enzyme, denen eine abbauende Aktivität des Hautgewebes vorhergesagt wird (Brüggemann, 2005). Die Genomsequenz bietet die Möglichkeit,

Tabelle 1.1:* 30 potentielle Pathogenitätsfaktoren von *P. acnes

offene Leserahmen	mogliche Funktion des Genproduktes
PPA0380, PPA0644, PPA0684, PPA0685, PPA1560, PPA1796, PPA2105, PPA2106	Hautgewebe-abbauende Enzyme
PPA0453, PPA0916, PPA1098, PPA1772, PPA2040	Chaperone
PPA0565, PPA0938, PPA1396	potentielle Hämolysine
PPA0687, PPA1198, PPA1231, PPA1340, PPA2108	CAMP-Faktoren
PPA0737, PPA0765	Antigene
PPA1715, PPA1880, PPA2127, PPA2130, PPA2210	Wirtsinteraktionsfaktoren
PPA1906, PPA1983	Adhäsionsfaktoren

Analysen auf Genomebene durchzuführen. Da Resistenzentwicklungen von *P. acnes* gegen die zurzeit verwendeten Antibiotika häufig sind, ist es das Ziel, neue Therapeutika, die spezifisch diese Enzymsysteme hemmen, zu finden.

In dieser Arbeit wurden für weitere Studien die Mikroorganismen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium xerosis* und *Malassezia furfur* verwendet. *S. aureus* ist Gram-positiv, fakultativ anaerob, unbeweglich, Koagulase-negativ und nicht sporenbildend. Es ist kugelförmig und opportunistisch pathogen. Es kommt überall in der Natur vor und wurde auf der Haut und in den oberen Atemwegen nachgewiesen. *S. aureus* verursacht Lungenentzündung, Hautinfektionen und Sepsis (Archer, 1998).
S. epidermidis ist Gram-positiv, fakultativ anaerob, unbeweglich und nicht sporenbildend. Es ist kugelförmig und opportunistisch pathogen (Vuong und Otto, 2002). Es kommt in Lebensmitteln und auf polymeren Oberflächen vor. Es ist ein Hautkeim und wurde auch in der Schleimhaut nachgewiesen. *S. epidermidis* verursacht Sepsis und ist an Entzündungen der Herzinnenhaut nach Operationen am offenen Herzen beteiligt (Zhang *et al.*, 2003).
C. xerosis ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, unbewegliches und nicht sporenbildendes Aktinobakterium. Es ist stäbchenförmig und opportunistisch pathogen. Es wurde von der Haut, aus Schleimhäuten und der Hornhaut des Auges isoliert. *C. xerosis* verursacht unter anderem Hautinfektionen und Lungenentzündungen (Funke *et al.*, 1997).
M. furfur ist ein einzelliger Pilz und fakultativ anaerob. Es ist opportunistisch pathogen. Es benötigt langkettige Fettsäuren und bevorzugt daher Hautregionen mit talgreichem Milieu. *M. furfur* verursacht Schuppenflechte und ist an Lungenentzündungen und Ekzemen beteiligt (Kaneko *et al.*, 2007; Ashbee *et al.*, 2002; Leeming *et al.*, 1987).

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Substanzen, die aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio stammen, auf das Wachstum von *P. acnes* zu untersuchen. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss ausgewählter Substanzen auf die oben genannten Hautkeime getestet. In dieser Arbeit wurden dafür die Mikroorganismen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* und *M. furfur* verwendet. Ziel war es, eine Substanz zu finden, die das Wachstum von *P. acnes*, nicht aber der weiteren Hautkeime hemmt. Eine Substanz, die diese Bedingungen erfüllt, wurde auf ihre minimale Hemmkonzentration und ihr mutagenes Potential hin untersucht.
Des Weiteren wurde der Einfluss der Substanzen auf die Transkription der potentiel-

len 30 Pathogenitätsfaktoren semi-quantitativ und quantitativ untersucht. Aus früheren Studien war bekannt, dass Lipide die Transkription einiger Gene, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren, induzierten (Rimpf, 2006). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass einige Substanzen die Transkription dieser Gene hemmten (Straub, 2009). In weiteren Versuchen wurden Deletionsmutanten von *P. acnes* erstellt. Dabei wurden Gene, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren, deletiert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von folgenden Firmen bezogen:

- AppliChem GmbH & Co. KG; Darmstadt
- Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
- Difco Laboratories; Augsburg
- Gibco BRL Life Technologies Inc.; Eggenstein
- Merck KGaA; Darmstadt
- Otto Nordwald GmbH; Hamburg
- Riedel-de Haen AG; Seelze
- Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

2.1.2 Spezielle Chemikalien und Enzyme

Von der MTI IndustrieGase AG (Elchingen) wurden das Formiergas und der Stickstoff für die Begasung der Kulturmedien bezogen.
Die Substanzen für die Lipid-Stammlösung stammten von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim.

Weitere spezielle Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biomol GmbH; Hamburg:
Lysozym
Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe:
Roti®-Chloroform, Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml), IPTG, Roti®-Phenol, X-Gal
Fermentas GmbH; St. Leon-Rot:
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM), *Eco*RI (10 U/µl), „High-Fidelity-*Taq*-DNA-Polymerase“ (5 U/µl), M-MuLV-Reverse-Transkriptase (20 U/µl), „10x Ligation Buffer“, „5x Reaction Buffer“ für M-MuLV-Reverse-Transkriptase, „10x Reaction Buffer for SAP“, „10x Reaction Buffer“ für T4-Polynukleotidkinase, RNase A (10 mg/ml), RNase-Inhibitor (40 U/µl), *Sal*I (10 U/µl), SAP (1 U/µl, T4-DNA-Ligase (5 U/µl), T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
Gerbu Biochemicals GmbH; Gaiberg:
$NADP^+$
Hartmann Analytic GmbH; Braunschweig:
$[\gamma - {}^{32}P]$-ATP (370 kBq/µl [1 pmol])
Invitrogen GmbH; Karlsruhe:
DNase I (50-375 U/µl), „5x First-Strand Buffer“, DTT (0,1 M), Reverse Transkriptase (SuperScript™ III-RT) (200 U/µl)
MP Biomedicals Germany; Eschwege:
S9-Extrakt
Oxoid Deutschland GmbH; Wesel:
„Columbia Agar Base“, Schafblut (defibriniert)
Roche Diagnostics GmbH; Mannheim:
Ampicillin, „Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments“(750 U/ml), Blockierungsreagenz, Chloramphenicol, CSPD® (25 mM), Digoxigenin-11-dUTP (25 mM), Kanamycin, „Light-Cycler® FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I“, Proteinase K (750 U/ml), „UltraPure“-Wasser
Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim:
DEPC, D-Glucose-6-Phosphat, Biotin, Colistin, Histidin
Wako Chemicals GmbH; Neuss:
Achromopeptidase (100 000 U)

2.1.3 Molekularbiologische Hilfsmittel

Für Agarosegele wurden folgende, von der Fermentas GmbH; St. Leon-Rot bezogene, Größenstandards verwendet: „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ und „RNA Ladder™ High Range“. Der „6x DNA Loading Dye“ und der „2x RNA Loading Dye“ wurden ebenfalls von der Fermentas GmbH; St. Leon-Rot, bezogen.

Folgende „Kits“ wurden in dieser Arbeit verwendet:

- „DIG Nucleic Acid Labeling and Detection System“, Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
- „Illustra MicroSpin™ G-25 Columns“, GE Healthcare; München
- „Qiagen® PCR Cloning Kit“, Qiagen GmbH; Hilden
- „PuReTaq™ Ready To Go beads“, GE Healthcare; München
- „UltraClean™ 15 DNA Purification Kit“, Süd Laborbedarf GmbH; München
- „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“, Hiss Diagnostics GmbH; Freiburg

2.1.4 Geräte und Materialien

Die in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Geräte und Materialien sind in folgender Liste aufgeführt:

Agarose-Gelelektrophorese-Kammer:
Technische Werkstatt der Universität Ulm; Ulm
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer für denaturierende Gelelektrophorese:
Technische Werkstatt der Universität Ulm; Ulm
AGFA CRONEX 5-Film:
Agfa-Gevaert N.V.; Leverkusen
Anaerobenkammer:
Technische Werkstatt der Universität Ulm; Ulm
Blotting-Apparatur:
VacuGene™ XL Blottingsystem, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
Brutschrank:
Heraeus Holding GmbH; Hanau
Einmalküvetten:
1/2 Mikro; 1,6 ml, VWR International GmbH; Darmstadt

Eismaschine:
Scotsman AF-200, Scotsman Ice Systems Europe Frimont SpA; Mailand, Italien
Elektroporationsgerät:
Gene Pulser® II, Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Pulse Controller Plus, Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Elektroporationsküvetten:
2 mm Lückenweite, Biozym Scientific GmbH; Oldendorf
Exsikkator:
DURAN Group GmbH; Wertheim/Main
Feinwaage:
AE 163, Mettler-Toledo GmbH; Gießen
Filterplättchen (∅ 16 mm):
Schleicher & Schuell GmbH; Dassel
Heizblock:
Thermoblock 1.0, Störk GmbH & Co. KG; Stuttgart
Heizpilze:
2 l, Tyco Thermal Controls GmbH; Heidelberg
4 l, Heraeus Holding GmbH; Hanau
Hybridisierungsofen:
Biometra OV 2, Biometra GmbH; Göttingen
Inkubationsschüttler:
Certomat® S II, B. Braun Biotech International GmbH; Melsungen
Excella E24 Incubator Shaker Series, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Nürtingen
HT, Infors GmbH; Einsbach
Kühlregal:
SÜMAK Kältetechnik GmbH; Leonberg
Kühlschränke:
Liebherr Holding GmbH; Biberach/Riß
Kühlzentrifugen:
Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG; Hamburg
Centrifuge 5402, Eppendorf AG; Hamburg
Universal 320 R, Andreas Hettich GmbH Co. KG; Tuttlingen
ZK401, HERMLE Labortechnik GmbH; Wehingen

„LightCycler®“ - Austattung und Zubehör:
Capillaries (20 µl), Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
2.0 Capillary Releaser, Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Capping Tool, Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Centrifuge Adapters, Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
1.5 Instrument, Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Sample Carousel (20 µl), Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Magnetrührer:
IKAMAG® REO, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG; Staufen
Mikrowelle:
Moulinex „OPTIQUICK“, SAMOU GmbH; Eigeltingen
Müller-Krempel-Flaschen:
Müller & Krempel; Bülach, Schweiz
Netzgerät:
Pharmacia Gene Power Supply GPS 200/400, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
Nylonmembran:
MP Biomedicals Germany GmbH; Eschwege
PCR-Gerät:
PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Biozym Scientific GmbH; Oldendorf
pH-Messgerät:
WTW pH 521, Wissenschaftliche-Technische Werkstätten GmbH; Weilheim
Photodokumentationsanlage:
Mitsubishi P93D, MWG Biotech GmbH; Ebersberg
Pipetten:
10, 20, 100, 200, 1 000 µl, Gilson International B.V.; Limburg-Offheim
Reinstwasseranlage:
Elgastat Maxima, USF Deutschland GmbH; Ransbach-Baumbach
„RiboLyser™“:
Hybaid GmbH; Heidelberg
Schraubdeckelröhrchen:
Bellco Glass Inc.; Hamburg
Schüttel- und Mischgerät:
VWR International GmbH; Darmstadt

Spektralphotometer:
GENESYS 10 vis, Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich
Ultrospec® 3100 pro, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
Sterilfilter:
Sarstedt AG & Co. KG; Nürnbrecht
Tiefkühlschränke:
-20 °C, Liebherr Holding GmbH; Biberach/Riß
-80 °C, Heraeus Holding GmbH; Hanau
Tischautoklav:
Systec 2540 EL, Tuttnauer Europe B.V.; Breda, Niederlande
Tischzentrifuge:
PICO 17, VWR International GmbH; Darmstadt
„Ultraviolet-Crosslinker“:
Amersham Life Science; Braunschweig
UV-Schirm:
TFP-M/WL (312 nm), biostep GmbH; Jahnsdorf
Transilluminator UST-30L-8E (365 nm), biostep GmbH; Jahnsdorf
Vakuumpumpe:
VacuGene™ Pump, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
Vakuumzentrifuge:
SpeedVac Concentrator SVC 100H, Bachofer GmbH; Reutlingen
Waagen:
Sartorius BP 8100, Sartorius AG; Göttingen
Sartorius BP 2100 S, Sartorius AG; Göttingen
Wandautoklav:
Münchener Medizin Mechanik; Planegg
Wasserbad:
Memmert GmbH & Co. KG; Schwabach
Zentrifugen für Hungate-Röhrchen:
EBA 20, Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen
EBA 3S, Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen

2.2 Mikroorganismen, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

2.2.1 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: **Verwendete Mikroorganismen**

Stamm	relevanter Phäno- oder Genotyp Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
Propionibacterium acnes KPA171202 (DSMZ 13279)	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Propionibacterium acnes KPA171202ΔPPA1340	*Propionibacterium acnes*-Typstamm mit Deletion des Gens PPA1340	diese Arbeit
Propionibacterium acnes KPA171202ΔPPA1396	*Propionibacterium acnes*-Typstamm mit Deletion des Gens PPA1396	diese Arbeit
Staphylococcus aureus (DSMZ 1104)	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Staphylococcus epidermidis (DSMZ 3269)	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Corynebacterium xerosis (DSMZ 20743)	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Malassezia furfur (DSMZ 6170)	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Salmonella typhimurium TA100	*hisG*46, *rfa*, Δ*uvr*B, pKM101	Laborstammsammlung
Escherichia coli K12 HB101	*supE*44, *supF*58, *hsdS*3($r_B^-m_B^-$), *recA*56, *galK*2, *galT*22, *metB*1, *hsdS*20($r_B^-m_B^-$), *recA*13 *ara*14, *proA*2, *lacY*1, *galK*2, *rpsL*20, *xyl*5, *mtl*1	Lacks und Greenberg, 1977
Escherichia coli K12 DH5α	*supE*44, *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, Δ*lacU*169(φ80*lacZ*ΔM15), *gyrA*96, *thi*1, *relA*1	Hanahan, 1983

2.2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: **Verwendete Plasmide**

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
pDrive	3 850	Klonierungsvektor, Km^r, Ap^r, *orif*1, P_{lac}, *lacZ*	Qiagen GmbH, Hilden
pK19*mobsacB*	5 722	*E. coli-Corynebacterium*-Schaukelvektor, (Integrationsvektor), Km^r, $oriV_{EC}$, *oriT*, *sacB*	Schäfer *et al.*, 1994
pRS1340	6 689	pK19*mobsacB* mit Deletionskonstrukt des Gens PPA1340 aus *Propionibacterium acnes*	diese Arbeit
pR1396	6 722	pK19*mobsacB* mit Deletionskonstrukt des Gens PPA1396 aus *Propionibacterium acnes*	diese Arbeit
pS0687	6 780	pK19*mobsacB* mit Deletionskonstrukt des Gens PPA0687 aus *Propionibacterium acnes*	diese Arbeit

2.2.3 Oligodesoxynukleotide

Die in diesen Versuchen verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in den Tabellen 2.3 bis 2.7 aufgeführt und wurden von der Firma „biomers.net GmbH“ (Ulm) synthetisiert.

Die Oligodesoxynukleotide in Tabelle 2.3 wurden für die Reverse Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR-Analysen) verwendet.

Tabelle 2.3: **Oligodesoxynukleotide für die RT-PCR-Analysen**

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
PPA0009_fw	GCCGAGGCCAAATCTTTC

Fortsetzung folgt

Tabelle 2.3: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
PPA0009_rev	TAGCAGGGTGCGGATATGATG
PPA0380_fw	GGCGCGTCAAGAGCTGTC
PPA0380_rev	GGCCGTTGTACATGACGG
PPA0453_fw	GAGCTCACCGAGGGCATG
PPA0453_rev	CGATCTCCTTACGGATCTGG
PPA0565_fw	GCGTGGTTGGGTTCACACC
PPA0565_rev	CGGGCATAGGTGATTGCTC
PPA0644_fw	CCAAGCCCGGAGAGTACG
PPA0644_rev	AGGTGACGATCGCGTCGG
PPA0684_fw	CCAGCACGGTTCAGCTCG
PPA0684_rev	ACGCCTTGGTCGTCGTCG
PPA0685_fw	GATCGACCAGTTCCCGGG
PPA0685_rev	CCCCCGTCATCGCTGTAC
PPA0687_fw	TTGCGACCCTTCATGCAG
PPA0687_rev	GCGTGATTGAGCGTCTTG
PPA0737_fw	GGATCTCTACCGTGAAGG
PPA0737_rev	TTGCGAGGCTTAGCAGTC
PPA0765_fw	TGCTCAGCAGGACGCCG
PPA0765_rev	CCCTGTCGGCGTTGCTCT
PPA0916_fw	GCCGACGAGATCAAGAAG
PPA0916_rev	GCACGGTAATGACTTCAC
PPA0938_fw	GAACTACGCGAGATGGTC
PPA0938_rev	GGCGTCATACTCGTCAAC
PPA1098_fw	TTACTCTGCGTCGGGAAA
PPA1098_rev	GCGAGAACTCCACAAAGC
PPA1198_fw	AAGGTCGCTAAGGCTGTC
PPA1198_rev	TGCCCAGCCCTGATAATG
PPA1231_fw	GCGTTCTGCGCTTAACTC
PPA1231_rev	TCAACGACAGCCTGATCC
PPA1340_fw	GCGACAGCTCATGCTGCC
PPA1340_rev	CGTTGGGTTTGAGGTCAGG

Fortsetzung folgt

Tabelle 2.3: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
PPA1396_fw	GGACTGGCACGTTCCCG
PPA1396_rev	GCAGCATGAGGCCGTCTG
PPA1560_fw	TTCCATCGTGCAGCGCCG
PPA1560_rev	CGTCCATCATTCGGCCC
PPA1715_fw	CACGACCGCAGTATTGAC
PPA1715_rev	GGCGTTAGCTTGCTTCTC
PPA1772_fw	GTCGCCACTAAGAACAAC
PPA1772_rev	GCGGCAATAACCTTCTCC
PPA1796_fw	CCCCCAACTTCAACGGGC
PPA1796_rev	GACACCAGGCTCGTCCA
PPA1880_fw	AAGCCACTCAACTTCCGGC
PPA1880_rev	CCGTCCGAGCGGTGTTTC
PPA1906_fw	TCGGCACGCAACGGAACG
PPA1906_rev	GCGACCCGAGTCGCCGG
PPA1983_fw	GCGCGGTTAGTGAAGATG
PPA1983_rev	TCGCGGTCTGTTTGGATG
PPA2040_fw	GTCGCAGGCTTCGTAAAC
PPA2040_rev	ATCACCGACGGCCGATTG
PPA2105_fw	ATTCGCCGTCATGGCCGC
PPA2105_rev	CCCTGCGAATGTCCGACG
PPA2106_fw	GGATCCTCAACGCCCACG
PPA2106_rev	GTGAGCCGGATGTTGGTC
PPA2108_fw	GGCTCCGAAGGTCAACTA
PPA2108_rev	TGGCGGGATTGAACCAC
PPA2127_fw	CGGCAATCGTCAGTTCTC
PPA2127_rev	GCAACACCGTGATGGATG
PPA2130_fw	GCTGCCTTTGTTGCACTG
PPA2130_rev	CTGACGAGGTACGTCTTC
PPA2210_fw	GCGGATTATCAGCTCTCC
PPA2210_rev	TGAGTAGACCCGAGGTTG
PPA2417_fw	GATACGGCCCAGACTCCTAC

Fortsetzung folgt

Tabelle 2.3: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
PPA2417_rev	CGAGATTCGCTCACCCTCAC

Die Oligodesoxynukleotide in Tabelle 2.4 wurden für die quantitative „Real-Time"-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR-Analysen) verwendet.

Tabelle 2.4: **Oligodesoxynukleotide für die qRT-PCR-Analysen**

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
PPA0010(2) fw	AACGGTATCGCCGACATCCGTG
PPA0010(2) rev	CAGCATGTTGCAGCCGAAGGTG
PPA0380(1) fw	GACTGGCTAATCACCGTCTC
PPA0380(1) rev	TCCTCGTACTGTCCCATGTC
PPA0453(2) fw	CAAGCCGCTGTTTGTCATTG
PPA0453(2) rev	GGCGATGTCATTGAGCATAG
PPA0565(1) fw	GATCCTCTACGTCGTCATGG
PPA0565(1) rev	GGTGAAGGATTGGGTTTCTG
PPA0644(1) fw	AAGCCGATGGATTCGATGAC
PPA0644(1) rev	CGCGAAGTGTTCTTACTGTG
PPA0684(2) fw	TATACCTCGCCCGTACACCACC
PPA0684(2) rev	TCGGAGTGATGCGAGCTGAACC
PPA0685(2) fw	CACAACCGCGTGCTCAACCCTC
PPA0685(2) rev	GCGTGCTGCGCGAAGTGGTAAG
PPA0687(2) fw	CGCCAACCGTGACCGGTACATC
PPA0687(2) rev	ATAGGCCGCAAGGAGCTCGGTG
PPA0737(1) fw	CTTCGCCCGTCAACTCACCCTC
PPA0737(1) rev	GGTCATGGCGTCGATGGTGGTC
PPA0765(1) fw	GATGGTTGAGCTTGCTCTTG
PPA0765(1) rev	TTGACACGGGCACTAGATTC
PPA0916(2) fw	TGGCGTTACCAAGTCGTTAG
PPA0916(2) rev	GCGGATATCACCAAGGAAGG
PPA0938(1) fw	TATCTGCACCTTCTGGTCTC
PPA0938(1) rev	TAGTCGACCATCTCGCGTAG

Fortsetzung folgt

Tabelle 2.4: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
PPA1098(2) fw	CTCGTCGATCTGGATTCAAC
PPA1098(2) rev	GCCTGCGATGTCAGAATTAG
PPA1198(1) fw	CTCAACCGTGCCATTATCAG
PPA1198(1) rev	ATACAGGAGGAACGGTGAAG
PPA1231(1) fw	ACGTTGAGCTTGGTCTTGAG
PPA1231(1) rev	TAGTCGCAGTGTCATCCTTG
PPA1340(1) fw	CCGCGAACGTCCTCAATATC
PPA1340(1) rev	CGTTGACGGTATCGACCATC
PPA1396(1) fw	GTCTGTCCCTGTGAGACTTG
PPA1396(1) rev	CGGCGGTACTCACTTTCATC
PPA1560(1) fw	ATATCACCAGCACCGATCAG
PPA1560(1) rev	TCGAATCAGCACGAACATCC
PPA1715(1) fw	AAACGGCTACCCTAGCAAAG
PPA1715(1) rev	GGGTGAAATCGTCACTGAAG
PPA1772(1) fw	CTCGTCGATCTGGATTCAAC
PPA1772(1) rev	GCCTGCGATGTCAGAATTAG
PPA1796(1) fw	TGCTTCCCGGCACTAATTTC
PPA1796(1) rev	GCGGATATCACCGGTATAGG
PPA1880(1) fw	AGACGTGGACTACTGTGAAG
PPA1880(1) rev	AGTGCTGTAGGACGTGAAAG
PPA1906(1) fw	CCAACGGACCATTCGTATCG
PPA1906(1) rev	CGGCCTGACTGACAATAGTG
PPA1983(1) fw	CCAACGGACCATTCGTATCG
PPA1983(1) rev	CGGCCTGACTGACAATAGTG
PPA2040(1) fw	GCTGAAGGGTGAGGTCAAAG
PPA2040(1) rev	TGTCCTCAGCAGTAGTGAAC
PPA2105(1) fw	CTACACCTTCACCACCAATG
PPA2105(1) rev	GACGAAGTCGACCTTCTCAG
PPA2106(1) fw	GGCCGTCAAATACTCCTTCG
PPA2106(1) rev	GCTCGTTGAACAGGTCGTAG
PPA2108(2) fw	CAGGCGCTCGCACAGGTCAATG

Fortsetzung folgt

Tabelle 2.4: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
PPA2108(2) rev	GATCGCGGTGCGCAGTTCGAAG
PPA2127(1) fw	AGAAGTTGGCAAAGGCTACG
PPA2127(1) rev	TCGATGGCTGCTTTCTTGAG
PPA2130(1) fw	CACGGGTTATACAGTGGGAATG
PPA2130(1) rev	TGAACCTTGCCGTATGACAG
PPA2210(1) fw	AAAGGCGAGCTGTCTTAGTG
PPA2210(1) rev	GAGCCGATTAAGGCAGTTG
PPA2417(1) fw	AGAAGCACCGGCTAACTACG
PPA2417(1) rev	CGTATCGAAAGCACGCTCAG

Die Oligodesoxynukleotide in Tabelle 2.5 wurden für die Sequenzierungen verwendet.

Tabelle 2.5: **Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung**

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
16S-fw	GTGCCAGCAGCCGCGGTA
16S-rev	TTGTAGCACGTGTGTAGCCC
recA-fw	TAAGATCGCCGCTATCCC
recA-rev	TCGGACGTTCTCCTTACC

Die Oligodesoxynukleotide in Tabelle 2.6 wurden für die Herstellung der DNA-Sonden verwendet.

Tabelle 2.6: **Oligodesoxynukleotide für die Herstellung der DNA-Sonden**

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)
PPA0687NB fw	TGCGACCCTTCAGTCAGTACAGAAATCC
PPA0687NB rev	TATTCCCTACGGTCGTCTTTGGGTTCAG

Die Oligodesoxynukleotide in Tabelle 2.7 wurden für die Konstruktion der Deletionsmutanten verwendet.

Tabelle 2.7: **Oligodesoxynukleotide für die Deletionsmutanten**

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)*	Schnittstelle
PPA1340D1	CGTAAT**GAATTC**GTCCATT GTGTCACCCACGG	*Eco*RI
PPA1340D2	CTCAATATCATTGGCAAGCT TTGTCCTGACACTTGCATCG	
PPA1340D3	AGCTTGCCAATGATATTGAG GACGTTCGCGGGCGCGAAGG	
PPA1340D4	AGCATT**GTCGAC**GACATCCA TCGTCCTGGGTC	*Sal*I
PPA1340test fw	TGTCTGTGCAAGGTTCCCGC	
PPA1340test rev	CTACTGGCACCGCTTGCCCT	
PPA1340trafo fw	ACCTGGACGCTAAGGCTAAT	
PPA1340trafo rev	GCTATTGCATATCCGATGCA	
PPA1396D1	CGTAAT**GAATTC**CTTGTTC ACTAGATCCGCCA	*Eco*RI
PPA1396D2	AGGCAGAGTGACGGTCAATA CGGTAGATCTGGGTTGGCGT	
PPA1396D3	TATTGACCGTCACTCTGCCT TCCCGCACTAGGCGTGTGGC	
PPA1396D4	CGTAAT**GAATTC**GTTCCTC ATTCCGATGTTCG	*Eco*RI
PPA1396test fw	TCCCCCTTGTGCGGGATCCT	
PPA1396test rev	GAACCGCGCAACCAATGTCT	
P1 0687 fw	CGTAAT**GAATTC**AATCAACC ACATTGACTCAA	*Eco*RI
P2 0687 rev	TCACGGTTGGCGCGCACCTG AAAGGTTCTCCGTTTATTGG	
P3 0687 fw	CAGGTGCGCGCCAACCGTGA CCGGTACATCCTTGGTCACA	
P4 0687 rev	AGTCAA**GAATTC**CTCGCGT	*Eco*RI

Fortsetzung folgt

Tabelle 2.7: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Sequenz ($5' \rightarrow 3'$)*	Schnittstelle
	GAGACGATGAACT	
Kon 0687 fw	GCAGCATGACCACCATGC	
Kon 0687 rev	TGCAGCTAATTGCGCGCG	
pK19 fw	TATGCAGCTGGCACGAC	
pK19 rev	GTAGCTGACATTCATCCG	

Anmerkung: ***fett markiert**: Schnittstelle, unterstrichen: Überhang für Ligation.

2.3 Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, die nicht kommerziell bezogen wurden, sind in ihren Zusammensetzungen im Folgenden aufgelistet:

Antikörperlösung (75 mU/ml)
Die Anikörperlösung („Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments“ ([750 U/ml]) wurde 1:10 000 in Blockierungslösung (1x) verdünnt. Dies entspricht einer Konzentration von 75 mU/ml.

ASE-Puffer

Natriumacetat x 3 H_2O	0,54	g	20 mM
EDTA-Natriumsalz	24	mg	1 mM
SDS	1	g	17 mM
H_2O	ad 500	ml	

Blockierungslösung (1x)
Die Blockierungslösung (1x) wurde durch 1:10 Verdünnen der Blockierungs-Stammlösung (10x) in Maleinsäurepuffer hergestellt.

Blockierungs-Stammlösung (10x)
10 g Blockierungsreagenz wurden in 100 ml Maleinsäurepuffer durch ständiges Rühren bei 65 °C auf einem Heizblock gelöst.

Detektionspuffer

Tris	2,42 g	0,1 M
NaCl	1,17 g	0,1 M
H_2O	ad 200 ml	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 9,5 eingestellt.

Dextransulfat (16,7 % [w/v])

16,7 g Dextransulfat wurden in 100 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 16,7 % (w/v).

DNase-Aufbewahrungspuffer

Natriumacetat x 3 H_2O	0,27 g	20 mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	73,5 mg	5 mM
PMSF	1,7 mg	0,1 mM
Glycerin	50 ml	50 % (v/v)
H_2O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 6,5 eingestellt.

DNase-Reaktionspuffer (10x)

Tris	2,42 g	200 mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,41 g	20 mM
KCl	3,73 g	500 mM
H_2O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,4 eingestellt.

Elektroporationslösung

Saccharose	171,5 g	0,5 M
Natriumacetat x 3 H_2O	0,1 g	1 mM
H_2O	ad 1 000 ml	

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 5,5 eingestellt.

Enzym-Stammlösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzym-Stammlösungen sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: **Enzym-Stammlösungen**

Enzym	Lösungsmittel	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Achromopeptidase	H_2O	1000 U/ml	10 U/ml
DNase I[1]	Aufbewahrungspuffer	50-375 U/µl	50 U/µl
Lysozym	H_2O	20 mg/ml	200 µg/ml
Proteinase K	TE-Puffer	750 U/ml	3 U/ml
RNase	TE-Puffer	10 mg/ml	40 µg/ml

Anmerkung: [1]: Die DNase I wurde von der Invitrogen GmbH, Karsruhe, in einer Konzentration von 50-375 U/µl geliefert. Die DNase I wurde mit dem DNase-Aufbewahrungspuffer in einer Konzentration von 50 U/µl verdünnt.

Die Enzym-Stammlösungen wurden nach dem Ansetzen, bis auf die DNase I-Lösung, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Ethidiumbromidlösung (2,85 µM)

Die Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) wurde 1:13 333 in TAE-Puffer verdünnt. Dies entspricht einer Konzentration von 2,85 µM.

Formamid-Auftragspuffer (5x)

Bromphenolblau-Natriumsalz	0,5	g	7	mM
Formamid	6,8	ml	1	M
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	1	ml	2,5	mM
EDTA-Natriumsalz	0,15	g	4	mM
Formaldehyd (37 % [v/v])	90	µl	9	mM
Glycerin	10	ml	20	% (v/v)
10x MAE-Puffer	40	ml	40	% (v/v)
H_2O	ad 100	ml		

Glucose-6-Phosphat-Stammlösung (0,1 M)

0,34 g D-Glucose-6-Phosphat-Dinatriumsalz x 2 H_2O wurden in 10 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 0,1 M.

Kaliumchlorid-Lösung (0,4 M)
2,98 g KCl wurden in 100 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 0,4 M.

Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 50 mM)

KH_2PO_4	1,33 g	20 mM
K_2HPO_4	2,66 g	30 mM
H_2O	ad 500 ml	

„Killing-Puffer“

Tris	1,21 g	20 mM
NaN_3	0,65 g	20 mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,51 g	5 mM
H_2O	ad 500 ml	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8 eingestellt.

Laurylsarcosin-Lösung (10 % [w/v])
20 g Laurylsarcosin wurden in 200 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 0,17 M.

M-Puffer

Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4, 0,2 M)	12,5 ml	0,1 M
$NADP^+$-Lösung (0,1 M)	1 ml	4 mM
D-Glucose-6-Phosphat-Stammlösung (0,1 M)	1,25 ml	5 mM
$MgCl_2$-Lösung (1,65 M)	0,5 ml	33 mM
KCl-Lösung (0,4 M)	0,5 ml	8 mM
H_2O	ad 25 ml	

Der M-Puffer wurde nach dem Ansetzen sterilfiltriert.

MAE-Puffer (10x)

MOPS	41,85 g	200 mM
Natriumacetat x 3 H_2O	6,8 g	50 mM
EDTA-Natriumsalz	1,86 g	5 mM
H_2O	ad 1 000 ml	

Magnesiumchlorid-Lösung (1,65 M)
33,65 g $MgCl_2$ x 6 H_2O wurden in 100 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 1,65 M.

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	1,16 g	0,1 M
NaCl	0,88 g	0,15 M
H_2O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

$NADP^+$-Lösung (0,1 M)
0,74 g $NADP^+$ wurden in 10 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 0,1 M.

Natriumacetat (pH 5,2, 3 M)
40,82 g Natriumacetat x 3 H_2O wurden in 100 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 3 M. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 5,2 eingestellt.

Natriumphosphatpuffer (pH 7,4, 0,2 mM)

NaH_2PO_4	1,14 mg	40 mM
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	7,12 mg	160 mM
H_2O	ad 250 ml	

Prähybridisierungslösung A

20x SSC-Puffer	5 ml	
Dextransulfat (16,7 % [w/v])	12 ml	10 % (v/v)
SDS-Lösung (10 % [w/v])	40 µl	0,7 mM
NaCl	23 mg	20 mM
H_2O	ad 20 ml	

Prähybridisierungslösung B

Formamid	10	ml	0,25 mM
20x SSC-Puffer	5	ml	
Laurylsarcosin-Lösung (10 % [w/v])	0,2	ml	1,7 mM
SDS-Lösung (10 % [w/v])	40	µl	0,7 mM
Blockierungs-Stammlösung (10x)	4	ml	2 % (w/v)
H_2O	ad 20	ml	

Saccharose-Lösung (0,5 M)

17,12 g Saccharose wurden in 100 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 0,5 M.

SDS-Lösung (10 % [w/v])

20 g SDS wurden in 200 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 0,35 M.

SSC-Puffer (20x)

NaCl	175,32 g		3 M
Natriumcitrat x 2 H_2O	88,23 g		0,3 M
H_2O	ad 1 000	ml	

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt.

TAE-Puffer

Tris	4,85 g		40 mM
Essigsäure (100 %)	1,14 ml		20 mM
EDTA-Natriumsalz	0,12 g		1 mM
H_2O	ad 1 000	ml	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8 eingestellt.

TE-Puffer

Tris	0,24 g		10 mM
EDTA-Natriumsalz	24	mg	1 mM
H_2O	ad 200	ml	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Waschpuffer 1

20x SSC-Puffer	25 ml	
SDS-Lösung (10 % [w/v])	2,5 ml	3,5 mM
H_2O	ad 250 ml	

Waschpuffer 2

20x SSC-Puffer	1,25 ml	
SDS-Lösung (10 % [w/v])	2,5 ml	3,5 mM
H_2O	ad 250 ml	

Waschpuffer 3

Maleinsäure	2,32 g	0,1 M
NaCl	1,75 g	0,15 M
Tween 20	0,6 ml	0,3 % (v/v)
H_2O	ad 200 ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

2.4 Zellanzucht

Herstellung anaerober Medien

Um den im Medium gelösten Sauerstoff zu entfernen, wurde das für das anaerobe Wachstum verwendete PYG-Komplexmedium für *P. acnes* gekocht. Während des Abkühlens wurde das Medium mit Stickstoff begast und anschließend luftdicht verschlossen. Danach wurde das Medium in einer Anaerobenkammer in Volumina von 5 ml in Schraubdeckelröhrchen mit Butylstopfen und Schraubdeckeln bzw. in Volumina von 50 ml in 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen mit Naturgummistopfen und Edelstahldeckel gefüllt. Das Medium wurde bei 121 °C und einem Druck von 200 kPa für 20 min autoklaviert. Resazurin diente als Redoxindikator. Resazurin liegt nach dem Autoklavieren in der reduzierten, farblosen Form des Resorufin vor. Durch Sauerstoff wird Resorufin wieder in eine pinke Form oxidiert.

Herstellung aerober Medien
Die für das aerobe Wachstum verwendeten Medien wurden angesetzt und in Volumina von von 5 ml in Reagenzgläsern bzw. in Volumina von 100 ml bzw. 500 ml in Erlenmeyerkolben mit Schikanen gefüllt. Die Reagenzgläser wurden mit Alukappen und die Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen verschlossen. Die Medien wurden bei 121 °C und einem Druck von 200 kPa für 20 min autoklaviert.

Herstellung fester Nährmedien
Zur Herstellung fester Nährmedien wurden den Medien vor dem Autoklavieren 1,5 g/l Agar (1,5 % [w/v]) zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden die Medien in Petrischalen gegossen und für einen Tag bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Herstellung fester Nährmedien für anaerobe Versuche wurden die Medien in einer Anaerobenkammer in Petrischalen gegossen und ebenfalls für einen Tag bei Raumtemperatur stehen gelassen. Alle Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

2.4.1 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien und ihre Zusammensetzungen sind im Folgenden aufgelistet:

AT-Agar

$NaNH_4HPO_4$ x 4 H_2O	3,5	g	16,8	mM
K_2HPO_4	10	g	57,4	mM
Citronensäure x H_2O	2	g	9,5	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2	g	0,81	mM
Agar	12	g	1,2	% (w/v)
H_2O	ad 900	ml		

Nach dem Autoklavieren wurden dem AT-Agar 100 ml einer getrennt autoklavierten 20%igen Glucose-Lösung zugegeben. Die entspricht einer Arbeitskonzentration von 0,1 M.

Blutagar

19,5 g „Columbia Agar Base“ wurden in 475 ml H_2O gelöst und für 15 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert. Nach dem Abkühlen unter Rühren wurden 25 ml Schafblut zugegeben. Anschließend wurde das Medium in Petrischalen gegossen und für einen Tag bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Blutagarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

BHIS-Medium (modifiziert nach DSMZ-Medium 215)

Sorbit	91,1 g	0,5 M
Kälberhirninfusion	3 g	0,3 % (w/v)
Rinderherzinfusion	3 g	0,3 % (w/v)
Pepton	6 g	0,6 % (w/v)
Glucose x H_2O	3 g	15,1 mM
NaCl	5 g	85,6 mM
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	2,5 g	14 mM
H_2O	ad 1 000 ml	

Der pH-Wert wurde auf 7,2-7,6 eingestellt.

LB-Medium („Lysogeny Broth“) (modifiziert nach Bertani, 1951)

Pepton	10 g	1 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	10 g	0,17 M
H_2O	ad 1 000 ml	

NB-Medium

Fleischextrakt	3 g	0,3 % (w/v)
Pepton	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	5 g	85,6 mM
H_2O	ad 1 000 ml	

PYG-Komplexmedium (modifiziert nach DSMZ-Medium 104 und Ferguson und Cummins, 1978)

Pepton	10 g	1 % (w/v)
Hefeextrakt	10 g	1 % (w/v)
Fleischextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
Glucose x H_2O	5 g	25 mM
K_2HPO_4	2 g	11,5 mM
Resazurin	1 mg	39,8 µM
Salzlösung (Stammlösung)	40 ml	
Hämin-Lösung (Stammlösung)	10 ,ml	
Vitamin K_1(Stammlösung)	0,2 ml	4,4 µM
Cystein-HCl x H_2O	0,5 g	2,8 mM
H_2O	950 ml	

Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Die Vitamin-K_1-Stammlösung und die Hämin-Stammlösung (2.4.2) wurden dem Medium zugegeben, nachdem es aufgekocht und unter Stickstoff abgekühlt worden war. Danach wurde es unter einer Stickstoffatmosphäre in einer Anaerobenkammer aufgeteilt und anschließend autoklaviert.

SLB-Medium

Saccharose	20 g	58,4 mM
Trypton	10 g	1 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	10 g	171,1 mM
H_2O	ad 1 000 ml	

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt.

SOC-Medium („Super Optimal Broth C“) (modifiziert nach Hanahan, 1983)

Trypton	20 g	2 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
Glucose x H_2O	4 g	20,2 mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	2 g	9,8 mM
NaCl	0,5 g	8,6 mM
KCl	0,2 g	2,7 mM
H_2O	ad 1 000 ml	

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7 eingestellt.

TB-Medium („Terrific Broth“) (modifiziert nach Tartoff und Hobbs, 1987)

Trypton	12 g	1,2 % (w/v)
Hefeextrakt	24 g	2,4 % (w/v)
Glycerin	4,5 ml	75,5 mM
KH_2PO_4	2 g	14,7 mM
K_2HPO_4	12,5 g	71,8 mM
H_2O	ad 1 000 ml	

Der pH-Wert wurde auf 7,1-7,5 eingestellt.

TSB („Trypticase Soy Broth“)-Medium (DSMZ-Medium 535)

Pepton aus Casein	17 g	1,7 % (w/v)
Pepton aus Soja	3 g	0,3 % (w/v)
Glucose x H_2O	2,5 g	12,6 mM
NaCl	5 g	85,6 mM
K_2HPO_4	2,5 g	14,3 mM
H_2O	ad 1 000 ml	

Der pH-Wert wurde auf 7,2-7,4 eingestellt.

Top-Agar

NaCl	5	g	85,6 mM
L-Histidin	1	mg	4,8 µM
Agar für Minimalmedium	6,5	g	0,65 % (w/v)
H_2O	ad 1 000	ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Von dem Topagar wurden jeweils 2,5 ml in Reagenzgläser gefüllt und anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde der Top-Agar bei 43 °C in ein Wasserbad gestellt. Vor Gebrauch wurden den 2,5 ml Top-Agar jeweils 2,5 µl der Biotin-Stammlösung (2.4.2) zugegeben.

2.4.2 Medienzusätze

Die Medienzusätze wurden den Medien zugegeben, nachdem diese autoklaviert und abgekühlt waren.

Antibiotika-Stammlösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind mit Lösungsmittel, Stammlösung und Arbeitskonzentration in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tabelle 2.9: **Antibiotika-Stammlösungen**

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]
Ampicilin-Natriumsalz	H_2O	100	100
Kanamycin-Sulfat	H_2O	30	30

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden nach dem Ansetzen sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Glucose-Lösung (20 % [w/v])

20 g Glucose wurden in 250 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 1 M.

Hämin-Stammlösung (100x)
Es wurden 50 mg Hämin in 1 ml 1 M NaOH gelöst und anschließend mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt. Die Arbeitskonzentration von Hämin betrug somit 7,6 µM. Die Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Lipid-Stammlösung (5x)
Die in dieser Arbeit verwendete Lipid-Stammlösung ist in Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tabelle 2.10: **Lipid-Stammlösung** (modifiziert nach Motwani *et al.*, 2001)

		Stammlösung		Arbeitskonzentration
Triglyceride	Tripalmitolein	215 mg	26,8 mM	5,4 mM
	Triolein	215 µl	24,2 mM	4,8 mM
	Trimyristin	215 mg	29,7 mM	5,9 mM
	Tripalmitin	215 µl	26,6 mM	5,3 mM
	Tristearin	215 mg	24,1 mM	4,8 mM
Fettsäuren	Myristoleinsäure	70 µl	29,1 mM	5,8 mM
	Palmitinsäure	70 µl	7,7 mM	1,5 mM
	Ölsäure	70 µl	24,8 mM	5 mM
	Myristinsäure	70 mg	23,1 mM	4,6 mM
	Palmitoleinsäure	70 mg	27,5 mM	5,5 mM
	Stearinsäure	70 mg	19,5 mM	3,9 mM
Wachsester	Palmitylpalmitat	325 mg	67,6 mM	13,5 mM
	Stearylstearat	325 mg	60,5 mM	12,1 mM
Squalen		315 µl	76,7 mM	15,3 mM
Cholesterin		40 mg	10,3 mM	2,1 mM
PYG-Komplexmedium		ad 10 ml		

Medienzusätze

Die in dieser Arbeit verwendeten sonstigen Medienzusätze sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: **Medienzusätze**

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösung	Arbeitskonzentration
IPTG	H_2O	119 mg/ml	47,6 µg/ml (200 µM)
X-Gal[1]	Dimethylformamid	100 mg/ml	40 µg/ml (98 µM)
Biotin	H_2O	12 mg/ml	12 µg/ml (83,9 µM)
L-Histidin	H_2O	13,6 mg/ml	13,6 µg/ml (87,5 µM)

Anmerkung: [1] dunkel lagern, da lichtempfindlich

Die Medienzusätze wurden, bis auf X-Gal, nach dem Ansetzen sterilfiltriert und bis auf Histidin bei -20 °C gelagert.

Salz-Stammlösung (25x)

Die in dieser Arbeit verwendete Salz-Stammlösung ist in Tabelle 2.12 aufgeführt.

Tabelle 2.12: **Salz-Stammlösung**

	Stammlösung		Arbeitskonzentration
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,25 g	680 µM	27,2 µM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,5 g	2 mM	80 µM
KH_2PO_4	1 g	7,4 mM	0,3 mM
NaCl	2 g	34 mM	1,36 mM
K_2HPO_4	1 g	7 mM	0,28 mM
$NaHCO_3$	10 g	94 mM	3,8 mM
H_2O	ad 1 000 ml		

Die Salz-Stammlösung wurde sterilfiltriert und unter einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Vitamin-K_1-Stammlösung (5 000x)
Es wurden 0,2 ml von Vitamin K_1 in 20 ml 95%igen (v/v) Ethanol gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die Arbeitskonzentration von Vitamin K_1 betrugt somit 4,4 µM. Die Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.3 Stammhaltung

Die Kulturen der Mikroorganismen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Ein Aliquot wurde bei -70 °C als Glycerinkultur (50 % [v/v] bzw. 10 % [v/v]) in fest verschließbaren Reaktionsgefäßen bzw. Schraubdeckelröhrchen gelagert. Die Glycerinkulturen (Stammkulturen) dienten als Ausgangskulturen, mit denen Flüssigmedien beimpft wurden.

2.4.4 Kultivierungsbedingungen

Kultivierung von *P. acnes*
Ausgehend von der Stammkultur wurden 5 ml PYG-Medium (2.4.1) in Schraubdeckelröhrchen beimpft. Diese Vorkultur diente als Inokulum für 50-ml-PYG-Kulturen. Die Inkubation der Kulturen erfolgte anaerob bei 37 °C ohne Schütteln. Das Überimpfen der Kulturen in frisches Medium erfolgte mit sterilen Spritzen.
Das Wachstum der Kulturen auf Festmedien erfolgte anaerob bei 37 °C.

Kultivierung von *S. aureus*
Ausgehend von der Stammkultur wurden 5 ml TB-Medium (2.4.1) in Reagenzgläsern beimpft. Diese Vorkultur diente als Inokulum für 100 ml TB-Medium in 300 ml-Erlenmeyerkolben. Die Inkubation der Kulturen erfolgte aerob bei 37 °C und bei 200 Upm auf einem Inkubationsschüttler. Das Überimpfen der Kulturen in frisches Medium erfolgte mit sterilen Glaspipetten.
Das Wachstum der Kulturen auf Festmedien erfolgte aerob bei 37 °C.

Kultivierung von *S. epidermidis*
Ausgehend von der Stammkultur wurden 5 ml LB-Medium (2.4.1) in Reagenzgläsern beimpft. Diese Vorkultur diente als Inokulum für 100 ml LB-Medium in 300-ml-Erlenmeyerkolben. Die Inkubation der Kulturen erfolgte aerob bei 37 °C und bei 200 Upm auf einem Inkubationsschüttler. Das Überimpfen der Kulturen in frisches Medium erfolgte mit sterilen Glaspipetten.
Das Wachstum der Kulturen auf Festmedien erfolgte aerob bei 37 °C.

Kultivierung von *C. xerosis*
Ausgehend von der Stammkultur wurden 5 ml TSB-Medium (2.4.1) in Reagenzgläsern beimpft. Diese Vorkultur diente als Inokulum für 100 ml TSB-Medium in 300-ml-Erlenmeyerkolben. Die Inkubation der Kulturen erfolgte aerob bei 37 °C und bei 200 Upm auf einem Inkubationsschüttler. Das Überimpfen der Kulturen in frisches Medium erfolgte mit sterilen Glaspipetten.
Das Wachstum der Kulturen auf Festmedien erfolgte aerob bei 37 °C.

Kultivierung von *M. furfur*
Ausgehend von der Stammkultur wurden 5 ml LB-Medium (2.4.1) in Reagenzgläsern beimpft. Diese Vorkultur diente als Inokulum für 300 ml LB-Medium in 1-l-Erlenmeyerkolben. Die Inkubation der Kulturen erfolgte aerob bei 30 °C und bei 200 Upm auf einem Inkubationsschüttler. Das Überimpfen der Kulturen in frisches Medium erfolgte mit sterilen Glaspipetten.
Das Wachstum der Kulturen auf Festmedien erfolgte aerob bei 30 °C.

Kultivierung von *S. typhimurium*
Ausgehend von der Stammkultur wurden 5 ml NB-Medium (2.4.1) in Reagenzgläsern beimpft. Diese Vorkultur diente als Inokulum für weitere 500 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben. Die Inkubation der Kulturen erfolgte aerob bei 37 °C und bei 200 Upm auf einem Inkubationsschüttler. Das Überimpfen der Kulturen in frisches Medium erfolgte mit sterilen Glaspipetten.
Das Wachstum der Kulturen auf Festmedien erfolgte aerob bei 37 °C.

Kultivierung von *E. coli*
Die Kultivierung der *E. coli*-Kulturen erfolgte in Reagenzgläsern, die 5 ml LB-Medium (2.4.1) enthielten, aerob bei 37 °C und bei 200 Upm auf einem Inkubationsschüttler.
Das Wachstum auf Festmedium erfolgte aerob bei 37 °C.

2.4.5 Bestimmung von Wachstumsparametern

Bestimmung der optischen Dichte
Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer. Die Messung erfolgte, indem die Schraubdeckelröhrchen mit der Kultur direkt in ein Photometer gestellt wurden, oder mit 1-ml-Halbmikroküvetten, in die 1 ml der Kultur gegeben wurde. Bei der Messung mittels 1-ml-Halbmikroküvetten wurden Proben, deren OD über 0,3 lag, mit sterilem Medium verdünnt, um die Linearität der Messwerte zu gewährleisten. Alle Messungen erfolgten gegen das entsprechende Medium als Leerwert.

Messung des externen pH-Wertes
Zur Ermittlung des pH-Wertes wurden 2 ml der Kultur für 5 min bei 13 000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein Reagenzglas gegeben, um mittels eines pH-Messgerätes den pH-Wert zu messen.

Bestimmung der Zellmasse
Zur Ermittlung der Zellmasse wurde eine definierte Menge der Kultur mit Hilfe eines Vakuums filtriert. Das Filterpapier wurde für 24 bzw. 48 Stunden in einem Exsikkator getrocknet. Die Differenz des Gewichts des leeren Filterpapiers und des Filterpapiers nach der Filtration und Trocknung ergab das Trockengewicht.

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Lösungen und hitzestabile Geräte wurden für Arbeiten mit DNA bei 121 °C und einem Druck von 200 kPa für 20 min autoklaviert, um Nukleasen zu inaktivieren und Kontaminationen zu verhindern. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.
Für Arbeiten mit RNA wurden die Lösungen und Geräte zweimal autoklaviert. Des Weiteren wurden die Lösungen mit DEPC-Wasser angesetzt, um RNasen zu inaktivieren.

Dazu wurde dem Wasser 1/200 Volumen DEPC zugegeben und gemischt, bis sich die Kügelchen lösten. Das Wasser wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und abschließend autoklaviert. Arbeitsflächen und hitzelabile Geräte wurden vor dem Arbeiten mit 1%iger (w/v) SDS-Lösung und mit 1%iger (w/v) NaOH-Lösung behandelt. Außerdem wurden stets Einweghandschuhe getragen, um Kontaminationen mit externen Nukleasen zu vermeiden.

2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus Mikroorganismen

2.5.1.1 Isolierung chromosomaler DNA

Für die Isolierung chromosomaler DNA wurden die Zellen einer Kultur in der spät-exponentiellen Wachstumsphase durch eine Zentrifugation für 20 min bei 5 000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 4 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) (2.3) aufgenommen. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 5 000 g und 4 °C. Das Sediment wurde in 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8) (2.3) aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl Achromopeptidase (1 1000 U/ml), 4 µg/ml RNase A (10 mg/ml) und 10 µl Lysozym (20 mg/ml) (Enzym-Stammlösungen siehe 2.3) zugegeben, um die Zellwand aufzuschließen und die RNA abzubauen. Nach Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C wurden 100 µl SDS (10 % [w/v]) und 4 µl Proteinase K (2.3) zugegeben, um Proteine abzubauen. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 55 °C inkubiert. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.5.2.1) zur Reinigung der chromosomalen DNA und eine Alkohol-Fällung (2.5.3.1). Dabei fiel die DNA sofort aus und die Probe wurde für 15 min bei 13 000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit Ethanol (70 % [w/v]) gewaschen. Danach folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13 000 g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment bei 55 °C in einem Heizblock getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 200 µl TE-Puffer (2.3) aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.1.2 RNA-Isolierung aus *P. acnes*

Zur Isolierung der RNA wurden die Zellen einer *P. acnes*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und sofort mit 1 Volumen „Killing-Puffer“ (2.3) versetzt. Der „Killing-Puffer“ diente dazu, alle Stoffwechselaktivitäten zu stoppen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 5 000 g und 4 °C. Der Überstand wurde ver-

worfen und das Sediment in 700 µl ASE-Puffer (2.3) gelöst. Das gelöste Sediment wurde für den Zellaufschluß in ein 2-ml-Schraubdeckelgefäß, in dem 250 mg Glaskügelchen vorgelegt wurden, gegeben. Der Zellaufschluß erfolgte dreimal jeweils bei Stufe 6,5 für 45 s bei 4 °C mit Hilfe des „RiboLyser™“. Dazwischen erfolgte jeweils eine Kühlung auf Eis. Um die Glaskügelchen von der Lösung zu trennen, erfolgte eine kurze Zentrifugation. Der Überstand wurde in zwei 1,5-ml-Reaktionsgefäße gegeben. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.5.2.1) zur Reinigung der RNA-Lösung und eine Alkohol-Fällung (2.5.3.1). Die RNA-Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.
Um die DNA, die einen störenden Einfluss auf weitere Analysen der RNA hat, zu entfernen, wurden die RNA-Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Zuerst wurde die Konzentration der Nukleinsäuren in der RNA-Probe bestimmt (2.5.3.3). Pro 150 µg Nukleinsäuren in der RNA-Probe wurden 50 U DNase I zugegeben. Dazu wurden 40 U RNase-Inhibitor und 1/10 Volumen 10x DNase-Reaktionspuffer (2.3) gegeben, woran sich eine Inkubation für 30 min bei 25 °C anschloß. Die Inaktivierung der DNase I erfolgte für 10 min bei 65 °C. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.5.2.1) zur Reinigung der RNA-Lösung und eine Alkohol-Fällung (2.5.3.1).
Ein Aliquot der RNA wurde sowohl vor als auch nach dem DNase-Verdau auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob ein Abbau der RNA stattgefunden hatte. Um zu überprüfen, ob sich noch DNA in den RNA-Proben befand, wurde eine Standard-PCR (2.5.6.1) durchgeführt. War nach der PCR noch ein Produkt vorhanden, also eine Bande im Agarosegel sichtbar, so wurde der DNase-Verdau wiederholt.

2.5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plamid-DNA aus *E. coli* wurde das „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Das Prinzip dieses „Kits“ beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der Reinigung der Plasmid-DNA über eine reversible Bindung an eine Silica-Matrix.
Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in einem Kühlscharnk gelagert. Die Plasmid-DNA wurde nach der Isolierung ohne gesonderte Reinigung direkt für weitere Versuche verwendet.

2.5.2 Reinigung von Nukleinsäuren

2.5.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Verunreinigungen wie Salze und Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Zu den Nukleinsäurelösungen wurde 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) gegeben. Die Ansätze wurden für 30 s gemischt, und es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13 000 g und Raumtemperatur. Die obere, wässrige Phase, in der sich die Nukleinsäuren befanden, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben. Die organische Phase und die Grenzschicht zwischen beiden Phasen mit den Verunreinigungen wurden verworfen. Zu der wässrigen Phase wurde 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) gegeben, gemischt und erneut zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde erneut in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben.
Der obige Reinigungsschritt wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu beobachten war. Anschließend erfolgte eine Alkoholfällung (2.5.3.1), bei der auch die Phenolreste aus der Nukleinsäurelösung entfernt wurden.

2.5.2.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten, vor allem von PCR-Ansätzen, erfolgte mit dem „UltraClean™ 15 DNA Purification Kit“ (Vogelstein und Gillespie, 1979). Zu den Proben wurde das dreifache Volumen „Ultra Salt“ gegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 5 min bei 55 °C in einem Heizblock, wobei die Probe mehrmals gemischt wurde. Danach wurden 8 µl „Ultra Bind“, eine Silica-Suspension („Glasmilch“), zu der Probe gegeben, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 s bei 13 000 g und Raumtemperatur, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Sediment wurde in 1 ml „Ultra Wash“ aufgenommen und die Probe wurde gemischt. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte für 30 s bei 13 000 g und Raumtemperatur, wobei jeweils der Überstand verworfen wurde. Das Sediment wurde bei 55 °C in einem Heizblock getrocknet und anschließend in 20 µl H_2O gelöst. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und anschließend zweimal eine Zentrifugation für 1 min bei 13 000 g und Raumtemperatur, wobei der Überstand jeweils in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben wurde. Die DNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.2.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Waren nach einer Gelelektrophorese mehrere DNA-Fragmente zu erkennen, wurde auf einem UV-Schirm ($\lambda = 365\,\text{nm}$) die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gewicht der Gelstücke wurde bestimmt und anschließend das dreifache Volumen „Ultra Salt“ zugegeben (pro 100 mg Gel 300 µl „Ultra Salt“). Ansonsten wurde wie unter 2.5.2.2 beschrieben verfahren.

2.5.3 Fällen und Konzentrieren von Nukleinsäuren

2.5.3.1 Fällung mit Alkohol

Nukleinsäuren fallen in Anwesenheit eines einfach geladenen Salzes und Alkohol aus. Daher wurden zur Fällung von Nukleinsäuren zu den Nukleinsäurelösungen 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) (2.3) und 2,5 Volumen absoluter, eiskalter Ethanol gegeben. Die Probe wurde danach für 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 30 min bei 13 000 g und 4 °C zentrifugiert. Ethanol wurde abgenommen und das Sediment mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 13 000 g und 4 °C. Ethanol wurde abgenommen und das Sediment in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (2.5.3.2). Abschließend wurde das Sediment im gewünschten Volumen Wasser aufgenommen.

2.5.3.2 Trocknen von Sedimenten in einer Vakuumzentrifuge

Um bei Sedimenten, vor allem nach Fällungen (2.5.3.1), die restliche Flüssigkeit zu entfernen, wurden die Proben in eine Vakuumzentrifuge gegeben. Durch das Vakuum kommt es zu einer Erniedrigung des Siedepunktes der Flüssigkeit, wodurch die Flüssigkeit verdampft. Durch die beheizbare Apparatur wird ein Gefrieren der Proben aufgrund der Verdunstungskälte verhindert. Das Zentrifugieren verhindert, dass austretende Gasblasen während des Trocknens die Proben zum Schäumen bringen. Das Sediment wurde nach dem Trocknen in einer Vakuumzentrifuge im gewünschten Volumen Wasser aufgenommen.

2.5.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer. Dafür wurden die zu messenden Proben in einer geeigneten Verdünnung in eine Quarzküvette gegeben, und es erfolgte die Messung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml und bei RNA 33 µg/ml. Das Verhältnis der Absorptionen (A_{260}/A_{280}) gibt die Reinheit der Nukleinsäurelösung an und sollte im Idealfall zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Wilfinger *et al.*, 1997).

2.5.4 Färben von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Nach dem Gellauf wurde das Agarosegel in einer Ethidiumbromid-Lösung für 10 min gefärbt. Ethidiumbromid lagert sich in Nukleinsäuren ein. Dadurch verändert sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid und somit können Nukleinsäuren durch Anregung mit ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage wurden die Agarosegele mit ultraviolettem Licht ($\lambda = 312$ nm) belichtet und fotografiert.

2.5.5 Trennung von Nukleinsäurefragmenten

2.5.5.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um Nukleinsäure-Fragmente entsprechend ihrer Größe zu trennen. Dabei wandert die DNA aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen im eletrischen Feld zur Anode. Agarose ist ein Polysaccharid, so dass die Nukleinsäure-Fragmente entsprechend ihrer Größe unterschiedlich stark zurückgehalten werden. In diesen Versuchen wurden 0,8%ige Agarosegele verwendet.
Für ein 0,8%iges Agarosegel wurden 0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (2.3) gelöst, in einer Mikrowelle (3 min bei 600 W) aufgekocht und in eine Gelkammer mit passendem Kamm gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es mit TAE-Puffer (2.3) überschichtet. Ein Aliquot der zu untersuchenden Probe wurde mit „6x DNA Loading Dye“ versetzt. Ein DNA-Größenstandard („Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix“) wurde ebenfalls aufgetragen und diente der Bestimmung der Fragmentgrößen. Der Gellauf erfolgte bei 20 V/cm für 45 min. Das Agarosegel wurde anschließend gefärbt und fotografiert (2.5.4).

2.5.5.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Denaturierende Agarosegele wurden für die Trennung von RNA verwendet. Mit diesen Gelen wurde die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert, die das Laufverhalten der RNA beeinflussen. Das Prinzip ist dasselbe wie unter beschriebene, nur dass zur Trennung der RNA 1%ige Agarosegele verwendet wurden.
Für ein 1%iges (w/v), denaturierendes Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 108 ml H_2O gegeben und autoklaviert, wodurch sich die Agarose im Wasser löste. Danach wurden 27 ml 37%iges (v/v) Formaldehyd und 15 ml 10x MAE-Puffer (2.3) zugegeben. Das Gel wurde in eine Gelkammer, die zuvor mit 0,1%iger NaOH gesäubert worden war, gegossen. Für 1 Stunde wurde das Gel zum Polymerisieren unter einen Abzug gestellt und danach mit 1x MAE-Puffer überschichtet. Ein RNA-Größenstandard („RNA Ladder™ High Range“) sowie die Proben, die zuvor mit 1/5 Volumen 5x Formamid-Auftragspuffer (2.3) versetzt worden waren, wurden vor dem Auftragen für 15 min bei 95 °C denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei 5 V/cm über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (2.3) gefärbt und mit Hilfe der Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4).

2.5.6 Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion

2.5.6.1 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) ist die Standardmethode zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten.
Die PCR wurde in 500-µl- bzw. 200-µl-Reaktionsgefäßen angesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl enthielt dabei 1 µg chromosomale DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, dNTP-Mix (je 10 mM), 25 pmol Oligodesoxynukleotid „forward“, 25 pmol Oligodesoxynukleotid „reverse“ und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase. Das Volumen wurde mit Wasser auf 50 µl eingestellt.
Das in dieser Arbeit verwendete Standard-Protokoll bestand aus einer anfänglichen Denaturierung von 5 min bei 95 °C, um die DNA-Doppelstränge zu trennen. Danach folgten 32 Zyklen von jeweils 30 s bei 95 °C, 30 s bei 55 °C* zur Anlagerung der Oligodesoxynukleotide an die einzelsträngige DNA („Annealing“) und von 1 min bei 72 °C zur Verlängerung der angelagerten Oligodesoxynukleotide durch die *Taq*-DNA-Polymerase („Elon-

gation“). Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt bei 72 °C ihr Temperaturoptimum und baut ungefähr 1 200 Nukleotide pro Minute ein. Entsprechend der zu erwartenden Fragmentlänge wurde die Zeit der „Elongation“ gewählt. Abschließend wurde noch eine „End-Elongation“ für 5 min bei 72 °C durchgeführt. Dadurch wurden alle Doppelstränge in voller Länge durch die *Taq*-DNA-Polymerase synthetisiert. Der Ansatz wurde danach auf 12 °C abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert.
Zur Kontrolle der PCR wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4).

* Die „Annealing“-Temperatur T_m ist abhängig von der Länge und der Sequenz der verwendeten Oligodesoxynukleotide und wurde wie folgt berechnet:

$$T_m = 64{,}9 - \frac{(G + C) - 16{,}4}{\text{Länge des Oligodesoxynukleotides in Basen}}\,[°C]$$

(https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html)

2.5.6.2 „Touch-Down“-PCR

Die „Touch-Down“-PCR wurde verwendet, wenn nach einer Standard-PCR kein Produkt gebildet worden war. Daraufhin wurde überprüft, ob dies an der „Annealing“-Temperatur liegen könnte. Dabei wurde derselbe Ansatz und dasselbe Programm wie bei der Standard-PCR (2.5.6.1) verwendet, nur dass die anfänglich gewählte „Annealing“-Temperatur bei jedem Zyklus um 0,5 °C zunahm. Hier wurde die „Touch-Down“-PCR verwendet, um zu überprüfen, ob überhaupt ein Produkt zu erwarten war. Dabei lag die anfänglich gewählte „Annealing“-Temperatur bei 47 °C.
Zur Kontrolle der „Touch-Down“-PCR wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4). War eine Bande sichtbar, so wurde zur Ermittlung der optimalen „Annealing“-Temperatur eine Gradienten-PCR durchgeführt (2.5.6.3).

2.5.6.3 Gradienten-PCR

Ergab die „Touch-Down“-PCR ein Produkt, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, um die optimale „Annealing“-Temperatur zu ermitteln. Dazu wurde der Gradientenblock statt des Standardthermoblocks in die PCR-Maschine eingebaut. Dieser ermöglicht es, in jeder Spalte eine andere „Annealing“-Temperatur anzugeben. Dabei wurde derselbe Ansatz und dasselbe Programm wie bei der Standard-PCR (2.5.6.1) verwendet.
Zur Kontrolle der Gradienten-PCR wurde jeweils ein Aliquot eines jeden Ansatzes auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4). Die „Annealing“-Temperatur des Ansatzes mit der stärksten Bandenintensität wurde für die weiteren PCR-Analysen verwendet.

2.5.6.4 „PuReTaq™ Ready To Go beads“

Bei der PCR mit „beads“ enthielten diese bereits alle für eine PCR notwendigen Komponenten (dNTPs, Puffer [inklusive $MgCl_2$] und Polymerase). Nur die beiden Oligodesoxynukleotide und die DNA mussten zugegeben werden. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die „beads“ wurden hier nur verwendet, um die Oligodesoxynukleotide auf ihre Funktion zu prüfen. Es wurde das PCR-Standard-Programm verwendet (2.5.6.1).
Nach der PCR mit „beads“ wurde zur Kontrolle ein Aliquot eines jeden Ansatzes auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4).

2.5.6.5 „Cross-over“-PCR

Die Methode der „cross-over“-PCR wurde in dieser Arbeit verwendet, um mittels dreier PCR-Ansätze Deletionskonstrukte zu generieren.
In zwei getrennten PCR-Ansätzen wurden zwei Fragmente, ein Fragment stromaufwärts und ein Fragment stromabärts des zu deletierenden Gens, generiert. Die Durchführung der PCR-Ansätze erfolgte nach dem Standardprotokoll (2.5.6.1). Von der „Cross-over“-PCR wurde zur Kontrolle ein Aliquot eines jeden Ansatzes auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4). War eine Bande der gewünschten Größe sichtbar, wurden die Fragmente gereinigt (2.5.2.2, 2.5.2.3). In einem dritten PCR-Ansatz erfolgte die ge-

genseitige Anlagerung der zwei amplifizierten Fragmente an komplementäre Regionen, die bereits an die entsprechenden Oligodesoxynukleotide angefügt worden waren. Der dritte PCR-Ansatz erfolgte mit den äußeren Oligodesoxynukleotiden, an die jeweils eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme angefügt wurde. Dies war für die spätere Klonierung von Bedeutung. Ein Aliquot des dritten PCR-Ansatzes wurde auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4). War eine Bande der gewünschten Größe sichtbar, wurde das Deletionsfragment für die weiteren Arbeiten gereinigt (2.5.2.2, 2.5.2.3). Das gereinigte Deletionsfragment wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert.

2.5.6.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Mit der Methode der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) lässt sich aus mRNA cDNA (*complementary DNA*) synthetisieren, die in einer anschließenden Standard-PCR als Matrize dient. Dazu wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert (2.5.1.2)
Für die Synthese der cDNA wurden 0,01 pg bis 0,5 µg Gesamt-RNA und je 20 pmol des „forward"- bzw. „reverse"-Oligodesoxynukleotides in ein 0,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben und das Volumen mit DEPC-behandeltem Wasser auf 11 µl eingestellt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Danach wurde der Ansatz bei 4 °C gekühlt. Dem Ansatz wurden 4 µl des „5x Reaction Buffer " für M-MuLV-Reverse-Transkriptase, dNTP-Mix (je 10 mM), 20 U RNase-Inhibitor und 40 U Reverse Transkriptase (M-MuLV-RT) zugegeben und das Volumen mit DEPC-behandeltem Wasser auf 20 µl eingestellt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 45 °C, dem Temperaturoptimum der M-MuLV-RT, inkubiert, wobei die Synthese der cDNA erfolgte. Um danach die M-MuLV-RT zu inaktivieren, wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 12 °C abgekühlt.
Mit der cDNA erfolgte eine PCR unter Standardbedingungen (2.5.6.1). Dazu wurden der cDNA 5 µl 10x Reaktionspuffer und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase zugegeben. Das Volumen wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf 50 µl eingestellt.
Zur Kontrolle der RT-PCR wurde ein Aliquot des RT-PCR-Ansatzes auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4).

2.5.6.7 quantitative „Real-Time"-Polymerasekettenreaktion

Mit der Methode der quantitativen „Real-Time"-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) lässt sich das Expressionsverhältnis eines Gens unter verschiedenen Anzuchtbedingungen bestimmen (Pfaffl *et al.*, 2002 und Pfaffl, 2001. In den Versuchen dieser Arbeit wurde dabei der LightCycler® verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass nach der cDNA-Synthese dem PCR-Ansatz der Floureszenfarbstoff SYBR Green I®, der im LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS}"enthalten ist, zugegeben wird. SYBR Green I® lagert sich in doppelsträngige DNA ein. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht ($\lambda = 470\,\text{nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda = 530\,\text{nm}$). Bei dieser Methode wurde blaues Licht ($\lambda = 470\,\text{nm}$) auf die Proben gegeben und die Intensitität des emittierenden grünen Lichtes ($\lambda = 530\,\text{nm}$) gemessen. Das Signal der Fluoreszenz nimmt während der PCR proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA zu. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei jedem Schritt nach der „Elongation".
Zuerst wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert (2.5.1.2). Anschließend erfolgte mit der isolierten RNA eine cDNA-Synthese. Ein typischer Ansatz der cDNA-Synthese für die Bestimmung des Expressionsverhältnisses bestand aus 50 ng Gesamt-RNA, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 2 pmol des „reverse"- Oligodesoxynukleotides. Das Volumen wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf 13 µl eingestellt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Danach wurde der Ansatz bei 4 °C gekühlt. Dem Ansatz wurden danach 4 µl des „5x First-Strand Buffers", 1 µl 0,1 M DTT, 20 U RNase-Inhibitor und 40 U Reverse Transkriptase (SuperScript^{TM} III-RT) zugegeben. Das Volumen wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf 20 µl eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 55 °C inkubiert, wobei die Synthese der cDNA erfolgte. Um danach die SuperScript^{TM} III-RT zu inaktivieren, wurde der Ansatz für 15 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 12 °C abgekühlt.
Mit der cDNA erfolgte eine PCR im LightCycler®. Ein typischer Ansatz bestand dabei aus 4 µl „LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I", je 2 µl des „forward"- bzw. „reverse"-Oligodesoxynukleotides (10 pmol), 5 µl cDNA und 7 µl „UltraPure"-Wasser. Die PCR-Ansätze wurden in vorgekühlte Glaskapillaren (Capillaries [20 µl]) gegeben. Die Kapillaren wurden geschlossen und für 10 s bei 700 Upm zentrifugiert. Danach wurden die Kapillaren in das Probenkarussel (Sample Carousel [20 µl]) gegeben, und es erfolgte eine PCR unter folgenden Bedingungen:

	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit	Δ°C/s
„HotStart“	1	95	10 min	20
Denaturierung	45	95	10 s	20
„Annealing“	45	variabel*	5 s	20
„Elongation“	45	72	10 s	20
Schmelzkurve	1	65 bis 98	-	0,1
Kühlung	1	32	-	20

* Die Berechnung der „Annealing“-Temperatur erfolgte mit der bei der Standard-PCR (2.5.6.1) aufgeführten Formel.

Die *Taq*-DNA-Polymerase wird durch Inhibitoren in ihrer Aktivität gehindert. Daher hat die *Taq*-DNA-Polymerase unter 75 °C keine Aktivität, so dass die Probenvorbereitung bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnte. Der „HotStart“ diente zur Inaktivierung der Inhibitoren und somit der Aktivierung der *Taq*-DNA-Polymerase. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe einer speziellen Software (Data Analysis, Version 3.5.28 [Roche]).

2.5.7 Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.7.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsspaltung dient dazu, DNA mittels Restriktionsendonukleasen zu spalten (verdauen) (Sambrook *et al.*, 2001).
In einem Ansatz wurden 1-10 µg DNA eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 2.5.3.3 beschrieben. Von jedem benötigtem Restriktionsenzym wurden 10 U/µg DNA eingesetzt und von dem Raktionspuffer wurde 1/10 Volumen zugegeben. Der Reaktionspuffer wurde dabei so gewählt, dass jedes Enzym eine Aktivität von mindestens 50 % aufwies (http://fermentas.com/en/tools/doubledigest). Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 20-100 µl und wurde mit H_2O eingestellt. Der Verdau erfolgte für 1,5 h bei 37 °C in einem Heizblock. Anschließend wurden die Enzyme für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot des Verdaus auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4). Anschließend wurde der Verdau gereinigt (2.5.2.2). Der Verdau wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert.

2.5.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Plasmid-DNA wurde nach einer Restriktionsspaltung am 5′-Ende dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. DNA-Fragmente wurden dephosphoryliert, um diese radioaktiv markieren zu können (Sambrook *et al.*, 2001).
Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 20-100 µl und wurde mit H_2O eingestellt. Es wurden zu 1-10 µg DNA 2 U/µg Phosphatase (SAP) und 1/10 Volumen „10x Reaction Buffer for SAP“ gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C und eine Inaktivierung der Phosphatase für 15 min bei 65 °C. Die geschnittene und dephosphorylierte DNA wurde vollständig auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage fotografiert (2.5.4). Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA gereinigt (2.5.2.3). Die geschnittene und dephosphorylierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert.

2.5.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wird verwendet, um DNA-Fragmente zusammenzufügen (Sambrook *et al.*, 2001).
Für einen Ligationsansatz von 20 µl wurden 0,1 µg geschnittene und dephosphorylierte Plasmid-DNA und 0,1 µg geschnitte DNA verwendet. Dazu wurden 1/10 Volumen 10x Ligasepuffer und 1 U Ligase gegeben. Das Gesamtvolumen wurde mit H_2O eingestellt. Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei 22 °C. Es folgte die Inaktivierung der Ligase für 15 min bei 65 °C. Der Ligationsansatz wurde nicht gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert.

2.5.7.4 TA-Klonierung

Die TA-Klonierung ermöglicht die Ligation eines PCR-Fragments in das Plasmid pDrive. Dies ermöglicht die Ligation des PCR-Produktes, welches am 3′-Ende einen Adenin-Überhang besitzt, den die „High-Fidelity-*Taq*-DNA-Polymerase“ bei einer PCR (2.5.6.1) anhängt, in das Plasmid.
Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit Hilfe des „Qiagen® PCR Cloning Kit“ in den „pDrive Cloning Vector“ ligiert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (2 µl PCR-Produkt, 5 µl 2x Puffer, 1 µl pDrive, 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl Wasser). Das Plasmid pDrive liegt linear vor und besitzt am 3′-Ende ein überhängendes Uracil.

Dies ermöglichte die Ligation des PCR-Produktes in das Plasmid. Das PCR-Produkt wurde dabei in das *lacZ*-Gen des Plasmids ligiert, wodurch eine Blau-Weiß-Selektion zur Identifizierung positiver Klone möglich war. Auch besitzt das Plasmid Gene für die Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz. Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei 22 °C, danach wurde die T4-DNA-Ligase durch Inkubation für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Der Ligationsansatz wurde nicht gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert.

2.5.8 Sequenzierung von DNA

Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen nicht kontaminiert waren, wurden Sequenzierreaktionen des *rrs*-Gens, welches für die 16S rRNA kodiert, und des *recA*-Gens, welches für die Rekombinase A kodiert, durchgeführt (Weisburg *et al.*, 1991).
Dazu wurde mit den Oligodesoxynukleotiden aus Tabelle 2.5 eine Standard-PCR (2.5.6.1) mit zwei Stufen durchgeführt, da die „Annealing"-Temperatur der beiden Oligodesoxynukleotide zu unterschiedlich war. Bei der ersten Stufe mit 10 Zyklen betrug die „Annealing"-Temperatur 48 °C, bei der zweiten Stufe mit 25 Zyklen 52 °C. Als Polymerase wurde die „High-Fidelity-*Taq*-DNA-Polymerase" verwendet, die am 3′-Ende ein überhängendes Desoxyadenin anhängt, das die TA-Klonierung ermöglicht. Als Matrize diente chromosomale DNA (2.5.1.1) des jeweiligen zu untersuchenden Mikroorganismus. Der PCR-Ansatz wurde anschließend gereinigt (2.5.2.2). Das PCR-Produkt wurde in den „pDrive Cloning Vector" ligiert (2.5.7.4).
Die Transformation des Plasmids erfolgte in *E. coli* K12 DH5α und *E. coli* K12 HB101 (2.8.3). Von dem Transformationsansatz wurden jeweils 150 µl auf LB-Agarplatten mit 30 µg/ml Kanamycin ausplattiert (2.4.2). Mit den transformierten *E. coli* K12 DH5α-Zellen erfolgte zusätzlich eine α-Komplementation (2.9). Die Agarplatten wurden über Nacht aerob bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
Mit den gewachsenen, positiven Kolonien wurden LB-Flüssigkulturen mit 100 µg/ml Ampicillin (2.4.2) beimpft. Die Flüssigkulturen wurden aerob bei 37 °C und 200 Upm auf einem Reagenzglasschüttler inkubiert.
Danach erfolgte eine Plasmid-Isolierung (2.5.1.3). Die Plasmide wurden in einer Konzentration von 50-100 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl zur Sequenzierung zur Firma Eurofins-MWG (Ebersberg) geschickt. Der Abgleich der Sequenzdaten fand über eine BLAST-Analyse (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi; Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990) (Datenbank der Universität Bielefeld) statt.

2.6 „Northern blot“-Verfahren

2.6.1 Herstellung markierter DNA-Sonden

2.6.1.1 Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten („DIG“-Markierung)

Für die Herstellung nicht-radioaktiv markierter DNA-Sonden wurden mit der *Taq*-DNA-Polymerase PCR-Produkte amplifiziert (2.5.6.1). Die dabei verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. Dem PCR-Ansatz wurden zudem 0,5 µl Digoxigenin-11-dUTP (25 mM) pro 50 µl PCR-Ansatz zugegeben. Digoxigenin-11-dUTP ermöglicht die Herstellung spezifisch markierter DNA-Sonden. Bei einem Kontrollgel war zu erkennen, dass die markierte Sonde im Vergleich zur unmarkierten Sonde ein langsameres Laufverhalten zeigte. Der PCR-Ansatz wurde nicht gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert.

2.6.1.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Für die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wurden mit der *Taq*-DNA-Polymerase PCR-Produkte amplifiziert (2.5.6.1). Die dabei verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. DNA-Fragmente, die als DNA-Sonde für das „Northern blot“-Verfahren dienten, wurden am 5′-Ende dephosphoryliert (2.5.7.2) und anschließend gereinigt (2.5.2.2).
Für die radioaktive Markierung wurden zu 50 ng der dephosphorylierten und gereinigten DNA-Sonde 1 U T4-Polynukleotidkinase, 1/10 Volumen „10x Reaction Buffer“ für T4-Polynukleotidkinase und 370 kBq [$\gamma - {}^{32}$P]-ATP (1 pmol) gegeben. Das Gesamtvolumen wurde mit H_2O auf 50 µl eingestellt Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend über „Illustra MicroSpin^{TM} G-25 Columns“, wobei nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde, gereinigt.

2.6.2 Vakuumtransfer von RNA auf Nylonmembranen

Das „Northern blot“-Verfahren wurde angewendet, um die Größe von Transkripten zu bestimmen (Thomas, 1980). Dazu wurden 10 µg Gesamt-RNA mit einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese (2.5.5.2) elektrophoretisch getrennt. Die RNA wurde danach mittels einer „Blotting“-Apparatur und Vakuumpumpe auf eine Nylonmembran übertra-

gen. Die Trägerplatte wurde mit Wasser benetzt und darauf die Nylonmembran gelegt. Darüber kam eine Plastikmaske, auf die das Gel luftblasenfrei gelegt wurde. Für zwei Stunden wurde ein Unterdruck von 5,5 kPa angelegt. Der Transfer erfolgte für zwei bis vier Stunden. Das Gel wurde dabei alle 15 min mit 20x SSC-Puffer (2.3) überschichtet. Nach dem Transfer der RNA auf die Nylonmembran wurde diese getrocknet. Die kovalente Bindung der RNA an die Nylonmembran erfolgte mit Hilfe eines „UV-Crosslinkers" mit $5 \times 10\,\mu J/cm^5$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm.

2.6.3 Hybridisierung von RNA

2.6.3.1 Hybridisierung von RNA mit Digoxigenin-markierten Sonden

Vor der Hybridisierung wurden unspezifische Bindestellen mit der Prähybridisierungslösung B (2.3) geblockt. Dazu wurde die Nylonmembran in ein Glasröhrchen mit 20 ml Prähybridisierungslösung B gegeben. Die Prähybridisierung fand für fünf Stunden bei 50 °C in einem Hybridisierungsofen statt. Die Digoxigenin-markierten Sonden (2.6.1.1) wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden 10 ml der Prähybridisierungslösung B abgenommen und 2 µl Sonde pro ml Prähybridisierungslösung B in das Glasröhrchen gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 50 °C in einem Hybridisierungsofen statt. Danach wurde die Nylonmembran zweimal für 15 min bei Raumtemperatur mit 20 ml mit Waschpuffer 1 (2.3) und einmal für 15 min bei 50 °C mit 20 ml Waschpuffer 2 (2.3) gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion (2.6.4.1) der „DIG-markierten" DNA-Sonden (2.6.4.1).

2.6.3.2 Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten Sonden

Vor der Hybridisierung wurden unspezifische Bindestellen mit der Prähybridisierungslösung A (2.3) geblockt. Dazu wurde die Nylonmembran in ein Glasröhrchen mit 20 ml Prähybridisierungslösung A gegeben. Die Prähybridisierung fand für vier Stunden bei 60 °C in einem Hybridisierungsofen statt. Die Membran wurde zwischen „Whatman"-Papier getrocknet. 500 ng der radioaktiv-markierten DNA-Sonden (2.6.1.2) wurden für 15 min bei 95 °C denaturiert und zusammen mit 20 ml Prähybridisierungslösung A in das Glasröhrchen gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 60 °C in einem Hybridisierungsofen statt. Danach wurde die Nylonmembran jeweils zweimal für 30 min bei 60 °C mit je 20 ml mit Waschpuffer 1 (2.3) und Waschpuffer 2 (2.3) gewaschen. Die

Nylonmembran wurde getrocknet und für die Detektion (2.6.4.2) in Haushaltsfolie eingewickelt.

2.6.4 Detektion von RNA

2.6.4.1 Detektion von Digoxigenin-markierten Sonden

Zur Detektion Digoxigenin-markierter Sonden (2.6.1.1) wurde eine Anikörperreaktion verwendet. Dabei binden die Antikörper spezifisch an die in der DNA-Sonde eingebauten Digoxigenin-Moleküle. An die Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gebunden. Durch die Zugabe des Substrates CSPD® wird die Phosphatgruppe von der Phosphatase unter Emmission von Licht abgespalten. Somit tritt auf einem zuvor aufgebrachten Röntgenfilm an der Stelle eine Schwarzfärbung auf, an der eine solche Reaktion stattgefunden hat.
Alle Schritte der Detektion von Digoxigenin-markierten Sonden fanden bei Raumtemperatur statt. Zur Detektion der Digoxigenin-markierten Sonden (2.6.1.1) wurde die Nylonmembran in einem Glasröhrchen für 4 min mit 20 ml Waschpuffer 3 (2.3) gewaschen. Der Waschpuffer 3 wurde verworfen und die Membran für 30 min in 10 ml Blockierungslösung (2.3) inkubiert. Zu den 10 ml Blockierungslösung wurden 2 µl der Antikörperlösung (75 mU/ml) (2.3) gegeben. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für 30 min. Anschließend wurde die Membran zweimal mit jeweils 50 ml Waschpuffer 3 (2.3) für 15 min gewaschen. Danach wurde die Membran mit 10 ml Detektionspuffer, dem 10 µl CSPD® (25 mM) zugegeben worden waren, inkubiert. Die Membran wurde danach getrocknet und in Haushaltsfolie eingewickelt. Die Membran wurde in eine lichtundurchlässige Kassette gegeben, wobei auf die Membran ein „AGFA CRONEX 5“-Film gelegt wurde. Der Film wurde bis zur gewünschten Signalstärke exponiert und anschließend entwickelt.

2.6.4.2 Detektion von radioaktiv markierten Sonden

Die in Haushaltsfolie eingewickelte Membran wurde zur Detektion in eine lichtundurchlässige Kassette gegeben. Dabei wurde auf die Membran ein „AGFA CRONEX 5“-Film gelegt. Der Film wurde bis zur gewünschten Signalstärke exponiert und anschließend entwickelt.

2.7 „Dot blot“-Verfahren

Beim „Dot blot“-Verfahren wurde die vorab denaturierte RNA direkt auf eine Nylonmembran gegeben (Kafatos *et al.*, 1979). Anschließend wurde die Nylonmembran getrocknet und die RNA mit einem „UV-Crosslinker“ mit $5 \times 10\,\mu J/cm^5$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254\,nm$ auf der Membran fixiert. Anschließend wurde mit der Hybridisierung (2.6.3) fortgefahren.

2.8 DNA-Transfer in Bakterien

2.8.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* K12 DH5α-Zellen

Eine 5-ml-Übernachtkultur von *E. coli* K12 DH5α-Zellen wurde in 500 ml LB-Medium in einem 2-l-Erlenmeyerkolben gegeben. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 Upm. Bei einer OD_{600} von 0,5-0,6 wurde die Kultur für 15 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Kultur für 20 min bei 4 °C und 5 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 500 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 5 000 g. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 40 ml eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5 000 g. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Sediment in 4 ml 10%igen Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 50 µl in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.8.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* K12 HB101-Zellen

Eine 5-ml-Übernachtkultur von *E. coli* K12 HB101-Zellen wurde in 500 ml LB-Medium in einem 2-l-Erlenmeyerkolben gegeben. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 Upm. Bei einer OD_{600} von 0,6-0,9 wurde die Kultur für 15 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Kultur für 10 min bei 4 °C und 5 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 250 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 5 000 g. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 30 ml eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C

und 5 000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 4 ml 10%igen Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 50 µl in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.8.3 Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zu 50 µl elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (2.8.1, 2.8.2) wurden 500 ng Plasmid-DNA gegeben. Dieser Ansatz wurde in eine eisgekühlte Küvette mit einer Lückenweite von 2 mm gegeben. Die Küvette wurde in ein Elektroporationsgerät gestellt und die Elektroporation wurde mit einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF durchgeführt. Die Feldstärke betrug somit 12,5 kV/cm. Die Zeitkonstante betrug 4,5-5 ms. Nach der Transformation wurden die Zellen zur Regeneration in 300 µl SOC-Medium (2.4.1) gegeben und für 45 min bei 37 °C und 200 Upm auf einem Schüttler regeneriert. Danach wurden 150 µl des Transformationsansatzes auf entsprechenden Selekiv-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

2.8.4 Herstellung elektrokompetenter *P. acnes*-Zellen

50 ml SLB-Medium in einer 250-ml-Müller-Krempel-Flasche wurden mit einer 5-ml-Übernachtkultur von *P. acnes*-Zellen beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C anaerob, bis die stationäre Phase erreicht war (OD_{600} von 2). Anschließend wurden 250 ml SLB-Medium in einer 2-l-Müller-Krempel-Flasche mit dieser 50-ml-Kultur beimpft. Die Kultur wurde bei 30 °C für 20 h anaerob inkubiert. Die folgenden Schritte fanden unter aeroben Bedingungen satt. Die Kultur wurde für 20 min bei 4 °C und 5 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 0,5 M eiskalter Saccharose gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 5 000 g. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 10 ml eiskalter Elektroporationslösung (2.3) gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 5 000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 2,5 ml Elektroporationslösung (1:100 des ursprünglichen Kulturvolumens) aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 100 µl in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.8.5 Transformation elektrokompetenter *P. acnes*-Zellen

(modifiziert nach Cheong *et al.*, 2008; Jore *et al.*, 2001)

Die Transformation der elektrokompetenten *P. acnes*-Zellen fand unter anaeroben Bedingungen statt. Zu 100 µl elektrokompetenten *P. acnes*-Zellen wurden 500 ng Plasmid-DNA gegeben. Dieser Ansatz wurde in eine eisgekühlte Küvette mit einer Lückenweite von 2 mm gegeben. Die Küvette wurde in ein Elektroporationsgerät gestellt, und die Elektroporation wurde mit einer Spannung von 2 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF durchgeführt. Die Feldstärke betrug somit 10 kV/cm und die Zeitkonstante 4,5-5 ms. Nach der Transformation wurden die Zellen zur Regeneration in 900 µl PYG-Medium (2.4.1) gegeben und für vier Stunden anaerob bei 37 °C ohne Schütteln regeneriert. Danach wurden 150 µl des Transformationsansatzes auf entsprechenden Selekiv-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden anaerob für zwei bis fünf Tage bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

2.9 α-Komplementation (Blau-Weiß-Selektion)

Die X-Gal-Färbung zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone (Blau-Weiß-Selektion) ermöglicht es, positive Klone zu identifizieren. Dies ist bei den in dieser Arbeit verwendeten Plasmiden pDrive und pK19*mobsacB* der Fall. Diese beiden Plasmide besitzen ein *lacZ*-Gen, das für eine β-Galactosidase kodiert. Das *lacZ*-Gen wiederum enthält eine „multiple cloning site“, die keine Auswirkung auf die Expression des Enzyms hat. Wird ein Fragment in die „multiple cloning site“ kloniert, so ist das *lacZ*-Gen zerstört und die β-Galactosidase nicht mehr funktionsfähig. X-Gal, ein Substratanalogon, wird duch die β-Galactosidase umgesetzt, wobei ein blauer Farbstoff gebildet wird. Kann kein X-Gal umgesetzt werden, wird kein blauer Farbstoff gebildet. Kolonien mit einem Insert in der „multiple cloning site“ erscheinen weiß und sind somit positive Klone, während blaue Kolonien kein Insert in der „multiple cloning site“ enthalten und somit Religanten darstellen. Die α-Komplementation wurde in dieser Arbeit mit dem *E. coli* K12 DH5α-Stamm durchgeführt, da dieser im Gegensatz zum *E. coli* K12 HB101-Stamm das ω-Fragment besitzt (*lacZ*ΔM15), das für eine Blau-Weiß-Selektion benötigt wird.
Zur Blau-Weiß Selektion enthielten die Agarplatten 200 µM IPTG und 98 µM X-Gal (2.4.2). Auf diese Agarplatten wurden 150 µl des Transformationsanatzes ausgestrichen. Die Agarplatten wurden aerob über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet.

2.10 Hämolysetest

Bei einem Hämolysetest wird untersucht, ob ein Mikroorganismus eine Hämolyseaktivität, die durch das Enzym Hämolysin ausgelöst wird, besitzt.
Dazu wurden 150 µl einer Kultur auf einer Blutagarplatte (2.4.1) ausgestrichen. Die Platte wurde entsprechend den Anforderungen des Mikroorganismus inkubiert (2.4.4). Zeigt ein Mikroorganismus eine Hämolyseaktivität, so waren auf der roten Blutagarplatte um die gewachsenen Kolonien farblose Höfe zu erkennen.

2.11 Konstruktion von Deletionsmutanten in *P. acnes*

Für die Konstruktion einer Deletionsmutante wurde das Plasmid pK19*mobsacB* verwendet (Schäfer *et al.*, 1994). Dies ist ein *Escherichia coli-Corynebacterium glutamicum*-Schaukelvektor. Er besitzt eine Kanamycin-Resistenz und das *sacB*-Gen, welches für die Levansucrase kodiert. Das Plasmid pK19*mobsacB* wurde hier für die Konstruktion von Deletionsmutanten in *P. acnes* verwendet, da *C. glutamicum* und *P. acnes* phylogenetisch nahe verwandt sind. Die für die Konstruktion der Deletionsmutanten in *P. acnes* verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.
Mittels einer „cross-over"-PCR (2.5.6.5) wurde ein Deletionskonstrukt des zu deletierenden Gens generiert. Dieses wurde in das Plasmid pK19*mobsacB* ligiert (2.5.7.3). Das Plasmid mit dem Deletionskonstrukt wurde anschließend in *E. coli* K12 DH5α transformiert (2.8.3). Zusätzlich wurde eine α-Komplementation durchgeführt (2.9). Nach der Transformation wurden die Zellen auf BHIS-Agarplatten (2.4.1), die 30 µg/ml Kanamycin (2.4.2) enthielten, ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Mit gewachsenen Klonen wurden LB-Flüssigkulturen (2.4.1), die 30 µg/ml Kanamycin enthielten, beeimpft. Es folgte eine Plasmidpräparation (2.5.1.3) und anschließend eine Kontroll-PCR nach dem Standard-Protokoll (2.5.6.1), wobei die verwendeten Oligodesoxynukleotide vor bzw. hinter dem klonierten Fragment lagen, so dass anhand der Fragmentlänge zu erkennen war, ob das Insert im Plasmid enthalten war. War das Insert im Plasmid enthalten, war ein Fragment von circa 1 50 Bp zu beobachten. War das Insert im Plasmid nicht enthalten, war ein Fragment von 558 Bp zu beobachten.
Plasmide, die das Insert enthielten, wurden in *P. acnes* transformiert (2.8.5). Nach der Transformation wurden die Zellen auf PYG-Agarplatten (2.4.1) mit 30 µg/ml Kanamycin

(2.4.2) ausplattiert. Mit gewachsenen Klonen, die das Plasmid aufgrund einer homologen Rekombination im Chromosom trugen, wurden PYG-Flüssigkulturen mit 30 µg/ml Kanamycin beimpft. Von den gewachsenen Kulturen wurden 100 µl auf PYG-Agarplatten, die 10 % Saccharose (w/v) enthielten, ausgestrichen. Die auf dem Plasmid pK19*mobsacB* kodierte Levansucrase bildete aus Saccharose Levan, ein Polyfructan, das für Bakterien toxisch ist. Dadurch wurde eine zweite homologe Rekombination erzwungen, nämlich dass das Plasmid pK19*mobsacB* aus dem Genom wieder entfernt wurde. Dadurch entstand entweder eine Deletionsmutante oder wieder der Wildtyp. Mit auf diesen Agarplatten gewachsenen Klonen wurden PYG-Flüssigkulturen beimpft. Es folgte die Isolierung der chromosomalen DNA (2.5.1.1) und eine Kontroll-PCR nach dem Standard-Protokoll (2.5.6.1), mit der überprüft wurde, ob eine Deletionsmutante vorliegt. Dies ist an der Länge des bei der PCR generierten Fragments zu erkennen.

2.12 AMES-Test

Der Ames-Test wird zur Abschätzung der Mutagenität einer chemischen Substanz verwendet (OECD-Richtlinie, 1997; Ames *et al.*, 1975). Genmutationen sind in Bakterien häufig. Bakterien vermehren sich schnell, woraus eine kurze Versuchsdauer resultiert und sich daher für einen solchen Test eignen. Der Teststamm *Salmonella typhimurium* TA100 ist abgeleitet vom Wildtypstamm *Salmonella typhimurium* LT2, dem Erreger des Mäusetyphus.

2.12.1 Anzucht des Teststamms

5 ml NB-Medium (2.4.1) wurden mit 5 µl Histidin (13,6 g/ml) (2.4.2) versetzt, mit dem Teststamm *Salmonella typhimurium* TA100 beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm auf dem Schüttler inkubiert. Histidin wurde diesem Medium zugegeben, um eine Anreicherung von Spontanrevertanten aufgrund einer Limitierung dieser Aminosäure zu verhindern. Diese Vorkultur wurde in frischem NB-Medium ohne Zusatz von Histidin 1:50 verdünnt und für sechs Stunden bis zu einer OD_{600} von 0,8 bei 37 °C auf einen Schüttler gestellt. Diese Kultur wurde danach direkt für den Test eingesetzt.

2.12.2 Vorinkubation der zu testenden Substanzen

Von den zu testenden Substanzen wurden verschiedene Verdünnungen erstellt. Von den einzelnen Verdünnungen wurden jeweils 20 µl in 1,5-ml-Reaktionsgefäße gegeben. Dazu wurden jeweils 0,5 ml M-Puffer (2.3) und 20 µl S9-Extrakt gegeben. Die Ansätze wurden auf Eis gestellt. Anschließend wurde zu den Ansätzen jeweils 0,1 ml des Teststammes *Salmonella typhimurium* TA100 gegeben und für 20 min in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt.
Als Sterilitätskontrolle wurden die einzelnen Substanzen, M-Puffer und S9-Extrakt ohne den Teststamm *Salmonella typhimurium* TA100 verwendet. Als Positivkontrolle wurde die Substanz Benz(a)pyren verwendt, von der bekannt ist, dass sie mutagen wirkt. Zur Ermittlung der Anzahl der Spontanrevertanten wurden Ansätze ohne zu testende Substanzen, aber mit M-Puffer, S9-Extrakt und dem Teststamm *Salmonella typhimurium* TA100 verwendet.

2.12.3 Plattierung und Inkubation

Der Top-Agar (2.4.1), von dem sich jeweils 2,5 ml in Reagenzgläsern befanden, wurde nach dem Autoklavieren in ein Wasserbad mit einer Wassertemperatur von 43 °C gestellt. Die AT-Agarplatten (2.4.1) wurden zwei Stunden vor Gebrauch bei 37 °C gewärmt.
Nach der Inkubation im Wasserbad wurden die Ansätze in jeweils 2,5 ml flüssigen Top-Agar gegeben, vorsichtig gemischt und anschließend auf eine AT-Agarplatte gegossen und verteilt. Bis zum Festwerden des Top-Agars wurden die Platten aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Biotins, welches im Top-Agar enthalten war, dunkel aufbewahrt. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei 37 °C in einem Brutschrank. Die Agarplatten standen dabei mit der Agarseite (Boden) nach unten im Brutschrank.
Die Auswertung der Agarplatten erfolgte nach zwei bzw. drei Tagen durch Zählen der Revertanten-Kolonien pro Platte.

3 Ergebnisse

P. acnes steht in Verdacht, hauptsächlich für das Krankheitsbild der Akne verantwortlich zu sein. In dieser Arbeit wurde der Einfluss aktiver Inhaltsstoffe aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio auf das Wachstum von *P. acnes* und weiterer Hautkeime (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* und *M. furfur*) untersucht. Ziel war es, eine Substanz zu finden, die das Wachstum von *P. acnes* hemmt, nicht aber das der weiteren Hautkeime. Um abschätzen zu können, ob eine Substanz, die diese Bedingung erfüllt, mutagen ist, wurde ein AMES-Test durchgeführt. Auch wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) einer solchen Substanz bestimmt.
Es wurde der Einfluss ausgewählter aktiver Inhaltsstoffe aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio auf die Transkription potentieller Pathogenitätsfaktoren von *P. acnes* sowohl semi-quantitativ (RT-Studien) wie auch quantitativ (qRT-Studien und „Northern-/Dot blot"-Analysen) untersucht. Ziel war es, eine Substanz zu finden, die die Transkription der potientiellen Pathogenitätsfaktoren hemmt.
Von *P. acnes* wurden Deletionsmutanten erstellt. Dabei wurden Gene, die für potientielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, deletiert. Durch die Charakterisierung der einzelnen Deletionsmutanten wurde der Einfluss des deletierten Gens auf das Potential der Pathogenität von *P. acnes* untersucht.

3.1 Sequenzierung

Die Sequenzierungen des *rrs*-Gens, welches für die 16S rRNA kodiert, und des *recA*-Gens, welches für die Rekombinase A kodiert, wurden durchgeführt, um sicher zu stellen, dass es sich um die entsprechenden, für diese Arbeit verwendeten, Stämme handelte. Die Sequenzdaten des *rrs*-Gens bzw. *recA*-Gens wurden mittels BLAST-Analysen verglichen (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi; Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990; Datenbank der Universität Bielefeld). Von *P. acnes* liegen die Daten der untersuchten Sequenzen in der Datenbank vor, ebenso von *S. typhimurium*. Die Aus-

wertung der Sequenzierungen ergab eine 100%ige Übereinstimmung. Von *S. aureus* und *S. epidermidis* lagen keine Daten der in dieser Arbeit verwendeten Stämme vor. Hier wurden mit anderen Subspezies von *S. aureus* und *S. epidermidis*, für die Daten vorlagen, Sequenzvergleiche durchgeführt. Die Auswertung ergab für *S. aureus* eine 99%ige Übereinstimmung mit dem Stamm *S. aureus* ATCC25923 und für *S. epidermidis* eine 99%ige Übereinstimmung mit *S. epidermidis* PCM2479. Von *C. xerosis* und *M. furfur* sind keine Daten in der Datenbank vorhanden, so dass hier keine Sequenzanalysen erfolgten.

3.2 Wachstum von *P. acnes*

In den folgenden Versuchen wurde das Wachstum in PYG-Komplexmedium, welches als Standardmedium für das Wachstum von *P. acnes* verwendet wurde, mit und ohne Zugabe von Lipiden untersucht. Des Weiteren wurden dem PYG-Komplexmedium aktive Inhaltsstoffe aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Dabei wurde der Einfluss der Substanzen in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum von *P. acnes* untersucht.

3.2.1 Wachstum von *P. acnes* allgemein

Das Wachstum von *P. acnes* wurde in PYG-Komplexmedium unter anaeroben Bedingungen untersucht. Der externe pH-Wert wurde gemessen, da *P. acnes* Propionsäure bildet und diese sich im Medium im Laufe des Wachstums von *P. acnes* anreichert.
Dem PYG-Komplexmedium wurden Lipide, die auch in der menschlichen Haut enthalten sind, zugegeben, um die Umgebung der menschlichen Haarfollikelzellen nachzubilden. Durch die Zugabe von Lipiden (5 %) in das Medium konnte die optische Dichte im Photometer nicht mehr ermittelt werden, so dass das Wachstum über die Bestimmung der Zellmasse beobachtet wurde.
Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1 zeigen, dass die Geschwindigkeit des Wachstums von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium unter Zugabe von Lipiden der Wachstumsrate ohne Lipide entsprach ($0{,}21\,h^{-1}$). Das Wachstum mit Lipiden ging früher in die exponentielle Phase über. Die Zellmasse betrug mit Lipiden 1,06 mg/ml, ohne Lipide mit 0,85 mg/ml ungefähr 20 % weniger. Der externe pH-Wert sank in PYG-Komplexmedium von anfänglich 7,2 aufgrund der Propionsäurebildung von *P. acnes* auf 5,1.

Tabelle 3.1: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit und ohne Zugabe von Lipiden**

	µ [h^{-1}]	Endmasse [mg/ml]
PYG-Komplexmedium	0,21	0,85
PYG-Komplexmedium plus Lipide (5 %)	0,21	1,06

3.2.2 Einfluss aktiver Inhaltsstoffe

Verschiedene Substanzen aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio wurden jeweils in vier verschiedenen Konzentrationen (0,001 %, 0,01 %, 0,1 % und 1 %) dem PYG-Komplexmedium ohne Lipide zugegeben. Danach wurden diese Ansätze mit einer *P. acnes*-Vorkultur beimpft und das Wachstum beobachtet. Das Wachstum erfolgte anaerob, und die Messung der OD erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm.
Die Ergebnisse sind in Kapitel bis aufgeführt. Dabei ist die Wachstumsrate µ und die $End - OD_{600}$ aufgeführt. Die Werte stellen jeweils den Mittelwert aus fünf Ansätzen dar. Die einzelnen Schaubilder sind im Anhang dargestellt.
Die getesteten Substanzen hemmten das Wachstum von *P. acnes* vollständig, oder sie hatten keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum (Tabelle 3.2) bzw. sie hemmten mit steigender Konzentration das Wachstum (Tabelle 3.3).

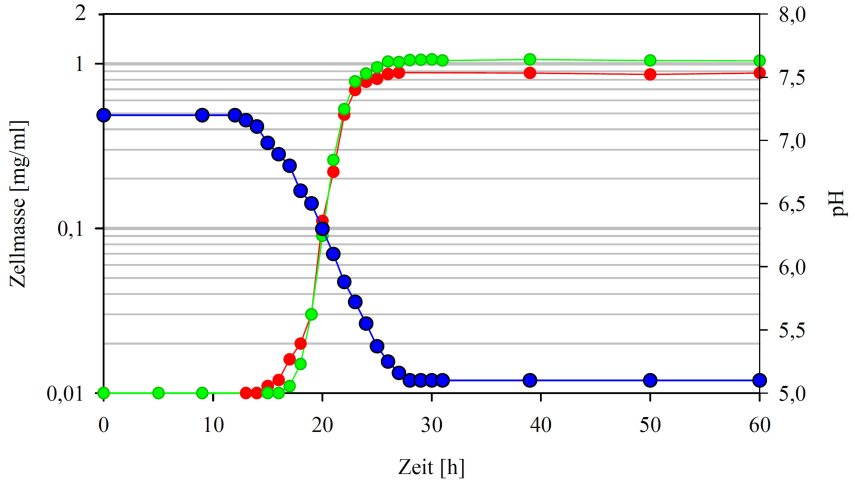

Abbildung 3.1: **Wachstum von *P. acnes*.** Symbole: • PYG-Komplexmedium, • PYG-Komplexmedium plus 5 % Lipide, • externer pH-Wert in PYG-Komplexmedium.

Die Wachstumsrate µ von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium betrug 0,173 und die End − OD_{600} betrug 2,04.
Die Wachstumsrate µ ist wie folgt definiert: $\mu = \frac{\ln 2}{t_D}$.

3.2.2.1 vollständige Hemmung des Wachstums

Es wurden Substanzen getestet, bei denen in einer Konzentration von 0,001 %, 0,01 %, 0,1 % und 1 % kein Wachstum von *P. acnes* zu beobachten war. Folglich konnte eine Wachstumsrate µ und eine End-OD_{600} nicht angegeben werden. Diese Substanzen waren PA19-Alkyletherguanidiniumlactat, Ether-Guanidium-Verbindung, Galanga-Extrakt, C2-Phytosphingosin-Ceramid und Salicylsäure. Bei PA19-Alkyletherguanidiniumlactat und der Ether-Guanidium-Verbindung trat eine Hemmung des Wachstums ab einer Konzentration von 0,000 1 % auf, bei Galanga-Extrakt, C2-Phytosphingosin-Ceramid und Salicylsäure ab einer Konzentration von 0,001 %.

3.2.2.2 kein bzw. geringer Einfluss auf das Wachstum

Die in Tabelle 3.2 aufgelisteten, getesteten Substanzen hatten keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum von *P. acnes*. Die entsprechenden Wachstumskurven dieser Versuche sind im Anhang aufgeführt.

3.2.2.3 Hemmung des Wachstums mit steigender Konzentration

Die in Tabelle 3.3 aufgelisteten, getesteten Substanzen hatten mit steigender Konzentration einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von *P. acnes*. Die entsprechenden Wachstumskurven dieser Versuche sind ebenfalls im Anhang aufgeführt.
Garcinia mangostana-Extrakt und Taurolidin B hemmten das Wachstum von *P. acnes* ab einer Konzentration von 0,01 %. Ab 0,1 % hemmten Octyllactamid, Taurolidin und Turmeric-Öl das Wachstum von *P. acnes*. Arjunolic-Säure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A hemmten ab einer Konzentration von 1 % das Wachstum von *P. acnes*. Bei niedermolekularer Hyaluronsäure und LMW-Skleroglucan war bei 1 % ein deutlicher Einfluss, jedoch keine vollständige Hemmung des Wachstums von *P. acnes* zu beobachten.

Tabelle 3.2: **Substanzen ohne bzw. mit geringem Einfluss auf das Wachstum[1] von *P. acnes***

	Konzentration							
	0,001 %		0,01 %		0,1 %		1 %	
Substanz	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}
Aloe arborescens-Extrakt	0,185	1,841	0,155	1,899	0,185	1,555	0,121	1,236
Formamidopropylbetain	0,145	2,115	0,105	2,114	0,128	2,114	0,1	1,948
4-Guanidinobuttersäure	0,145	1,989	0,145	1,969	0,145	1,974	0,145	1,985
Glycerin-modifizierte Hyaluronsäure	0,128	2,115	0,081	1,912	0,062	1,722	0,058	1,521
Hyaluronsäure	0,145	1,974	0,145	1,963	0,145	1,991	0,145	1,983
Malonylamidopropylbetain	0,145	2,115	0,145	2,114	0,138	2,103	0,131	1,956
Milchsäure-Octylamid	0,105	1,863	0,126	1,855	0,158	1,774	0,143	1,672
P813	0,145	1,984	0,145	1,993	0,145	1,987	0,145	1,981
1,2-Pentandiolmonocaprylat	0,145	2,115	0,128	2,114	0,115	2,107	0,128	1,906
Policosanol	0,012	1,987	0,12	1,981	0,177	1,92	0,12	1,395
Polyglutaminsäure	0,145	2,113	0,137	2,11	0,145	2,012	0,105	1,972
Pyroglutaminsäureoctylamid	0,15	2,109	0,138	2,113	0,115	1,579	0,056	1,054
Pyroglutaminsäureoctylester	0,15	1,983	0,150	1,991	0,15	1,974	0,15	1,992

Anmerkung:[1]: Wachstum in PYG-Komplexmedium ohne Lipide.

Tabelle 3.3: **Hemmung des Wachstums[1] von *P. acnes* mit steigender Konzentration der Substanz**

	Konzentration							
	0,001 %		0,01 %		0,1 %		1 %	
Substanz	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}
Arjunolic-Säure	0,130	1,996	0,125	1,878	0,120	1,549	n. g.	
Cistus-Extrakt	0,198	1,862	0,198	1,299	0,161	0,555	n. g.	
Garcinia mangostana-Extrakt	0,144	1,942	n. g.		n. g.		n. g.	
niedermolekulare Hyaluronsäure	0,139	1,245	0,139	1,36	0,125	1,335	0,13	0,37
LMW-Skleroglucan	0,202	1,964	0,191	1,893	0,14	1,615	0,202	0,658
Octyllactamid	0,087	2,077	0,081	2,048	n. g.		n. g.	
Taurolidin	0,145	1,14	0,098	1,045	n. g.		n. g.	
Taurolidin A	0,143	1,405	0,123	1,105	0,235	0,99	n. g.	
Taurolidin B	0,1	1,15	n. g.		n. g.		n. g.	
Turmeric-Öl	0,125	1,355	1,1	1,335	n. g.		n. g.	

Anmerkung:[1]: Wachstum in PYG-Komplexmedium ohne Lipide, n. g.: nicht gewachsen.

3.3 Einfluss aktiver Inhaltsstoffe auf das Wachstum von *P. acnes* und weiterer Hautkeime

In diesen Versuchen wurde der Einfluss verschiedener ausgewählter Substanzen aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio auf das Wachstum von *P. acnes* und weiterer Hautkeime (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* und *M. furfur*) untersucht. Dabei wurden die Substanzen jeweils in einer Konzentration von 0,1 % dem Medium zugegeben. Danach wurden diese Ansätze mit einer Vorkultur beimpft und das Wachstum beobachtet. Das Wachstum erfolgte bei *P. acnes* anaerob, bei den weiteren Hautkeimen aerob. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm. Bei *M. furfur* wurde das Wachstum über die Bestimmung der Zellmasse beobachtet. Eine Substanz wurde als hemmend eingestuft, wenn eine OD_{600} von 0,4-0,8 (zwei bis drei Verdopplungen) bzw. eine Zellmasse von 0,4-0,8 mg/ml nicht überschritten wurde. Des Weiteren wurde eine Substanz als hemmend auf das Wachstums eines Mikroorganimus definiert, wenn die End-OD_{600} bzw. Endmasse maximal 10 % der maximalen OD_{600} des entsprechenden Mikroorganismus ohne Zugabe einer Substanz in das Medium betrug.
Die Ergebnisse der Wachstumsversuche sind in Tabelle 3.4 und in den Abbildungen 3.2 bis 3.6 aufgeführt. Dabei ist die Wachstumsrate µ und die End-OD_{600} bzw. Endmasse aufgeführt. Die Werte stellen jeweils den Mittelwert aus fünf Ansätzen dar.
Es ist zu erkennen, dass Galanga-Extrakt die einzige Substanz war, die das Wachstum von *P. acnes* hemmte, nicht aber das Wachstum von *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* und *M. furfur*. *Garcinia mangostana*-Extrakt und Taurolidin B sind Substanzen, die das Wachstum aller untersuchten Hautkeime hemmten, während bei Taurolidin A kein Einfluss auf das Wachstum der Hautkeime zu beobachten war.

Tabelle 3.4: **Wachstum[1] der Hautkeime unter Zugabe aktiver Inhaltsstoffe (0,1 %)**

	P. acnes		*S. aureus*		*S. epidermidis*		*C. xerosis*		*M. furfur*[2]	
Substanz	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-OD_{600}	µ [h^{-1}]	End-masse [mg/ml]
ohne Zusatz	0,173	2,04	0,829	26,4	0,763	2,97	0,226	5,23	0,375	1,113
Galanga-Extrakt	n. g.		0,75	17,4	0,635	2,33	0,234	4,73	0,41	1,68
Garcinia mangostana-Extrakt	n. g.		n. g.		n. g.		n. g.		n. g.	
LMW-Skleroglucan	0,14	1,65	n. g.		1,18	3,643	0,443	1,512	0,474	1,54
PA19-Alkylether-guanidiniumlactat	n. g.		n. g.		1,661	1,224	n. g.		n. g.	
C2-Phytosphingosin-Ceramid	n. g.		n. g.		1,386	1,42	n. g.		n. g.	
Policosanol	0,177	1,92	n. g.		0,816	1,17	0,391	1,218	0,481	1,423
Salicylsäure	n. g.		0,874	18,5	n. g.		0,361	1,43	n. g.	
Taurolidin	n. g.		0,979	18,1	n. g.		n. g.		n. g.	
Taurolidin A	0,235	0,99	0,851	17,8	0,618	0,74	0,361	1,22	0,38	1,13
Taurolidin B	n. g.		n. g.		n. g.		n. g.		n. g.	
Turmeric-Öl	n. g.		n. g.		1,24	1,163	0,484	2,11	0,412	1,26

Anmerkung: [1]: Wachstum in PYG-Komplexmedium ohne Lipide, [2]: bei *M. furfur* wurde das Wachstum über die Zellmasse bestimmt, n. g.: nicht gewachsen.

3.3.1 Wachstum von *P. acnes*

P. acnes wurde in PYG-Komplexmedium kultiviert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt. *P. acnes* wuchs bis zu einer maximalen OD_{600} von 2,04 und die Wachstumsrate µ betrug 0,173 h^{-1}. Galanga-Extrakt, *Garcinia mangostana*-Extrakt, PA19-Alkyletherguanidiniumlactat, C2-Phytosphingosin-Ceramid, Salicylsäure, Taurolidin, Taurolidin B und Turmeric-Öl hemmten das Wachstum von *P. acnes* in einer Konzentration von 0,1 %. Bei LMW-Skleroglucan ($\mu = 0{,}14\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,65), Policosanol ($\mu = 0{,}177\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,92) und Taurolidin A ($\mu = 0{,}235\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 0,99) war in einer Konzentration von 0,1 % ein Wachstum von *P. acnes* zu beobachten.

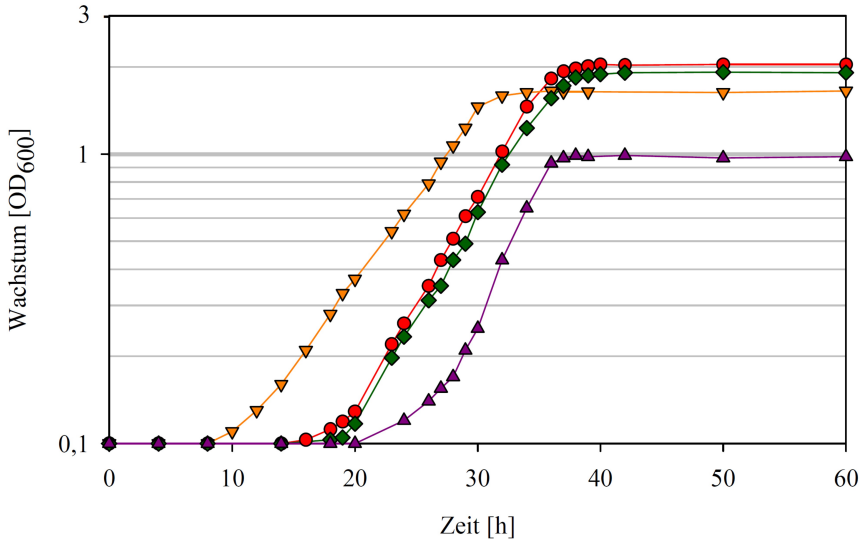

Abbildung 3.2: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium ohne Lipide.** Substanzen, die das Wachstum hemmten, sind nicht dargestellt. Symbole: ● *P. acnes*, ▼ *P. acnes* mit 0,1 % (w/v) LMW-Skleroglucan, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % (w/v) Policosanol, ▲ *P. acnes* mit 0,1 % (w/v) Taurolidin A.

3.3.2 Wachstum von *S. aureus*

S. aureus wuchs ohne Zugabe von Substanzen in TB-Medium bis zu einer maximalen OD_{600} von 26,4. Ab einer OD_{600} von 2,64 wurde eine Substanz als nicht hemmend definiert. In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche von *S. aureus* dargestellt. *S. aureus* hatte eine Wachstumsrate von $\mu = 0{,}829\,h^{-1}$. Galanga-Extrakt ($\mu = 0{,}75\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 17,4), Salicysäure ($\mu = 0{,}874\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 18,5) und Taurolidin A ($\mu = 0{,}851\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 17,8) hatten keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus*. Bei Taurolidin ($\mu = 0{,}979\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 18,1) war ein verzögertes Wachstum zu beobachten, aber keine Hemmung. Bei den weiteren getesteten Substanzen (*Garcinia mangostana*-Extrakt, LMW-Skleroglucan, PA19-Alkyletherguanidiniumlactat, C2-Phytosphingosin-Ceramid, Policosanol, Taurolidin B und Turmeric Öl) war kein Wachstum von *S. aureus* zu beobachten.

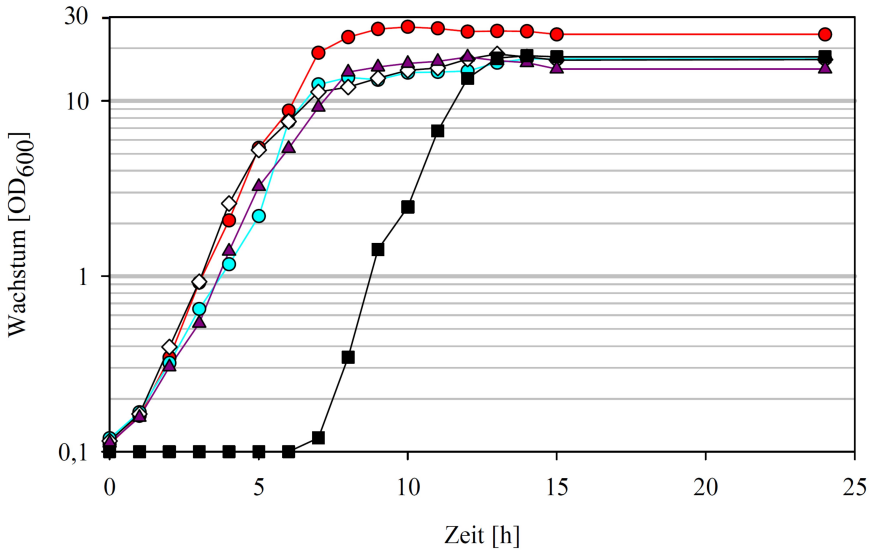

***Abbildung 3.3:* Wachstum von *S. aureus* in TB-Medium.** Substanzen, die das Wachstum hemmten, sind nicht dargestellt. Symbole: ● *S. aureus*, ● *S. aureus* mit 0,1 % (w/v) Galanga-Extrakt, ◊ *S. aureus* mit 0,1 % (w/v) Salicylsäure, ■ *S. aureus* mit 0,1 % (w/v) Taurolidin, ▲ *S. aureus* mit 0,1 % (w/v) Taurolidin A.

3.3.3 Wachstum von *S. epidermidis*

Die Wachstumsversuche von *S. epidermidis* wurden in LB-Medium durchgeführt. Die aktiven Inhaltsstoffe wurden in einer Konzentration von 0,1 % dem Medium zugegeben. Die maximale OD_{600} von *S. epidermidis* ohne Zugabe aktiver Inhaltsstoffe betrug 2,97, so dass ab einer OD_{600} von 0,4-0,8 von Wachstum ausgegangen wurde. Die Wachstumsrate µ betrug 0,763 h^{-1}. In Abbildung 3.4 sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit *S. epidermidis* aufgeführt. Galanga-Exrakt ($\mu = 0{,}635\ h^{-1}$, End-OD_{600} von 2,33) und LMW-Skleroglucan ($\mu = 1{,}18\ h^{-1}$, End-OD_{600} von 3,643) hatten keinen Einfluss auf das Wachstum. Bei PA19-Alkyletherguanidiniumlactat ($\mu = 1{,}661\ h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,224), C2-Phytosphingosin-Ceramid ($\mu = 1{,}381\ h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,42), Policosanol ($\mu = 0{,}816\ h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,17), Taurolidin A ($\mu = 0{,}618\ h^{-1}$, End-OD_{600} von 0,74) und Turmeric-Öl ($\mu = 1{,}24\ h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,163) war die End-OD_{600} niedriger im Vergleich zum Wachstum von *S. epidermidis* ohne Zugabe eines aktiven Inhaltsstoffes, aber es war keine Hemmung des Wachstums zu beobachten. Bei Zugabe der aktiven Inhaltssoffe *Garcinia mangostana*-Extrakt, Salicylsäure, Taurolidin und Taurolidin B in das Medium war kein Wachstum von *S. epidermidis* zu beobachten.

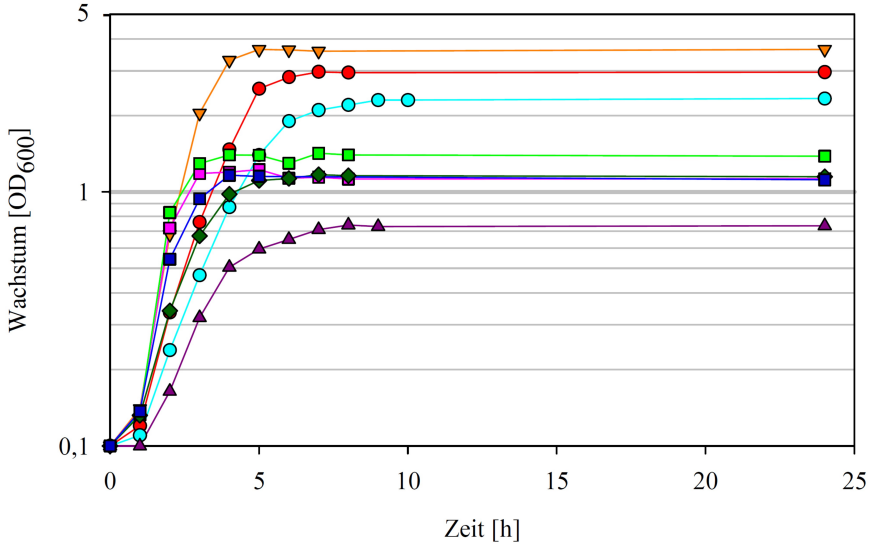

***Abbildung 3.4:* Wachstum von *S. epidermidis* in LB-Medium.** Substanzen, die das Wachstum hemmten, sind nicht dargestellt. Symbole: ● *S. epidermidis*, ● *S. epidermidis* mit 0,1 % (w/v) Galanga-Extrakt, ▼ *S. epidermidis* mit 0,1 % (w/v) LMW-Skleroglucan, ■ *S. epidermidis* mit 0,1 % (v/v) PA19-Alkyletherguanidiniumlactat, ■ *S. epidermidis* mit 0,1 % (w/v) C2-Phytosphingosin-Ceramid, ♦ *S. epidermidis* mit 0,1 % (w/v) Policosanol, ▲ *S. epidermidis* mit 0,1 % (w/v) Taurolidin A, ■ *S. epidermidis* mit 0,1 % (v/v) Turmeric-Öl.

3.3.4 Wachstum von *C. xerosis*

C. xerosis wurde in TSB-Medium kultiviert. Aktive Inhaltsstoffe wurden dem Medium in einer Konzentration von 0,1 % zugegeben. In Abbildung 3.5 sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit *C. xerosis* aufgeführt. *C. xerosis* wuchs bis zu einer OD_{600} von 5,23, so dass eine Substanz als nicht hemmend galt, wenn eine OD_{600} von 0,4-0,8 überschritten wurde. Der aktive Inhaltsstoff Galanga-Extrakt ($\mu = 0{,}234\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 4,73) hatte keinen Einfluss auf das Wachstum von *C. xerosis*. Bei den aktiven Inhaltsstoffen LMW-Skleroglucan ($\mu = 0{,}443\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,512), Policosanol ($\mu = 0{,}391\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,218), Salicylsäure ($\mu = 0{,}361\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,43) und Turmeric-Öl ($\mu = 0{,}484\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 2,11) war eine geringere End-OD_{600} zu beobachten, aber keine Hemmung des Wachstums von *C. xerosis*. Bei Taurolidin A war ein verzögertes Wachstum und eine geringere End-OD_{600} ($\mu = 0{,}361\,h^{-1}$, End-OD_{600} von 1,22) zu beobachten. Bei den aktiven Inhaltsstoffen *Garcinia mangostana*-Extrakt, PA19-Alkyletherguanidiniumlactat, C2-Phytosphingosin-Ceramid, Taurolidin und Taurolidin B war kein Wachstum von *C. xerosis* zu beobachten.

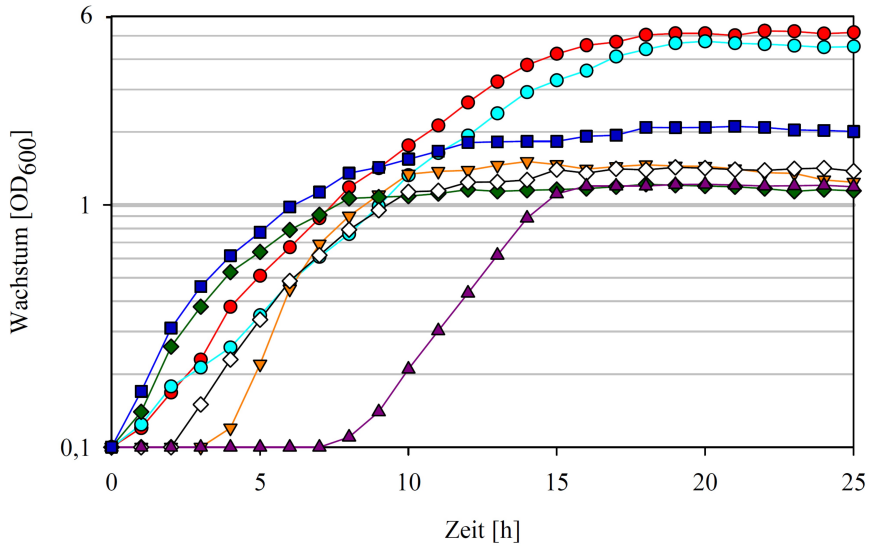

***Abbildung 3.5:* Wachstum von *C. xerosis* in TSB-Medium.** Substanzen, die das Wachstum hemmten, sind nicht dargestellt. Symbole: ● *C. xerosis*, ● *C. xerosis* mit 0,1 % (w/v) Galanga-Extrakt, ▼ *C. xerosis* mit 0,1 % (w/v) LMW-Skleroglucan, ♦ *C. xerosis* mit 0,1 % (w/v) Policosanol, ◊ *C. xerosis* mit 0,1 % (w/v) Salicylsäure, ▲ *C. xerosis* mit 0,1 % (w/v) Taurolidin A, ■ *C. xerosis* mit 0,1 % (v/v) Turmeric-Öl.

3.3.5 Wachstum von *M. furfur*

M. furfur wuchs in LB-Medium bis zu einer maximalen Zellmasse von 1,113 mg/ml, so dass ab einer Zellmasse von 0,4-0,8 mg/ml von Wachstum ausgegangen wurde. Die aktiven Inhaltsstoffe wurden dem Medium in einer Konzentration von 0,1 % zugegeben. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Die aktiven Inhaltsstoffe Galanga-Extrakt ($\mu = 0{,}41\,h^{-1}$, Endmasse von 1,68 mg/ml), LMW-Skleroglucan ($\mu = 0{,}474\,h^{-1}$, Endmasse von 1,54 mg/ml), Policosanol ($\mu = 0{,}481\,h^{-1}$, Endmasse von 1,423 mg/ml), Taurolidin A ($\mu = 0{,}304\,h^{-1}$, Endmasse von 1,13 mg/ml) und Turmeric-Öl ($\mu = 0{,}412\,h^{-1}$, Endmasse von 1,26 mg/ml) hatten keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum von *M. furfur*. Wurden die aktiven Inhaltsstoffe *Garcinia mangostana*-Extrakt, PA19-Alkyletherguanidiniumlactat, C2-Phytosphingosin-Ceramid, Salicylsäure, Taurolidin und Taurolidin A in das Medium gegeben, war kein Wachstum von *M. furfur* zu beobachten.

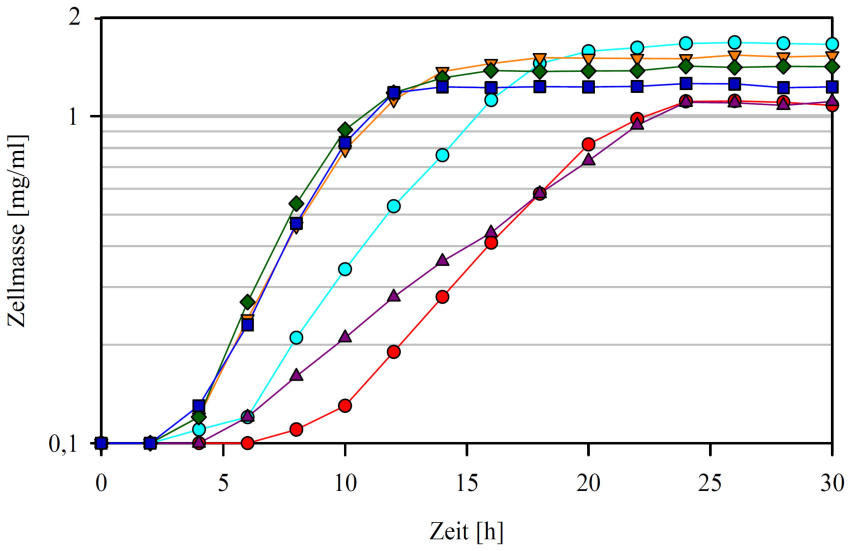

***Abbildung 3.6:* Wachstum von *M. furfur* in LB-Medium.** Substanzen, die das Wachstum hemmten, sind nicht dargestellt. Symbole: ● *M. furfur*, ● *M. furfur* mit 0,1 % (w/v) Galanga-Extrakt, ▼ *M. furfur* mit 0,1 % (w/v) LMW-Skleroglucan, ◆ *M. furfur* mit 0,1 % (w/v) Policosanol, ▲ *M. furfur* mit 0,1 % (w/v) Taurolidin A, ■ *M. furfur* mit 0,1 % (v/v) Turmeric-Öl.

3.4 Minimale Hemmkonzentration

Galanga-Extrakt war der einzige, getestete aktive Inhaltsstoff, der das Wachstum von *P. acnes* hemmte, nicht aber der vier weiteren getesteten Hautkeime (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* und *M. furfur*). In diesen Versuchen wurde die minimale Hemmkonzentration des Galanga-Extrakts ermittelt. Wachstumsversuche von *P. acnes* in PYG-Medium ohne Lipide mit dem aktiven Inhaltsstoff Galanga-Extrakt zeigten, dass ab einer Konzentration von 0,000 1 % eine Hemmung des Wachstums auftrat (Abbildung 3.7). In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ab welcher Konzentration eine Hemmung des Wachstums von *P. acnes* auf PYG-Agarplatten auftrat. Dazu wurde eine *P. acnes*-Kultur auf PYG-Platten ausplattiert und die Platten für 16 Stunden bei 37 °C anaerob inkubiert. Danach wurden auf Filterplättchen verschiedene Konzentrationen des Galanga-Extraktes gegeben. Diese Filterplättchen wurden auf die PYG-Agarplatte gelegt, auf der zuvor die *P. acnes*-Kultur ausplattiert worden war. Nach 72 Stunden erfolgte die Auswertung, indem die Größe des entstandenen Hemmhofes gemessen wurde (Tabelle 3.5). Dazu wurde der Abstand zwischen dem Testplättchen und dem Rand des Bakterienrasens gemessen. Dabei war zu beobachten, dass ab einer Konzentration von 0,005 mg eine Hemmung auftrat. Mit steigender Konzentration war ein größerer Hemmhof zu erkennen. Ab einer Konzentrationvon 0,2 mg war keine Zunahme des Durchmessers des Hemmhofes (1,2 mm) zu beobachten (Abbildung 3.8).

Tabelle 3.5: **Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration des Galanga-Extraktes auf *P. acnes* mittels Messung des Hemmhofes**

Konzentration [mg]	∅ Hemmhof [mm]
0,001	0
0,003	0
0,005	0,1
0,01	0,2
0,025	0,4
0,05	0,7
0,01	1,1
0,2	1,2
2	1,2

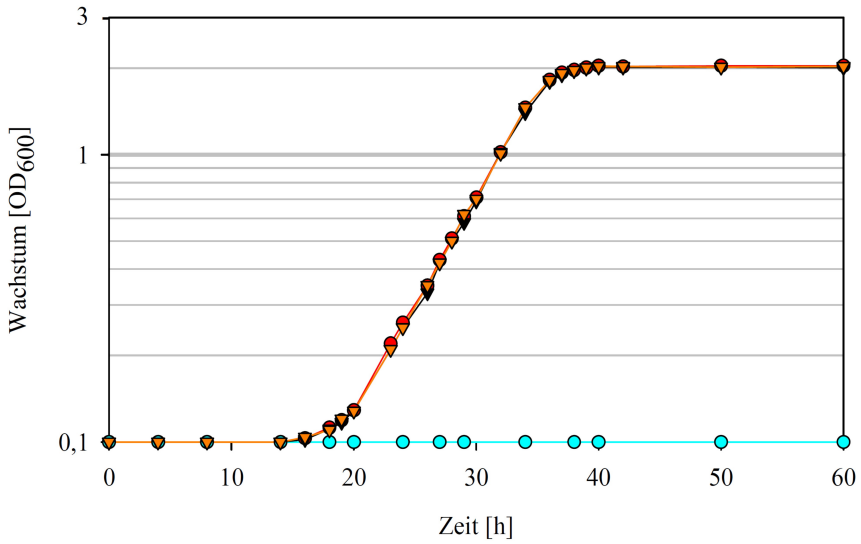

Abbildung 3.7: **Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration des Galanga-Extraktes auf *P. acnes* mittels Wachstumsveruchen in PYG-Medium ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* plus 0,001 % (w/v) Galanga-Extrakt, ▼ *P. acnes* plus 0,000 1 % (w/v) Galanga-Extrakt, ▼ *P. acnes* plus 0,000 01 % (w/v) Galanga-Extrakt.

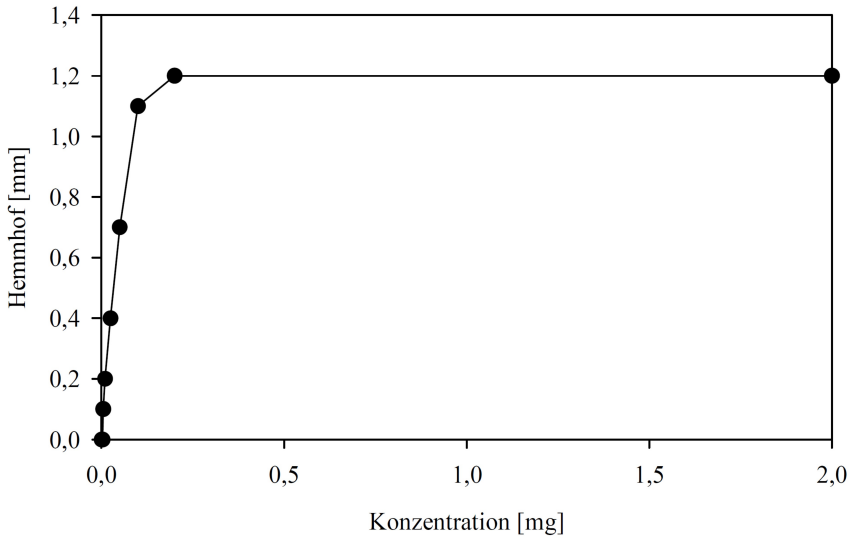

Abbildung 3.8: **Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration des Galanga-Extraktes auf *P. acnes* mittels Messung des Hemmhofes auf PYG-Medium ohne Lipide**

3.5 AMES-Test

Der Ames-Test dient der Abschätzung der Mutagenität einer chemischen Substanz. Als Teststamm wurde in diesen Versuchen *Salmonella typhimurium* TA100 verwendet. In den oben beschriebenen Wachstumskurven wurde der Einfluss verschiedener Substanzen aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio auf das Wachstum von *P. acnes* und weiterer Hautkeime (*C. xerosis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* und *M. furfur*) untersucht. Galanga-Extrakt war die einzige getestete Substanz, die das Wachstum von *P. acnes*, nicht aber der anderen Hautkeime, hemmte. Galanga-Extrakt wurde auf sein mögliches mutagenes Potential hin untersucht. Dazu wurde der AMES-Test angewandt. Mit diesem Test kann eine erste Aussage darüber getroffen werden, ob eine Substanz möglicherweise mutagen wirkt. Als Kontrolle diente die Substanz Benz(a)pyren, von der bekannt ist, dass sie mutagen wirkt. Des Weiteren wurden Cistus-Extrakt und *Garcinia mangostana*-Extrakt getestet, von denen bekannt ist, dass sie ebenfalls mutagen wirken (persönliche Mitteilung von der Evonik GmbH). Für den Test wurden die Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Durch das Zählen der Revertanten-Kolonien pro Platte und den Vergleich zur Anzahl der Spontanrevertanten (Ansatz ohne zu testende Substanz) konnte eine Aussage über eine potentielle mutagene Wirkung der getesteten Substanz getroffen werden. Ist die Anzahl der Revertanten-Kolonien einer getesteten Substanz um das 1,5- bis 3fache größer als die Zahl der Spontanrevertanten, so wird eine Substanz als mutagen bewertet. Zur Überprüfung der Sterilität der bei dem Test verwendeten Chemikalien bzw. Zusätze wurden diese demselben Testverfahren unterzogen, nur ohne Zugabe des Teststammes *S. typhimurium* TA100. Bei der Überprüfung der Sterilität waren auf den Platten keine Kolonien zu erkennen, so dass alle verwendeten Chemikalien bzw. Zusätze steril waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 dargestellt. In den Abbildungen 3.9, 3.10 und 3.11 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Die Anzahl der Spontanrevertanten betrug 28 Kolonien pro Platte, so dass eine Substanz als mutagen eingestuft wurde, sobald mehr als 42 Revertanten-Kolonien pro Platte (Mutagenitätsgrenze) zu beobachten waren. Dies war bei den beiden schon als mutagen bekannten Substanzen Cistus-Extrakt und *Garcinia mangostana*-Extrakt zu beobachten. Beim Cistus-Extrakt stieg die Zahl der Revertanten-Kolonien bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/Platte auf 66 pro Platte an. Beim *Garcinia mangostana*-Extrakt stieg die Zahl der Revertanten-Kolonien bis zu einer Konzentration von 0,005 mg/Platte auf 71 pro Platte an. Beide Substanzen wurden als mutagen bewertet, da die Mutagenitätsgrenze von 42 Revertanten-Kolonien pro Platte überschritten worden war. Beim Galanga-Extrakt wurde die Mutagenitätsgren-

ze von 42 Revertanten-Kolonien pro Platte nicht überschritten, so dass diese Substanz als nicht mutagen eingestuft wurde. Bei Benz(a)pyren als bekannte mutagene Substanz waren mit 128 Revertanten-Kolonien pro Platte bei einer Konzentartion von 0,000 5 mg pro Platte die meisten Kolonien zu beobachten.

Tabelle 3.6: **Mutagenität vier verschiedener Substanzen auf *S. typhimurium* TA100**

Substanz	Menge [mg/Platte]	Revertanten-Kolonien pro Platte[1]
Cistus-Extrakt	0	28 ± 3
	0,000 1	29 ± 4
	0,001	37 ± 4
	0,002	52 ± 5
	0,005	66 ± 7
	0,01	61 ± 8
	0,05	48 ± 4
	0,1	37 ± 4
Galanga-Extrakt	0	28 ± 3
	1,25	29 ± 3
	2,5	32 ± 4
	3,75	33 ± 3
	50	26 ± 4
	7,5	31 ± 4
	10	28 ± 3
	15	27 ± 3
	20	26 ± 3
	50	31 ± 4
Garcinia mangostana-Extrakt	0	28 ± 3
	0,000 1	30 ± 3
	0,01	32 ± 4
	0,05	43 ± 4
	0,1	62 ± 4
	0,3	69 ± 6
	0,5	71 ± 7
	1	67 ± 7

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.6: Fortsetzung

Substanz	Menge [mg/Platte]	Revertanten-Kolonien pro Platte[1]
	1,25	63 ± 8
	2,5	53 ± 6
Benz(a)pyren	0,000 25	101 ± 12
	0,000 5	127 ± 14

Anmerkung: [1]: Alle Werte stammen aus sieben unabhängigen Experimenten. Bei den angegebenen Werten ist die Zahl der Spontanrevertanten nicht von der Anzahl der Revertanten-Kolonien abgezogen.

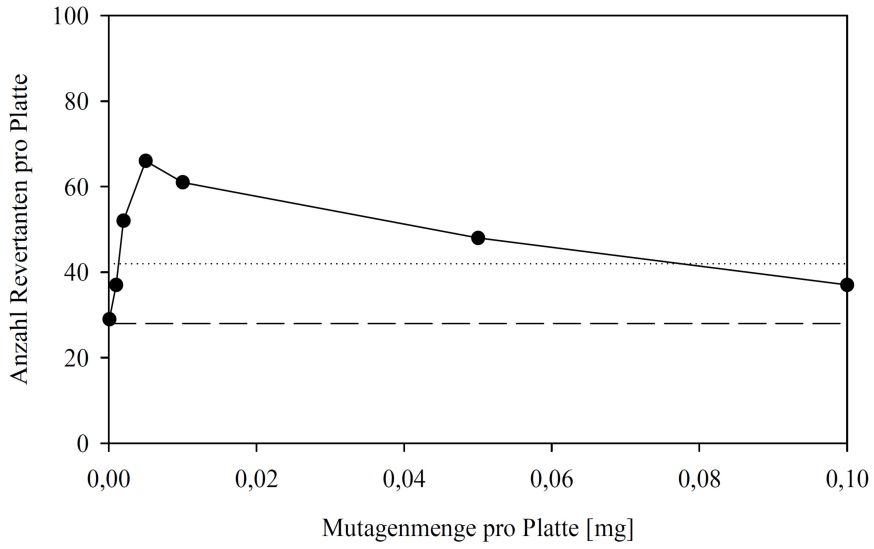

Abbildung 3.9: **Grafische Auswertung des AMES-Tests für Cistus-Extrakt.** Symbole: • Dosis-Effekt-Beziehung für den aktiven Inhaltsstoff Cistus-Extrakt, --- Anzahl der Spontanrevertanten, · · · 1,5fache Anzahl der Spontanrevertanten (Grenze der Mutagenität).

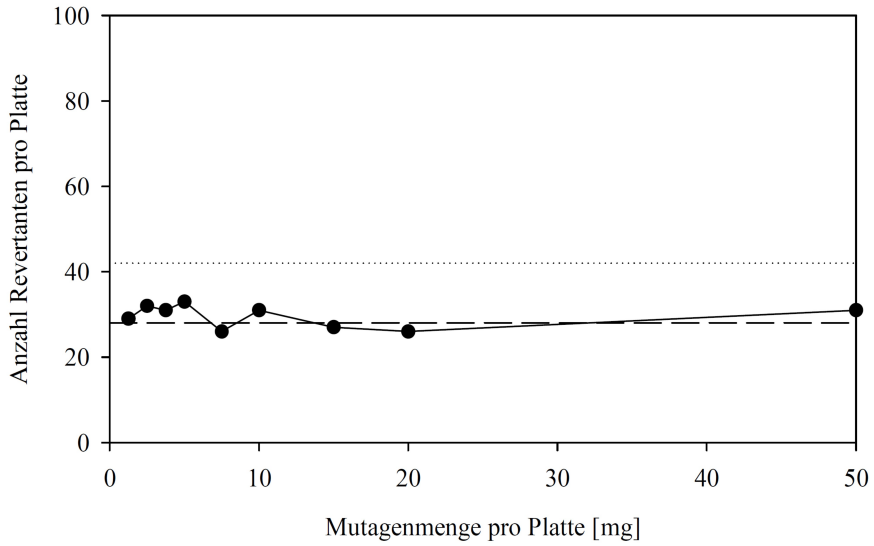

Abbildung 3.10: **Grafische Auswertung des AMES-Tests für Galanga-Extrakt.** Symbole: • Dosis-Effekt-Beziehung für den aktiven Inhaltsstoff Galanga-Extrakt, --- Anzahl der Spontanrevertanten, · · · 1,5fache Anzahl der Spontanrevertanten (Grenze der Mutagenität).

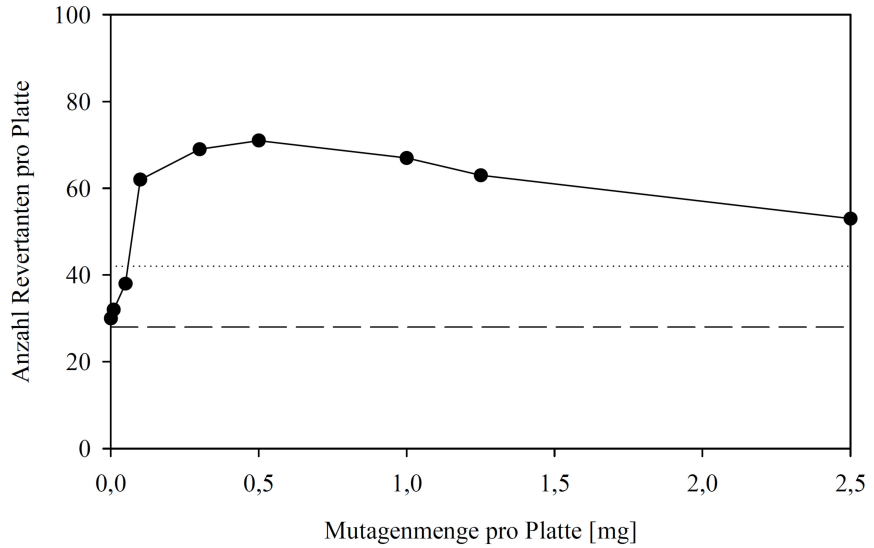

Abbildung 3.11: **Grafische Auswertung des AMES-Tests für *Garcinia mangostana*-Extrakt.** Symbole: • Dosis-Effekt-Beziehung für den aktiven Inhaltsstoff *Garcinia mangostana*-Extrakt, --- Anzahl der Spontanrevertanten, · · · 1,5fache Anzahl der Spontanrevertanten (Grenze der Mutagenität).

3.6 Transkriptionsstudien

In den Transkriptionstudien wurden verschiedene aktive Inhaltsstoffe aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio getestet. Dabei wurde untersucht, ob diese Substanzen die Transkription potentieller Pathogentitätsfaktoren hemmen. Dies erfolgte semi-quantitativ mittels RT-PCR-Analysen wie auch quantitativ mittles quantitativer „Real-Time"-Polymerasekettenreaktions (qRT-PCR)-Analysen. Bei den RT-PCR-Analysen wurde untersucht, ob ein Transkript nachweisbar war, während die Quantität der Transkripte in den qRT-PCR-Analysen untersucht wurde.

3.6.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)-Studien

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, unter welchen Bedingungen von den potentiellen Pathogenitätsfaktoren von *P. acnes* Transkripte gebildet werden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Transkription einiger Gene durch die Zugabe von Lipiden in das Medium induziert wird (Straub 2009, Rimpf 2006). Es wurde untersucht, welche Gene unter der Zugabe von aktiven Inhaltsstoffen aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio (*Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A) in einer Konzentration von 0,1 % abgelesen wurden. Im Anhang sind die Ergebnisse der entsprechenden Wachstusmversuche für die qRT-PCR-Analysen aufgeführt.
Es wurden Proben aus dem exponentiellen Wachstum bei einer Zellmasse von 0,07-0,1 mg/ml von *P. acnes* genommen und mit „Killing-Puffer" versetzt, um die Stoffwechselaktivitäten zu stoppen. Danach wurde die RNA isoliert und eine cDNA-Synthese durchgeführt. Mit der cDNA erfolgte eine Standard-PCR und die anschließende Auswertung auf einem Agarose-Gel. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 und 3.8 dargestellt. Die Positivkontrollen sowohl mit der 16S rRNA (PPA2417) und der Gyrase A (PPA0010), beides sind konstitutiv exprimierte Gene, als auch die Negativkontrollen waren in Ordnung. Bei den Positivkontrollen waren Banden im Agarosegel zu beobachten, bei den Nekativkontrolle waren keine banden zu erkennen. Als Beispiel der Auswertung einer RT-PCR-Analyse ist das Bild eines 0,8%igen Agarosegels in Abbildung 3.12 dargestellt. Die Oligodesoxynukleotide wurden dabei so gewählt, dass ein Fragment der Länge von 500 Bp auf dem Gel zu sehen war, sollte ein Trankript vorhanden gewesen sein.

Bei den RT-PCR-Analysen ohne Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium (Tabelle 3.7) konnte gezeigt werden, dass von den Genen PPA0687, PPA1198 und PPA1231, die für CAMP-Faktoren kodieren, unter keinen der getesteten Bedingungen Transkripte nachweisbar waren. Von den Genen PPA1340 und PPA2108, die für CAMP-Faktoren kodieren, war in PYG-Komplexmedium ein Transkript nachweisbar. Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure und Cistus-Extrakt hemmten die Transkription des Gens PPA1340. Das Gen PPA2108 wurde bei Zugabe der Substanzen LMW-Skleroglucan und Cistus-Extrakt nicht abgelesen.
Transkripte der Gene PPA0565 und PPA1396, die für Hämolysine kodieren, waren in PYG-Komplexmedium nachweisbar. Das Gen PPA0565 wurde durch LMW-Skleroglucan und niedermolekulare Hyaluronsäure gehemmt, das Gen PPA1396 durch Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A. Ein Transkript des Gens PPA0938, das für ein Hämolysin kodiert, war in PYG-Komplexmedium nicht nachweisbar, aber bei der Zugabe der Substanzen *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A.
Von dem Gen PPA0453 (*groEL*) wurde in PYG-Komplexmedium ein Transkript gebildet. LMW-Skleroglucan und niedermolekulare Hyaluronsäure hemmten die Transkription dieses Gens. Von den Genen PPA0916 (*dnaJ*), PPA1098 (*dnaK*), PPA1772 (*groEL2*) und PPA2040 (*dnaK*) war in PYG-Komplexmedium kein Transkript nachweisbar. *Aloe arborescens*-Extrakt induzierte die Transkription der Gene PPA0916 und PPA1772, Arjunolic-Säure von PPA1772. Cistus-Extrakt und Taurolidin A induzieren die Transkription der Gene PPA0916, PPA1772 und PPA2040.
Von den Genen PPA1906 und PPA1983, die für Adhäsionsfaktoren kodieren, waren in PYG-Komplexmedium keine Transkripte nachweisbar. Taurolidin A induzierte die Transkription beider Gene, Cistus-Extrakt die des Gens PPA1983.
Ein Transkript der Gene, die für Hautgewebe-abbauenden Enzyme kodieren, war bei den Genen PPA0380 (kodiert für Hyaluronat-Lyase), PPA0622 (kodiert für Endoglycoceramidase), PPA0684 (kodiert für Sialidase L), PPA0685 (kodiert für Sialidase A), PPA1560 (kodiert für Sialidase), PPA1796 (kodiert für *gehA*-Homolog), PPA2105 (kodiert für *gehA*-Lipase) und PPA2106 (kodiert für Endoglycoceramidase) in PYG-Komplexmedium nicht nachweisbar. *Aloe arborescens*-Extrakt induzierte die Transkription der Gene PPA 0380, PPA0644, PPA1540 und PPA2106. Arjunolic-Säure induzierte die Transkription der Gene PPA0380, PPA1540 und PPA2106, LMW-Skleroglucan von PPA2106. Taurolidin A induzierte die Transkription der Gene PPA0380, PPA0644, PPA0684, PPA0685, PPA1540 und PPA2106, Cistus-Extrakt die Transkription der Gene PPA0380, PPA0644, PPA0685, PPA2105 und PPA2106.

Von den Genen PPA1715, PPA1880, PPA2127, PPA2130 und PPA2210, die für Wirtsinteraktionsfaktoren kodieren, waren in PYG-Komplexmedium keine Transkripte nachweisbar. *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, Taurolidin A und Cistus-Extrakt induzierten die Transkription des Gens PPA1715. Taurolidin A und Cistus-Extrakt induzierten die Transkription des Gens PPA1880, niedermolekulare Hyaluronsäure und Taurolidin A die Transkription des Gens PPA2127. Die Transkription des Gens PPA2210 wurde durch die niedermolekulare Hyaluronsäure induziert.
Das Gen PPA0737, das für ein Antigen kodiert, wurde in PYG-Komplexmedium nicht abgelesen. Die Transkription dieses Gens wurde durch *Aloe arborescens*-Extrakt induziert. Ein Transkript des Gens PPA0765, das für ein Antigen kodiert, war in PYG-Komplexmedium, nicht aber bei der Zugabe der Substanzen Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A nachweisbar.

Bei den RT-PCR-Analysen mit Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium (Tabelle 3.8) konnte gezeigt werden, dass Lipide auf die Transkription der CAMP-Faktoren keinen Einfluss hatten. *Aloe arborescens*-Extrakt, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure und Taurolidin A induzierten die Trankription des Gens PPA0687, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure und Cistus-Extrakt induzierten die Transkription des Gens PPA1231. Arjunolic-Säure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A hemmten die Transkription des Gens PPA1340.
Die drei Gene PPA0565, PPA0938 und PPA1396, die für Hämolysine kodieren, wurden durch Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium abgelesen. Lipide induzierten die Transkription des Gens PPA0938. *Aloe arborescens*-Extrakt hemmte die Transkription des Gens PPA0938, *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan und Taurolidin A hemmten die Transkription des Gens PPA1396.
Lipide hatten keinen Einfluss auf die Transkription der Gene, die für Chaperone kodieren. Von dem Gen PPA0453 (*groEL*) wurde in PYG-Komplexmedium mit und ohne Zugabe von Lipiden ein Transkript gebildet. Niedermolekulare Hyaluronsäure und Cistus-Extrakt hemmten die Transkription dieses Gens. Bei den Chaperonen wurde von den Genen PPA0916 (*dnaJ*), PPA1098 (*dnaK*), PPA1772 (*groEL2*) und PPA2040 (*dnaK*) kein Transkript gebildet. *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A induzierten die Transkription der Gene PPA0916 und PPA2040. *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure und Taurolidin A induzierten die Transkription des Gens PPA1772, Cistus-Extrakt die Transkription des Gens PPA1098.

Von den beiden Genen PPA1906 und PPA1983, die für Adhäsionsfaktoren kodieren, waren in PYG-Komplexmedium keine Transkripte nachweisbar. Lipide induzierten die Transkription des Gens PPA1983. LMW-Skleroglucan und Cistus-Extrakt induzierten die Transkription des Gens PPA1906. *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A hemmten die Transkription des Gens PPA1983.
Ein Transkript der Gene, die für Hautgewebe-abbauenden Enzyme kodieren, war in PYG-Komplexmedium nicht nachweisbar. Dies war bei den Genen PPA0380 (kodiert für Hyaluronat-Lyase), PPA0622 (kodiert für Endoglycoceramidase), PPA0684 (kodiert für Sialidase L), PPA0685 (kodiert für Sialidase A), PPA1560 (kodiert für Sialidase), PPA1796 (kodiert für *gehA*-Homolog), PPA2105 (kodiert für *gehA*-Lipase) und PPA2106 (kodiert für Endoglycoceramidas) der Fall. Die Zugabe von Lipiden in das Medium induzierte die Transkription dieser Gene. *Aloe arborescens*-Extrakt hemmte die Transkription des Gens PPA0380, Cistus-Extrakt die des Gens PPA0684. *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A hemmten die Transkription des Gens PPA0685. *Aloe arborescens*-Extrakt und Taurolidin A hemmten die Transkription des Gens PPA1796, *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure und Taurolidin A die des Gens PPA2105. Die Transkription des Gens PPA2106 wurde durch Cistus-Extrakt gehemmt.
Die Transkription der Gene PPA2130 und PPA2210, die für Wirtsinteraktionsfaktoren kodieren, wurde durch die Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium induziert. *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A induzierten die Transkription des Gens PPA1715. Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan und niedermolekulare Hyaluronsäure induzierten die Transkription des Gens PPA1880, *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure und Taurolidin A die des Gens PPA2127. *Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure, niedermolekulare Hyaluronsäure und Taurolidin A hemmten die Transkription des Gens PPA2130, Arjunolic-Säure, LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure und Cistus-Extrakt die des Gens PPA 2210.
Das Gen PPA0737, das für ein Antigen kodiert, wurde in PYG-Komplexmedium mit und ohne Zugabe von Lipiden nicht abgelesen. Cistus-Extrakt induzierte die Transkription dieses Gens. Ein Transkript des Gens PPA0765, das für ein Antigen kodiert, war in PYG-Komplexmedium mit und ohne Zugabe von Lipiden nachweisbar. *Aloe arborescens*-Extrakt hemmte die Transkription dieses Gens.

Tabelle 3.7: **Auswertung der RT-PCR-Analysen**

Gen	Genprodukt	PYG	A. a.	Arj.	LMW	Hy.	Tau. A	Cis.
PPA0687	CAMP-Faktor	-	-	-	-	-	-	-
PPA1198	CAMP-Faktor	-	-	-	-	-	-	-
PPA1231	CAMP-Faktor	-	-	-	-	-	-	-
PPA1340	CAMP-Faktor	+	+	-	-	-	+	-
PPA2108	CAMP-Faktor	+	-	+	-	+	+	-
PPA0565	potentielles Hämolysin	+	+	-	+	-	+	+
PPA0938	potentielles Hämolysin	-	+	+	-	-	+	+
PPA1396	potentielles Hämolysin	+	+	-	-	-	-	-
PPA0453	GroEL	+	+	+	-	-	+	+
PPA0916	DnaJ	-	+	-	-	-	+	+
PPA1098	DnaK	-	-	-	-	-	-	-
PPA1772	GroEL2	-	+	+	-	-	+	+
PPA2040	DnaK	-	-	-	-	-	+	+
PPA1906	Adhäsionsfaktor	-	-	-	-	-	+	-
PPA1983	Adhäsionsfaktor	-	-	-	-	-	+	+
PPA0380	Hyaluronat-Lyase	-	+	+	-	-	+	+
PPA0644	Endoglycoceramidase	-	+	-	-	-	+	+
PPA0684	Sialidase L	-	-	-	-	-	+	-
PPA0685	Sialidase A	-	-	-	-	-	+	+
PPA1560	Sialidase	-	+	+	-	-	+	-
PPA1796	*gehA*-Homolog	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.7: Fortsetzung

Gen	Genprodukt	PYG	A. a.	Arj.	LMW	Hy.	Tau. A	Cis.
PPA2105	*gehA*-Lipase	-	-	-	-	-	-	+
PPA2106	Endoglycoceramidase	-	+	+	+	-	+	+
PPA1715	Wirtsinteraktionsfaktor	-	+	+	-	-	+	+
PPA1880	Wirtsinteraktionsfaktor	-	-	-	-	-	+	+
PPA2127	Wirtsinteraktionsfaktor	-	-	-	-	+	+	-
PPA2130	Wirtsinteraktionsfaktor	-	-	-	-	-	-	-
PPA2210	Wirtsinteraktionsfaktor	-	-	-	-	+	-	-
PPA0737	Antigen	-	-	-	+	-	-	-
PPA0765	Antigen	+	+	-	-	-	-	-

Anmerkung: +: Transkript nachweisbar; -: Transkript nicht nachweisbar. PYG: PYG-Komplexmedium; A. a.: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) *Aloe arborescens*-Extrakt; Arj.: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) Arjunolic-Säure; LMW: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) LMW-Skleroglucan; Hy.: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) niedermolekularer Hyaluronsäure; Cis.: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) Cistus-Extrakt; Tau. A: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) Taurolidin A.

Tabelle 3.8: **Auswertung der RT-PCR-Analysen mit Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium**

Gen	Genprodukt	PYH	+ L.	A. a. + L.	Arj. + L.	LMW + L.	Hy. + L.	Tau. A + L.	Cis. A + L.
PPA0687	CAMP-Faktor	-	-	+	-	+	-	+	-
PPA1198	CAMP-Faktor	-	-	-	-	-	-	-	-
PPA1231	CAMP-Faktor	-	-	-	+	+	+	-	+
PPA1340	CAMP-Faktor	+	+	-	+	+	+	-	-
PPA2108	CAMP-Faktor	+	+	+	+	+	+	+	+
PPA0565	potentielles Hämolysin	+	+	+	+	+	+	+	+
PPA0938	potentielles Hämolysin	-	+	-	+	+	+	+	+
PPA1396	potentielles Hämolysin	+	+	-	-	-	+	-	+
PPA0453	GroEL	+	+	+	+	+	-	+	-
PPA0916	DnaJ	-	-	+	+	+	+	+	+
PPA1098	DnaK	-	-	-	-	-	-	-	+
PPA1772	GroEL2	-	-	+	+	+	+	+	-
PPA2040	DnaK	-	-	+	+	+	+	+	+
PPA1906	Adhäsionsfaktor	-	-	-	-	+	-	-	+
PPA1983	Adhäsionsfaktor	-	+	-	-	+	+	-	-
PPA0380	Hyaluronat-Lyase	-	+	-	+	+	+	+	+
PPA0644	Endoglycoceramidase	-	+	+	+	+	+	+	+
PPA0684	Sialidase L	-	+	+	+	+	+	+	-
PPA0685	Sialidase A	-	+	-	-	-	-	-	-
PPA1560	Sialidase	-	+	+	+	+	+	+	+

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.8: Fortsetzung

Gen	Genprodukt	PYG	PYG + L.	A. a. + L.	Arj. + L.	LMW + L.	Hy. + L.	Tau. A + L.	Cis. + L.
PPA1796	*gehA*-Homolog	-	+	-	+	+	+	-	+
PPA2105	*gehA*-Lipase	-	+	-	-	-	-	-	+
PPA2106	Endoglycoceramidase	-	+	+	+	+	+	+	-
PPA1715	Wirtsinteraktionsfaktor	-	-	+	+	+	+	+	+
PPA1880	Wirtsinteraktionsfaktor	-	-	-	+	+	+	-	-
PPA2127	Wirtsinteraktionsfaktor	-	-	+	+	+	+	+	-
PPA2130	Wirtsinteraktionsfaktor	-	+	-	-	+	-	-	+
PPA2210	Wirtsinteraktionsfaktor	-	+	+	-	-	-	+	-
PPA0737	Antigen	-	-	-	-	-	-	-	+
PPA0765	Antigen	+	+	-	+	+	+	+	+

Anmerkung: +: Transkript nachweisbar; -: Transkript nicht nachweisbar. PYG: PYG-Komplexmedium; L.: Zugabe von 5 % (w/v) Lipiden; A. a.: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) *Aloe arborescens*-Extrakt; Arj.: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) Arjunolic-Säure; LMW: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) LMW-Skleroglucan; Hy.: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) niedermolekularer Hyaluronsäure; Cis.: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) Cistus-Extrakt; Tau. A: PYG-Komplexmedium unter Zugabe von 0,1 % (w/v) Taurolidin A.

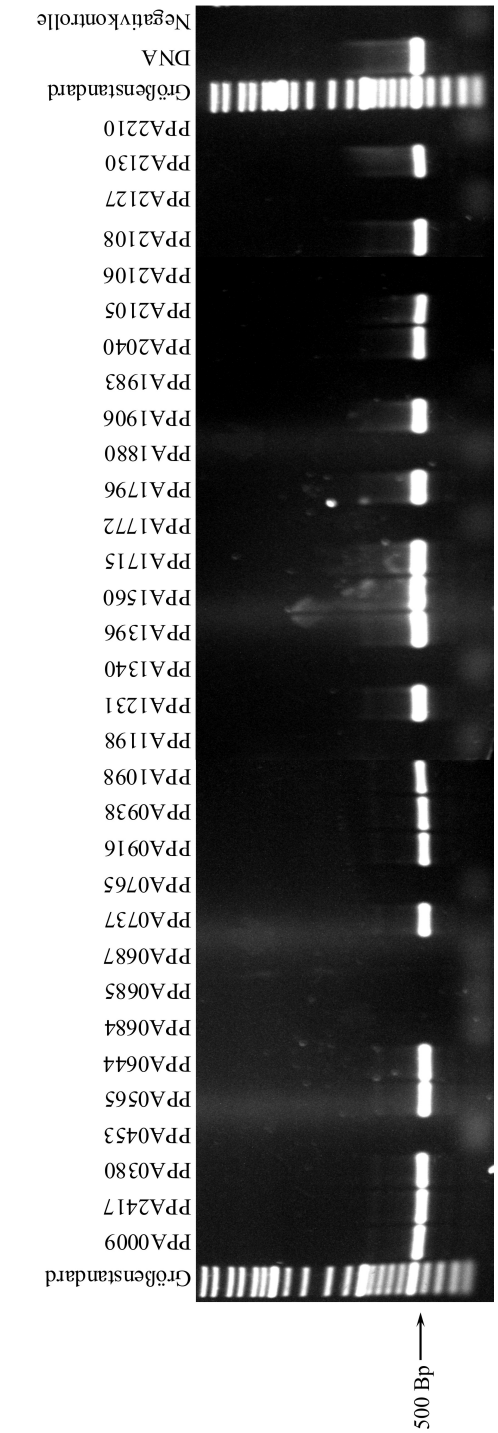

Abbildung 3.12: **0,8%iges Agarosegel der RT-PCR-Analysen.** Aufgetragen sind beispielhaft die Ergebnisse der Transkriptionsstudien des Cistus-Extraktes (0,1 % [w/v]) mit 5 % (w/v) Lipiden. Das Gen PPA0009, das für die Gyrase A kodiert, und PPA2417, das für die 16S rRNA kodiert, sind konstitutiv exprimierte Gene und dienten als Kontrolle.

3.6.2 Quantitative „Real-Time"-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)-Studien (LightCycler®)

In den folgenden Versuchen wurde das Expressionsverhältnis der Transkription der Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, untersucht. Es wurde untersucht, welche Gene unter Zugabe von Lipiden bzw. bestimmten Substanzen aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio (LMW-Skleroglucan und Taurolidin A) in welchem Verhältnis abgelesen werden. Im Anhang sind die Ergebnisse der entsprechenden Wachstumsversuche für die qRT-PCR-Analysen aufgeführt. Keine der Substanzen, die in diesen Analysen verwendet worden waren, hatte eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *P. acnes*.
Es wurden Proben aus dem exponentiellen Wachstum (Zellmasse von 0,07-0,1 mg/ml) von *P. acnes* genommen und mit „Killing-Puffer" versetzt, um die Stoffwechselaktivitäten zu stoppen. Danach wurde die RNA isoliert und eine cDNA-Synthese durchgeführt. Mit der cDNA erfolgte eine quantitative „Real-Time"-Polymerasekettenreaktion. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3.9 bis 3.12 und in den Abbildungen 3.13 bis 3.20 dargestellt. Die einzelnen Messwerte (cp-Werte) der qRT-PCR-Analysen sind im Anhang aufgeführt. Als Referenzgene dienten in diesen Versuchen das konstitutiv exprimierte Gen („housekeeping genes") der Gyrase A (PPA0010) und der 16S rRNA (PPA2417).

Zur Bestimmung der Effizienz der Transkription eines Gens wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurde die cDNA einer Probe in verschiedenen Verdünnungen in einem PCR-Ansatz eingesetzt und die einzelnen „crossing points" (cp-Werte) ermittelt. Durch das Auftragen der cp-Werte über die Verdünnungen konnte eine Kalibriergerade erstellt werden. Mit Hilfe deren Steigung m konnte die Effizienz E wie folgt berechnet werden:
$E = 10^{\frac{-1}{m}}$
Die Bestimmung des Expressionsverhältnisses (ratio) erfolgte durch die Bestimmung der einzelnen cp-Werte der jeweiligen Proben, wobei darauf zu achten war, dass immer dieselbe Verdünnung der cDNA eingesetzt wurde. Das Expressionsverhältnis wurde nach der $\Delta\Delta$ cp-Methode wie folgt berechnet (Pfaffl, 2001):

$$\text{ratio} = \frac{E_{\text{Testgen}}^{(\text{cp PYG}_{\text{Testgen}} - \text{cp Testbedingung}_{\text{Testgen}})}}{E_{\text{Referenzgen}}^{(\text{cp PYG}_{\text{Referenzgen}} - \text{cp Testbedingung}_{\text{Referenzgen}})}}$$

Eine Erhöhung der Expression liegt ab einem Expressionsverhältnis größer gleich drei vor. Eine andere Möglichkeit der Auswertung war, den Logarithmus des Expressionsverhältnisses zur Basis zwei zu berechnen. Ab einem Wert größer gleich 1,56 wird von einer Erhöhung der Transkription ausgegangen, bei einem Wert kleiner gleich -1,56 wird die Transkription eines Gens reprimiert.

Bei den Analysen wurde zuerst untersucht, ob die zu testende Substanz einen Einfluss auf die Transkription einzelner Pathogenitätsfaktoren hat. In Tabelle 3.9 und 3.10 bzw. in den Abbildungen 3.13 bis 3.16 sind die Ergebnisse dargestellt. Keine der beiden getesteten Substanzen (LMW-Skleroglucan und Taurolidin A) hatte einen Einfluss auf die Transkription der Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren. Nur die Transkription des Gens PPA0684, das für eine Sialidase kodiert, wurde durch die Zugabe von LMW-Skleroglucan in das PYG-Komplexmedium erhöht. Dies ist sowohl bei den Referenzgenen, die für die 16S rRNA bzw. Gyrase A kodieren, zu beobachten gewesen. Wie in den Abbildungen zu erkennen ist, wurde die Transkription der meisten Gene durch die Zugabe der Substanzen reprimiert.

Wurden Lipide in das PYG-Komplexmedium zugegeben, so war die Transkription in Bezug auf das Gen PPA2417, das für die 16S rRNA kodieret, als Referenz von elf Genen erhöht (Tabelle 3.11, Abbildungen 3.17 und 3.18). Eine Erhöhung der Transkription war für das Gen eines CAMP-Faktors (PPA0686), die Gene der Chaperone DnaK (PPA2040 und 1098), GroEL2 (PPA1772) und DnaJ (PPA0916), das Gen eines Antigens (PPA0737), das Gen des Hautgewebe-abbauenden Enzyms Endoglycoceramidase (PPA0644) und des *gehA*-Homologs (PPA1796), des Gen eines Adhäsionsfaktors (PPA1983), das Gen eines Wirtsinteraktionsfaktors (PPA2127) und das Gen eines potentiellen Hämolysins (PPA1396) zu beobachten. Lipide hatten bei den weiteren 19 untersuchten Gene keine Veränderung des Transkriptionsverhältnisses zur Folge. Wurden LMW-Skleroglucan bzw. Taurolidin A in das Medium, das Lipide enthielt, zugegeben, so war keine Erhöhung der Transkription der untersuchten 30 Gene zu beobachten. Beide Substanzen hemmten die Transkription potentieller Pathogenitätsfaktoren. Bei einer logarithmischen Auftragung des Expressionsverhältnisses war zu erkennen, dass die Gene PPA2105 (kodiert für *gehA*-Lipase) und PPA0453 (kodiert für GroEL) bei Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium reprimiert wurden. Bei den meisten der 30 untersuchten Genen, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren, hatten die Substanzen LMW-Skleroglucan und Taurolidin A einen reprimierenden Einfluss.

Wurden Lipide in das PYG-Komplexmedium zugegeben, so war die Transkription in Bezug auf das Gen PPA0010, das für die Gyrase A kodiert, als Referenz von 13 Genen erhöht (Tabelle 3.11, Abbildungen 3.19 und 3.20). Eine Erhöhung der Transkription war für das Gen eines CAMP-Faktors (PPA0686), die Gene der Chaperone DnaK (PPA2040 und 1098), GroEL2 (PPA1772) und DnaJ (PPA0916), das Gen eines Antigens (PPA0737), die Gene der Hautgewebe-abbauenden Enzyme Endoglycoceramidase (PPA0644), Sialidase (PPA1560) und *gehA*-Homolog (PPA1796), die Gene der Adhäsionsfaktoren (PPA1983 und PPA1906), das Gen eines Wirtsinteraktionsfaktors (PPA2127) und das Gen eines potentiellen Hämolysins (PPA1396) zu beobachten. Bei den weiteren 17 untersuchten Genen hatten Lipide keine Erhöhung der Transkription zur Folge. Wurde LMW-Skleroglucan in das Medium gegeben, das Lipide enthielt, war die Transkription der Gene PPA1796 (kodiert für *gehA*-Homolog), PPA0380 (kodiert für Hyaluronat-Lyase), PPA1340 (kodiert für CAMP-Faktor) und PPA2105 (kodiert für *gehA*-Lipase) erhöht. Wurde Taurolidin A in das Medium, das Lipide enthielt, zugegeben, war die Transkription das Gens PPA1340 (kodiert für CAMP-Faktor) erhöht. Dasselbe war bei einer logarithmischen Darstellung des Expressionsverhältnisses zu erkennen. Des Weiteren war zu beobachten, dass in Bezug auf die Gyrase A als Referenzgen die Gene PPA2105 (kodiert für *gehA*-Lipase) und PPA0453 (kodiert für GroEL) bei Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium reprimiert wurden.

Tabelle 3.9: **Auswertung der qRT-PCR-Analysen mit dem Gen der 16S rRNA als Referenz.** Wachstum in PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden.

			Expressionsverhältnis		$\log_2$(Expressionsverhältnis)	
Gen	Genprodukt	Effizienz	LMW-Skl.	Taurolidin A	LMW-Skl.	Taurolidin A
PPA2417	16S rRNA	2,25	1,00	1,00	0,00	0,00
PPA0687	CAMP-Faktor	1,78	0,52	0,03	-0,94	-5,06
PPA1198	CAMP-Faktor	2,15	0,01	0,01	-6,51	-6,64
PPA1231	CAMP-Faktor	2,04	0,70	0,53	-0,50	-0,92
PPA1340	CAMP-Faktor	1,80	0,14	0,43	-2,85	-1,22
PPA2108	CAMP-Faktor	1,94	0,12	0,07	-3,08	-3,84
PPA0565	potentielles Hämolysin	2,14	0,01	0,07	-6,67	-3,84
PPA0938	potentielles Hämolysin	2,07	0,11	0,07	-3,24	-3,84
PPA1396	potentielles Hämolysin	2,02	0,00	0,23	-8,23	-2,12
PPA0453	GroEL	1,85	0,34	0,11	-1,58	-3,18
PPA0916	DnaJ	1,80	0,02	0,08	-5,67	-3,64
PPA1098	DnaK	2,05	0,10	0,07	-3,33	-3,84
PPA1772	GroEL2	1,79	0,03	0,05	-5,31	-4,32
PPA2040	DnaK	1,93	0,00	0,42	-9,80	-1,25
PPA1906	Adhäsionsfaktor	1,95	0,00	0,09	-12,64	-3,47
PPA1983	Adhäsionsfaktor	1,93	0,07	0,07	-3,80	-3,84
PPA0380	Hyaluronat-Lyase	2,03	0,00	0,01	-9,01	-6,64
PPA0644	Endoglycoceramidase	2,08	0,14	0,04	-2,81	-4,64
PPA0684	Sialidase L	2,40	4,94	0,17	2,31	-2,56

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.9: Fortsetzung

			Expressionsverhältnis		$\log_2$(Expressionsverhältnis)	
Gen	Genprodukt	Effizienz	LMW-Skl.	Taurolidin A	LMW-Skl.	Taurolidin A
PPA0685	Sialidase A	1,86	0,58	0,02	-0,80	-5,64
PPA1560	Sialidase	1,96	0,00	0,03	-7,84	-5,06
PPA1796	*gehA*-Homolog	2,02	0,00	0,02	-9,95	-5,64
PPA2105	*gehA*-Lipase	2,14	0,00	0,13	-14,30	-2,94
PPA2106	Endoglycoceramidase	1,70	0,12	0,01	-3,02	-6,64
PPA1715	Wirtsinteraktionsfaktor	1,79	0,02	0,01	-5,72	-5,54
PPA1880	Wirtsinteraktionsfaktor	1,95	0,03	0,03	-5,31	-5,06
PPA2127	Wirtsinteraktionsfaktor	2,05	0,16	0,22	-2,64	-2,18
PPA2130	Wirtsinteraktionsfaktor	1,88	0,06	0,06	-4,16	-4,06
PPA2210	Wirtsinteraktionsfaktor	2,00	0,01	0,09	-7,00	-3,47
PPA0737	Antigen	2,06	0,01	0,10	-6,11	-3,32
PPA0765	Antigen	1,83	0,16	0,07	-2,68	-3,84

Anmerkung: LMW-Skl.: LMW-Skleroglucan.

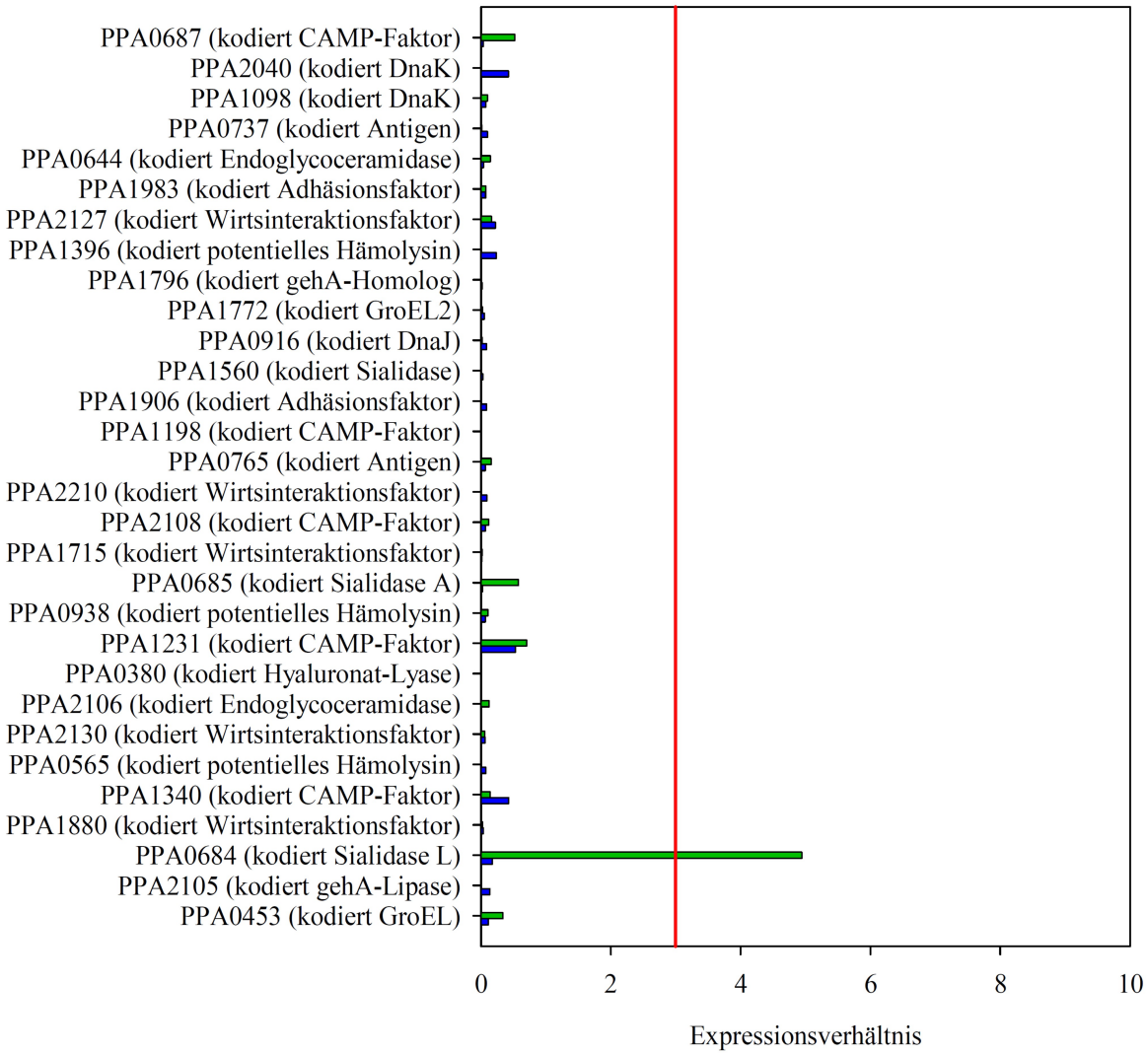

Abbildung 3.13: **Grafische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen.** Wachstum der Kultur in PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden mit dem Gen der 16S rRNA als Referenz. Die rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Erhöhung der Transkription (Expressionsverhältnis ≥ 3) dar. Symbole: ■ Zugabe von LMW-Skleroglucan in das Medium, ■ Zugabe von Taurolidin A in das Medium.

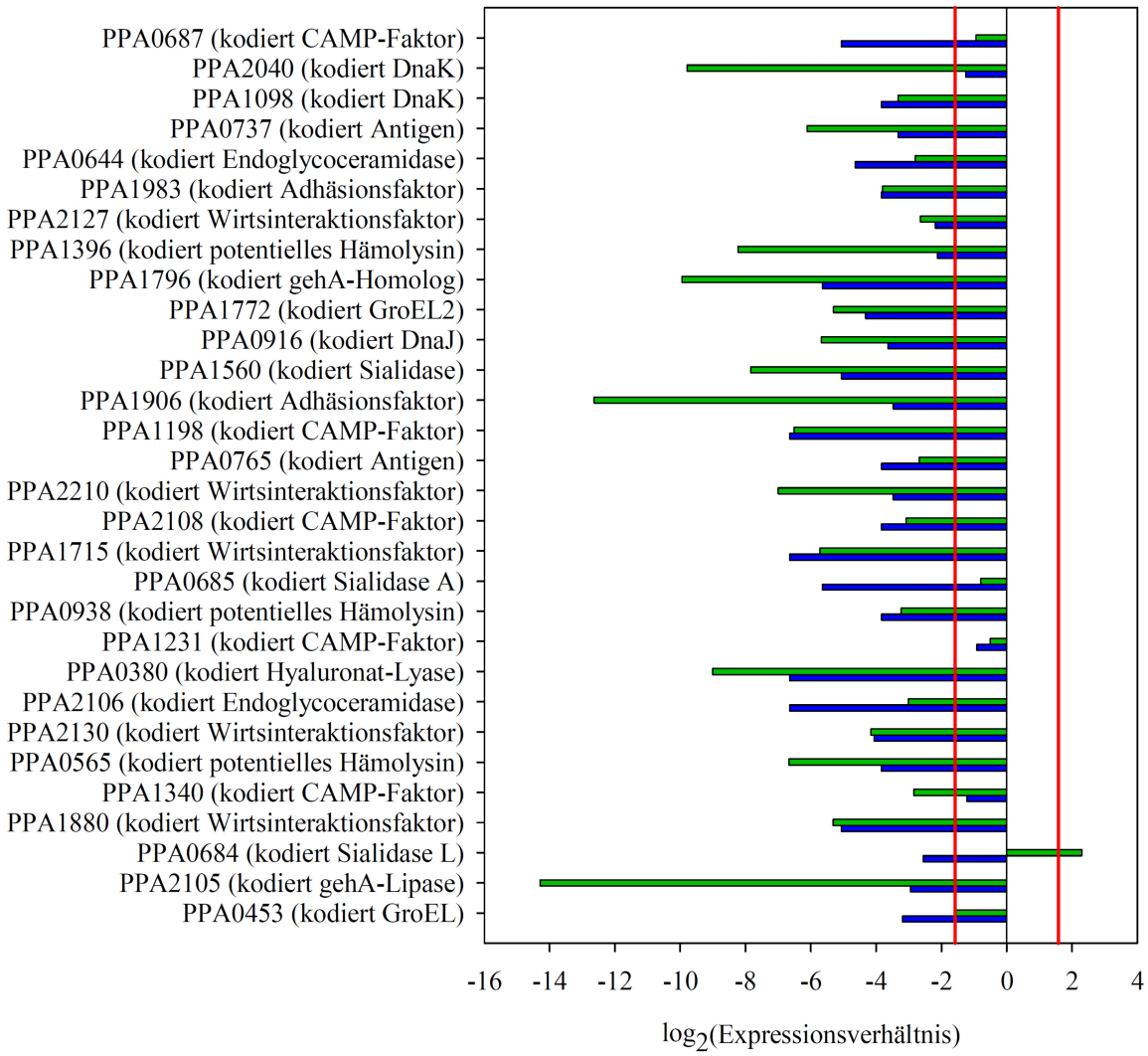

Abbildung 3.14: **Grafische Darstellung der Ergebnisse (logarithmisch) der qRT-PCR-Analysen.** Wachstum der Kultur in PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden mit dem Gen der 16S rRNA als Referenz. Die linke rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Reprimierung eines Gens dar ($\log_2$(Expressionsverhältnis) $\leq$ -1,56), die rechte rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Erhöhung der Transkription dar ($\log_2$(Expressionsverhältnis) $\geq$ 1,56). Symbole: ■ Zugabe von LMW-Skleroglucan in das Medium, ■ Zugabe von Taurolidin A in das Medium.

Tabelle 3.10: **Auswertung der qRT-PCR-Analysen mit dem Gen der Gyrase A als Referenz.** Wachstum in PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden.

			Expressionsverhältnis		$\log_2$(Expressionsverhältnis)	
Gen	Genprodukt	Effizienz	LMW-Skl.	Taurolidin A	LMW-Skl.	Taurolidin A
PPA0010	Gyrase A	1,83	1,00	1,00	0,00	0,00
PPA0687	CAMP-Faktor	1,78	0,99	0,16	-0,01	-2,68
PPA1198	CAMP-Faktor	2,15	0,02	0,04	-5,58	-4,50
PPA1231	CAMP-Faktor	2,04	1,34	2,46	0,43	1,30
PPA1340	CAMP-Faktor	1,80	0,26	1,99	-1,92	0,99
PPA2108	CAMP-Faktor	1,94	0,22	0,32	-2,15	-1,67
PPA0565	potentielles Hämolysin	2,14	0,02	0,34	-5,75	-1,56
PPA0938	potentielles Hämolysin	2,07	0,20	0,31	-2,31	-1,70
PPA1396	potentielles Hämolysin	2,02	0,01	1,09	-7,30	0,12
PPA0453	GroEL	1,85	0,64	0,52	-0,65	-0,95
PPA0916	DnaJ	1,80	0,04	0,38	-4,75	-1,40
PPA1098	DnaK	2,05	0,19	0,35	-2,40	-1,53
PPA1772	GroEL2	1,79	0,05	0,22	-4,38	-2,17
PPA2040	DnaK	1,93	0,00	1,96	-8,87	0,97
PPA1906	Adhäsionsfaktor	1,95	0,00	0,41	11,71	-1,29
PPA1983	Adhäsionsfaktor	1,93	0,14	0,33	-2,87	-1,61
PPA0380	Hyaluronat-Lyase	2,03	0,00	0,04	-8,08	-4,51
PPA0644	Endoglycoceramidase	2,08	0,27	0,18	-1,88	-2,49
PPA0684	Sialidase L	2,40	9,41	0,80	3,23	-0,32

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.10: Fortsetzung

			Expressionsverhältnis		$\log_2$(Expressionsverhältnis)	
Gen	Genprodukt	Effizienz	LMW-Skl.	Taurolidin A	LMW-Skl.	Taurolidin A
PPA0685	Sialidase A	1,86	1,10	0,10	0,13	-3,36
PPA1560	Sialidase	1,96	0,01	0,14	-6,91	-2,83
PPA1796	*gehA*-Homolog	2,02	0,00	0,08	-9,02	-3,68
PPA2105	*gehA*-Lipase	2,14	0,00	0,63	-13,37	-0,68
PPA2106	Endoglycoceramidase	1,70	0,23	0,03	-2,09	-5,00
PPA1715	Wirtsinteraktionsfaktor	1,79	0,04	0,06	-4,79	-4,07
PPA1880	Wirtsinteraktionsfaktor	1,95	0,05	0,15	-4,38	-2,75
PPA2127	Wirtsinteraktionsfaktor	2,05	0,31	1,04	-1,71	0,06
PPA2130	Wirtsinteraktionsfaktor	1,88	0,11	0,28	-3,23	-1,84
PPA2210	Wirtsinteraktionsfaktor	2,00	0,01	0,42	-6,07	-1,26
PPA0737	Antigen	2,06	0,03	0,46	-5,17	-1,12
PPA0765	Antigen	1,83	0,30	0,31	-1,75	-1,67

Anmerkung: LMW-Skl.: LMW-Skleroglucan.

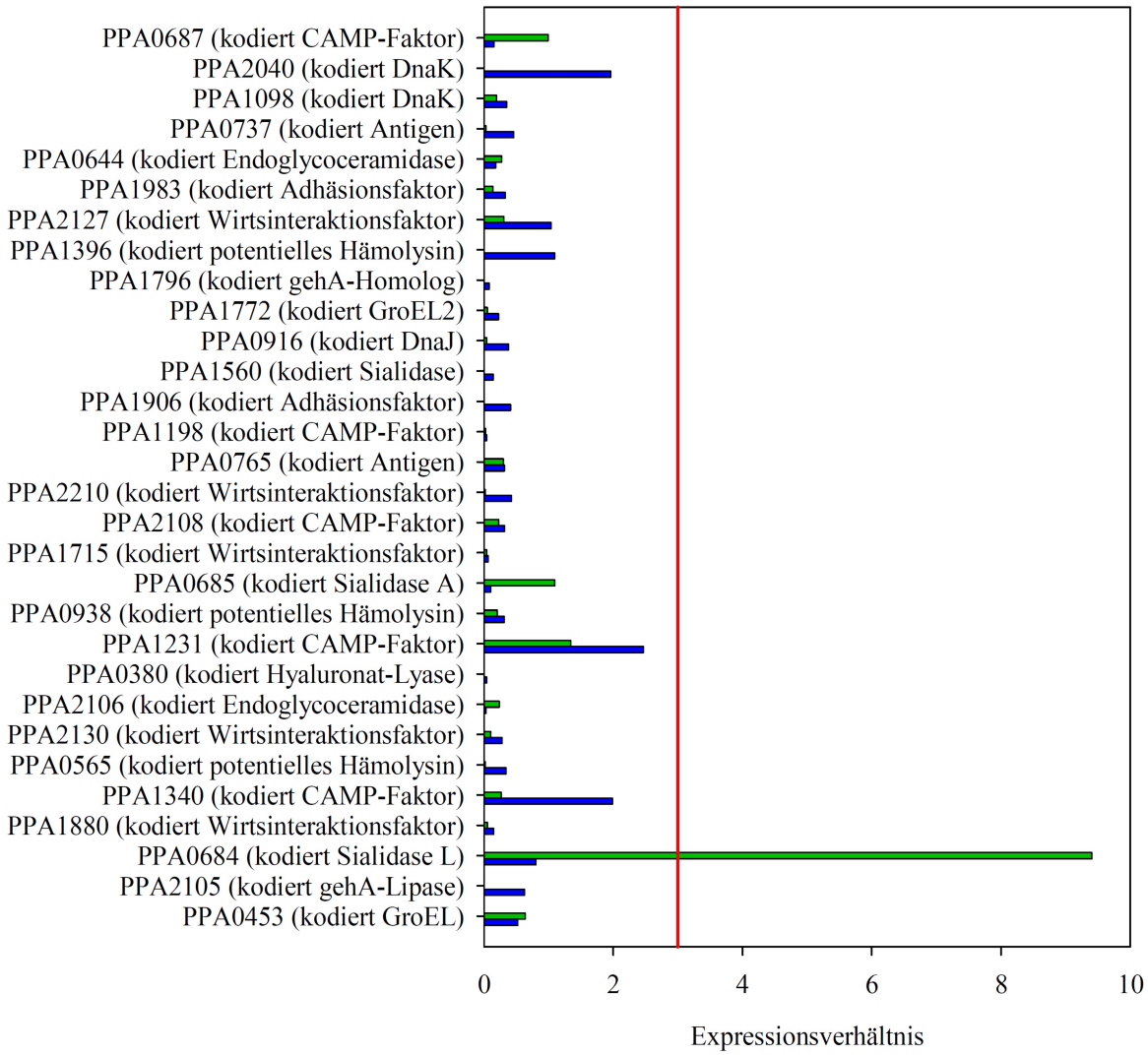

Abbildung 3.15: **Grafische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen.** Wachstum der Kultur in PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden mit dem Gen der Gyrase A als Referenz. Die rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Erhöhung der Transkription (Expressionsverhältnis ≥ 3) dar. Symbole: ■ Zugabe von LMW-Skleroglucan in das Medium, ■ Zugabe von Taurolidin A in das Medium.

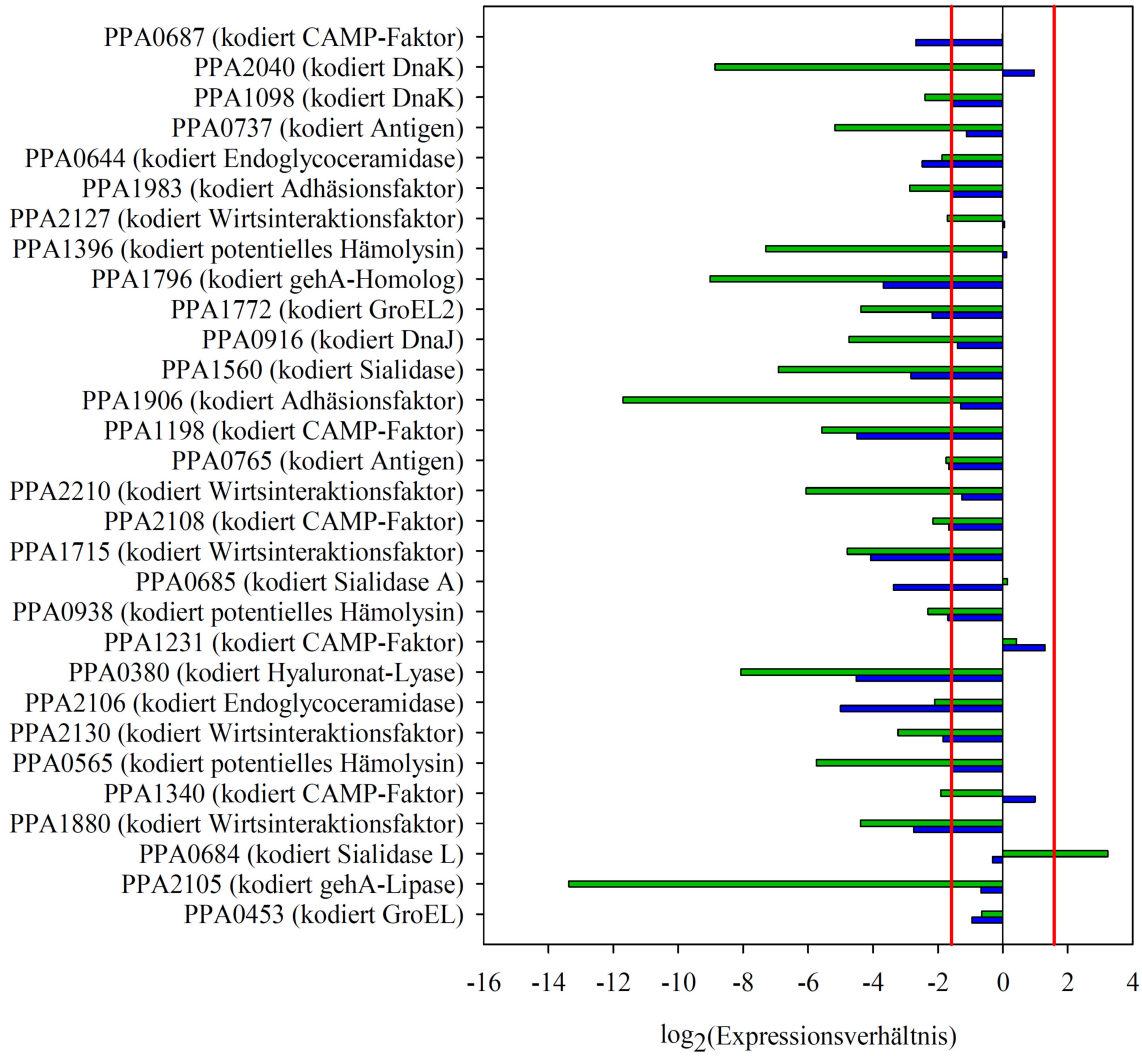

Abbildung 3.16: **Grafische Darstellung der Ergebnisse (logarithmisch) der qRT-PCR-Analysen.** Wachstum der Kultur in PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden mit dem Gen der Gyrase A als Referenz. Die linke rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Reprimierung eines Gens dar ($\log_2$(Expressionsverhältnis) $\leq$ -1,56), die rechte rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Erhöhung der Transkription dar ($\log_2$(Expressionsverhältnis) $\geq$ 1,56). Symbole: ■ Zugabe von LMW-Skleroglucan in das Medium, ■ Zugabe von Taurolidin A in das Medium.

Tabelle 3.11: **Auswertung der qRT-PCR-Analysen mit dem Gen der 16S rRNA als Referenz.** Wachstum in PYG-Komplexmedium mit Lipiden.

			Expressionsverhältnis			$\log_2$(Expressionsverhältnis)		
Gen	Genprodukt	Effizienz	Lipide	LMW-Skl.	Tau. A	Lipide	LMW-Skl.	Tau. A
PPA2417	16S rRNA	2,25	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
PPA0687	CAMP-Faktor	1,78	42,36	0,01	0,05	5,41	-6,24	-4,25
PPA1198	CAMP-Faktor	2,15	2,07	0,01	0,00	1,05	-6,78	-8,05
PPA1231	CAMP-Faktor	2,04	1,43	0,06	0,81	0,52	-4,02	-0,30
PPA1340	CAMP-Faktor	1,80	1,03	1,17	2,59	0,04	0,22	1,37
PPA2108	CAMP-Faktor	1,94	1,76	0,08	0,06	0,81	-3,70	-4,10
PPA0565	potentielles Hämolysin	2,14	1,10	0,07	0,10	0,14	-3,93	-3,30
PPA0938	potentielles Hämolysin	2,07	1,43	0,09	0,07	0,52	-3,55	-3,82
PPA1396	potentielles Hämolysin	2,02	3,91	0,30	1,83	1,97	-1,75	-4,34
PPA0453	GroEL	1,85	0,02	0,01	1,83	-5,11	-7,02	0,87
PPA0916	DnaJ	1,80	3,00	0,03	0,15	1,58	-5,01	-2,71
PPA1098	DnaK	2,05	8,55	0,07	0,36	3,10	-3,85	-1,48
PPA1772	GroEL2	1,79	3,01	0,03	0,04	-1,59	-5,21	-4,56
PPA2040	DnaK	1,93	11,76	0,02	0,94	3,56	-5,91	-0,09
PPA1906	Adhäsionsfaktor	1,95	2,75	0,21	0,10	1,46	-2,23	-3,27
PPA1983	Adhäsionsfaktor	1,93	5,64	0,14	0,03	2,50	-2,79	-4,84
PPA0380	Hyaluronat-Lyase	2,03	1,38	2,64	0,03	0,42	1,40	-5,24
PPA0644	Endoglycoceramidase	2,08	6,66	0,12	0,12	2,74	-3,12	-3,11
PPA0684	Sialidase L	2,40	0,86	0,56	0,01	-0,22	-0,83	-6,63

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.11: Fortsetzung

			Expressionsverhältnis			$\log_2$(Expressionsverhältnis)		
Gen	Genprodukt	Effizienz	Lipide	LMW-Skl.	Tau. A	Lipide	LMW-Skl.	Tau. A
PPA0685	Sialidase A	1,86	1,55	0,01	0,00	0,63	-7,11	-8,52
PPA1560	Sialidase	1,96	2,77	0,53	0,03	1,47	-0,93	-4,88
PPA1796	*gehA*-Homolog	2,02	3,27	1,18	0,72	1,71	0,24	-0,47
PPA2105	*gehA*-Lipase	2,14	0,23	0,72	0,83	-2,15	-0,47	-0,27
PPA2106	Endoglycoceramidase	1,70	1,33	0,01	0,10	-3,36	-6,51	0,41
PPA1715	Wirtsinteraktionsfaktor	1,79	1,63	0,01	0,00	0,71	-6,15	-8,51
PPA1880	Wirtsinteraktionsfaktor	1,95	0,93	0,04	0,10	-0,10	-4,48	-3,26
PPA2127	Wirtsinteraktionsfaktor	2,05	5,19	0,19	1,96	2,37	-2,49	0,97
PPA2130	Wirtsinteraktionsfaktor	1,88	1,32	0,03	0,03	0,40	-5,01	-5,26
PPA2210	Wirtsinteraktionsfaktor	2,00	1,81	0,39	0,14	0,86	-1,36	-2,79
PPA0737	Antigen	2,06	8,08	0,05	0,31	3,10	-4,25	-1,70
PPA0765	Antigen	1,83	2,06	0,02	0,33	1,04	-5,69	-1,62

Anmerkung: LMW-Skl.: LMW-Skleroglucan, Tau. A: Taurolidin A.

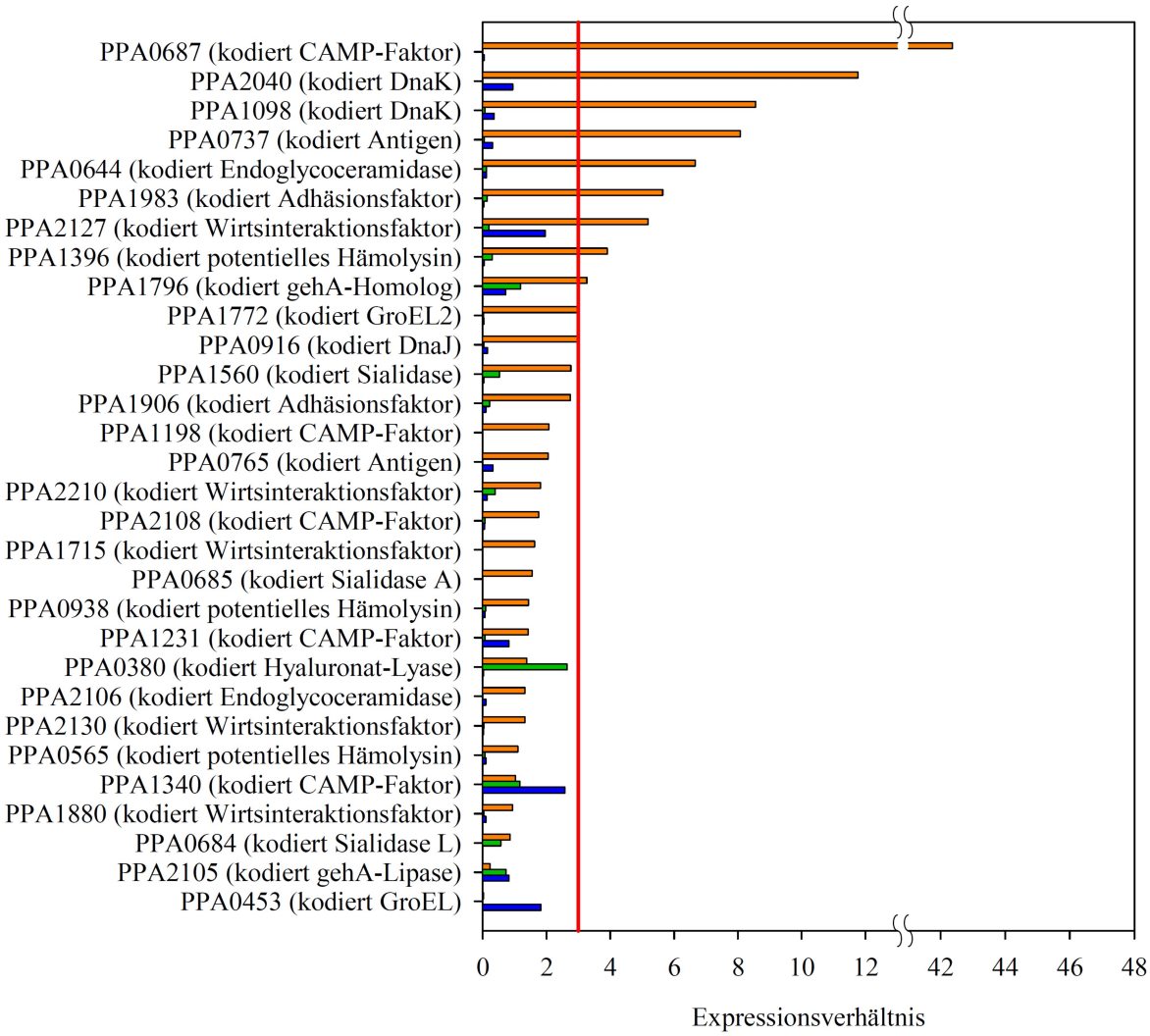

Abbildung 3.17: **Grafische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen.** Wachstum der Kultur in PYG-Komplexmedium mit Zugabe von Lipiden mit dem Gen der 16S rRNA als Referenz. Die rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Erhöhung der Transkription (Expressionsverhältnis ≥ 3) dar. Symbole: ■ Zugabe von Lipiden in das Medium, ■ Zugabe von LMW-Skleroglucan und Lipiden in das Medium, ■ Zugabe von Taurolidin A und Lipiden in das Medium.

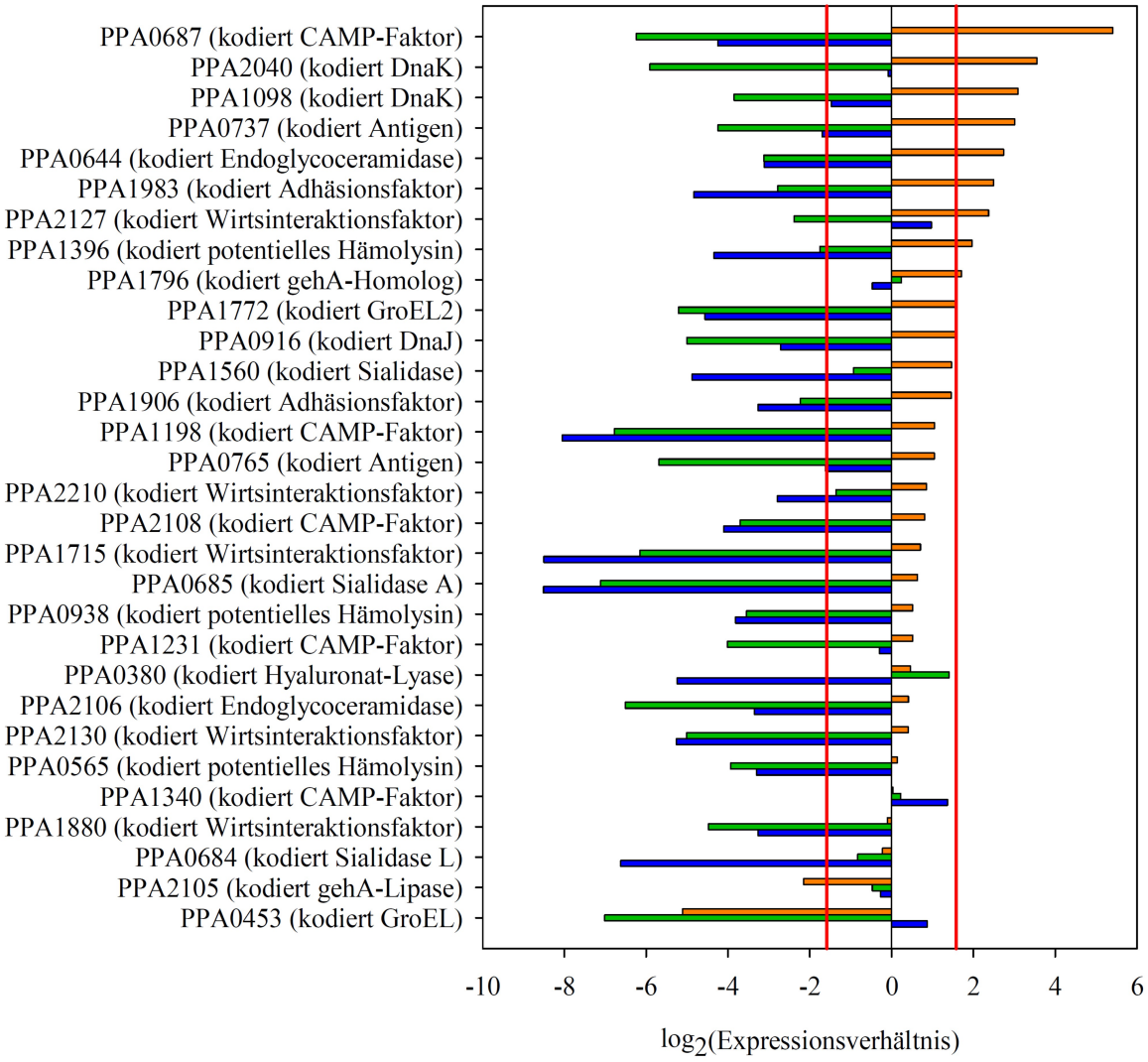

Abbildung 3.18: **Grafische Darstellung der Ergebnisse (logarithmisch) der qRT-PCR-Analysen.** Wachstum der Kultur in PYG-Komplexmedium mit Zugabe von Lipiden mit dem Gen der 16S rRNA als Referenz. Die linke rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Reprimierung eines Gens dar ($\log_2$(Expressionsverhältnis) $\leq$ -1,56), die rechte rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Erhöhung der Transkription dar ($\log_2$(Expressionsverhältnis) $\geq$ 1,56). Symbole: ■ Zugabe von Lipiden in das Medium, ■ Zugabe von LMW-Skleroglucan und Lipiden in das Medium, ■ Zugabe von Taurolidin A und Lipiden in das Medium.

Tabelle 3.12: **Auswertung der qRT-PCR-Analysen mit dem Gen der Gyrase A als Referenz.** Wachstum in PYG-Komplexmedium mit Zugabe Lipiden.

			Expressionsverhältnis			$\log_2$(Expressionsverhältnis)		
Gen	Genprodukt	Effizienz	Lipide	LMW-Skl.	Tau. A	Lipide	LMW-Skl.	Tau. A
PPA0010	Gyrase A	1,83	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
PPA0687	CAMP-Faktor	1,78	46,51	0,06	0,07	5,54	-4,03	-3,85
PPA1198	CAMP-Faktor	2,15	2,28	0,04	0,00	1,19	-4,57	-7,65
PPA1231	CAMP-Faktor	2,04	1,57	0,29	1,08	0,65	-1,80	0,11
PPA1340	CAMP-Faktor	1,80	1,13	5,40	3,43	0,17	2,43	1,78
PPA2108	CAMP-Faktor	1,94	1,93	0,36	0,08	0,95	-1,49	-3,70
PPA0565	potentielles Hämolysin	2,14	1,21	0,30	0,13	0,27	-1,72	-2,89
PPA0938	potentielles Hämolysin	2,07	1,57	0,40	0,09	0,65	-1,34	-3,41
PPA1396	potentielles Hämolysin	2,02	4,29	1,38	0,07	2,10	0,46	-3,93
PPA0453	GroEL	1,85	0,03	0,04	2,42	-4,97	-4,80	1,28
PPA0916	DnaJ	1,80	3,29	0,14	0,20	1,72	-2,80	-2,30
PPA1098	DnaK	2,05	9,39	0,32	0,48	3,23	-1,64	-1,07
PPA1772	GroEL2	1,79	3,30	0,12	0,06	1,72	-3,00	-4,15
PPA2040	DnaK	1,93	12,91	0,08	1,25	3,69	-3,69	0,32
PPA1906	Adhäsionsfaktor	1,95	3,02	0,99	0,14	1,59	-0,02	-2,86
PPA1983	Adhäsionsfaktor	1,93	6,20	0,67	0,05	2,63	-0,57	-4,43
PPA0380	Hyaluronat-Lyase	2,03	1,51	12,25	0,03	0,60	3,61	-4,84
PPA0644	Endoglycoceramidase	2,08	7,32	0,53	0,15	-2,70	-0,91	-2,87
PPA0684	Sialidase L	2,40	0,94	2,60	0,01	-0,09	1,38	-6,22

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.12: Fortsetzung

			Expressionsverhältnis			$\log_2$(Expressionsverhältnis)		
Gen	Genprodukt	Effizienz	Lipide	LMW-Skl.	Tau. A	Lipide	LMW-Skl.	Tau. A
PPA0685	Sialidase A	1,86	1,70	0,03	0,00	0,77	-4,90	-8,11
PPA1560	Sialidase	1,96	3,04	2,44	0,15	1,60	1,28	-4,47
PPA1796	*gehA*-Homolog	2,02	3,59	5,48	0,96	1,84	2,45	-0,07
PPA2105	*gehA*-Lipase	2,14	0,25	3,34	1,10	-2,02	1,74	0,14
PPA2106	Endoglycoceramidase	1,70	1,46	0,05	0,13	0,55	-4,30	-2,95
PPA1715	Wirtsinteraktionsfaktor	1,79	1,79	0,07	0,00	0,84	-3,94	-8,10
PPA1880	Wirtsinteraktionsfaktor	1,95	1,02	0,21	0,14	0,04	-2,27	-2,86
PPA2127	Wirtsinteraktionsfaktor	2,05	5,69	0,89	2,60	2,51	-0,17	1,38
PPA2130	Wirtsinteraktionsfaktor	1,88	1,45	0,14	0,03	0,54	-2,80	-4,86
PPA2210	Wirtsinteraktionsfaktor	2,00	1,99	1,81	0,19	0,99	0,85	-2,39
PPA0737	Antigen	2,06	8,87	0,24	0,41	3,14	-2,03	-1,30
PPA0765	Antigen	1,83	2,26	0,09	0,43	1,18	-3,48	-1,21

Anmerkung: LMW-Skl.: LMW-Skleroglucan, Tau. A: Taurolidin A.

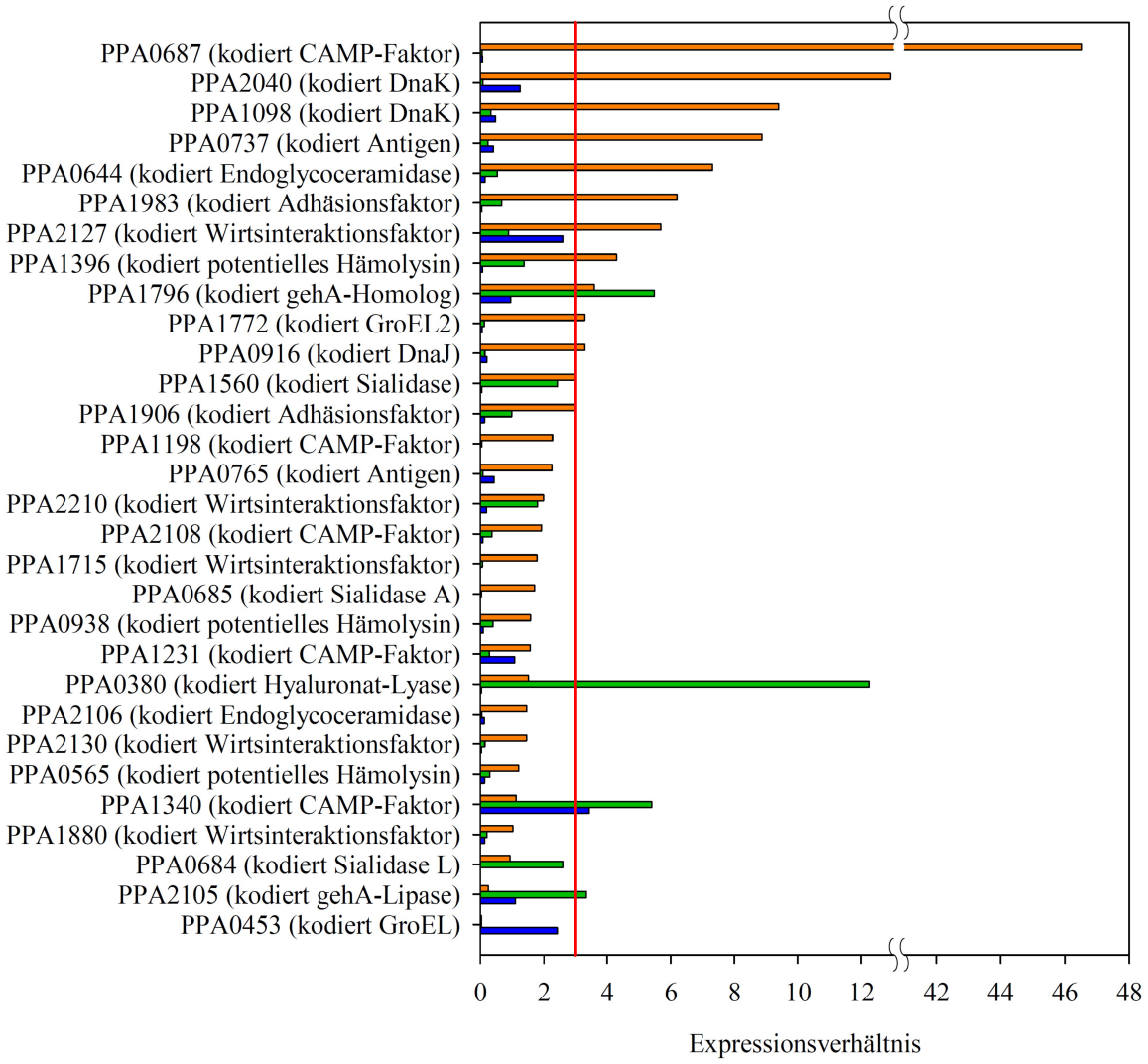

Abbildung 3.19: **Grafische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen.** Wachstum der Kultur in PYG-Komplexmedium mit Zugabe von Lipiden mit dem Gen der Gyrase A als Referenz. Die rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Erhöhung der Transkription (Expressionsverhältnis ≥ 3) dar. Symbole: ■ Zugabe von Lipiden in das Medium, ■ Zugabe von LMW-Skleroglucan und Lipiden in das Medium, ■ Zugabe von Taurolidin A und Lipiden in das Medium.

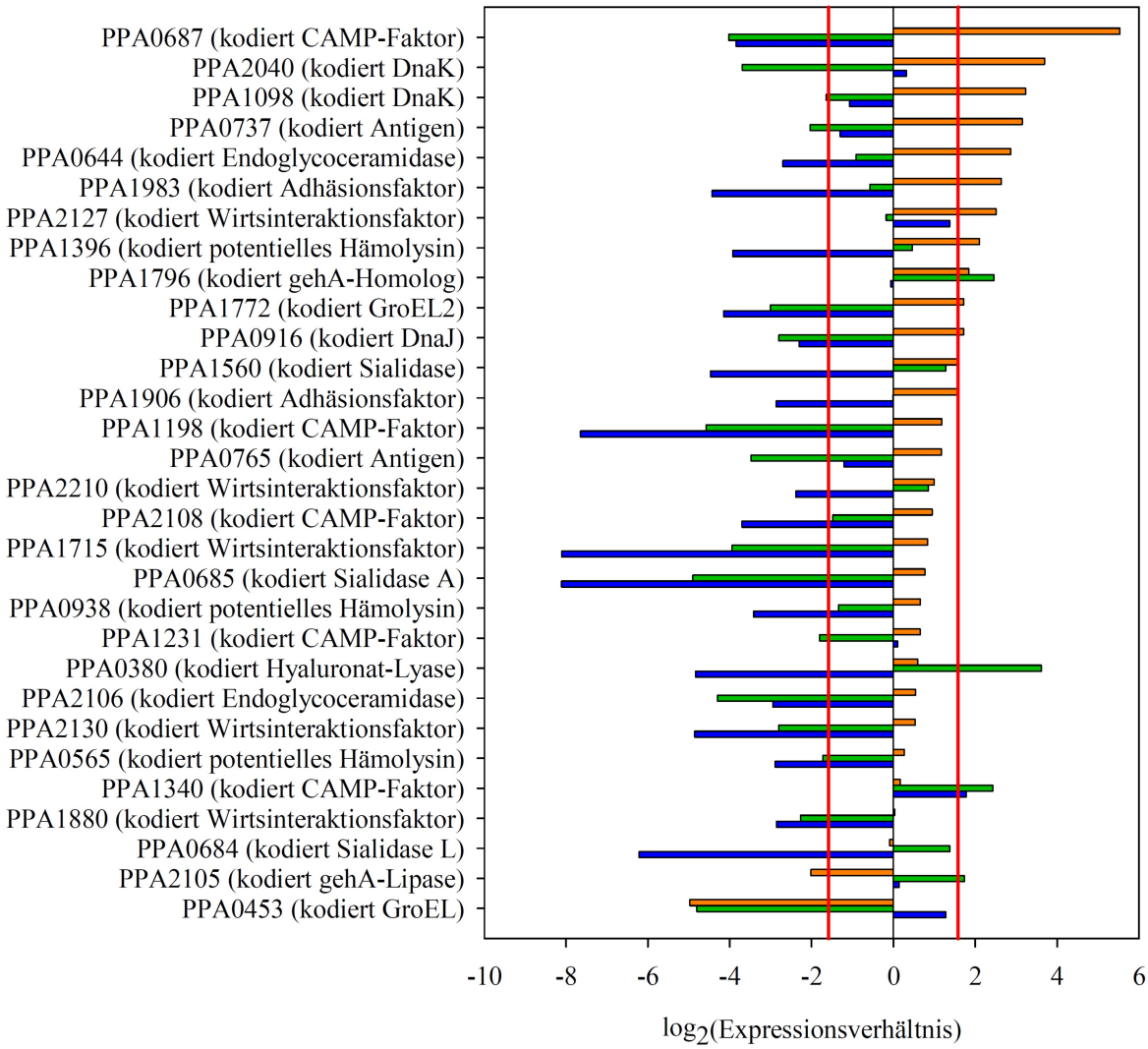

Abbildung 3.20: **Grafische Darstellung der Ergebnisse (logarithmisch) der qRT-PCR-Analysen.** Wachstum der Kultur in PYG-Komplexmedium mit Zugabe von Lipiden mit dem Gen der Gyrase A als Referenz. Die linke rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Reprimierung eines Gens dar ($\log_2$(Expressionsverhältnis) $\leq$ -1,56), die rechte rote, senkrechte Linie stellt die Grenze der Erhöhung der Transkription dar ($\log_2$(Expressionsverhältnis) $\geq$ 1,56). Symbole: ■ Zugabe von Lipiden in das Medium, ■ Zugabe von LMW-Skleroglucan und Lipiden in das Medium, ■ Zugabe von Taurolidin A und Lipiden in das Medium.

3.7 „Northern-/Dot blot“-Analysen

Die quantitativen „Real-Time“-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)-Analysen zeigten, dass das Gen PPA0687 aus *P. acnes*, das für einen CAMP-Faktor kodiert, durch die Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium um mehr als 40fach erhöht war. Dies sollte über „Northern-“ bzw. „Dot blot“-Analysen bestätigt werden. Dazu wurden 10 µg Gesamt-RNA mittels einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese getrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Transfer der RNA war erfolgreich, und es folgte eine Inkubation mit „DIG“ bzw. radioaktiv markierten DNA-Sonden, welche spezifisch an die mRNA des Gens binden. Nach mehrtägiger Exposition des Röntgenfilms konnte mit der „DIG“-Markierung kein Signal erhalten werden. Mit radioaktiv markierten Sonden konnte ebenfalls kein Signal erhalten werden. Die Kontrolle, bei der die DNA-Sonde direkt auf die Nylonmembran gegeben worden war, zeigte ein Signal bei der Hybridisierung mit „DIG“-markierten und radioaktiv markierten Sonde (3.21). Dies zeigte, dass die verwendete Methodik des „Northern-“ bzw. „Dot blots“ funktionierte. Die 40fache Erhöhung der Transkription des Gens PPA0687 unter Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium konnte mittels „Northern-“ bzw. „Dot blot“-Analysen nicht bestätigt werden.

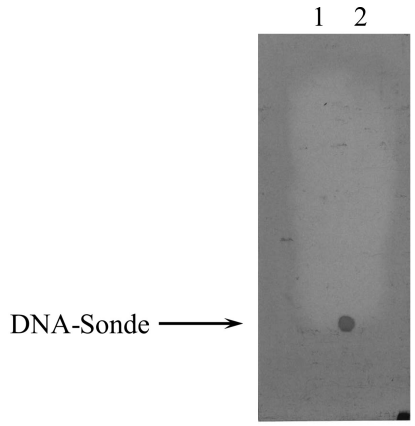

***Abbildung 3.21:* Aufnahme des „Dot blots“.** Aufgetragen wurde die Sonde selbst und RNA, isoliert aus Zellen, die in PGY-Komplexmedium mit Lipiden (Spur 1) und ohne Lipide (Spur 2) angezogen worden waren. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten Sonden.

3.8 Deletionsmutanten in *P. acnes*

In *P. acnes* wurden Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, deletiert. Dazu wurde das Plasmid pK19*mobsacB* verwendet. Dies ist ein *E. coli-C. glutamicum*-Schaukelvektor und wurde aufgrund der phylogenetischen Nähe von *P. acnes* zu *C. glutamicum* verwendet. Mittels des Plasmids pK19*mobsacB* können Deletionsmutanten hergestellt werden. Dabei werden zwei homologe Rekombinationsereignisse genutzt. Bisher ist über die Transformation von Propionibakterien wenig bekannt. In dieser wurden Versuche zur Transformationseffizienz durchgeführt. In weiteren Versuchen wurden die Deletionsmutanten erstellt und charakterisiert. Es wurden die Gene PPA1340 (kodiert für CAMP-Faktor) und PPA1396 (kodiert für Hämolysin) deletiert.

3.8.1 Wachstum von *P. acnes* unter verschiedenen Bedingungen

Die Anzucht der Zellen von *P. acnes*, die für die Transformation durch Elekroporation verwendet wurden, erfolgte in SLB-Medium. Es wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von *P. acnes* in SLB-Medium im Vergleich zu PYG-Komplexmedium untersucht. Das in dieser Arbeit für die Erstellung von Deletionsmutanten verwendete Plasmid pK19*mobsacB* vermittelt eine Kanamycinresistenz. Um zu überprüfen, ob dieses Plasmid für eine Transformation in *P. acnes* geeignet ist, wurden Wachstumsversuche von *P. acnes* in Anwesenheit von 30 µg/ml Kanamycin in PYG-Komplexmedium durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Wachstumsversuche sind in Tabelle 3.13 und Abbildung 3.22 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass *P. acnes* in SLB-Medium dasselbe Wachstumsgeschwindigkeit wie in PYG-Komplexmedium zeigte. Die Wachstumsrate µ in PYG-Komplexmedium betrug 0,168 h^{-1} und in SLB-Medium 0,171 h^{-1}. Die End-OD in PYG-Komplexmedium betrug 2,040 und in SLB-Medium 2,030. Kanamycin in einer Konzentration von 30 µg/ml hat eine hemmende Wirkung auf *P. acnes*. Es war kein Wachstum zu beobachten. Das Plasmid pK19*mobsacB* wurde daher für die weiteren Transformationsversuche verwendet.

3.8.2 Konstruktion der Plasmide

Mittels der „cross-over"-PCR wurden Deletionskonstrukte für verschiedene Gene generiert und in das Plasmid pK19*mobsacB* kloniert (Abbildung 3.23). Die entstandenen Plasmide wurden pRS1340, pR1396 und pS0687 genannt. Der Erfolg der Klonierung

Tabelle 3.13: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium, SLB-Medium und PYG-Komplexmedium mit 30 µg/ml Kanamycin**

Medium	µ[h^{-1}]	End − OD_{600}
PYG-Komplexmedium	0,168	2,040
SLB-Medium	0,171	2,030
PYG-Komplexmedium mit 30 µg/ml Kanamycin	n. g.	

Anmerkung: n. g.: nicht gewachsen.

wurde mit Hilfe einer Standard-PCR überprüft. Dabei wurde das Oligodesoxynukleotidpaar für das Plasmid pK19*mobsacB* (pK19 fw und pK 19 rev) verwendet.
Ein Aliquot der PCR-Ansätze wurde auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 dargestellt. War die Klonierung erfolgreich, so war ein Fragment mit der ungefähren Länge von 1 600 Bp auf einem Gelbild zu erkennen. Ein Fragment von etwa 500 Bp war bei einer nicht erfolgreichen Klonierung zu erkennen. Als Größenstandard (Marker) wurde der „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ verwendet. Es ist zu erkennen, dass die Klonierungen der Deletionskonstrukte in das Plasmid pK19*mobsacB* erfolgreich waren.

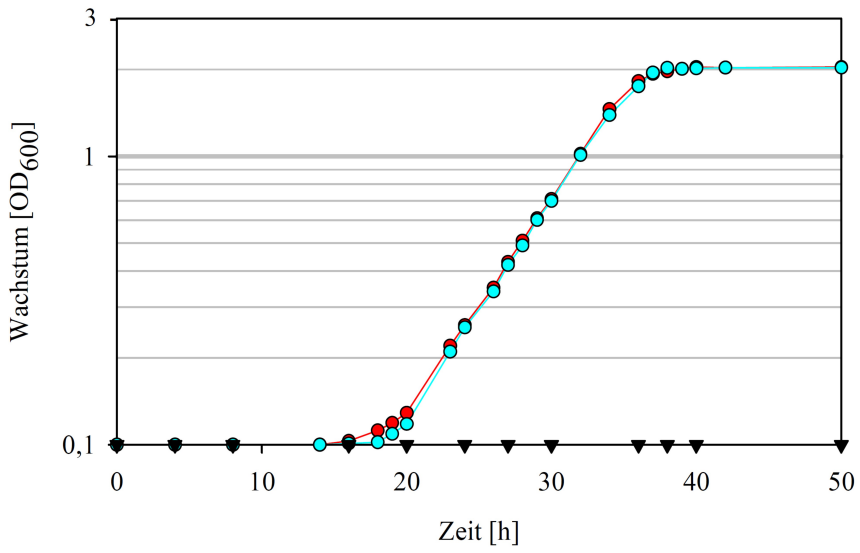

Abbildung 3.22: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium, SLB-Medium und PYG-Komplexmedium mit 30 µg/ml Kanamycin.** Symbole: ● PYG-Komplexmedium, ● SLB-Medium, ▼ PYG-Komplexmedium mit 30 µg Kanamycin.

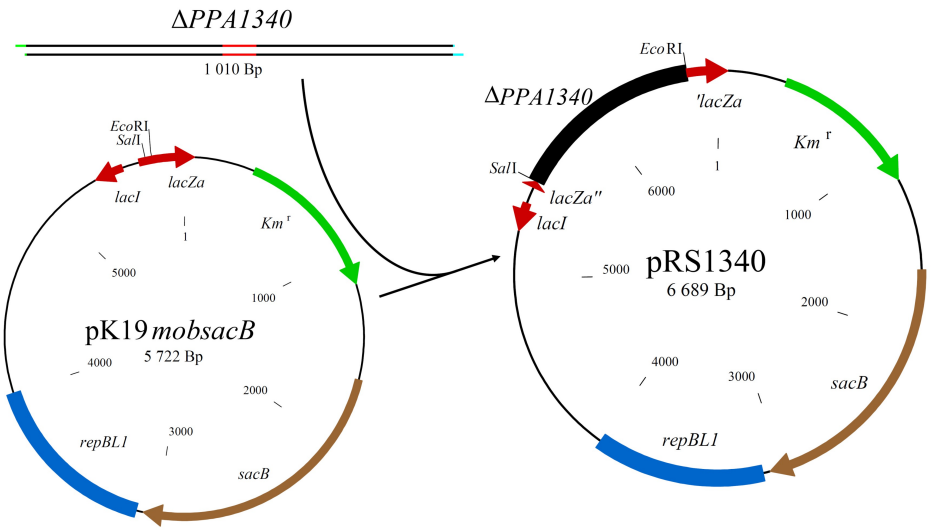

***Abbildung 3.23:* Prinzip der Ligation am Beispiel des Deletionskonstruktes für das Gen PPA1340**. Das entstandene Plasmid wurde pRS1340 genannt.

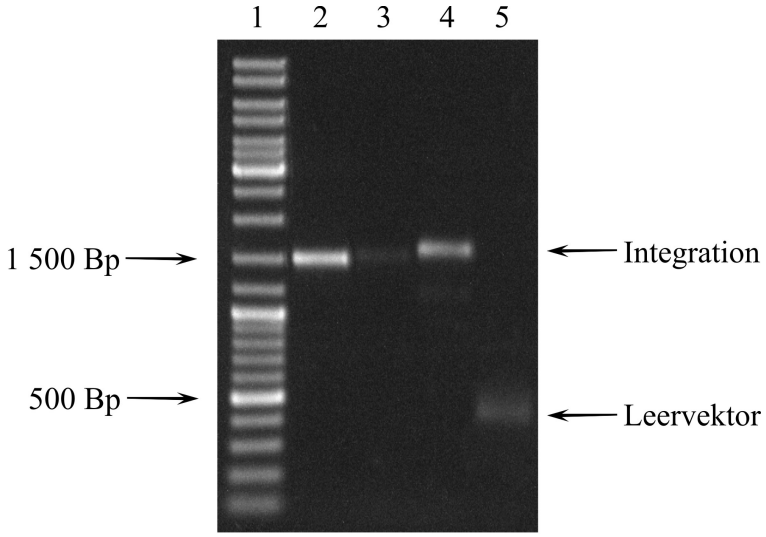

***Abbildung 3.24:* 0,8%iges Agarosegel der PCR zur Überprüfung der Plasmide.** In Spur 1 ist der Größenstandard „Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix“ aufgetragen. PCR-Produkte der Plasmide pRS1340, pR1396, pS0687 und pK19*mobsacB* sind in den Spuren 2, 3, 4 bzw. 5 aufgetragen.

3.8.3 Transformation von *P. acnes*

Zur Überprüfung, bei welchen Bedingungen die Transformationeffizienz von *P. acnes* am höchsten ist, wurden die *P. acnes*-Zellen für die Transformation bei verschiedenen Temperaturen (24 °C, 30 °C und 37 °C) inkubiert. Die Elektrotransformation erfolgte bei verschiedenen Feldstärken (5, 7,5, 10 und 12,5 kV/cm) bei einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Die Transformationseffizienz ist in Abbildung 3.25 und Tabelle 3.14 dargestellt. Dabei war bei allen Temperaturen, bei denen die Zellen inkubiert worden waren, die höchste Transformationseffizienz bei einer Feldstärke von 10 kV/cm zu beobachten. Die höchste Transformationseffizienz war dabei bei den Zellen zu beobachten, die bei 30 °C angezogen worden waren. Ob das Plasmid in das Genom von *P. acnes* erfolgreich integrierte, wurde mittels einer Standard-PCR überprüft. PYG-Komplexmedium, das 30 µg Kanamycin enthielt, wurde mit den gewachsenen Kolonien beimpft. Die chromosomale DNA wurde isoliert und als Vorlage für die Standard-PCR verwendet. Integrierte das Plasmid in das Genom, war eine Bande bei ungefähr 500 Bp zu erkennen. War das Plasmid nicht im Genom vorhanden, war keine Bande zu beobachten. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Die Oligodesoxynukleotide wurden dabei so gewählt, dass ein Oligodesoxynukleotid im Genom und ein Oligodesoxynukleotid im Plasmid bindet.

***Tabelle 3.14:* Transformationseffizienz von *P. acnes* bei verschiedenen Feldstärken.** Das Wachstum der Zellen erfolgte bei verschiedenen Temperaturen.

	Feldstärke F [kV/cm]			
Temperatur	5	7,5	10	12,5
24 °C	21 ± 5	26 ± 7	38 ± 12	16 ± 5
30 °C	39 ± 11	62 ± 14	101 ± 6	72 ± 16
37 °C	36 ± 7	44 ± 9	72 ± 8	37 ± 7

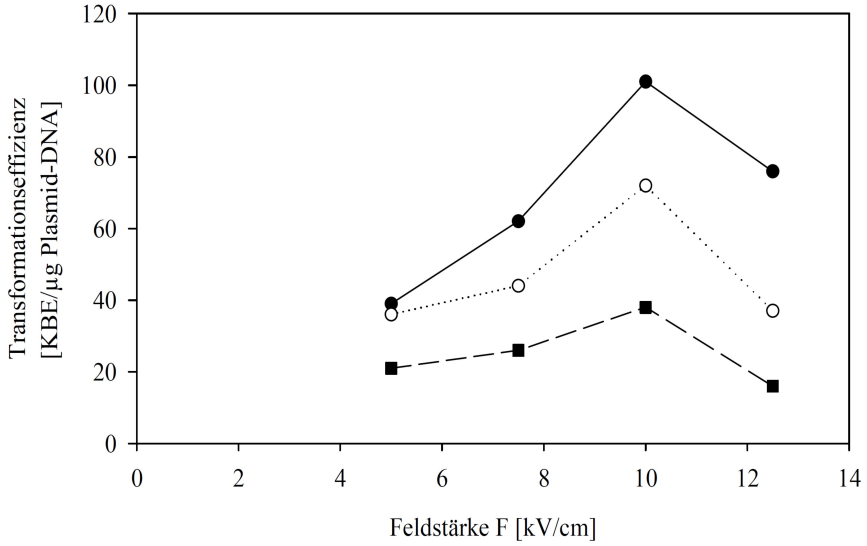

Abbildung 3.25: **Transformationseffizienz von *P. acnes* bei verschiedenen Feldstärken.** Das Wachstum der Zellen erfolgte bei verschiedenen Temperaturen. Symbole: • Wachstum der kompetenten Zellen bei 30 °C, ○ Wachstum der kompetenten Zellen bei 37 °C, ■ Wachstum der kompetenten Zellen bei 24 °C.

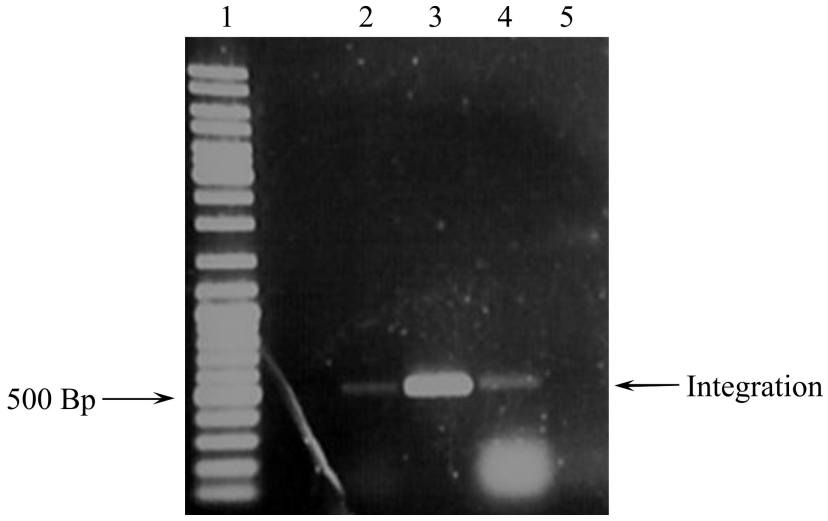

Abbildung 3.26: **0,8%iges Agarosegel der PCR zur Überprüfung der Integration des Plasmids pK19*mobsacB* in *P. acnes*.** In Spur 1 ist der Größenstandard „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ aufgetragen. In den Spuren 2, 3 und 4 ist ein PCR-Produkt der Integration des Plasmids pK19*mobsacB* in *P. acnes*, in Spur 5 ein PCR-Produkt von *P. acnes* aufgetragen.

3.8.4 Charakterisierung von Deletionsmutanten in *P. acnes*

Nach obigen Vorversuchen wurden Gene in *P. acnes* deletiert und die Mutanten anschließend charakterisiert. In diesen Versuchen wurden das Gen PPA1340, das für einen CAMP-Faktor kodiert, und das Gen PPA1396, das für ein Hämolysin kodiert, deletiert. Die Deletion des Gens PPA0687 konnte nicht etabliert werden. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der Deletion auf das Wachstum und die Hämolyseaktivität untersucht. Des Weiteren wurden RT-Analysen durchgeführt, um zu überprüfen, ob Transkripte der deletierten Gene nachweisbar sind.

3.8.4.1 Etablierung der Deletion in *P. acnes*

Nach der erfolgreichen Transformation und Integration des Plasimds in das Genom von *P. acnes* wurde über eine zweite homologe Rekombination die Deletion etabliert. Bei diesem Ereignis, bei dem das Plasmid aus dem Genom entfernt wird, kann der Wildtyp oder die Deletionsmutante entstehen. Dies wurde mittels einer Standard-PCR überprüft. Ein Aliquot der PCR-Ansätze wurde auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Als Größenstandard (Marker) wurde der „Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix“ verwendet. Es ist zu erkennen, dass die Deletion erfolgreich war.
Für die Deletionsmutante *P. acnes* ΔPPA1340 war ein Fragment mit der Länge von 1 339 Bp auf einem Gelbild zu erkennen. Ein Fragment von 1 939 Bp ist bei einer nicht erfolgreichen Deletion zu erkennen. Für die Deletionsmutante *P. acnes* ΔPPA1396 war ein Fragment mit der Länge von 1 150 Bp auf einem Gelbild zu erkennen. Ein Fragment von 610 Bp ist bei einer nicht erfolgreichen Deletion zu erkennen. 35 % der potentiellen Deletionsmutanten waren positiv. Um zu überprüfen, ob es sich um *P. acnes* bei den Deletionsmutanten handelte, wurde eine Sequenzierung des *recA*-Gens durchgeführt. Der Vergleich der Sequenz mit einer Datenbank (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990) (Datenbank der Universität Bielefeld) ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit *P. acnes*.

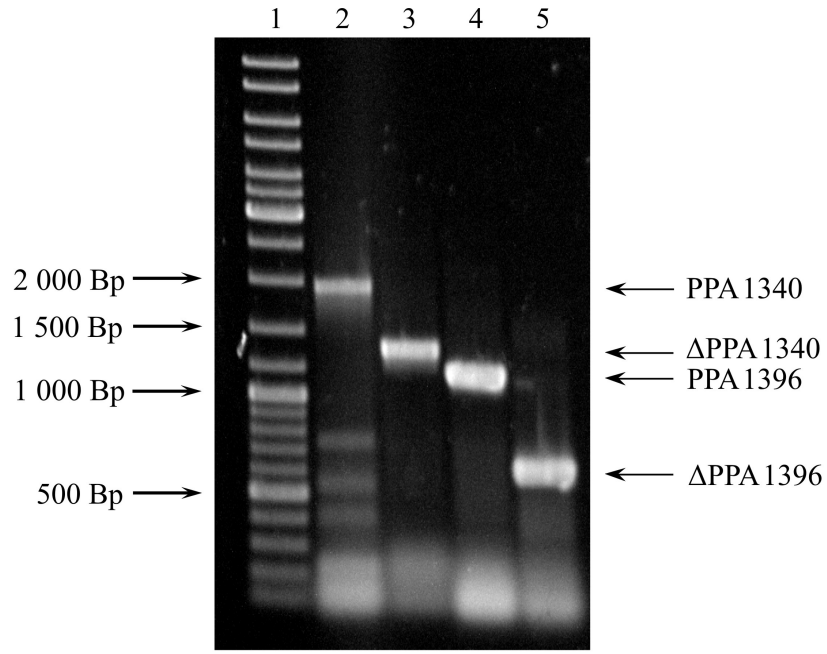

***Abbildung 3.27:* 0,8%iges Agarosegel der PCR zur Überprüfung der Deletion in *P. acnes*.** In Spur 1 ist der Größenstandard „Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix“ aufgetragen. In Spur 2 ist ein PCR-Produkt des Gens PPA1340 von *P. acnes*, in Spur 3 ein PCR-Produkt des Gens PPA1340 von *P. acnes* ΔPPA1340 aufgetragen. In Spur 4 ist ein PCR-Produkt des Gens PPA1396 von *P. acnes*, in Spur 5 ein PCR-Produkt des Gens PPA1396 von *P. acnes* ΔPPA1396 aufgetragen.

3.8.4.2 Wachstum der Deletionsmutanten

Nach der Etablierung der Deletion in *P. acnes* wurde untersucht, ob diese Deletion eine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten hat. Dazu wurde das Wachstum der Mutanten in PYG-Komplexmedium mit und ohne Zugabe von Lipiden im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche sind in Tabelle 8.2 und Abbildung 3.28 dargestellt. Es konnten keine Unterschiede des Wachstumsverhaltens der Mutanten beobachtet werden. Die Wachstumsrate µ in PYG-Komplexmedium ohne Lipide betrug bei *P. acnes* 0,180 h^{-1}, bei *P. acnes* ΔPPA1340 0,176 h^{-1} und bei *P. acnes* ΔPPA1396 0,173 h^{-1}. Die Endmasse war bei allen Stämmen mit 0,9 mg/ml gleich. Die Wachstumsrate µ im PYG-Komplexmedium mit Lipiden betrug bei *P. acnes* 0,211 h^{-1}, bei *P. acnes* ΔPPA1340 0,191 h^{-1} und bei *P. acnes* ΔPPA1396) 0,220 h^{-1}. Die Endmasse war bei allen Stämmen mit 1,0 mg/ml gleich. Unter Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium war eine schnellere Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten. Die Deletion der Gene

PPA1340 (kodiert für CAMP-Faktor) und PPA1396 (kodiert für Hämolysin) hatte keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten.

***Tabelle 3.15:* Wachstum der Deletionsmutanten**. Wachstum von *P. acnes* KPA171202 ΔPPA1340 und *P. acnes* KPA171202 ΔPPA1396 im Vergleich zu *P. acnes* KPA171202 mit und ohne Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium

	ohne Lipide		mit Lipide	
Stamm	μ[h^{-1}]	Endmasse [mg/ml]	μ[h^{-1}]	Endmasse [mg/ml]
P. acnes	0,180	0,903	0,211	1,040
P. acnes ΔPPA1340	0,176	0,903	0,191	1,040
P. acnes ΔPPA1396	0,173	0,902	0,220	1,020

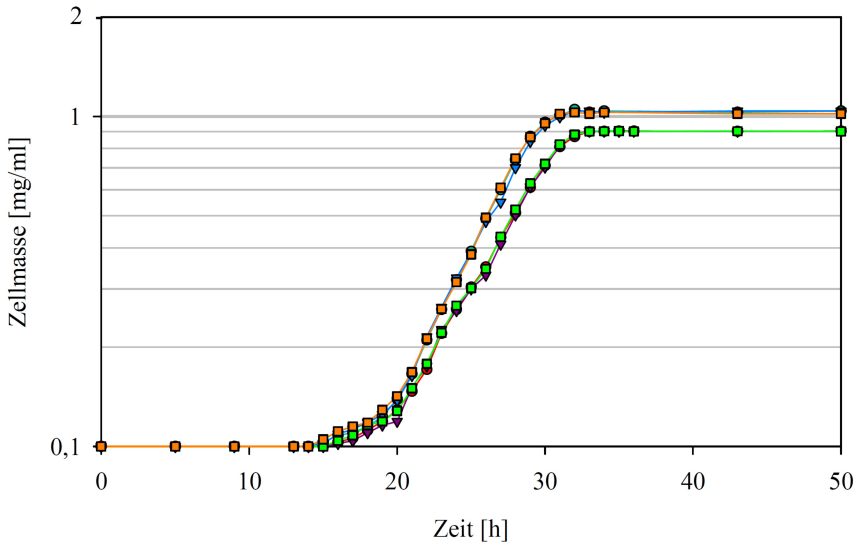

***Abbildung 3.28:* Wachstum der Deletionsmutanten**. Wachstum von *P. acnes* ΔPPA1340 und *P. acnes* ΔPPA1396 im Vergleich zu *P. acnes* mit und ohne Zugabe von Lipiden in das PYG Komplexmedium. Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* plus Lipide, ▼ *P. acnes* ΔPPA1340, ▼ *P. acnes* ΔPPA1340 plus Lipide, ■ *P. acnes* ΔPPA1396, ■ *P. acnes* ΔPPA1396 plus Lipide

3.8.4.3 Transkriptionsstudien der Deletionsmutanten

Bei den Deletionsmutanten sollte kein Transkript des jeweils deletierten Gens vorhanden sein. Die Kulturen der Mutanten wuchsen in PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden. Vorherige RT-PCR-Analysen zeigten, dass Transkripte der beiden zu untersuchenden Gene nachweisbar waren (3.6). Die RNA wurde aus den Stämmen *P. acnes*, *P. acnes* ΔPPA1340 und *P. acnes* ΔPPA1396 isoliert. Es folgte die cDNA-Synthese, die als Matrize für die nachfolgende PCR diente. Es wurden die entsprechenden Oligodesoxynukleotide der RT-PCR-Analysen verwendet. Ein PCR-Ansatz enthielt chromosomale DNA als Matrize und diente als Kontrolle des PCR-Programms. Für die Negativkontrolle wurde Wasser in das Reaktionsgefäß gegeben und anschließend für 10 min auf 95 °C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Abschließend wurde cDNA aus dem Ansatz von PPA1340 verwendet.
Ein Aliquot der PCR-Ansätze wurde auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 dargestellt. War ein Transkript vorhanden, war ein Fragment mit der ungefähren Länge von 500 Bp auf einem Agarose-Gelbild zu erkennen. Als Größenstandard (Marker) wurde der „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ verwendet. Anhand der RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass bei den Mutanten keine Transkripte der deletierten Gene gebildet wurden.

3.8.4.4 Hämolysetest der Deletionsmutanten

Die Gene, die in *P. acnes* erfolgreich deletiert wurden, kodieren für einen CAMP-Faktor (PPA1340) und ein Hämolysin (PPA1396). Beide bewirken eine Auflösung der Erythrozyten (Hämolyse). Die Hämolyseaktivität lässt sich mit Blutagarplatten überprüfen, indem 150 µl einer gewachsenen Flüssigkultur auf diesen Platten ausgestrichen werden. Von *P. acnes* ist bekannt, dass es eine Hämolyseaktivität besitzt. Es wurde untersucht, ob die deletierten Gene derMutanten *P. acnes* ΔPPA1340 und *P. acnes* ΔPPA1396 einen Einfluss auf die Hämolyseaktivität haben. Es war zu beobachten, dass die bisher deletierten Gene keinen Einfluss auf die Hämolyseaktivität hatten.

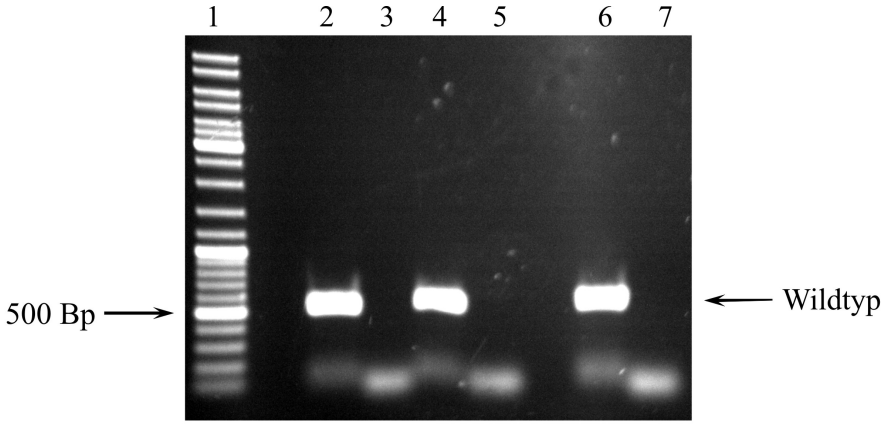

***Abbildung 3.29:* 0,8%iges Agarosegel der RT-PCR zur Überprüfung der Deletion in *P. acnes*.** In Spur 1 ist der Größenstandard „Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix“ aufgetragen. In Spur 2 ist ein RT-PCR-Produkt des Gens PPA1340 von *P. acnes*-Wildtyp, in Spur 3 ein RT-PCR-Produkt des Gens PPA1340 von *P. acnes* ΔPPA1340 aufgetragen. In Spur 4 ist ein RT-PCR-Produkt des Gens PPA1396 von *P. acnes*-Wildtyp, in Spur 5 ein RT-PCR-Produkt des Gens PPA1396 von *P. acnes* ΔPPA1396 aufgetragen. In Spur 6 ist ein PCR-Produkt der Positivkontrolle und in Spur 7 ist ein PCR-Produkt der Nagativkontrolle aufgetragen.

4 Diskussion

P. acnes steht in Verdacht, ursächlich am Krankheitsbild der Akne beteiligt zu sein. Die Kenntnis über die Transkription der Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, ist wichtig für das Verständnis der Virulenz und für eine mögliche neue Therapie. Antibiotika sind aufgrund der Resistenzentwicklungen des Bakteriums immer wirkungsloser, so dass die Suche nach neuen Möglichkeiten einer Therapie in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund gerückt ist (Webster *et al.*, 2002). Das komplett sequenzierte Genom von *P. acnes* eröffnete die Möglichkeit, über Sequenzanalysen potentielle Pathogenitätsfaktoren auszumachen (Brügemann *et al.*, 2004). Es wurden 30 potentielle Pathogenitätsfaktoren gefunden, die sich in sieben Gruppen einteilen lassen: Adhäsionsfaktoren, Antigene, CAMP-Faktoren, Chaperone, Hämolysine, Hautgewebe abbauende Enzyme und Wirtsinteraktionsfaktoren.
Es wurde der Einfluss verschiedener aktiver Inhaltsstoffe auf das Wachstum von *P. acnes* und weiterer Hautkeime (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xersis* und *M. furfur*) untersucht. Es sollten Substanzen gefunden werden, die das Wachstum von *P. acnes*, nicht aber das der weiteren Hautkeime, hemmen.
In weiteren Versuchen wurden die 30 Gene, die bei *P. acnes* für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, auf ihre Transkription hin untersucht (McDowell *et al.*, 2005). Hintergrund war es, Substanzen zu finden, die die Transkription dieser 30 Gene, deren Genprodukte für die Virulenz von *P. acnes* vermutlich verantwortlich sind, hemmen. Ziel war es, die Transkription der Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, zu hemmen, ohne das Wachstum von *P. acnes* zu hemmen.
Der aktuelle Stand der Forschung ist, dass der Einfluss von *P. acnes* auf das menschliche Immunsystem sehr gut untersucht ist. Bei Patienten mit dem Krankheitsbild der Akne werden Faktoren wie Metalloproteinasen 1 und 3, Interleukin-8, Defensine und Granzym B signifikant hochreguliert (Trivedi *et al.*, 2006). Metalloproteinasen sind Endopeptidasen und bauen Kollagen, ein Bestandteil des Bindegewebes, ab (Kalis *et al.*, 2005; Koreck *et al.*, 2003). Interleukin-8 ist an Entzündungsreaktionen beteiligt (Nagy

et al., 2006; Cheng *et al.*, 2002). Defensine dienen der Abwehr von mikrobiellen Erregern. Die Konzentration der Defensine steigt bei Entzündungen deutlich an (Chronnell *et al.*, 2001). Granzym B induziert die Apoptose, also den programmierten Zelltod (Trapani und Smyth, 2002; Heibein *et al.*, 2000). Alle diese Faktoren sind an Entzündungen beteiligt, so dass bekannt ist, dass *P. acnes* Entzündungsreaktionen auslöst. Auch ist bisher die Wirkung verschiedener Antibiotika auf *P. acnes* bekannt (Gollnick, 2003; Webster, 2002; Ross *et al.*, 2000). Das komplexe Krankheitsbild der Akne lässt vielfältige Behandlungsmöglichkeiten zu. In dieser Arbeit stand die Hemmung des Wachstums von *P. acnes* bzw. die Hemmung der Trankription von Genen, deren Genprodukte für potenteille Pathogenitätsfaktoren kodieren, im Vordergrund. Dieser Aspekt ist bisher nicht untersucht worden.

4.1 Akne

4.1.1 Krankheitsbild der Akne

Akne ist in den Industrieländern die häufigste Hauterkrankung überhaupt und beginnt mit der Pubertät. Sie klingt meist mit dem dritten Lebensjahrzehnt von alleine ab. 80 % aller Jugendlichen sind von ihr mehr oder weniger stark betroffen. Jungen sind von der Akne oft stärker betroffen als Mädchen, wobei die Akne bei Frauen bis zum 40. Lebensjahr fortbestehen kann. Besonders betroffene Hautpartien sind Hals, Gesicht, Dekolletee, Oberarme und Rücken (Bojar und Holland, 2004). Pathophysiologisch spielt auch eine genetische Veranlagung eine Rolle. Durch eine vermehrte Produktion an Hormonen, vor allem von Androgenen wie Testosteron, kommt es zu einer Überfunktion der Talgdrüsen, da diese Androgenrezeptoren tragen. Durch die vermehrte Produktion an Talg und der gesteigerten Bildung an Hornzellen kommt es zu einer Verstopfung der Ausführungsgänge der Talgdrüsen und es entsteht ein Pfropf (Koreck *et al.*, 2003). Innerhalb dieses Pfropfes befindet sich das Bakterium *P. acnes*. Die menschliche Haut besteht zu ungefähr 10 % aus Lipiden. Diese Lipide sind vor allem Triglyceride, Fettsäuren, Wachsester, Squalen, Cholesterin und Cholesterinester (Coderch *et al.*, 2003; Motwani *et al.*, 2001). *P. acnes* verwertet die Triglycerid-Bestandteile des Talgs, indem es Triglyceride in freie Fettsäuren und Glycerin spaltet. Das Glycerin dient dem Bakterium als Kohlenstoffquelle. Die freien Fettsäuren lösen eine Immunreaktion aus und sind damit Ursache der bei Akne auftretenden Entzündungen (Brüggemann, 2005; Gollnick *et al.*, 2003). Auch Zell-

wandbestandteile von *P. acnes* sind an der Akne beteiligt. Bei der Immunreaktion bilden Monozyten, Makrophagen und Keratinozyten die Interleukine-1α und -8, den Tumor-Nekrose-Faktor-α und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (Kalis *et al.*, 2005; Koreck *et al.*, 2003; Vowels *et al.*, 1995; Buck und Kelly, 1980). *P. acnes* bewirkt auch eine antigen- und mitogen-abhängige Aktivierung der Lymphozyten, die daraufhin das Interleukin-2 bilden (Magin *et al.*, 2005). All diese Faktoren führen zu einer Entzündung. Beim Abheilen dieser Entzündungen kann es, je nach genetischer Disposition, zu teilweiser sehr schwerer Narbenbildung kommen, was für die betroffenen Personen vor allem psychisch sehr belastend ist (Jappe *et al.*, 2002).

4.1.2 Therapie der Akne

Das komplexe Krankheitsbild der Akne lässt vielfältige Behandlungsmöglichkeiten zu. Die Regulation der erhöhten Aktivität der Talgdrüsen, Verminderung der Verhornung der Haut, Hemmung des Wachstums von *P. acnes* und Behandlung der Entzündung selbst sind Möglichkeiten der Behandlung (Zouboulis *et al.*, 2005). Die derzeitige Therapie besteht aus einer topischen und einer sytemischen Behandlung. Die topische Behandlung kommt bei milder Akne zur Anwendung. Vor allem werden Cremes und Salben die Benzylperoxid, Tretionin, Azelainsäure und Antibiotika wie Erythromcycin, Tetracyclin und Clindamycin enthalten, verwendet (Plewig *et al.*, 2006). Tretionin hemmt die Bildung von Hornzellen, während die anderen Substanzen antibakterielle Wirkung haben. Bei der systemischen Behandlung schwerer Akne kommen orale Antibiotika wie Erythromycin, Tetracyclin, Minocyclin und Doxycyclin zur Anwendung. Auch eine Hormontherapie ist möglich, wobei am häufigsten die Kombination Östrogen plus Cyproteronacetat verwendet wird. In schwersten Fällen wird Isotretionin, ein Vitamin A-Präparat, verabreicht. Dieses ist allerdings fruchtschädigend und findet daher nur in Ausnahmefällen Verwendung (Gollnick, 2003; Jansen und Plewig, 1997).

4.1.3 Hautflora

Die Haut ist eines der größten Organe des Menschen. Sie hat eine Oberfläche von 1,75 m^2 und ein Gewicht von ungefähr 5 kg. Die Haut besteht aus drei Schichten: Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis). Die Haut hat die Funktion, die inneren Organe des Menschen zu schützen und äußere Einflüsse wahrzunehmen. Der pH-Wert der Haut ist leicht sauer (zwischen 4,2 auf der Wange und 6,25 an der

Fußsohle) und die Temperatur der Hautoberfläche schwankt zwischen 29,5 °C an den Fingern und 36,6 °C unter den Achselhöhlen. Sie ist auch die erste Barriere für potentielle Keime und verfügt über Abwehrmechanismen gegenüber Mikroorganismen. Sie ist nährstoffarm, hat einen geringen Feuchtigkeitsgrad, ist leicht sauer und in einigen Arealen ist der Salzgehalt hoch (z. B. unter den Achselhöhlen), so dass Mikroorganismen schlechte Lebensbedingungen antreffen. Auch werden über die Haut antimikrobielle Peptide, Lysozyme und Antikörper (Immunglobuline) freigesetzt. Trotzdem ist die Haut von Mikroorganismen besiedelt, die unter diesen Bedingungen leben können. Ungefähr 200 Gramm Feuchtgewicht beträgt die Masse an Mikroorganismen, die die Haut besiedeln. Sie nutzen die wenigen vorhandenen Nährstoffe, die die Haut bietet (Wilson, 2005). Als Kohlenstoffquelle sind z. B. Glucose, Ribose und Fettsäuren in Schweiß enthalten, die *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* und *Malassezia* spp. nutzen. Auch sind im Schweiß Aminosäuren und Vitamine wie Biotin und Thiamin enthalten. Die auf der Haut lebenden Mikroorganismen bilden auch eine gute Abwehr anderer pathogener Mikroorganismen. *P. acnes* setzt z. B. Proteasen frei, was das Wachstum anderer Propionibakterien und einiger Staphylokokken hemmt. Die Hautkeime setzen auch Stoffe und Substanzen frei, die wiederum von anderen Mikroorganismen genutzt werden. *Staphylococcus* spp. setzen z. B. Lactat frei, das von *Propionibacterium* spp. genutzt wird. Ein Eingreifen in die Zusammensetzung der Hautflora hat somit weitreichende Folgen (Relman, 2002). Deshalb war es in dieser Arbeit von Interesse, am Besten die Transkription der Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren bei *P. acnes* kodieren, zu hemmen, ohne dessen Wachstum zu beeinträchtigen.
In dieser Arbeit wurden weitere Wachstumsversuche mit *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* und *M. furfur* durchgeführt. Alle fünf Mikroorganismen sind überall auf der Haut vorhanden, die Lokalisation in den Ausführungsgängen der Talgdrüsen und Haarfollikelzellen ist aber unterschiedlich (Burkhart et al., 1999). *P. acnes* sitzt in den Ausführungsgängen der Talgdrüsen und Haare. Die weiteren Eigenschaften sind bereits in der Einleitung beschrieben worden.
Staphylokokken sitzen in der Follikelmündung unterhalb der Oberfläche. Sie haben einen (G+C)-Gehalt von 35 %, sind obligat anaerob, unbeweglich und bilden keine Sporen. Sie sind Katalase-positiv, besitzen aber keine Oxidase. Sie verwerten eine Reihe von Zuckern wie Glucose und Ribose und produzieren Säuren, v. a. Lactat (Götz, 2002). *S. aureus* bildet mehrere Toxine, die eine hämolytische Aktivität besitzen. Auch bildet es Adhesine und Proteasen. *S. aureus* bildet einen Biofilm, was es sehr resistent gegen antimikrobielle Stoffe macht. Es kommt hauptsächlich in den oberen Atemwegen vor, und 30 %

der Bevölkerung tragen den Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) (Kuroda *et al.*, 2001; Archer, 1998). *S. epidermidis* bildet das δ-Toxin, das rote Blutkörperchen lysiert. Auch induziert dieses Toxin die Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors-α und der Interleukine-1α und -6. *S. epidermidis* toleriert eine NaCl-Konzentration von 10 % (Otto, 2009; Kocianova *et al.*, 2005; Vuong und Otto, 2002).
C. xerosis sitzt an der Follikelmündung an der Oberfläche. Es hat einen (G+C)-Gehalt von ungefähr 60 %, ist unbeweglich, Katalase-positiv und obligat anaerob. Es ist auch in der Lage, unter salzhaltigen Bedingungen zu wachsen. Es toleriert eine NaCl-Konzentration von 6,5 %. Es nutzt Glucose und Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle. *C. xerosis* adheriert auch gut an menschliche epidermale Keratinozyten (Funke *et al.*, 1997).
M. furfur ist ein einzelliger Pilz und obligat anaerob. Er sitzt nahe der Follikelmündung an der Oberfläche. Er vermehrt sich durch Knospung und besitzt eine dicke Zellwand, die Mannoproteine, Lipide und Chitin enthält. Die Anzucht wird als schwierig bezeichnet, gelang in dieser Arbeit aber sehr gut. *M. furfur* kann keine Zucker verwerten, nutzt aber Lipide als Kohlenstoff- und Energiequelle. Über die Salztoleranz ist nichts bekannt (Ashbee *et al.*, 2002; Sugita *et al.*, 2001).
Alle diese Hautkeime sind normale Hautbewohner. Sie sitzen in den Ausführungsgängen der Talgdrüsen und Haarfollikelzellen und nutzen dabei die im Talg enthaltenen Lipide und Fettsäuren und können aufgrund ihres pathogenen Potentials eine Entzündungsreaktion, das Krankheitsbild der Akne, auslösen. Bei immunsupprimierten Menschen können diese Keime aber auch schwerwiegende Krankheiten wie Lungenentzündung oder Sepsis auslösen.

4.2 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen des *rrs*-Gens und des *recA*-Gens erfolgten, um Kontaminationen der verwendeten Mikroorganismen auszuschließen. Das *rrs*-Gen (ribosomal RNA small) kodiert für den RNA-Anteil der kleinen Untereinheit der Ribosomen (16S rRNA) (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001; Weisburg *et al.*, 1991). Es ist in jedem Bakterium vorhanden und besitzt variable und konservierte Bereiche, so dass sich Bakterien sehr gut voneinander unterscheiden lassen. Allerdings sind Unterscheidungen der Subspezies anhand der Sequenz des *rrs*-Gens schwierig. Um auch Subspezies unterscheiden zu können, wurde das *recA*-Gen, das für die Rekombinase A kodiert, sequenziert.

Von nicht allen in dieser Arbeit verwendeten Stämmen waren Daten über die Sequenzen des *rrs*- bzw. *rec* A-Gens verfügbar. In dieser Arbeit wurde die Datenbak der Universität Bielefeld verwendet (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, Basic Local Alignment Search Tool, Altschul*et al.*, 1990). Von *P. acnes* und *S. typhimurium* waren Daten verfügbar. Mit den erhaltenen Sequenzen gab es eine 100%ige Übereinstimmung mit der Datenbank. Von *S. aureus* und *S. epidermidis* sind von den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen keine Daten verfügbar. Es wurden die Sequenzen des *rrs*- bzw. *rec* A-Gens mit Subspezies dieser Stämme verglichen. Es gab dabei eine 99%ige Übereinstimmung. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Stämmen um *S. aureus* und *S. epidermidis* handelte. Von *C. xerosis* und *M. furfur* sind keine Daten verfügbar, auch nicht über Subspezies. Die Sequenzierung von *C. xerosis* ergab eine 97%ige Übereinstimmung zu *Corynebacterium*. Bei *M. furfur* erfolgte aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten keine Sequenzierung. Da es sich bei *M. furfur* um eine Pilz handelt, müsste hier die Sequenzierung der 18S rRNA erfolgen.

4.3 Wachstumsversuche

In Wachstumsversuchen wurde der Einfluss verschiedener Substanzen aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio auf das Wachstum von *P. acnes* untersucht. Dazu wurden Substanzen jeweils in einer Konzentration von 0,001 %, 0,01 %, 0,1 % und 1 % dem Medium zugegeben. Die Wirkung der Substanzen auf *P. acnes* war bisher unbekannt. Einige dieser Substanzen sind in Kosmetika enthalten und von einigen ist bekannt, dass sie antibakteriell wirken. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss einiger Substanzen auf das Wachstum weiterer Hautkeime untersucht. Dabei wurden die Substanzen in einer Konzentration von 0,1 % dem Medium zugegeben. Ziel war es, eine Substanz zu finden, die das Wachstum von *P. acnes*, nicht aber der weiteren Hautkeime hemmt.
Die Substanzen wurden dem Medium zu Beginn der Wachstumsversuche zugegeben. Lipide wurden in diesen Versuchen dem Medium nicht zugegeben. Im Folgenden sind die verwendeten Substanzen mit ihren Eigenschaften beschrieben.

4.3.1 Eigenschaften der Substanzen

Aloe arborescens-Extrakt enthält pflanzliche Steroide (Sterole, Phytosterole), Vitamine, vor allem das Vitamin B_{12}, Mineralien und auch vom Menschen benötigte, essentielle Aminosäuren. Es hemmt Entzündungen, stärkt das Immunsystem und hilft gegen Allergien (Lissoni *et al.*, 2009).

Von der Arjunolic-Säure war bisher lediglich bekannt, dass es das Wachstum von *Cryptococcus neoformans*, einem hefeähnlichen Pilz, hemmt. Sie ist ein Triterpen, besitzt eine antioxidative Wirkung und wurde aus der Pflanze *Leandra chaetodon* isoliert.
Das Cistus-Extrakt wird aus der Zistrose (*Cistus incanus ssp. tauris*) gewonnen. Es kommt bei Hauterkrankungen wie Akne, bei Neurodermitis und bei Schleimhauterkrankungen zur Anwendung. Die Wirkung ist wahrscheinlich auf die im Cistus-Extrakt enthaltenen Polyphenole zurückzuführen, die bakterizid wirken (Guzman *et al.*, 2009).
Die Ether-Guanidinium-Verbindung enthält Ether und Guanidin. Ether entsteht durch eine Kondensationsreaktion zweier Alkohole und ist vor allem als Lösungs- und Narkosemittel bekannt. Guanidin ist ein wichtiger Bestandteil für Kreatin, Kreatinin und Arginin.
Formamidopropylbetain enthält die zwei Bestandteile Formamid und Betain. Formamid wird als Lösungsmittel, Reduktionsmittel und bei der Synthese von Vitaminen eingesetzt. Betain (Trimethylammoniumacetat) ist ein Abbauprodukt des Cholins und kommt in vielen Pflanzen vor. In der Medizin wird es häufig gegen Arteriosklerose und Bluthochdruck eingesetzt (Shi *et al.*, 2010).
Das Galanga-Extrakt ist ein Zimtsäurederivat und absorbiert UV-Strahlung.
Das *Garcinia mangostana*-Extrakt enthält unter anderem einige für den Menschen essentielle Aminosäuren und Xanthon, das eine antioxidative Wirkung besitzt (Watanapokasin *et al.*, 2009; Weecharangsan *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2006).
Glycerin-modifizierte Hyaluronsäure enthält Hyaluronsäure mit einem Glycerinrest. Die Eigenschaften der Hyaluronsäure sind unten beschrieben. Glycerin (Propan-1,2,3-triol) ist ein dreiwertiger Alkohol und wird in der Kosmetik als Feuchtigkeitsspender verwendet. Glycerin dient aber auch als Frostschutzmittel und Weichmacher. In der Medizin wird Glycerin zur Behandlung von Hirnödemen eingesetzt.
4-Guanidinobuttersäure enthält Buttersäure und Guanidin, einen wichtigen Bestandteil von Kreatin, Kreatinin und Arginin. Buttersäure wird von der menschlichen Haut schnell resorbiert und führt zu schweren Verätzungen.
Hyaluronsäure ist ein Glykosaminglykan und beim Menschen ein wichtiger Bestandteil des Bindegewebes und der Gelenkflüssigkeit. In der Medizin wird Hyaluronsäure auch als Gelenkflüssigkeitsersatz verwendet, während es in der Kosmetik zur Straffung der Haut eingesetzt wird (John und Price, 2009).
LMW-Skleroglucan ist ein wasserlösliches Biopolymer und findet vor allem in der Kosmetik Verwendung.

Malonylamidopropylbetain enthält die zwei Bestandteile Malonylamid und Betain. Die Eigenschaften von Betain sind oben beschrieben.
Milchsäure-Octylamid wird in der Kosmetik als Pflegezusatz verwendet.
Octyllactamid enthält Lactamid, welches vor allem als Pflegezusatz verwendet wird.
P813 (Polyglycerol-3-caprylat) ist ein pflanzlicher Bestandteil und hemmt Bakterien, die Schweiß zu übel riechenden Produkten abbauen, und ist deshalb Bestandteil vieler Deodorants. Caprylat ist die Carbonsäure, eine gesättigte Fettsäure, die zur Herstellung antiseptischer Arzneimittel dient.
PA19-Alkyletherguanidiniumlactat enthält Ether, Guanidin und Lactat. Ether und Guanidin sind oben beschrieben. Lactat kann von *P. acnes* verstoffwechselt werden, inwieweit aber Lactat von PA19-Alkyletherguanidiniumlactat von *P. acnes* abgespalten werden kann, ist unbekannt.
1,2-Pentandiolmonocaprylat enthält Caprylat, eine kurzkettige, gesättigte Fettsäure, die im menschlichen Darmtrakt von der normalen Bakterienflora gebildet wird.
C2-Phytosphingosin-Ceramid ist ein Lipid und es ist bekannt, dass es Entzündungen hemmt (Pavicic *et al.*, 2007). Phytosphingosin ist ein normaler Bestandteil in der Hornschicht der Haut. An Fettsäuren gebunden liegt Phytosphingosin dort als Ceramid vor (Dunlap et al., 2010).
Policosanol ist eine Mischung von acht aliphatischen Alkoholen (Octacosanol, Triacontanol, Hexacosanol, Tetracosanol, Heptacosanol, Nonacosanol, Dotriacontanol und Tetratriacontanol) und wird aus Zuckerrohr gewonnen. In einzelnen Studien zeigte es eine senkende Wirkung der Blutfettwerte (hemmt Cholesterolsynthese) und hemmte auch die Thrombozytenaggregation. Policosanol ist als Wirkstoff für Medikamente in Deutschland nicht zugelassen (Berthold *et al.*, 2006; Gouni-Berthold *et al.*, 2001).
Polyglutaminsäure, Pyroglutaminsäureoctylamid und Pyroglutaminsäureoctylester enthalten Glutaminsäure. Diese wird vor allem als Geschmacksverstärker in Nahrungsmitteln verwendet. Sie ist jedoch auch ein Neurotransmitter im Zentralnervensystem des Menschen (Geha *et al.*, 2000). Glutaminsäure ist wichtig für den Zellstoffwechsel und für die Bildung von Aminosäuren notwendig (Wirths *et al.*, 2010; Janke *et al.*, 2008).
Salicylsäure wird zur Herstellung der Acetylsalicylsäure verwendet, die beim Menschen schmerz- und entzündungshemmend wirkt. Salicylsäure wirkt auch antibakteriell und wurde früher als Konservierungsmittel verwendet, was heute aber verboten ist.
Bei Taurolidin ist bekannt, dass es ein breites Spektrum von Bakterien und Pilzen abtötet. Es wird vor allem zur Desinfektion von Kathetern eingesetzt (Simon *et al.*, 2008).
Turmeric-Öl wird bereits in der Medizin als antiseptisches und antibakterielles Mittel

eingesetzt (Jurenka, 2009). Es wird aus der Pflanze *Curcuma longa* isoliert und auch als Nahrungszusatz (E100) verwendet.

4.3.2 Wachstum von *P. acnes*

Die Wachstumsversuche im Allgemeinen zeigten, dass das Wachstumsverhalten von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit und ohne Zugabe von Lipiden dasselbe war. Lipide wurden dem medium zugegeben, um Bedingungen, wie sie auf der Haut vorkommen, zu imitieren. Durch die Bildung von Propionsäure sank der pH-Wert des Mediums im Verlauf des Wachstums. Dies konnte schon in einer früheren Arbeit gezeigt werden (Rimpf, 2006).
Der Einfluss aktiver Inhaltsstoffe aus dem Evonik-Goldschmidt-Portfolio auf das Wachstum von *P. acnes* wurde untersucht, um Substanzen zu finden, die das Wachstum hemmen. Die Substanzen wurden dabei in einer Konzentration von 0,001 %, 0,01 %, 0,1 % und 1 % eingesetzt. Dem Medium wurden dabei keine Lipide zugegeben. Es wurde jeweils die End-OD_{600} und die Wachstumsrate μ bestimmt. Von einigen Substanzen, die untersucht worden waren, war die antimikrobielle Wirkung bekannt. Jedoch war nicht bekannt, in welcher Konzentration eine solche Substanz antimikrobiell wirkt oder ob diese überhaupt einen Einfluss auf das Wachstum von *P. acnes* hat. Die Ergebnisse lassen sich daher auch nicht in bisher bekannte Untersuchungen einordnen. Es wurden Substanzen gefunden, die ab einer bestimmten Konzentration das Wachstum hemmten. Bei PA19-Alkyletherguanidiniumlactat und der Ether-Guanidium-Verbindung trat eine Hemmung des Wachstums ab einer Konzentration von 0,000 1 % auf, bei Galanga-Extrakt, C2-Phytosphingosin-Ceramid und Salicylsäure ab einer Konzentration von 0,001 %. *Garcinia mangostana*-Extrakt und Taurolidin B hemmten das Wachstum von *P. acnes* ab einer Konzentration von 0,01 %. Ab 0,1 % hemmten Octyllactamid, Taurolidin und Turmeric-Öl das Wachstum von *P. acnes*. Arjunolic-Säure, Cistus-Extrakt und Taurolidin A hemmten ab einer Konzentration von 1 % das Wachstum von *P. acnes*. Bei niedermolekularer Hyaluronsäure und LMW-Skleroglucan war bei 1 % ein deutlicher Einfluss, jedoch keine vollständige Hemmung des Wachstums von *P. acnes* zu beobachten. Die weiteren getesteten Substanzen hatten keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. acnes*. Von Salicylsäure, Taurolidin und Turmeric-Öl ist bekannt, dass sie eine antimikrobielle Wirkung haben. Dies war in diesen Versuchen auch zu beobachten. Bei diesen Substanzen war ab einer bestimmten Konzentration kein Wachstum mehr zu beobachten. Ein Teil dieser Ergebnisse war bereits aus einer früheren Arbeit bekannt (Straub, 2009).

4.3.3 Wachstum weiterer Hautkeime

Ausgewählte Substanzen aus den obigen Wachstumsversuchen wurden verwendet, um deren Einfluss auf das Wachstum der in dieser Arbeit verwendeten, weiteren Hautkeime (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* und *M. furfur*) zu untersuchen. Die Auswahl der Substanzen folgte nach Absprache mit der Evonik GmbH und sie wurden dem Medium in einer Konzentration von 0,1 % zugegeben. Das Medium enthielt keine Lipide. Eine Versuchsreihe enthielt keine Substanzen. Dabei wurde die maximale OD bzw. Zellmasse bestimmt. Dies diente als Referenz, ob eine Substanz hemmte oder nicht. Eine Substanz wurde als hemmend eingestuft, wenn maximal nur zwei Verdopplungen erreicht wurden. Waren mehr als zwei Verdopplungen zu beobachten, so mussten noch mindestens 10 % der maximalen OD bzw. Zellmasse erreicht werden, damit eine Substanz als nicht hemmend eingestuft wurde. Bei den Versuchen war zu erkennen, dass *Galanga*-Extrakt das Wachstum aller in dieser Arbeit untersuchten Hautkeime hemmte, nicht aber von *P. acnes*. Von diesem Extrakt wurde in weiteren Versuchen die minimale Hemmkonzentration und das mutegene Potential untersucht. Taurolidin A hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Hautkeime. *Garcinia mangostana*-Extrakt und Tarolidin B hemmten das Wachstum von *P. acnes* und der weiteren Hautkeime.

4.4 Minimale Hemmkonzentration

In diesen Versuchen wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) des *Garcinia mangostana*-Extraktes bestimmt. Dazu wurden Antibiotikaplättchen mit verschiedenen Konzentrationen (0 bis 2 mg) auf Agarplatten gegeben. Auf dieser Platte wurde zuvor eine Kultur von *P. acnes* ausplattiert. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass die Substanz in das Medium diffundiert und somit das Wachstum der ausplattierten Kultur hemmt. Um das Plättchen entstand abhängig von der Konzentration der Substanz ein kreisförmiger, klarer Hemmhof, der sich vom trüben Bewuchs der restlichen Agarplatte abhob (Smith *et al.*, 1996). Im Hemmhof hat keine Vermehrung von *P. acnes* stattgefunden. Ab einer Konzentration von 0,005 mg pro Plättchen des *Garcinia mangostana*-Extraktes war ein Hemmhof zu erkennen. Dies war somit die MHK des *Garcinia mangostana*-Extraktes.

4.5 AMES-Test

Der Ames-Test wird zur Abschätzung der Mutagenität einer chemischen Substanz verwendet (Ames *et al.*, 1975). Da Genmutationen in Bakterien häufig vorkommen und Bakterien sich schnell vermehren, woraus eine kurze Versuchsdauer resultiert, werden sie für einen solchen Test verwendet. Der Nachteil ist aber, dass viele für die metabolische Aktivierung erforderlichen Enzymsysteme der Säuger (z. B. Cytochrom P450) in *Salmonella typhimurium* fehlen. Dieses Problem wird durch ein extrazelluläres, metabolisches Aktivierungssystem (Leberextrakt) kompensiert. Da viele Mutagene nicht direkt mit der DNA reagieren, sondern in Form reaktiver Metabolite, erfolgt eine Simulation des säugerartigen Metabolismus durch den sogenannten „S9-Mix“ (Rattenleberextrakt). Die Teststämme sind abgeleitet vom Wildtypstamm LT2 von *Salmonella typhimurium*, dem Erreger des Mäusetyphus. Diese besitzen eine Histidin-Auxotrophie (his^-), d. h. sie sind unfähig zur Histidinsynthese und können sich auf einem Histidin-freien Minimalagar nicht vermehren. Die Ursache dieser Auxotrophie liegt in einer Mutation in einem der Gene, die die Enzyme der Histidinbiosynthese kodieren. Diese Mutation kann, spontan oder durch äußere Einflüsse, rückmutieren, d. h. durch eine weitere Mutation rückgängig gemacht werden (Reversion). Diese Revertanten-Zellen synthetisieren dann Histidin und vermehren sich deshalb auf Minimalagar. Auf diesem Minimalagar erfolgt also eine Selektion der Revertanten. Bestimmte his^--Stämme werden durch einige Mutagene sehr häufig, durch andere dagegen seltener revertiert. Dies ist Ausdruck der Spezifität von Mutagenen, denn je nach Wirkmechanismus lösen sie bestimmte Basenpaarsubstitutionen oder „frameshift“-Mutationen aus. Diese bevorzugt induzierten Mutationen führen je nach Stamm, d. h. je nach der vorgegebenen his^--Mutation, zu mehr oder weniger häufigen Reversionen.
In diesem Versuch wurde nach dem Standardprotokoll der OECD verfahren (OECD-Richtlinie, 1997). Es wurde der Teststamm *S. typhimurium* TA100 verwendet. Dieser hat eine Histidinmutation (hisG46). Dies ist eine „missense“-Mutation, bei der eine Basenpaarsubstitution mit CCC anstelle von CTC (Prolin statt Leucin) erfolgte. Es kann eine Reversion durch alkylierende Mutagene und UV-Licht, die Basenpaarsubstitutionen induzieren, erfolgen. Außerdem hat *S. typhimurium* TA100 eine *uvrB*-Mutation, die eine Erhöhung der Mutagen-Empfindlichkeit bewirkt, da die Nukleotid-Exzisionsreparatur, welche verschiedenartige DNA-Schäden fehlerfrei repariert, ausgeschaltet ist. Daraus resultiert eine vermehrte Mutagenese. Darüberhinaus hat der Teststamm eine *rfa*-Mutation, die eine Erhöhung der Mutagen-Empfindlichkeit bewirkt, da

eine Zellwand mit defekter Lipopolysaccharid-Schicht gebildet wird und so zu einer erhöhten Mutagenexposition der DNA führt, was ebenfalls zu einer Wirkungsverstärkung des Mutagens führt. Außerdem besitzt *S. typhimurium* TA100 das Plasmid pKM101. Dieses Plasmid führt zu einer Erhöhung der Mutagen-Empfindlichkeit durch die Vermittlung der Fähigkeit, DNA-Schäden in fehlerhafter Weise zu verarbeiten. Dies hat eine Schadenstolerierung bei der DNA-Synthese zur Folge und führt zu häufigen Basenfehlpaarungen.
Die Anzahl der Revertanten gibt an, wie stark die Mutagenität einer Substanz ist. Da *S. typhimurium* TA100 his^- ist, konnte dieser Stamm nur wachsen, wenn eine Rückmutation (Reversion) erfolgte und dies liess einen Rückschluß auf die Mutagenität der untersuchten Substanz zu. Die theoretische spontane Mutationsrate liegt bei ungefähr zehn Revertanten pro einer Million Zellen. Daher wurden zuerst Versuche ohne zu untersuchende Substanz im Ansatz durchgeführt.
Galanga-Extrakt war die einzige getestete Substanz, die in einer Konzentration von 0,1 % das Wachstum von *P. acnes*, nicht aber der weiteren getesteten Hautkeime hemmt. Mittels AMES-Test wurde untersucht, ob das Galanga-Extrakt eine mutagene Wirkung besitzt. In diesen Versuchen war nicht zu erkennen, dass das Galanga-Extrakt in einer Konzentration zwischen 0 und 50 mg pro Platte ein mutagenes Potential besitzt. Die Anzahl der Spontanrevertanten betrug 28 pro Platte. Ab einer Anzahl von 42 Revertanten pro Platte (1,5fache Anzahl der Spontanrevertanten) wäre Galanga-Extrakt als mutagen zu betrachten. Die Grenze der Mutagenität wurde aber in diesen Versuchen nie überschritten. Der Test an sich funktionierte, da Substanzen, die als mutagen eingestuft werden, als solche auch zu erkennen waren. Dies war beim Cistus- und *Garcinia mangostana*-Extrakt der Fall (persönliche Mitteilung der Evonik GmbH). Bei höheren Konzentrationen dieser beiden Substanzen war eine Abnahme der Anzahl der Revertanten zu beobachten. Dies war darauf zurückzuführen, dass in diesen Konzentrationen die Substanz nicht mehr mutagen, sondern toxisch für die Zellen war. Auch Benz(a)pyren, das hinlänglich als sehr mutagen bekannt ist, konnte als mutagene Substanz in diesen Versuchen eingestuft werden. Benz(a)pyren diente als Positivkontrolle.
Die Grenzen des AMES-Tests liegen darin, dass nicht-gentoxische Substanzen nicht erkannt werden. Es werden auch nur Genmutationen, nicht aber Chromosomen- oder Genommutationen erkannt. Auch falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse werden oft erhalten. Somit ist eine mutagene bzw. nicht-mutagene Wirkung einer Substanz nicht mit letzter Sicherheit gegeben. Auch ist die Wirkung einer Substanz vom AMES-Test auf den Menschen nicht pauschal übertragbar. Dazu bedarf es weiterer Tests (Kuenemann-

Migeot *et al.*, 1997). Der AMES-Test gibt aber eine erste, schnelle Aussage über das potentielle mutagene Potential einer Substanz.

4.6 Transkriptionsanalysen potentieller Pathogenitätsfaktoren

In diesen Versuchen wurde untersucht, unter welchen Bedingungen Transkripte der 30 Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren in *P. acnes* kodieren, gebildet wurden. Bei den semi-quantitativen Analysen mittels RT-PCR wurde untersucht, ob Transkripte nachweisbar waren, während bei den quantitativen Analysen untersucht wurde, in welchem Verhältnis Transkripte vorhanden waren. Im Folgenden sind die Eigenschaften der potentiellen Pathogenitätsfaktoren beschrieben.

4.6.1 Eigenschaften der potentiellen Pathogenitätsfaktoren

Es wurden alle 30 Gene untersucht, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren in *P. acnes* kodieren. Die Faktoren sind teilweise aus anderen Bakterien bekannt und wurden für diese auch schon beschrieben. Die Gene PPA0453 (kodiert für GroEL), PPA0916 (kodiert für DnaJ), PPA1098 (kodiert für DnaK), PPA1772 (kodiert für GroEL2) und PPA2040 (kodiert für DnaK) kodieren für Hitzeschockproteine, die teilweise in *Escherichia coli* und anderen Bakterien untersucht wurden und immunstimmulierende Eigenschaften aufweisen (Miyoshi *et al.*, 2006; Farrar *et al.*, 2000). Die potentiellen Hämolysine (kodiert durch die Gene PPA0565, PPA0938 und PPA1396) und die CAMP-Faktoren (kodiert durch die Gene PPA0687, PPA1198, PPA1231, PPA1340 und PPA2108) bewirken eine Hämolyse der Erythrozyten (Wren *et al.*, 1998; Chouhudry, 1978). Der CAMP-Faktor, der für *Streptococcus agalactiae* beschrieben ist (Lang und Palmert, 2003) und in *P. acnes* mittlerweile nachgewiesen wurde (Valenne *et al.*, 2005), bildet bei Erythrozyten Poren in der Zellmembran, wodurch eine Zelllyse erfolgt (Bernheimer *et al.*, 1979). CAMP ist die Abkürzung für die drei Personen Christie, Atkins und Munch-Petersen, die diesen Faktor zuerst charakterisiert haben (Christie *et al.*, 1944). Die potentiellen Antigene (kodiert durch die Gene PPA0727 und PPA0737) interagieren mit anderen Zellen und haben vermutlich eine den Adhäsinen ähnliche Funktion (Valenne *et al.*, 2005). Die Transkripte der Gene PPA1715, PPA1880, PPA2127, PPA2130 und PPA2210, die für Wirtsinteraktionsfaktoren kodieren, und PPA1983 bzw. PPA1906, die für Adhäsionsfaktoren kodieren,

wurden ebenfalls untersucht. Es ist bekannt, dass diese Faktoren bei Pneumokokken eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Bakterium und menschlichen Zellen spielen (Jedrzejas, 2001). Eine Interaktion von *P. acnes* mit menschlichen Zellen wurde bereits nachgewiesen (Basal *et al.*, 2004; Burkhart *et al.*, 1999). Die Hyaluronat-Lyase (kodiert durch das Gen PPA0380) baut Hyaluron, welches ein wichtiger Bestandteil des Bindegewebes ist, ab (King *et al.*, 2004; Makris *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 1997). Endoglycoceramidasen (kodiert durch die Gene PPA0644 und PPA2106) spalten die glycosidische Verknüpfung zwischen dem Oligosaccharid- und Ceramid-Anteil von Glycosphingolipiden, die Bestandteil der Zelloberflächenmembran sind (Horibata *et al.*, 2004; Horibata *et al.*, 2000; Sakurada *et al.*, 1992). Sialidasen (kodiert durch die Gene PPA0684, PPA0685 und PPA1560) spalten von Sialoglycokonjugaten, die Bestandteil eukaryotischer Zellmembranen sind, endständige Sialinsäure-Moleküle ab (Chou *et al.*, 1996). Glycerin-Esterhydrolasen (kodiert durch die Gene PPA1796 und PPA2105) spalten die Esterbindung der Triglyceride, so dass freie Fettsäuren und Glycerin entstehen (Miskin *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005; Snellman *et al.*, 2002; Beven, 2001).
Alle CAMP-Faktoren und Hautgewebe abbauenden Enzyme sind Exoproteine, ebenso ein potentielles Hämolysin (kodiert durch das Gen PPA0565) und zwei Wirtsinteraktionsfaktoren (kodiert durch die Gene PPA1715 und PPA1880). Alle Hitzeschockproteine, ein Adhäsionsfaktor (kodiert durch das Gen PPA1906) und das Anitgen (kodiert durch das Gen PPA0737) sind cytoplasmatische Proteine. Die Wirtsinteraktionsfaktoren (kodiert durch die Gene PPA2127, PPA2130 und PPA2210) sowie die potentiellen Hämolysine (kodiert durch die Gene PPA0938 und PPA1396), ein Adhäsionsfaktor (kodiert durch das Gen PPA1983) und ein Antigen (kodiert durch das Gen PPA0737) sind Membranproteine.

4.6.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)-Studien

Verglichen wurden bei den Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion-Analysen (RT-Analysen) die Bedingungen unter Zugabe der jeweiligen Substanz mit den Bedingungen in PYG-Komplexmedium mit und ohne Zugabe von Lipiden. Als Kontrolle dienten dabei die Gene PPA2417, welches für die 16S rRNA kodiert, und PPA0009, welches für die Gyrase A kodiert. Beide Gene werden konstitutiv transkribiert. Die Auswahl der Substanzen erfolgte nach Absprache mit der Firma Evonik GmbH. Die in diesen Versuchen eingesetzten Substanzen (*Aloe arborescens*-Extrakt, Arjunolic-Säure,

LMW-Skleroglucan, niedermolekulare Hyaluronsäure, Taurolidin A und Cistus-Extrakt) zeigten bei den Wachstumsversuchen in einer Konzentration von 0,1 % keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum von *P. acnes*. Ein Teil der Ergebnisse stammt aus früheren Diplomarbeiten (Straub, 2009; Rimpf, 2006) und wurde in dieser Arbeit vervollständigt.
Auffällig war, dass die Transkription der Gene, die für Hautgewebe abbauende Enzyme kodieren, durch die Zugabe von Lipiden in das Medium induziert wurden. Dies lässt sich damit erklären, dass es sich bei den zugegeben Lipiden um Substrate für diese Enzyme handeln könnte. Die RT-Analysen ohne Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium dienten als Kontrolle, welchen Effekt später die Zugabe von Lipiden in das Medium hatte. Das Ergebnis der RT-Analysen ist uneinheitlich. Ohne Zugabe von Lipiden in das Medium waren die Hyaluronsäure und das LMW-Skleroglucan Substanzen, die die Transkription der meisten Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, verhindern. Allerdings induzierte das LMW-Skleroglucan die Transkription des Gens PPA2106 (kodiert für Endoglycoceramidase) und des Gens PPA0737 (kodiert für ein Antigen). Hyaluronsäure induzierte die Transkription der zwei Gene PPA2127 und PPA2210 (kodieren für Wirtsinteraktionsfaktoren). Mit Zugabe von Lipiden war das *Aloe arborescens*-Extrakt die Substanz, die die Transkription der meisten untersuchten Gene hemmte. Allerdings induzierte *Aloe arborescens*-Extrakt die Transkription einiger Gene. Es gibt also keine Substanz, die die Transkription aller Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, hemmt. Um genauere Aussagen zur Expression machen zu können, wurden quantitative „Real-Time"-Polymerasekettenreaktion-Analysen durchgeführt.

4.6.3 Quantitative „Real-Time"-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)-Studien (LightCycler®)

Bei den quantitativen „Real-Time"-Polymerasekettenreaktion-Analysen (qRT-PCR-Analysen) wurde das Expressionsverhältnis mittels der ΔΔcp-Methode bestimmt. Dabei wird jeweils die Effizienz der Amplifikation eines jeden Gens bestimmt. Die Effizienz beträgt im optimalen Fall zwei, Werte zwischen 1,8-2,4 sind aber in Ordnung. Mittels der Effizienz und des mittels einer Software bestimmten cp-Werts („crossing point") lässt sich das Expressionsverhältnis eines Gens unter verschiedenen Bedingungen ermitteln. Dazu wurde das zu untersuchende Gen ins Verhältnis zu einem Referenzgen gesetzt (Pfaffl, 2001; Vu *et al.*, 2000). In diesen Versuchen wurde der LightCycler® verwendet.

Dabei wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I®) den PCR-Proben zugegeben und die Fluoreszenz stieg linear mit der Anzahl der Produkte. Der cp-Wert war der Wert, bei dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhob. Zu diesem Zeitpunkt war die Vermehrung noch exponentiell. Die Bestimmung der Effizienz erfolgte, indem cDNA eines Zielgens in verschiedenen Konzentrationen in den einzelnen PCR-Ansätzen eingesetzt wurde. Durch das Auftragen der Anzahl der Zyklen über die cp-Werte wurde eine Kalibriergerade ermittelt, mit Hilfe deren Steigung die Effizienz berechnet werden konnte.
Die Gene PPA0010 (kodiert für die Gyrase A) und PPA2417 (kodiert für die 16S rRNA) wurden als Referenzgen verwendet. Zu beachten ist allerdings, dass auch Referenzgene bei der Transkription Schwankungen unterliegen (Hibbeler *et al.*, 2008). Unter verschiedenen Bedingungen und Wachstumsphasen kann eine verschiedene Menge an Transkripten dieser Gene vorhanden sein. Hier wurden alle Proben mit derselben Zellmasse genommen, so dass diese Schwankungen minimiert wurden. Ab einem Expressionsverhältnis größer gleich drei wird von einer Überexpression gesprochen. Werden die Werte logarithmisch ($\log_2$) aufgetragen, so ist ab einem Wert größer gleich 1,56 eine Überexpression gegeben, während bei einem Wert kleiner gleich -1,56 von einer Hemmung auszugehen ist.
In diesen Versuchen wurden die Substanzen LMW-Skleroglucan und Taurolidin A verwendet. Beide Substanzen hatten keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *P. acnes*. Bei den ersten qRT-PCR-Analysen wurde der Einfluss der Substanzen auf die Transkription der 30 zu untersuchenden Gene beobachtet. Dies erfolgte ohne Zugabe von Lipiden. Dabei war zu erkennen, dass die Zugabe von LMW-Skleroglucan in das Medium eine Überexpression des Gens PPA0684, das für die Sialidase L kodiert, zur Folge hatte. Dies war bei beiden Referenzgenen der Fall. Ein Grund für diesen Effekt kann nicht angegeben werden. Ansonsten hatten die Substanzen keinen oder einen hemmenden Effekt auf die Transkription der Gene.
Unter Zugabe von Lipiden trat bei einigen Genen eine Überexpression auf, die aber durch die Zugabe der Substanzen nicht mehr gegeben war. Die beiden Substanzen verhinderten also eine Transkription der untersuchten Gene. Sie sind damit potentielle Kandidaten dafür, dass sie keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. acnes* haben, aber die Transkription der Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, hemmen. Mit der Gyrase A als Referenzgen war bei einigen Genen kein Effekt bzw. sogar eine Überexpression zu beobachten. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Gyrase A als konstitutiv exprimiertes Gen nicht so gut geeignet ist im Vergleich zum Gen, das für die 16S rRNA kodiert.

Anzumerken ist, dass bei den qRT-PCR-Analysen die Ergebnisse der RT-Analysen nur teilweise bestätigt werden konnten. Dies ist damit zu begründen, dass die qRT-PCR sensitiver ist. Bei den RT-Analysen wird auch nicht die Effizienz der Transkription bestimmt, die einen großen Einfluss bei der Berechnung des Expressionsverhältnisses hat. Somit sind die Daten der qRT-PCR-Analysen die geeigneteren, um eine Aussage treffen zu können (Bustin, 2002).

4.7 „Northern blot“- /„Dot blot“-Analysen

„Northern blot“- /„Dot blot“-Analysen wurden durchgeführt, um die 40fache Überexpression des Gens PPA0687, das für einen CAMP-Faktor kodiert, mit einer weiteren Methode zu bestätigen. Die Überexpression dieses Gens war bei den qRT-PCR-Analysen zu beobachten. Bei einem „Northern blot“ ist es das Ziel, RNA-Fragmente, die zuvor mittels einer Gelelektrophorese ihrer Größe nach getrennt worden waren, auf eine Membran zu blotten und durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne Fragmente spezifisch nachweisen zu können (Thomas, 1980). Die Sonden in diesen Versuchen waren radioaktiv und nicht-radioaktiv markiert. Mittels des „Dot blots“ können einzelne Fragmente nachgewiesen werden (Kafatos *et al.*, 1979).
Mittels „Northern blot“- /„Dot blot“-Analysen konnte nicht gezeigt werden, dass das Gen PPA0687 überexprimiert wird. In diesen Versuchen konnte nur für die Sonde selbst ein Signal beobachtet werden. Da für die Sonde selbst ein Signal zu beobachten war, war die Methode erfolgreich. Ein Transkript war jedoch weder bei RNA, die aus Zellen, die in PYG-Komplexmedium, noch bei RNA, die aus Zellen, die in PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden angezogen worden waren, zu beobachten.

4.8 Erstellung von Deletionsmutanten in *P. acnes*

In diesen Versuchen wurden Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, in *P. acnes* deletiert. Die Deletion der Gene PPA1340 und PPA1396 war erfolgreich. Das Gen PPA1340 kodiert für einen CAMP-Faktor und das Gen PPA1397 für ein Hämolysin. Der CAMP-Faktor wie auch das Hämolysin bewirken eine Lyse der Erythrozyten. Die Hämolyseaktivität von Bakterien lässt sich mittels Blutagarplatten überprüfen. Die Deletion der Gene wurde des Weiteren mittels PCR überprüft. Um zu überprüfen, ob noch Transkripte der deletierten Gene gebildet wurden, wurden RT-Analysen durchgeführt.

Außerdem wurde der Einfluss der Deletionen auf das Wachstumsverhalten untersucht. Die Deletion des Gens PPA0687, das für einen CAMP-Faktor kodiert, gelang nicht. Es ist aber bisher nicht bekannt, dass ein CAMP-Faktor essentiell für das Wachstum eines Bakteriums ist (Henseler *et al.*, 2008; Bernheimer *et al.*, 1978). Da die Deletion des Gens PPA1340, das ebenfalls für einen CAMP-Faktor kodiert, erfolgreich war, sollte auch dieses Gen deletiert werden. Die Methode der Deletion wurde in diesen Versuchen etabliert. Die Deletion dieses Gen war deshalb von Interesse, da qRT-PCR-Analysen zeigten, dass durch die Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium die Transkription um das 40fache erhöht war. Vermutlich hat aber dieses Gen doch eine essentielle Bedeutung für *P. acnes*.

4.8.1 Konstruktion der Plasmide für die Deletion potentieller Pathogenitätsfaktoren

Für die Konstruktion einer Deletionsmutante wurde das Plasmid pK19*mobsacB* verwendet. Das Plasmid pK19*mobsacB* ist ein *E. coli*-*C. glutamicum*-Schaukelvektor. Es besitzt ein *lacZ*-Gen, eine Kanamycin-Resistenz und ein *sacB*-Gen, welches für die Levansucrase kodiert. Der Vektor pK19*mobsacB* wird nur in *E. coli* repliziert, nicht aber in *C. glutamicum*. Der Vektor pK19*mobsacB* besitzt zwei Replikationsursprünge: einen für Gram-negative Bakterien zur DNA-Replikation ($oriV_{EC}$) und einen, an dem die konjugative Übertragung auf den Rezipienten beginnt ($oriT$). Wachstumsversuche mit *P. acnes* zeigten, dass ein Wachstum bei 30 µg/ml Kanamycin im Medium nicht mehr zu beobachten war. Somit konnte dieses Plasmid für die weiteren Versuche verwendet werden.
Für die Deletion wurde mittels der „cross-over"-PCR ein Deletionsfragment generiert und in die „multiple cloning site" des Plasmids kloniert. Das Deletionsfragment enthielt homologe Sequenzen des 5′- und 3′-Endes des zu deletierenden Gens. Dies war für die spätere homologe Rekombination von Bedeutung. Mittels dieses Vorgehens wurden die Plasmide pRS1340, pR1396 und pS0687 konstruiert. Das Plasmid mit dem Deletionskonstrukt wurde in *E. coli* K12 DH5α transformiert.
Die Selektion potentieller positiver *E. coli* K12 DH5α-Klone erfolgte über die Kanamycin-Resistenz und die α-Komplementation (Blau-Weiß-Selektion). Das Plasmid pK19*mobsacB* trägt ein *lacZ*-Gen, das für das α-Fragment der β-Galactosidase kodiert. Das α-Fragment des *lacZ*-Gens wiederum enthält eine „multiple cloning site", die keine Auswirkung auf die Expression des Enzyms hat. Wurde ein Fragment, in diesen Versuchen das Deletionskonstrukt, in die „multiple cloning site" kloniert, so war das α-Fragment

der β-Galactosidase nicht mehr funktionsfähig. Bei der α-Komplementation (Blau-Weiß-Selektion) inhibierte IPTG als Galactopyranosid den *lacI*-Repressor. Dies führte zu einer Induktion des *lac*-Promoters. Dadurch wurde das auf dem Plasmid liegende α-Fragment der β-Galactosidase exprimiert. X-Gal, ein Substratanalogon, wurde duch die β-Galactosidase umgesetzt, wobei ein blauer Farbstoff gebildet wurde. Konnte kein X-Gal umgesetzt werden, da die β-Galactosidase nicht mehr funktionsfähig ist, wurde kein blauer Farbstoff gebildet. Kolonien mit einem Insert in der „multiple cloning site" erschienen somit weiß und stellten die rekombinanten Klone dar. Blaue Kolonien enthielten kein Insert in der „multiple cloning site" und stellten somit Religanten dar. Die α-Komplementation wurde in dieser Arbeit mit dem *E. coli* K12 DH5α-Stamm durchgeführt, da dieser im Gegensatz zum *E. coli* K12 HB101-Stamm das ω-Fragment der β-Galactosidase besitzt (*lacZ*ΔM15), das für eine Blau-Weiß-Selektion benötigt wird. Nur das α und ω-Fragment der β-Galactosidase zusammen besitzen eine Enzymaktivität zur Umsetzung des X-Gals.

4.8.2 Transformationseffizienz von *P. acnes*

In den ersten Versuchen wurde untersucht, unter welchen Bedingungen die höchste Transformationseffizienz von *P. acnes* erreicht werden konnte. Bisher war wenig über die genetische Veränderung von Propionibakterien bekannt (Kiatpapan und Murooka, 2002) Dazu wurden Transformationsprotokolle von Propionibakterien modifiziert (Cheong *et al.*, 2008; Jore *et al.*, 2001). Als zu transformierendes Plasmid wurde das Plasmid pRS1340 verwendet. In diesen Protokollen erfolgte die Anzucht der Zellen für die Elektroporation in SLB-Medium. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *P. acnes* in SLB-Medium dasselbe Wachstumsverhalten wie in PYG-Komplexmedium zeigte. SLB-Medium ist LB-Medium mit 2 % (w/v) Saccharose. Die Anzucht der Zellen für die Elektroporation erfolgte bei verschiedene Temperaturen. Die Transformation der elektrokompetenten *P. acnes*-Zellen erfolgte bei einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Die getesteten Feldstärken lagen zwischen 5 und 12,5 kV/cm. Der Transformationsansatz wurde nach der Elektroporation auf kanamycinhaltige PYG-Agarplatten ausplattiert, und nach der Inkubation der Platten wurden die Klone gezählt. Die höchste Transformationseffizienze mit 101 KBE/µg Plasmid-DNA war bei einer Feldstärke von 10 kV/cm zu beobachten, wobei die Zellen für die Elektroporation bei 30 °C wuchsen. Aus der Literatur sind für *P. acnes* Transformationseffizienz von $1{,}5 \cdot 10^4$ (Cheong *et al.*, 2008) und 10-30 für *P. freudenreichii* (Jore *et al.*, 2001) bekannt. Für die Etablierung

der Deletion in *P. acnes* wuchsen daher die Zellen für die Elektroporation bei 30 °C, und die Transformation erfolgte bei einem Widerstand von 200 Ω, einer Kapazität von 25 µF und einer Feldstärke von 10 kV/cm (Cheong *et al.*, 2008: Feldstärke: 15 kV/cm, Zeitkonstante: 3,2 ms; Jore *et al.*, 2001: Widerstand: 200 Ω, Kapazität: 25 µF, Feldstärke: 20 kV/cm).

4.8.3 Charakterisierung der Deletionsmutanten in *P. acnes*

Nachdem die Transformation von *P. acnes* erfolgreich war, wurden in weiteren Versuchen Gene in *P. acnes* deletiert. Anschließend wurden die Deletionsmutanten charakterisiert. Die Deletion der Gene PPA1340 (kodiert für einen CAMP-Faktor) und PPA1396 (potentielles Hämolysin) war erfolgreich.
Aus positiven, rekombinanten *E. coli* K12 DH5α-Klonen wurden die Plasmide pRS1340, pR1396 und pS0687 isoliert. Mittels PCR wurde überprüft, ob das Deletionskonstrukt tatsächlich im Plasmid integriert war. Es folgte die Transformation des Plasmids in *P. acnes*. Über eine homologe Rekombination integrierte der Vektor in das Genom von *P. acnes*. Dies wurde über die Kanamycinresistenz überprüft, indem die Zellen nach der Transformation auf kanamycinhaltige PYG-Agarplatten ausgestrichen wurden. Mit den gewachsenen Klonen wurden PYG-Flüssigmedien, die Kanamycin enthielten, beimpft. Diese gewachsenen Kulturen wurden auf PYG-Agarplatten, die Saccharose enthielten, ausplattiert. Über das *sacB*-Gen wurde die Levansucrase gebildet, die Saccharose in das für die Zelle toxische Levan (ein Polyfructan) umsetzte (Marx, 2008; Gay *et al.*, 1982). Über diesen Selektionsschritt wurde ein zweites Rekombinationsereignis erzwungen, nämlich dass der Vektor aus dem Genom entfernt wurde. Dabei entstand entweder der Wildtyp oder die Deletionsmutante. Das Prinzip der Deletion von Genen in *P. acnes*, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Dieses Ereignis konnte aber nur über eine Kontroll-PCR festgestellt werden.

Dazu wurden PYG-Flüssigmedien mit gewachsenen Kolonien beimpft. Aus den gewachsenen Zellen wurde die chromosomale DNA isoliert. Mittels einer PCR wurde überprüft, ob es sich um den Wildtyp oder eine Deletionsmutante handelte. Bei ungefähr 35 % der Klone, die auf PYG-Agarplatten, die Saccharose enthielten, wuchsen, handelte es sich um Deletionsmutanten. Über den Erfolg der Etablierung von Deletionsmutanten in *P. acnes* ist nichts bekannt. Die Methode, Gene mittels zweier homologer Rekombinationsereignisse über das Plasmid pK19*mobsacB* zu deletieren, ist in *C. glutamicum* etabliert. Dort beträgt die Rate der positiven Deletionen 55 % (Schäfer *et al.*, 1994).

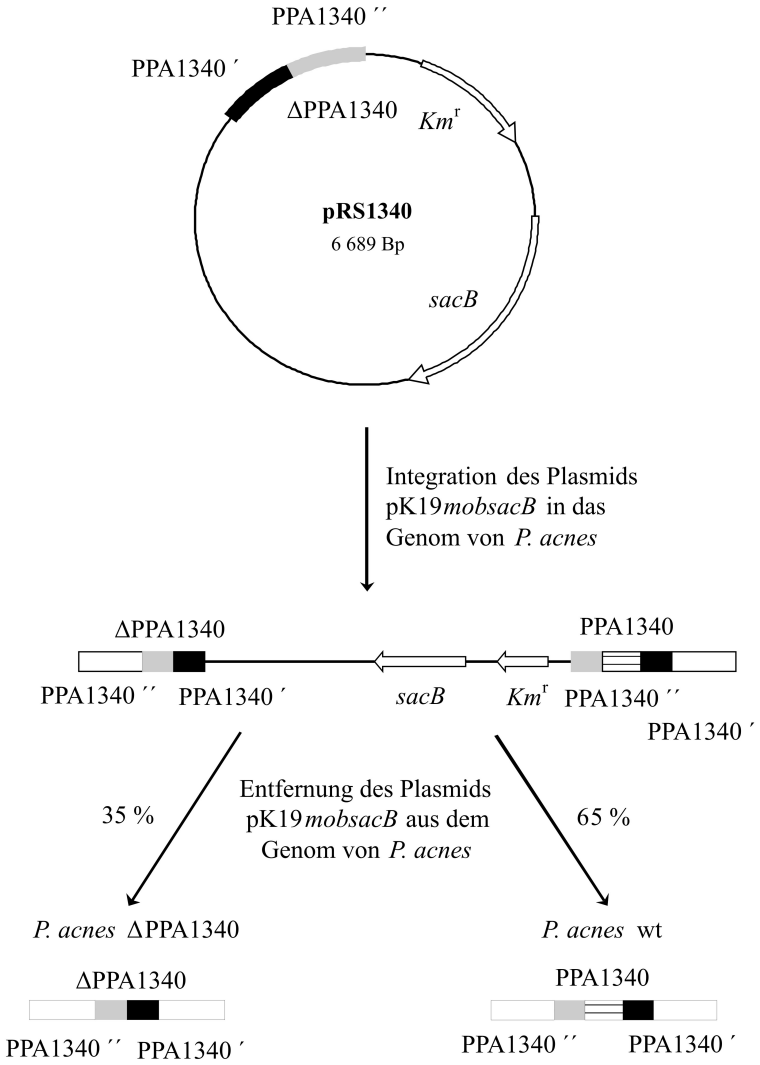

Abbildung 4.1: **Anwendung des Plasmids pK19*mobsacB*, um Deletionsmutanten in *P. acnes* zu generieren (schematisch).** Das Plasmid integrierte in das Genom von *P. acnes* mittels homologer Rekombination. Die Sequenz des Gens PPA1340 des Wildtyps und die Sequenz des Deletionskonstruktes waren durch die die Sequenz des Plasmids getrennt. Durch Wachstum auf PYG-Agarplatten, die 10 % Saccharose enthielten, wurde das Plasmid mittels einer weiteren homologen Rekombination aus dem Genom entfernt. Zu 35 % entstand die Mutante (*P. acnes* ΔPPA1340) und zu 65 % wieder der Wildtyp (*P. acnes* wt). Symbole: ■ 5′-Ende des Gens PPA1340, ■ 3′-Ende des Gens PPA1340, ⇐ Km^r- und *sacB*-Gen, ⊟ zu deletierende Sequenz des Gens PPA1340, **-** Plasmid-Sequenz.

Die Deletion des Gens PPA1340, das für einen CAMP-Faktor kodiert, war erfolgreich. Der *P. acnes*-Stamm wurde *P. acnes* ΔPPA1340 genannt. Ebenso gelang die Deletion des Gens PPA1396, das für ein potentielles Hämolysin kodiert. Dieser *P. acnes*-Stamm wurde *P. acnes* ΔPPA1396 genannt.
Die Wachstumsversuche der Stämme *P. acnes* ΔPPA1340 und *P. acnes* ΔPPA1396 in PYG-Komplexmedium mit und ohne Zugabe von Lipiden zeigten, dass die Deletionen dieser Gene keinen Einfluss auf das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp von *P. acnes* hatten. Dies war zu erwarten, da sowohl der CAMP-Faktor wie das potentielle Hämolysin nicht essentiell für *P. acnes* sind.
Die RT-PCR-Analysen zeigten, dass wie erwartet keine Transkripte der deletierten Gene bei den Deletionsmutanten zu beobachten waren. Somit wurde gezeigt, dass die Deletion der Gene PPA1340 und PPA1396 erfolgreich war.
Mittels Blutagarplatten lässt sich die Hämolyseaktivität eines Bakterienstammes zeigen. Es war bekannt und konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass *P. acnes* eine Hämolyseaktivität besitzt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Deletion bzw. der Verlust der Aktivität eines einzelnen potentiellen Pathogenitätsfaktors keinen Einfluss auf die Virulenz eines Bakteriums hat (Hensler *et al.*, 2008).

4.9 Ausblick

Diese Arbeit bietet einen ersten Überblick darüber, wie Alternativen zu bisherigen Therapien aussehen könnten. Der Einfluss weiterer Substanzen auf das Wachstum der Hautkeime kann untersucht werden. Auch weitere Transkriptionsstudien werden Aufschluss darüber geben, ob es möglich ist, die Transkription der Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, zu hemmen, ohne das Wachstum von *P. acnes* zu beeinflussen. Für Substanzen, die das Wachstum von *P. acnes* spezifisch hemmen, stehen weitere Tests bezüglich der negativen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus aus. Des Weiteren bietet die Möglichkeit, Gene von *P. acnes* zu deletieren, einen weiteren Ansatz, die potentiellen Pathogenitätsfaktoren zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

- Unter Zugabe von Substanzen in das PYG-Komplexmedium ohne Zugabe von Lipiden konnte beobachtet werden, dass die Substanzen PA19-Alkyletherguanidiniumlactat, Ether-Guanidinium-Verbindung, Galanga-Extrakt, Phytosphingosin-HCl- und Salicylsäure das Wachstum von *P. acnes* hemmten. Die meisten getesteten Substanzen hatten keinen Einfluss auf das Wachstum, während weitere getestete Substanzen je nach eingesetzter Konzentration einen hemmenden Effekt zeigten.
- Die Wachstumsversuche mit weiteren Hautkeimen (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* und *M. furfur*) zeigten, dass die Substanz Galanga-Extrakt das Wachstum von *P. acnes* hemmte, nicht aber der weiteren Hautkeime.
- Die minimale Hemmkonzentration war für Galanga-Extrakt bei *P. acnes* 0,005 mg.
- Der AMES-Test für Galanga-Extrakt fiel negativ aus. Das heißt, Galanga-Extrakt ist nicht mutagen.
- Bei RT-PCR-Analysen war zu beobachten, dass die Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexedium die Transkription der Gene PPA1340, PPA2108, PPA0565, PPA0938, PPA1396, PPA0453, PPA1983, PPA0380, PPA0644, PPA0684, PPA 0685, PPA1560, PPA1796, PPA2105, PPA2106, PPA2130, PPA2210 und PPA0765 von *P. acnes* induzierte.
- Bei RT-PCR-Analysen war zu sehen, dass *Aloe arborescens*-Extrakt in PYG-Komplexmedium mit Lipiden die Transkription fast aller Gene, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren in *P. acnes* kodieren, hemmte.
- qRT-PCR-Analysen zeigten, dass die Zugabe von Lipiden in das PYG-Komplexmedium die Gene PPA0687, PPA2040, PPA1098, PPA0737, PPA0644, PPA1983, PPA2126, PPA1396, PPA1796, PPA1772 und PPA0916 aus *P. acnes* überexprimierte, wobei das Gen für die 16S rRNA (PPA2417) als Referenzgen diente. Bei der Verwendung des Gens für die Gyrase A (PPA0010) als Referenzgen konnte zusätzlich eine Überesxpression für Gene PPA1560 und PPA1906 beobachtet werden. Das Wachstum erfolgte dabei in Komplexmedium mit Lipiden.

- Bei den Substanzen LMW-Skleroglucan und Taurolidin A in PYG-Komplexmedium mit Lipiden war keine Überexpression aller 30 untersuchten Gene aus *P. acnes*, die für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren, zu beobachten, wobei das Gen der 16S rRNA als Referenzgen diente. Bei der Verwendung des Gens für die Gyrase A (PPA0010) als Referenzgen konnte bei LMW-Skleroglucan zusätzlich eine Überexpression für die Gene PPA1796, PPA0380, PPA1340 und PPA2105 und bei Taurolidin A für das Gen PPA1340 beobachtet werden.
- Die 40fache Überexpression des Gens PPA0687 bei den qRT-PCR-Analysen konnte mittels „Northern-/Dot blot"-Analysen nicht bestätigt werden.
- Die Gene PPA1340 und PPA1396 konnten in *P. acnes* deletiert werden. Die Deletionen hatten keinen Einfluss auf das Wachstum und die Hämolyseaktivität. RT-PCR-Analysen zeigten, dass nach der Deletion wie erwartet keine Transkripte nachweisbar waren.
- Die Deletion des Gens PPA0687 gelang nicht.

6 Summary

- Growth of *P. acnes* was inhibited in the presence of PA19-alkyletherguanidiniu-lactate, ether-guanidinium-compound, Galanga-extract, phytosphingosine-HCl, and salicylic acid in PYG complex medium without addition of lipds. However, most tested substances had no influence on growth, whereas some substances in different concentrations inhibited the growth partially.
- Growth experiments showed that Galanga-extract inhibited the growth of *P. acnes*, but not the growth of further skin inhabitants (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. xerosis* and *M. furfur*).
- The minimal inhibition concentration of Galanga-extract was 0,005 mg for *P. acnes*.
- Galanga-Extract was AMES negative. Therefore Galanga-extract has no mutagenic potential.
- Induction of transcription of genes PA1340, PPA2108, PPA0565, PPA0938, PPA 1396, PPA0453, PPA1983, PPA0380, PPA0644, PPA0684, PPA0685, PPA1560, PPA 1796, PPA2105, PPA2106, PPA2130, PPA2210, and PPA0765 by lipids in PYG complex medium was shown by RT-PCR analyses.
- Inhibition by *Aloe arborescens*-extract was shown for most genes coding for potential pathogenic factors testetd in PYG complex medium with lipds.
- Overexpression of genes PPA0687, PPA2040, PPA1098, PPA0737, PPA0644, PPA 1983, PPA2126, PPA1396, PPA1796, PPA1772, and PPA0916 of *P. acnes* due to the addition of lipids to the PYG complex medium was shown by qRT-PCR analyses. Gene PPA2417, coding for the 16S rRNA, was used as reference gene. However, there was overexpression of genes PPA1560 and PPA1906 when the gene PPA0010, coding for gyrase A, was used as reference. PYG complex medium plus lipids was used in either growth experiment.

- Using PPA2417 as a reference, no overexpression of any gene coding for potential pathogenic factors of *P. acnes* was detected by LMW-skleroglucan und taurolidine A in addition to PYG complex medium with lipids. However, overexpression of genes PPA1796, PPA0380, PPA1340, and PPA2105 in response to LMW-skleroglucan was detected, using PPA0010, coding for gyrase A, as reference. Furthermore, there was overexpression of the gene PPA1340 in response to taurolidine A.
- A 40-fold overexpression of the gene PPA0687 was shown by qRT-PCR analyses. However, Northern-/dot blot analyses failed to confirm this observation.
- The deletion of the genes PPA1340 and PPA1396 in *P. acnes* was successful, but no effect on growth and haematolysis was observed. Also, no transcript of any deleted gene was detected by RT-PCR analysis.
- The deletion of the gene PPA0687 was not successful.

7 Literaturverzeichnis

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipmann. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

Ames, B. N., J. Mccann und E. Yamasaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31: 347-364.

Archer, G. L. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 26: 1179-1181.

Ashbee, H. R., und E. G. Evans. 2002. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 21-57.

Basal, E., A. Jain und G. P. Kaushal. 2004. Antibody response to crude cell lysate of *Propionibacterium acnes* and induction of pro-inflammatory cytokines in patients with acne and normal healthy subjects. *Journal of Microbiology* 42: 117-125.

Bergey, D. H., D. R. Boone, R. W. Castenholz und G. Garrity. 1923. Bergey´s manual of determinative bacteriology. 1st edition. *Williams and Wilkins*, Baltimore, USA.

Bernheimer, A. W., R. Linder und L. S. Avigad. 1979. Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci. *Infection and Immunity* 23: 838-844.

Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62: 293-300.

Berthold, H. K., S. Unverdorben, R. Degenhardt, M. Bulitta und I. Gouni-Berthold. 2006. Effect of policosanol on lipid levels among patients with hypercholesterolemia or combined hyperlipidemia. *Journal of the American Medical Association* 295: 2262-2269.

Beven, C. A., M. Dieckelmann und I. R. Beacham. 2001. A strain of *Pseudomonas fluorescens* with two lipase-encoding genes, one of which possibly encodes cytoplasmatic lipolytic activity. *Journal of Applied Microbiology* 90: 979-987.

Bojar, R. A. und K. T. Holland. 2004. Acne and *Propionibacterium acnes*. *Clinics in Dermatology* 22: 375-379.

Brüggemann, H. 2005. Insights in the pathogenic potential of *Propionibacterium acnes* from its complete genome. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 24: 67-72.

Brüggemann, H. 2005. Genomentschlüsselung von *Propionibacterium acnes*: Neue Erkenntnisse über den Beitrag des Bakteriums zur Entstehung der Hautakne. *Haut* 16: 94-97.

Brüggemann, H., A. Henne, F. Hoster, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Strittmatter, S. Hujer, P. Dürre und G. Gottschalk. 2004. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science* 305: 671-673.

Buck, G. E. und M. T. Kelly. 1980. Investigation of the component of *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium parvum*) responsible for macrophage activation. *Infection and Immunity* 27: 620-627.

Burkhart, C. G., C. N. Burkhart und P. F. Lehmann. 1999. Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. *Postgraduate Medicine Journal* 75: 328-331.

Burkhart, C. G., J. Cantrill, C. L. Butcher und P. F. Lehmann. 1999. *Propionibacterium acnes*: interaction with complement and development of an enzyme-linked immunoassay for the detection of antibody. *International Journal of Dermatology* 38: 200-203.

Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 23-39.

Cheng, Q., T. Koga, H. Uchi, H. Hara, H. Terao, Y. Moroi, K. Urabe und M. Furue. 2002. *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production may be madiates by NF-kappaB activation in human monocytes. *Journal of Dermatological Science* 29: 97-103.

Cheong, D. E., H. I. Leeb und J. S. So. 2008. Optimization of electrotransformation conditions for *Propionibacterium acnes*. *Journal of Microbiological Methods* 72: 38-41.

Chou, M. Y., S. C. Li und Y. T. Li. 1996. Cloning and expression of sialidase L, a NeuAca2 → 3Gal-specific sialidase from the leech, *Macrobdella decora*. *Journal of Biological Chemistry* 271: 19219-19224.

Choudhury. T. K. K. 1978. Synergistic lysis of erythrocytes by *Propionibacterium acnes*. *Journal of Clinical Microbiology* 8: 238-241.

Christie, R., N. E. Atkins und E. Munch-Petersen. 1944. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 22: 197-200.

Chronnell, C. M., L. R. Ghali, R. S. Ali, A. G. Quinn, D. B. Holland und J. J. Bull. 2001. Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions. *Journal of Dermatological Science* 117: 1120-1125.

Coderch, L., O. Lopez O., A. Maza und J. L. Parra. 2003. Ceramides and skin function. *American Journal of Clinical Dermatology* 4: 107-129.

Douglas, H. C., und S. E. Gunter. 1946. The taxonomic position of *Corynebacterium acnes*. *Journal of Bacteriology* 52: 15-23.

Dunlap, K. A., H. Kwak, R. C. Burghart, F. W. Bazer, R. R. Magness, G. A. Johnson und K. J. Bayless. 2010. The sphingosin-1-phosphate (S1P) signaling pathway is regulated during pregnancy in sheep. *Biology of Reproduction* 82: 256-279.

Farrar, M. D., E. Ingham und K. T. Holland. 2000. Heat shock proteins and inflammatory acne vulgaris: molecular cloning, overexpression and purification of a *Propionibacterium acnes* GroEL and DnaK homologue. *Federation of European Microbiological Societes Microbiology Letters* 191: 183-186.

Ferguson Jr., D. A., und C. S. Cummins. 1978. Nutritional requirements of anaerobic coryneforms. *Journal of Bacteriology* 135: 858-867.

Funke, G., A. Grävenitz, J. E. Clarridge und K. A. Bernard. 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 125-159.

Gay, P., D. Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari und J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 153: 1424-1431.

Geha, R. S., A. Beiser, C. Ren, R. Patterson, P. A. Greenberger, L. C. Grammer, A. M. Ditto, K. E. Harris, M. A. Shaughnessy, P. R. Yarnold, J. Corren und A. Saxon. 2000. Review of alleged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. *American Society for Nutritional Sciences* 130: 1058-1062.

Gollnick, H. 2003. Current concepts of the pathogenesis of acne: implications for drug treatment. *Drugs* 63: 1579-1596.

Gouni-Berthold, I., und H. K. Berthold. 2001. Policosanol: clinical pharmacology and therapeutic significance of a new lipid-lowering agent. *American Heart Journal* 143: 256-365.

Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* 43: 1367-1378.

Guzman, B., M. D. Lledo und P. Vargas. 2009. Adaptive radiation in mediterranean *Cistus* (Cistaceae). *Public Library of science* 4: e6362.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580.

Heibein, J. A., I. S. Goping, M. Barry, M. J. Pinkoski, G. C. Shore, D. R. Green und R. C. Bleackley. 2000. Granzym B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and bax. *Journal of Experimental Medicine* 192: 1391-1402.

Hensler, M. E., D. Quach, C. Hsieh, K. S. Doran und V. Nizet. 2008. CAMP factor is not essential for systemic virulence of group B *Streptococcus*. *Microbial Pathogenesis* 44: 84-88.

Hibbeler, S., J. P. Scharsack und S. Becker. 2008. Housekeeping genes for quantitative expression studies in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *BioMed Central Molecular Biology* 9: 18-29.

Horibata, Y., K. Sakaguchi, N. Okino, H. Iida, M. Inagaki, T. Fujisawa, Y. Hama und M. Ito. 2004. Unique catabolic pathway of glycosphingolipids in a hydrazoan, *Hydra magnipapillata*, involving endoglycoceramidase. *Journal of Biological Chemistry* 279: 33379-33389.

Horibata, Y., N. Okino, S. Ichinose, A. Omori und M. Ito. 2000. Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel acidic endoglycoceramidase from the jellyfish, *Cyanea nozakii*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31297-31304.

Janke, C., K. Rogowski und J. Dijk. 2008. Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? *European Molecular Biology Organization* 9: 636-641.

Jansen, T., und G. Plewig. 1997. Advances and perspectives in acne therapy. *European Journal of Medical Research* 2: 321-334.

Jappe, U., E. Ingham, J. Henwood und K. T. Holland. 2002. *Propionibacterium acnes* and inflammation in acne; *P. acnes* has T-cell mitogenic activity. *British Journal of Dermatology* 146: 202-209.

Jedrzejas, M. J. 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 187-207.

John, H. E., und R. D. Price. 2009. Perspectives in the selection of hyaluronic acid fillers for facial wrinkles and aging skin. *Patient Preference and Adherence* 3: 225-230.

Jore, J. P. M., N. van Luijk, R. G. M. Luiten, M. J. van der Werf und P. H. Pouwels. 2001. Efficient transformation system for *Propionibacterium freudenreichii* based on a novel vector. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 499-503.

Jung, H. A., B. N. Su, W. J. Keller, R. G. Mertha und A. D. Kinghorn. 2006. Antioxidant xanthones from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2077-2082.

Jurenka, J. S. 2009. Anti-inflamatory properties of Curcumin, a major constituent of curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review* 14: 141-153.

Kafatos, F. C., C. W. Jones und A. Efstratiadis. 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Research* 24: 1541-1552.

Kalis, C., M. Gumenscheimer, N. Freudenberg, S. Tchaptchet, G. Fejer, A. Heit, S. Akira, C. Galanos und M. A. Freudenberg. 2005. Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *Journal of Immunology* 174: 4295-4300.

Kaneko T., K. Makimura, M. Abe, R. Shiota, Y. Nakamura, R. Kano, A. Hasegawa, T. Sugita, S. Shibuya, S. Watanabe, H. Yamaguchi, S. Abe und N. Okamura. 2007. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 3737-3742.

Kiatpapan, P., und Y. Murooka. 2002. Genetic manipulation system in *Propionibacteria*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93: 1-8.

Kim, S. Y., A. N. Semyonov, R. T. Twieg, A. L. Horwich, J. Frydman und W. E. Moerner. 2005. Probing the sequence of conformationally induced polarity changes in the molecular chaperonin GroEL with fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry* 109: 24517-24525.

King, S. J., A. G. Allen, D. J. Maskell, C. G. Dowson und A. M Whatmore. 2004. Distribution, genetic diversity, and variable expression of the gene encoding hyaluronate lyase within the *Streptococcus suis* population. *Journal of Bacteriology* 186: 4740-4747.

Kocianova, S., C. Vuong, Y. Yao, J. M. Voyich, E. R. Fischer, F. R. DeLeo und M. Otto. 2005. Key role of poly-γ-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Investigation* 3: 688-694.

Koreck, A., A. Pivarcsi, A. Dobozy und L. Kemeny. 2003. The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. *International Journal for Clinical and Investigative Dermatology* 2: 96-105.

Kuenemann-Migeot, C., F. Callais, I. Momas und B. Festy. 1997. Use of *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 and YG1021 and deconjugating enzymes for evaluating the mutagenicity from smokers' urine. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 390: 283-291.

Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S.Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi und K. Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 357: 1225-1240.

Lacks, S., und B. Greenberg. 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *Journal of Molecular Biology* 114: 153-168.

Lang, S., und M. Palmert. 2003. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *Journal of Biological Chemistry* 278: 38167-38173.

Leeming, J. P., und F. H. Notman. 1987. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 2017-2019.

Lissoni, P., F. Rovelli, F. Brivio, R. Zago, M. Colciago, G. Messina, A. Mora und G. Porro. 2009. A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus *Aloe arborescens* in patients with metastatic cancer. *In Vivo* 23: 171-176.

Magin, P., J. Adams, G. Heading, D. Pond und W. Smith. 2005. Patient´s perceptions of isotretinoin, depression and suicide. *Australian Family Physician* 34: 795-797.

Makris, G., J. D. Wright, E. Ingham und K. T. Holland. 2003. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus* - a virulence factor? *Microbiology* 150: 2005-2013.

Marx, C.J. 2008. Development of a broad-host-range *sacB*-based vector for unmarked allelic exchange. *BioMed Central Research Notes* 10: 1186-1193.

McDowell, A., A. L. Perry, P. A. Lambert und S. Patrick. 2008. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. *Journal of Medical Microbiology* 57: 218-224.

McDowell, A., S. Valenne, G. Ramage, M. M. Tunney, J. V. Glenn, G. C. McLorinan, A. Bhatia, J. F. Maisonneuve, M. Lodes, D. H. Persing und S. Patrick. 2005. *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 326-334.

Mello, L. V., B. L. de Groot, S. Li und M. J. Jedrzejas. 2002. Structure and flexibility of *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase complex with its substrate. *Journal of Biological Chemistry* 277: 36678-36688.

Miskin, J. E., A. M. Farrell, W. J. Cunliffe und K. T. Holland. 1997. *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. *Microbiology* 143: 1745-1755.

Miyoshi, A., L. G. Bermudez-Humaran, L. A. Ribeiro, Y. le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella und V. Azevedo. 2006. Heterologous expression of *Brucella abortus* GroEL heat-shock protein in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories* 5: 1-8.

Motwani, M. R., L. D. Rhein und J. L. Zatz. 2001. Differential scanning calorimetry studies of sebum models. *Journal of Cosmetic Science* 52: 211-224.

Nagy, I., A. Pivarcsi, A. Koreck, M. Szell, E. Urban und L. Kemeny. 2006. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human betadefensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll like receptors. *Journal of Dermatological Science* 124: 931-938.

Organisation for Economic Co-operation and Development. 1997. Bacterial reverse mutation test. *Organisation for Economic Co-operation and Development - guideline for testing chemicals* 71.

Otto, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* - the accidental pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7: 555-567.

Pavicic, T., U. Wollenweber, M. Farwick und H. C. Korting. 2007. Antimicrobial and -inflammatory activity and efficacy of phytosphingosine: an in vitro and in vivo study addressing acne vulgaris. *International Journal of Cosmetic Science*: 1-10.

Pfaffl, M. W., G. W. Horgan und L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 39-48.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.

Plewig, G., K. T. Holland und P. Nenoff. 2006. Clinical and bacteriological evaluation of nadifloxacin 1 % cream in patients with acne vulgaris: a double-blind, phase III comparison study versus erythromycin 2 % cream. *European Journal of Dermatology* 16: 48-55.

Relman, D. A. 2002. New technologies, human-microbe interactions, and the search for previously unrecognized pathogens. *Journal of Infetions Diseases* 186: 254-258.

Rimpf, T. 2006. Pathogenitätsfaktoren von *Propionibacterium acnes*: Wachstumsversuche und Transkriptionsstudien. Diplomarbeit, Universität Ulm.

Ross, J. I., A. M. Snelling, E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, J. J. Leyden, P. Collingnon, B. Dreno, A. Reynaud, J. Fluhr und S. Oshima. 2000. 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. *British Journal of Dermatology* 144: 339-3346.

Sabouraud, R. J. A. 1987. La seborrhee grasse et la pelade. *Annales de l´Institut Pasteur* 11: 134-159.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Sakurada, K., T. Ohata und M. Hasegawa. 1992. Cloning, expression, and characterization of the *Micromonospora viridifaciens* neuraminidase gene in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* 174: 6869-6903.

Sambrook, J., D. W. Russel, N. Irwin und K. A. Janssen 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

Schabereiter-Gurtner, C., S. Maca, S. Rölleke, K. Nigl, J. Lukas, A. Hirschl, W. Lubitz and T. Barisani-Asenbauer. 2001. 16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42: 1164-1171.

Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach und A. Pühler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73.

Shi, Q. Z., L. W. Wang, W. Zhang und Z. J. Gong. 2010. Betain inhibits toll-like receptor 4 expression in rats with ethanol-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology* 16: 897-903.

Simon, A., R.A. Ammann, G. Wiszniewsky, U. Bode, G. Fleischhack und M. M. Besuden. 2008. Taurolidine-citrate lock solution (TauroLock) significantly reduces CVAD-associated grampositive infections in pediatric cancer patients. *BioMed Central Infectious Diseases* 8: 102-109.

Smith, M. A., P. Alperstein, K. France, E. M. Vellozzi und H. D. Isenberg. 1996. Susceptibility testing of *Propionibacterium acnes* comparing agar dilution with E test. *Journal of Clinical Microbiology* 4: 1024-1036.

Snellman, E. A., E. R. Sullivan und R. R. Colwell. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter sp.* RAG-1. *European Journal of Biochemistry* 269: 5771-5779.

Steiner, B., S. Romero-Steiner, D. Cruce und R. George. 1997. Cloning and sequencing of the hyaluronate lyase gene from *Propionibacterium acnes*. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 315-321.

Straub, M. 2009. Identifikation der Pathogenitätsfaktoren in *Propionibacterium acnes* sowie der Einfluss aktiver Inhaltsstoffe auf das Wachstum weiterer Hautkeime. Diplomarbeit, Universität Ulm.

Sugita, T., H. Suto, T. Unno, R. Tsuboi, H. Ogawa, T. Shinoda und A. Nishikawa. 2001. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3486-3490.

Tartoff, K. D., und C. A. Hobbs. 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Laboratories Focus* 9: 12-16.

Thomas, P. S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 5201-5205.

Trapani, J. A., und M. J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforine/-granzyme cell death pathway.*Nature Reviews Immunology* 2: 735-747.

Trivedi, N. R., K. L. Gilliland, W. Zhao, W. Liu und D. M. Thiboutot. 2006. Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling. *Journal of Investigative Dermatology* 126: 1071-1079.

Unna, P. G. 1896. Histopathology of diseases of the skin. *Harward University Press*, Harward, USA.

Valenne, S., A. McDowell, G. Ramage, M. M. Tunney, G. G. Einarsson, S. O´Hagan, G. B. Wisdom, D. Fairley, A. Bhatia, J.-F. Maisonneuve, M. Lodes, D. H. Persing und S. Patrick. 2005. CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. *Microbiology* 151: 1369-1379.

Vogelstein, B., und D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 615-619.

Vowels, B. R., S. Yang und J. J. Leyden. 1995. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infection and Immunity* 63: 3158-3165.

Vu, H. L., S. Troubetzkoy, H. H. Nguyen, M. W. Russell und J. Mestecky. 2000. A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by (RT)-PCR and a new mathematical model for data analysis. *Nucleic Acids Research* 28: 18-26.

Vuong, C., und M. Otto. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infections* 4: 481-489.

Watanapokasin, R., F. Jarinthanan, A. Jerusalmi, S. Suksamrarn, Y. Nakamura, S. Sukseree, W. Uthaisang-Tanethpongtamb, P. Ratananukul und T. Sano. 2010. Potential of xanthones from tropical fruit Mangosteen as anti-cancer agents: caspase-dependent apoptosis induction in vitro and in mice. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 10: 298-312.

Webster, G. F., T. Poyner und B. Cunliffe. 2002. Acne vulgaris. *British Medical Journal* 325: 475-479.

Weecharangsan, W., P. Opanasopit, M. Sukma, T. Ngawhirunpat, U. Sotanaphun und P. Siripong. 2006. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). *Medical Principles and Practice* 15: 281-287.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier und D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.

Wilfinger, W. W., K. Mackey und P. Chomczynski. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22: 474-481.

Wilson, M. Microbial inhabitants of humans. 2005. *Cambridge University Press*, Cambridge, GB.

Wirths, O., T. Bethge, A. marcello, A. Harmeier, S. Jawahr, P. J. Lucassen, G. Multhaup, D. L. Brody, T. Esparza, M. Ingelsson, H. Kalimo, L. Lannfelt und T. A. Bayer. 2010. Pyroglutamate abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer´s disease cases. *Journal of Neural Transmission* 117: 85-96.

Wren, B. W., R. A. Stabler, S. S. Das, P. D. Butcher, J. A. Mangan, J. D. Clarke, N. Casali, T. Parish und N. G. Stoker. 1998. Characterization of a haemolysin from *Mycobacterium tuberculosis* with homology to a virulence factor of *Serpulina hyodysenteriae*. *Microbiology* 144: 1205-1211.

Zhang, Y. Q., S. X. Ren, H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P. Zhao, D. Qu, A. Danchin und Y. M. Wen. 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Molecular Microbiology* 49: 1577-1593.

Zouboulis, C. C., A. Eady, M. Philpott, L. A. Goldsmith, C. Orfanos, W. C. Cuncliff und R. Rosenfield. 2005. What is the pathogenesis of acne? *Experimental Dermatology* 14: 143-152.

8 Anhang

8.1 Einfluss aktiver Inhaltsstoffe auf das Wachstum von *P. acnes*

8.1.1 Vollständige Hemmung des Wachstums

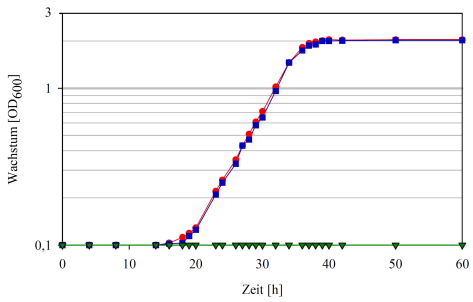

Abbildung 8.1: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit C2-Phytosphingosin-Ceramid ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ■ *P. acnes* mit 0,000 1 % C2-Phytosphingosin-Ceramid, ▼ *P. acnes* mit 0,001 % C2-Phytosphingosin-Ceramid.

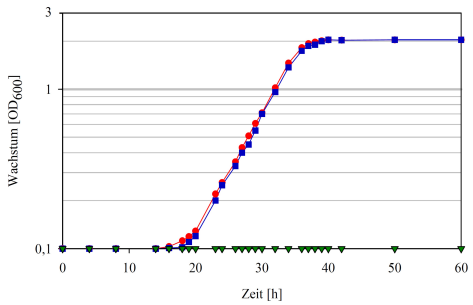

Abbildung 8.2: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Ether-Guanidinium-Verbindung ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ■ *P. acnes* mit 0,000 01 % Ether-Guanidinium-Verbindung, ▼ *P. acnes* mit 0,000 1 % C2-Phytosphingosin-Ceramid.

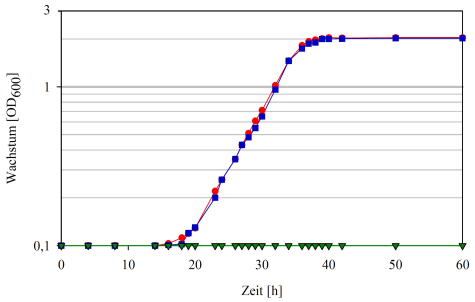

Abbildung 8.3: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Galanga-Extrakt ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ■ *P. acnes* mit 0,000 1 % Galanga-Extrakt, ▼ *P. acnes* mit 0,001 % Galanga-Extrakt.

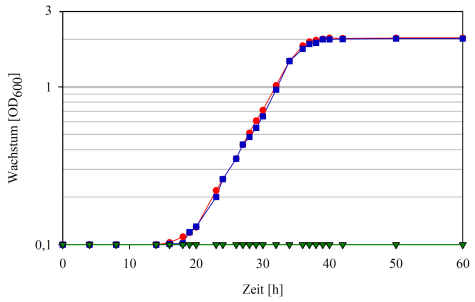

Abbildung 8.4: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit PA19-Alkyletherguanidiniumlactat ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ■ *P. acnes* mit 0,000 01 % PA19-Alkyletherguanidiniumlactat, ▼ *P. acnes* mit 0,000 1 % PA19-Alkyletherguanidiniumlactat.

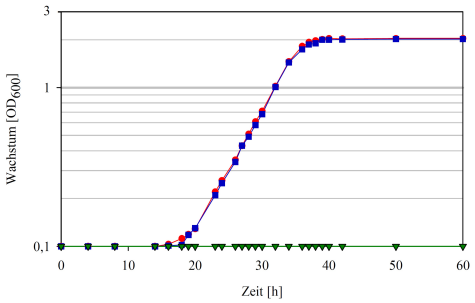

Abbildung 8.5: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Salicylsäure ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ■ *P. acnes* mit 0,000 1 % Salicylsäure, ▼ *P. acnes* mit 0,001 % Salicylsäure.

8.1.2 Kein bzw. geringer Einfluss auf das Wachstum

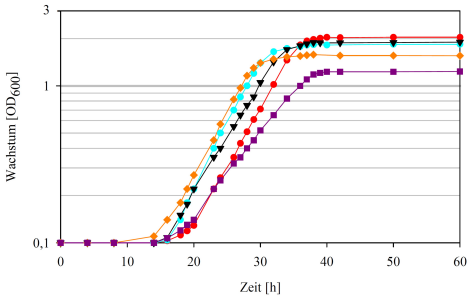

Abbildung 8.6: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit *Aloe arborescens*-Extrakt ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % *Aloe arborescens*-Extrakt, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % *Aloe arborescens*-Extrakt, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % *Aloe arborescens*-Extrakt, ■ *P. acnes* mit 1 % *Aloe arborescens*-Extrakt.

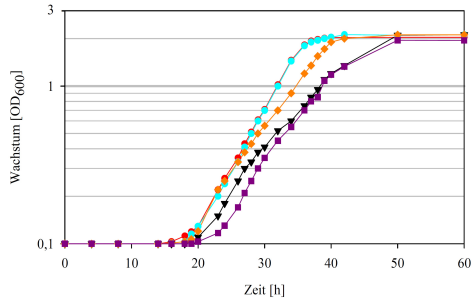

Abbildung 8.7: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Formamidopropylbetain ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Formamidopropylbetain, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Formamidopropylbetain, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Formamidopropylbetain, ■ *P. acnes* mit 1 % Formamidopropylbetain.

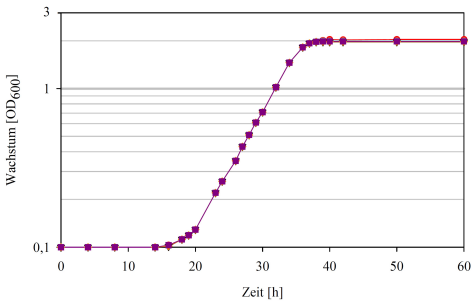

Abbildung 8.8: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit 4-Guanidinobuttersäure ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % 4-Guanidinobuttersäure, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % 4-Guanidinobuttersäure, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % 4-Guanidinobuttersäure, ■ *P. acnes* mit 1 % 4-Guanidinobuttersäure.

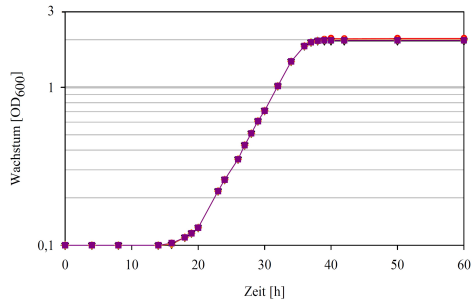

Abbildung 8.9: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Hyaluronsäure ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Hyaluronsäure, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Hyaluronsäure, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Hyaluronsäure, ■ *P. acnes* mit 1 % Hyaluronsäure.

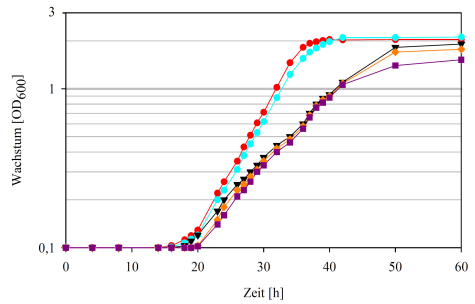

Abbildung 8.10: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Glycerin-modifizierte Hyaluronsäure ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Glycerin-modifizierte Hyaluronsäure, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Glycerin-modifizierte Hyaluronsäure, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Glycerin-modifizierte Hyaluronsäure, ■ *P. acnes* mit 1 % Glycerin-modifizierte Hyaluronsäure.

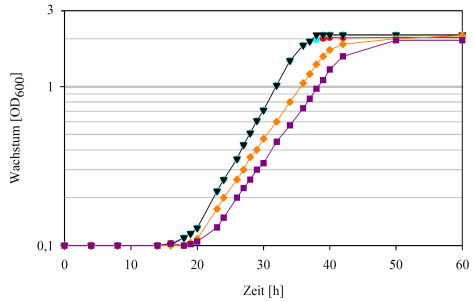

Abbildung 8.11: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Malonylamidopropylbetain ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Malonylamidopropylbetain, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Malonylamidopropylbetain, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Malonylamidopropylbetain, ■ *P. acnes* mit 1 % Malonylamidopropylbetain.

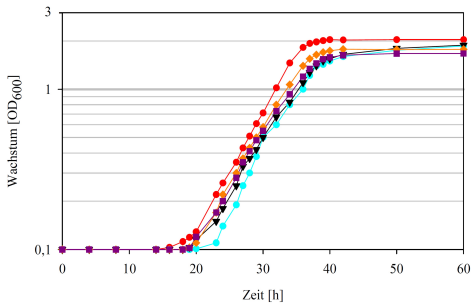

Abbildung 8.12: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Milchsäureoctylamid ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Milchsäureoctylamid, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Milchsäureoctylamid, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Milchsäureoctylamid, ■ *P. acnes* mit 1 % Milchsäureoctylamid.

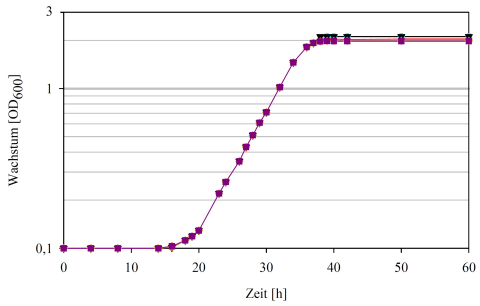

Abbildung 8.13: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit P813 ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % P813, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % P813, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % P813, ■ *P. acnes* mit 1 % P813.

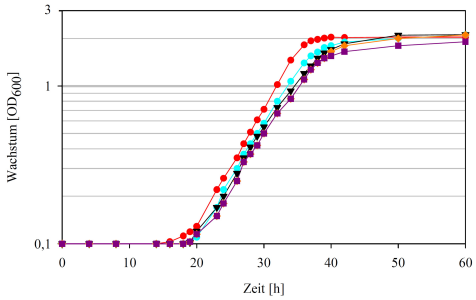

Abbildung 8.14: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit 1,2-Pentandiolmonocaprylat ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % 1,2-Pentandiolmonocaprylat, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % 1,2-Pentandiolmonocaprylat, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % 1,2-Pentandiolmonocaprylat, ■ *P. acnes* mit 1 % 1,2-Pentandiolmonocaprylat.

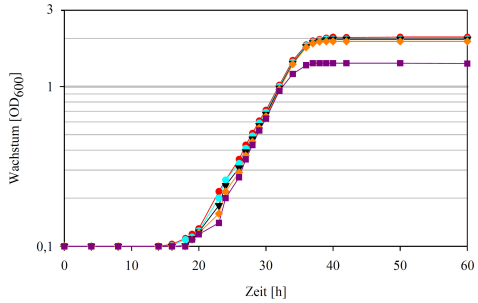

Abbildung 8.15: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Policosanol ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Policosanol, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Policosanol, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Policosanol, ■ *P. acnes* mit 1 % Policosanol.

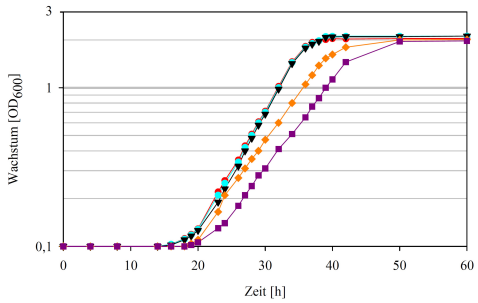

Abbildung 8.16: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Polyglutaminsäure ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Polyglutaminsäure, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Polyglutaminsäure, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Polyglutaminsäure, ■ *P. acnes* mit 1 % Polyglutaminsäure.

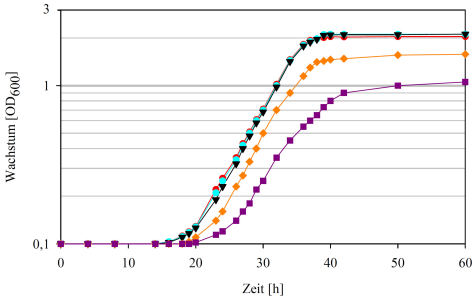

Abbildung 8.17: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Pyroglutaminsäureoctylamid ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Pyroglutaminsäureoctylamid, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Pyroglutaminsäureoctylamid, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Pyroglutaminsäureoctylamid, ■ *P. acnes* mit 1 % Pyroglutaminsäureoctylamid.

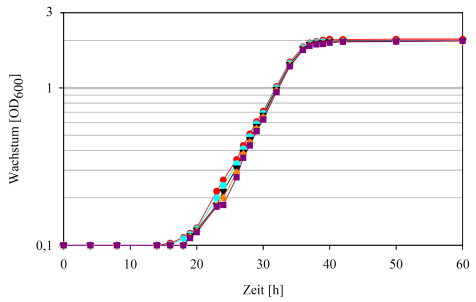

Abbildung 8.18: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Pyroglutaminsäureoctylester ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Pyroglutaminsäureoctylester, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Pyroglutaminsäureoctylester, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Pyroglutaminsäureoctylester, ■ *P. acnes* mit 1 % Pyroglutaminsäureoctylester.

8.1.3 Hemmung des Wachstums mit steigender Konzentration

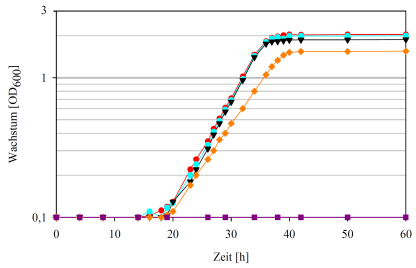

Abbildung 8.19: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Arjunolic-Säure ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Arjunolic-Säure, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Arjunolic-Säure, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Arjunolic-Säure, ■ *P. acnes* mit 1 % Arjunolic-Säure.

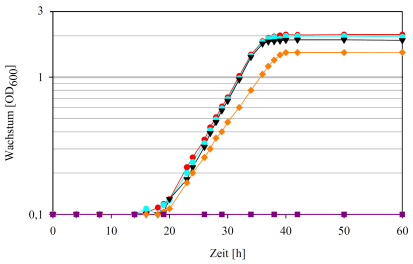

Abbildung 8.20: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Cistus-Extrakt ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Cistus-Extrakt, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Cistus-Extrakt, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Cistus-Extrakt, ■ *P. acnes* mit 1 % Cistus-Extrakt.

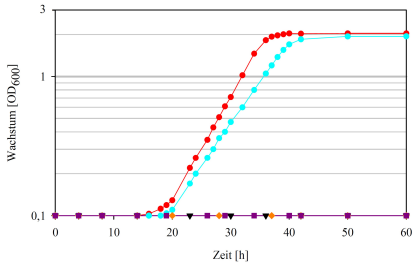

Abbildung 8.21: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit *Garcinia mangostana*-Extrakt ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % *Garcinia mangostana*-Extrakt, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % *Garcinia mangostana*-Extrakt, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % *Garcinia mangostana*-Extrakt, ■ *P. acnes* mit 1 % *Garcinia mangostana*-Extrakt.

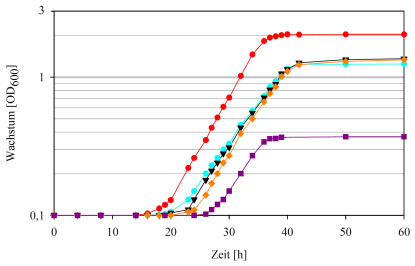

Abbildung 8.22: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit niedermolekulare Hyaluronsäure ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % niedermolekulare Hyaluronsäure, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % niedermolekulare Hyaluronsäure, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % niedermolekulare Hyaluronsäure, ■ *P. acnes* mit 1 % niedermolekulare Hyaluronsäure.

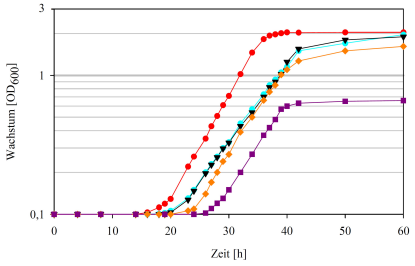

Abbildung 8.23: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit LMW-Skleroglucan ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % LMW-Skleroglucan, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % LMW-Skleroglucan, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % LMW-Skleroglucan, ■ *P. acnes* mit 1 % LMW-Skleroglucan.

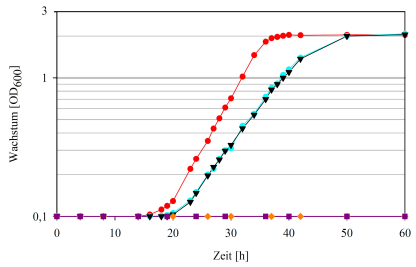

Abbildung 8.24: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Octyllactamid ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Octyllactamid, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Octyllactamid, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Octyllactamid, ■ *P. acnes* mit 1 % Octyllactamid.

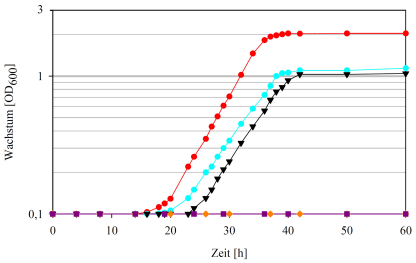

Abbildung 8.25: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Taurolidin ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Taurolidin, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Taurolidin, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Taurolidin, ■ *P. acnes* mit 1 % Taurolidin.

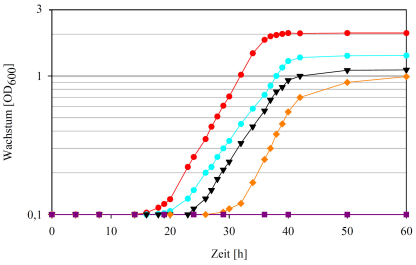

Abbildung 8.26: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Taurolidin A ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Taurolidin A, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Taurolidin A, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Taurolidin A, ■ *P. acnes* mit 1 % Taurolidin A.

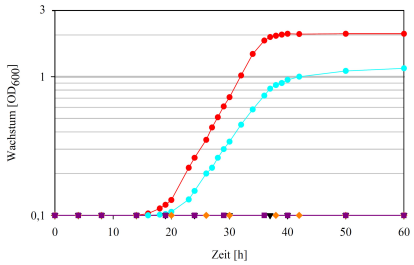

Abbildung 8.27: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Taurolidin B ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Taurolidin B, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Taurolidin B, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Taurolidin B, ■ *P. acnes* mit 1 % Taurolidin B.

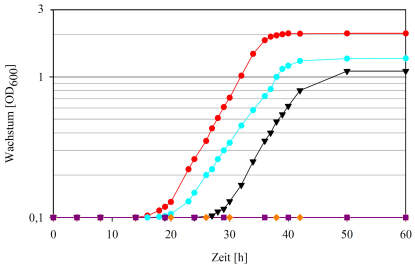

Abbildung 8.28: **Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium mit Turmeric-Öl ohne Lipide.** Symbole: ● *P. acnes*, ● *P. acnes* mit 0,001 % Turmeric-Öl, ▼ *P. acnes* mit 0,01 % Turmeric-Öl, ♦ *P. acnes* mit 0,1 % Turmeric-Öl, ■ *P. acnes* mit 1 % Turmeric-Öl.

8.2 Daten und Grafiken der Transkriptionsstudien

8.2.1 Wachtumsversuche zu den RT-PCR-Studien

***Tabelle 8.1:* Wachstum von *P. acnes*.** Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium unter Zugabe von aktiven Inhaltsstoffen und Lipiden.

Inhaltsstoff	ohne Lipide		mit Lipide	
		Endmasse		Endmasse
Stamm	µ[h^{-1}]	[mg/ml]	µ[h^{-1}]	[mg/ml]
ohne Inhaltsstoff	0,180	0,903	0,211	1,040
Aloe arborescens-Extrakt	1,076	0,882	0,955	1,045
Arjunolic-Säure	1,231	0,882	1,223	0,90
LMW-Skleroglucan	0,374	0,66	0,273	0,72
nierdermolekulare Hyaluronsäure	0,953	0,884	1,076	0,93
Taurolidin A	0,606	0,37	0,527	0,44
Cistus-Extrakt	0,439	0,41	0,495	0,50

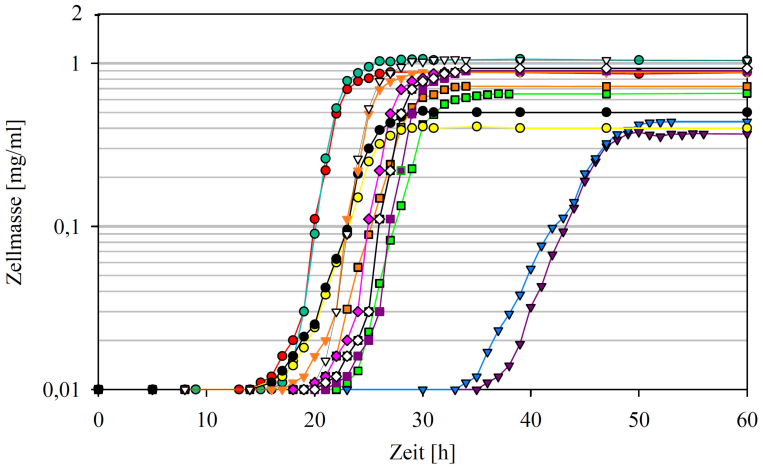

***Abbildung 8.29:* Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium.** Symbole: ● ohne Lipide, ● mit Lipide, ▼ Taurolidin A, ▼ Taurolidin A mit Lipide, ■ LMW-Skleroglucan, ■ LMW-Skleroglucan mit Lipide, ● Cistus-Extrakt, ● Cistus-Extrakt mit Lipide, ▼ *Aloe arborescens*-Extrakt, ○ *Aloe arborescens*-Extrakt mit Lipide, ■ Arjunolic-Säure, ■ Arjunolic-Säure mit Lipide, ♦ niedermolekulare Hyaluronsäure, □ niedermolekulare Hyaluronsäure mit Lipide.

8.2.2 Wachtumsversuche zu den qRT-PCR-Studien

***Tabelle 8.2:* Wachstum von *P. acnes*.** Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium unter Zugabe von aktiven Inhaltsstoffen und Lipiden.

Inhaltsstoff	ohne Lipide		mit Lipide	
		Endmasse		Endmasse
Stamm	µ[h^{-1}]	[mg/ml]	µ[h^{-1}]	[mg/ml]
ohne Inhaltsstoff	0,180	0,903	0,211	1,040
LMW-Skleroglucan	0,374	0,66	0,273	0,72
Taurolidin A	0,606	0,37	0,527	0,44

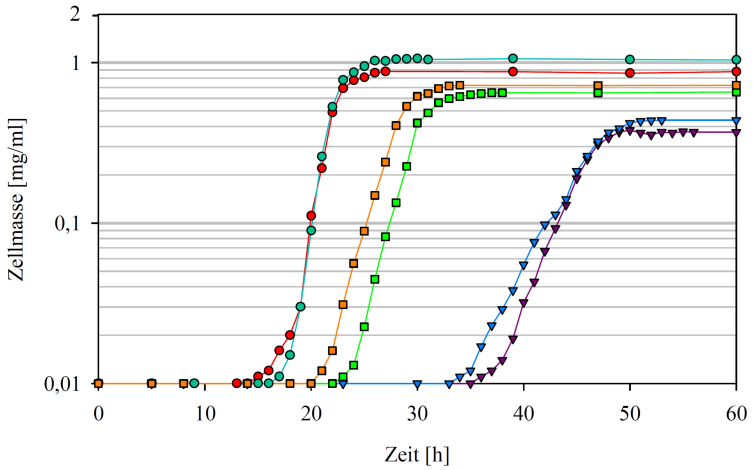

***Abbildung 8.30:* Wachstum von *P. acnes* in PYG-Komplexmedium.** Symbole: ● ohne Lipide, ● mit Lipide, ▼ Taurolidin A, ▼ Taurolidin A mit Lipide, ■ LMW-Skleroglucan, ■ LMW-Skleroglucan mit Lipide.

8.2.3 cp-Werte qRT-PCR-Studien

Tabelle 8.3: **Daten der qRT-PCR-Studien**

Gen	Genprodukt	m	E	PYG	LMW	T. A	PYG + L.	LMW + L.	T. A + L.
PPA0010	Gyrase A	-3,811	1,83	28,94	24,11	24,68	29,39	23,48	24,29
PPA2417	16S rRNA	-2,838	2,25	15,20	10,81	10,13	15,42	9,25	11,39
PPA0687	CAMP-Faktor	-3,995	1,78	24,07	19,02	22,83	17,88	23,19	23,82
PPA1198	CAMP-Faktor	-3,013	2,15	24,97	26,21	25,68	24,25	24,8	28,23
PPA1231	CAMP-Faktor	-3,226	2,04	24,55	20,05	19,68	24,3	21,68	20,51
PPA1340	CAMP-Faktor	-3,926	1,80	31,42	28,71	25,86	31,68	22,92	24,53
PPA2108	CAMP-Faktor	-3,472	1,94	29,68	27,53	27,54	29,1	26,26	29,31
PPA0565	potentielles Hämolysin	-3,030	2,14	26,69	28,09	24,73	26,8	23,92	25,63
PPA0938	potentielles Hämolysin	-3,164	2,07	26,09	24,28	24,17	25,84	22,83	25,48
PPA1396	potentielles Hämolysin	-3,264	2,02	29,02	32,06	25,25	27,34	23,89	28,9
PPA0453	GroEL	-3,739	1,85	23,81	19,8	20,7	29,85	23,86	17,81
PPA0916	DnaJ	-3,908	1,80	26,07	26,7	23,35	24,51	23,76	24,01
PPA1098	DnaK	-3,206	2,05	24,87	23,12	22,76	22,13	21,86	21,99
PPA1772	GroEL2	-3,971	1,79	23,71	23,91	21,87	22,12	21,61	23,83
PPA2040	DnaK	-3,495	1,93	25,77	30,67	20,84	22,3	24,65	21,17
PPA1906	Adhäsionsfaktor	-3,460	1,95	28,60	36,41	26,08	27,35	23,66	27,36
PPA1983	Adhäsionsfaktor	-3,501	1,93	26,44	25,03	24,22	24,08	22,03	26,84
PPA0380	Hyaluronat-Lyase	-3,261	2,03	31,32	35,12	32,1	31,12	23,1	32,09
PPA0644	Endoglycoceramidase	-3,149	2,08	25,81	23,6	24,65	23,46	22,16	24,53
PPA0684	Sialidase L	-2,624	2,40	29,18	23,3	26,5	29,56	24,33	30,89

Fortsetzung folgt

Tabelle 8.3: Fortsetzung

Gen	Genprodukt	m	E	PYG	LMW	T. A	PYG + L.	LMW + L.	T. A + L.
PPA0685	Sialidase A	-3,718	1,86	25,10	20,24	24,71	24,68	25,26	29,64
PPA1560	Sialidase	-3,430	1,96	30,46	33,25	29,55	29,21	24,22	30,89
PPA1796	*gehA*-Homolog	-3,274	2,02	30,71	35,45	30,68	29,28	23,6	26,78
PPA2105	*gehA*-Lipase	-3,020	2,14	30,29	38,62	27,53	32,48	24,38	26,48
PPA2106	Endoglycoceramidase	-4,330	1,70	23,51	20,75	25,19	23,31	22,91	22,07
PPA1715	Wirtsinteraktionsfaktor	-3,937	1,79	24,11	24,8	24,53	23,58	23,14	28,91
PPA1880	Wirtsinteraktionsfaktor	-3,441	1,95	26,50	26,68	25,5	26,87	23,92	25,26
PPA2127	Wirtsinteraktionsfaktor	-3,217	2,05	28,34	25,92	24,69	26,29	23,9	23,08
PPA2130	Wirtsinteraktionsfaktor	-3,633	1,88	26,67	25,6	24,62	26,51	24,53	27,55
PPA2210	Wirtsinteraktionsfaktor	-3,326	2,00	28,20	30,06	25,74	27,6	22,58	26,53
PPA0737	Antigen	-3,194	2,06	29,34	30,27	26,85	26,69	26,72	26,69
PPA0765	Antigen	-3,808	1,83	26,87	24,05	24,53	25,97	25,4	23,61

Anmerkung:m: Steigung, E: Effizienz, PYG: PYG-Komplexmedium, LMW: LMW-Skleroglucan, T. A: Taurolidin A., L.: Lipide.

8.3 Weitere Informationsquellen

Im Folgenden sind weitere benutzte Informationsquellen[1] und Computerprogramme aufgeführt.

Internetadressen:
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: http://www.genome.jp
National Center for Biotechnological Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Prokaryotic Database of Gene Regulation: http://www.prodoric.de
Fermentas GmbH: http://fermentas.com/en/tools/doubledigest
Basic Local Alignment Search Tool: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi
Finnzymes Oy: https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html

[1]Stand: 6. April 2010

Programme:
Clone Manager 7: Scientifical Educational Software; Cary, USA
Data Analysis 3.5.28: Roche; Penzberg
Enhance Map Draw 4: Scientifical Educational Software; Cary, USA
SigmaPlot 8.0: SYSTAT Software; Erkrath

8.4 Größenstandards

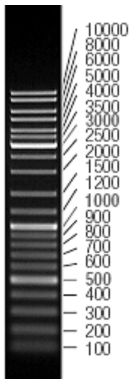

Abbildung 8.31: „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH; St. Leon-Rot. Angaben in Basenpaaren.

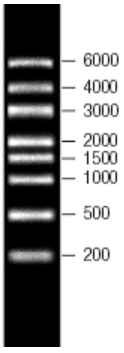

Abbildung 8.32: „RNA Ladder™, High Range“, Fermentas GmbH; St. Leon-Rot. Angaben in Basen.

9 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Peter Dürre für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit an seinem Institut, für das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten und für die Diskussionen bezüglich meiner Arbeit. Auch für die immer gute Stimmung bei diversen Institutsfeiern und die gute Unterhaltung bei Zugfahrten.

Ich danke Prof. Dr. Bernhard Eikmanns für die Übernahme des Korreferates und auch für die Hilfe bei meinem S2-Antrag.

Ein großer Dank auch an die Evonik GmbH, die einen Teil dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hatte. Danke an Dr. Tim Köhler und Dr. Mike Farwick für die Betreuung und Ratschläge und an Heiko Andrea für die tolle Unterstützung und Hilfe bei den LightCycler®-Experimenten!

Vielen Dank auch an Melanie Straub, zum einen für das Korrigieren dieser Arbeit und zum anderen für die tollen Ergebnisse und die gute Arbeit als Diplomandin an „meinem“ Thema!

Ein Dank geht natürlich auch an ...

... Bettina für das Durchlesen eines Teils des Skripts und an Alex, wir drei waren die intellektuellste WG Ulms.

... Fenja für die Korrektur der Zusammenfassung.

... unsere Sekretärin Anne und an die Arbeitsgruppe und das Institut, besonders Dominik und Marc.

... Katharina für die Leihgabe der Vorlesungsskripte.

... Manu mit Peter, Hannes und Leander. Mir wurde es nie langweilig, da ich ja immer als Briefträger, Tierpfleger, Möbelpacker oder Babysitter zu tun hatte.

... alle, die sich immer wieder nach dem Stand der Dinge erkundigten, und die mir außerhalb der Universität bei dem einen oder anderen Problem beigestanden haben: Kathrin, Michael, Sebastian und Henning.

... meinen Bruder Dieter für die Hilfe bei der Formatierung mit LaTeX.

Ein großer Dank geht natürlich besonders an meine Eltern für die gesamte bisherige Unterstützung, vor allem während des Studiums. Mit zwei Doktoranden ist es auch nicht einfach ...

Lebenslauf

3. März 1980	Geburt in Giengen an der Brenz
1986-1990	Besuch der Grundschule Lina-Hähnle-Schule (früher Schwageschule), Giengen
1990-1999	Besuch des Margarete-Steiff-Gymnasiums, Giengen
06.1999	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
07.1999-06.2000	Zivildienst bei der Arbeiterwohlfahrt, Kreisverband Heidenheim
09.2000	Immatrikulation an der Universität Ulm im Fach Biologie
08.2002-11.2002	Diplomvorprüfungen in den Fächern Zoologie, Botanik, Mikrobiologie, Chemie und Physik
12.2004-09.2005	Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie (Hauptfach), Molekularbiologie, Pharmakologie und Betriebswirtschaftslehre
12.2005-08.2006	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Ulm zum Thema: Pathogenitätsfaktoren von *Propionibacterium acnes*: Wachstumsversuche und Transkriptionsstudien
09.2006	Beginn der Promotion am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Ulm zum Thema: Einfluss von Lipiden und aktiven Inhaltsstoffen auf Wachstum und Expression von Pathogenitätsfaktoren in *Propionibacterium acnes*, sowie Konstruktion von Deltionsmutanten. Einfluss aktiver Inhaltsstoffe auf das Wachstum von Hautkeimen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben. Alle Zitate sind gekennzeichnet, und alle Abbildungen enthalten nur die originalen Daten und sind in keinem Fall inhaltsverändernder Bildarbeiten unterzogen worden. Alle existierenden Exemplare der vorliegenden Dissertation sind in Wort und Bild übereinstimmend.

Ulm, April 2010

Thomas Rimpf