

Untersuchung der Adhäsion von Corynebakterien an humane Haut

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
-Abteilung Lebensmittelchemie-
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Corinna Schröder

aus Hamburg

Hamburg 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1999 bis Mai 2002 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, an der Universität Hamburg in Kooperation mit der Forschung & Entwicklung cosmed der Beiersdorf AG Hamburg (Leiter Herr Dr. K.-P. Wittern), Funktion Forschung cosmed (Leiter Herr Dr. H. Wenck), in der Abteilung Forschung Körperpflege (Leiter Herr Dr. R. Schmucker) unter Betreuung von Frau Dr. C. Meier, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Bisping

Tag der Disputation: 05.07.2002

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Möglichste getan hat.*

Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich dem Leiter der Forschung & Entwicklung Herrn Dr. K.-P. Wittern für die Möglichkeit danken, diese Dissertation am Paul Gerson Unna-Forschungszentrum der Beiersdorf AG anzufertigen. Ein großer Dank gilt Herrn Dr. H. Wenck, dem Leiter der Funktion Forschung, und Herrn Dr. R. Schmucker, dem Leiter der Abteilung Forschung Körperpflege, für ihr stetes Interesse an dieser Arbeit und ihre konstruktiven Ideen.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. C. Meier-Zimmerer für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Durch die intensive Einbeziehung in das Laborgeschehen, ihre Ratschläge und Anregungen sowie durch ihre wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit wurde diese Dissertation zu einer sehr interessanten, spannenden und lehrreichen Zeit für mich. Herzlich danken möchte ich ihr für ihre stetige Diskussionsbereitschaft und die vielen anregenden Gespräche.

Ein großer Dank gebührt Frau H. Fölster für ihre Unterstützung durch das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit. Danken möchte ich ihr darüber hinaus für die vielen aufmunternden Gespräche, die die Arbeit im letzten Jahr begleiteten.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich beim gesamten Team der Abteilung Forschung Körperpflege für die herzliche Atmosphäre bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank den Mitarbeitern des Gebäudes 371, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danken möchte ich Herrn H.-J. Düsing für die Hilfe bei der Berechnung der Polaritäten verschiedener Lipide.

Allen bisher nicht genannten Mitarbeiter der Beiersdorf AG, deren Unterstützung ich in Anspruch nahm, danke ich, besonders den Probanden, die sich mit ihrer Spende von Hautlipiden an den durchgeführten Untersuchungen beteiligten. Darüber hinaus gilt ein herzlicher Dank der Testorganisation und dem Probandeneinsatz, die mich bei der Planung von Probandentests unterstützten.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die ständige Unterstützung und Rücksichtnahme während des Studiums und der Dissertation.

Meinem Freund J. Ilseman danke ich ganz herzlich für seine Geduld und Unterstützung, durch die meine Konzentration auf diese Arbeit nicht besser hätte gewährleistet sein können.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart für die Betreuung meiner Dissertation und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. B. Bisping für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC-Medium	Allgemeines Corynebakterien Medium
AK	Arbeitskreis
arcsec	Winkelsekunde
BSA	Rinderserum (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Corynebacterium
ca.	circa
Cer	Ceramid
cm	Zentimeter
Co	Columbia Nährboden
Co+T	Columbia + Tween Nährboden
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dest.	destilliert
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DOPC	Dioleoyl phosphatidylcholine
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
ed./eds.	Herausgeber (editor/editors)
EtOH	Ethanol
evt.	eventuell
FCS	foetales Rinderserum (fetal bovine (calf) serum)
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glucose
h	Stunde
HaCaT	Keratinozytenzelllinie (human adolscent calcium transformed cells)
HPTLC	Hochleistung-Dünnschichtchromatographie (high performance thin-layer chromatography)
Hrsg.	Herausgeber
IntOD	Integrierte optischen Dichte
KGM	Keratinozyten Wachstumsmedium (Keratinocyte Growth Medium)
konz.	konzentriert
LogP(ow)	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
M	Mol
MeOH	Methanol
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute

mL	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
NANA	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
p.A.	pro Analysis, analysenrein
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS/T	Phosphat gepufferte Salzlösung + Tween
RMA	ResonanzspiegelAffinometrie (Resonant Mirror Affinometrie)
RP	hydrophobe Umkehrphase (reversed phase)
RPM	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RYD	Arg-Tyr-Asp Tripeptid-Sequenz
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
S.	Staphylococcus
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
sp	Spacer
Tab.	Tabelle
UV	ultraviolett
u.v.a.	und viele andere
v	Volumen
v.a.	vor allem
w	Gewicht
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zur Zeit
µL	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	1
1.2. Die Mikroflora der Haut	5
1.3. Bakterielle Adhäsion	8
1.4. Glykolipide	11
1.5. Lipidzusammensetzung des Stratum corneums	12
1.6. Ziel der Arbeit	15
2. METHODEN	18
2.1. Sterilisation	18
2.2. Bakterienkultivierung	18
2.2.1. Stammhaltung	18
2.2.2. Bakterienanzucht	18
2.2.3. Markierung von Bakterien (Färbung mit DAPI)	19
2.3. Gewinnung von humanen Corneozyten	19
2.4. Kultivierung von Keratinozyten (Zellkultur)	20
2.4.1. HaCaT-Zellen	20
2.4.2. Humane Keratinozyten	20
2.5. Isolierung von Hautlipiden	21
2.5.1. Isolierung von Lipiden aus Corneozyten und Keratinozyten	21
2.5.2. Gewinnung von Lipiden direkt von der Hautoberfläche	21
2.6. Mikroskopische Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an das Stratum corneum	22
2.7. Nachweismethode für die Adhäsion von Bakterien an immobilisierte Ganglioside und Lipide	22
2.7.1. Auftragen von Gangliosiden und Lipiden auf HPTLC-Platten	22
2.7.2. Dünnschichtchromatographie	23
2.7.3. Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen	23
2.7.4. HPTLC-Overlay Assay mit DAPI-markierten Bakterien	24
2.7.5. Anfärben der Chromatogramme	24
2.7.5.1. Kupfersulfat-Färbung	24
2.7.5.2. Anisaldehyd-Färbung	25
2.8. Untersuchung der bakteriellen Adhäsion mit dem optischen Biosensor IAsys plus	25
2.8.1. Messprinzip des Resonanzspiegels	27

2.8.2. Der Bindungszyklus	30
2.8.3. Der Bindungsassay an Biotin-Küvetten.....	32
2.8.4. Bakterienaufarbeitung.....	33
2.8.5. Immobilisierung des NeutrAvidins™.....	33
2.8.6. Bindung von biotinylierten Liganden an die NeutrAvidin™-Oberfläche	34
2.8.7. Adhäsion von Corynebakterien.....	35
2.8.8. Regeneration der Biotinküvette.....	35
2.9. Statistik	35
3. ERGEBNISSE	36
3.1. Mikroskopische Untersuchung der Adhäsion von Corynebakterien an Stratum corneum.....	36
3.2. Nachweis der bakteriellen Adhäsion an Ganglioside mittels HPTLC und Overlay-Assay	37
3.2.1. Optimierung der Methode zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an Ganglioside mittels HPTLC	37
3.2.1.1. Optimierung des Fließmittels.....	37
3.2.1.2. Optimierung der Extraktgewinnung	39
3.2.2. Untersuchung der Bindungsaffinität von C. group G (86) an Ganglioside.....	42
3.2.3. Untersuchung der Bindungseigenschaften von Corynebakterien an Lipidextrakte	44
3.3. Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an Lipide mittels HPTLC und Overlay Assay	47
3.3.1. Optimierung der Methode zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an Lipide mittels HPTLC / Overlay Assay	47
3.3.1.1. Untersuchung des Einflusses von Plexigum auf den Overlay Assay mit Lipiden	47
3.3.1.2. Optimierung der HPTLC-Platten und Anpassung des Fließmittels.....	49
3.3.1.3. Untersuchung des Einflusses der Wachstumsphase von Bakterien und der Nährmedien auf den Overlay-Assay.....	51
3.3.2. Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien zu Hautlipiden.....	53
3.3.3. Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an strukturverwandte Lipide zur genaueren Charakterisierung der genutzten Rezeptorstruktur.....	60
3.3.4. Untersuchung von Probandenextrakten.....	73

3.4. Untersuchung der bakteriellen Adhäsion mit dem optischen Biosensor IAsys plus	77
3.4.1. Vorbereitung der Küvette: Anlagerung von NeutrAvidin™ an die Biotin-Oberfläche	79
3.4.2. Untersuchung der Bindungsaffinität der Corynebakterien zur NeutrAvidin™-Oberfläche	80
3.4.3. Anlagerung von biotinylierten Substanzen an die NeutrAvidin™-Oberfläche und Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien	84
3.4.4. Untersuchung des Einflusses von Methanol auf die NeutrAvidin™-Oberfläche	87
3.4.5. Anlagerung von Methanol löslichen biotinylierten Substanzen an die NeutrAvidin™-Oberfläche und Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien.....	89
4. DISKUSSION	91
4.1. Bakterielle Adhäsionseigenschaften an Ganglioside	91
4.2. Bakterielle Adhäsionseigenschaften an Lipide	98
4.3. Einsatz des optischen Biosensor IAsys plus zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion	107
4.4. Zusammenfassende Diskussion	113
5. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	115
5.1. Zusammenfassung.....	115
5.2. Summary	117
6. LITERATUR	119
7. ANHANG	131
7.1. Material.....	131
7.1.1. Geräte und Software.....	131
7.1.1.1. Bakterienstammhaltung, Kultivierung und Identifikation	131
7.1.1.2. HPTLC und Overlay Assay.....	131
7.1.1.3. IAsys plus	132
7.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	132
7.1.2.1. Chemikalien.....	133
7.1.2.2. Bakterienstämme	134
7.1.2.3. Reagenzien für die Bakterienkultivierung	134
7.1.2.4. Glykolipide (HPTLC).....	134
7.1.2.5. Biotinylierte Substanzen (IAsys plus)	135
7.1.2.6. Reagenzien für die Zellkultur	135

7.1.2.7. Verbrauchsmaterial	137
7.1.3. Medien, Puffer und Lösungen	137
7.1.3.1. Feste und flüssige Medien zur Anzucht von Corynebakterien	137
7.1.3.2. Puffer und Lösungen für die Bakterienaufarbeitung und Färbung	138
7.1.3.3. Sterile Puffer und Lösungen für die Zellkultur	139
7.1.3.4. Puffer für die Corneozytenabspülung	140
7.1.3.5. Puffer und Lösungen für die HPTLC	140
7.1.3.6. Puffer und Lösungen für die Untersuchungen mit dem IAsys plus	141
7.1.4. Entsorgung eingesetzter Chemikalien und Einwegartikel	141
7.2. Arbeitsvorschriften	142
7.2.1. Sterilisation	142
7.2.2. Bakterienkultivierung	142
7.2.2.1. Anlage von Glycerinkulturen	142
7.2.2.2. Kultur auf Agarplatte	142
7.2.2.3. Markierung von Bakterien (Färbung mit DAPI)	143
7.2.3. Gewinnung von humanen Corneozyten	143
7.2.4. Kultivierung von Keratinozyten (Zellkultur)	144
7.2.4.1. HaCaT-Zellen	144
7.2.4.1.1. Kultivierung	144
7.2.4.1.2. Passagieren	144
7.2.4.1.3. Einfrieren	146
7.2.4.1.4. Auftauen	146
7.2.4.2. Humane Keratinozyten	146
7.2.4.2.1. Isolierung epidermaler Keratinozyten	146
7.2.4.2.1.1. Dispase-Verdau	147
7.2.4.2.1.2. Trypsin-Verdau	148
7.2.4.2.1.3. Aussähen der isolierten Keratinozyten	148
7.2.4.2.2. Kultivierung	149
7.2.4.2.3. Passagieren	149
7.2.4.2.4. Einfrieren	150
7.2.4.2.5. Auftauen	150
7.2.5. Isolierung von Hautlipiden	150
7.2.5.1. Isolierung von Lipiden aus Corneozyten und Keratinozyten	150
7.2.5.2. Gewinnung von Lipiden direkt von der Hautoberfläche	151
7.2.6. Mikroskopische Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an das Stratum corneum	152
7.2.7. Nachweismethode für die Adhäsion von Bakterien an immobilisierte Ganglioside und Lipide durch HPTLC	153
7.2.7.1. Auftragen von Gangliosiden und Lipiden auf HPTLC-Platten	153
7.2.7.2. Dünnschichtchromatographie	154
7.2.7.3. Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen	155

7.2.7.4. HPTLC-Overlay Assay mit DAPI markierten Bakterien	155
7.2.7.5. Chromatographische Färbeverfahren.....	156
7.2.7.5.1. Kupfersulfat-Färbung	156
7.2.7.5.2. Anisaldehyd-Färbung.....	156
7.2.8. Untersuchung der bakteriellen Adhäsion mit dem optischen Biosensor IAsys plus.....	156
7.2.8.1. Bakterienaufarbeitung	156
7.2.8.2. Immobilisierung des NeutrAvidins™	157
7.2.8.3. Bindung von biotinylierten Liganden.....	157
7.2.8.4. Adhäsion von Corynebakterien	158
7.2.8.5. Regeneration der Biotinküvette	159
7.3. Tabellen.....	160
7.3.1. Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (86) an verschiedene Ganglioside.....	160
7.3.2. Untersuchung des Einflusses der Wachstumsphase von Bakterien auf den Overlay-Assay.....	160
7.3.3. Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien zu Hautlipiden.....	161
7.3.3.1. Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) zu Hautlipiden.....	161
7.3.3.2. Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (48) zu Hautlipiden.....	162
7.3.3.3. Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171) zu Hautlipiden ..	163
7.3.3.4. Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (96) zu Hautlipiden.....	165
7.3.3.5. Bindungsaffinität von <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651) zu Hautlipiden	166
7.3.4. Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien zu verschiedenen Lipidstandards	167
7.3.4.1. Erste Standardgruppe, Abb. 37	167
7.3.4.1.1. Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) zu verschiedenen Lipiden.....	167
7.3.4.1.2. Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (48) zu verschiedenen Lipiden	169
7.3.4.1.3. Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171) zu verschiedenen Lipiden.....	170
7.3.4.1.4. Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (96) zu verschiedenen Lipiden	171
7.3.4.1.5. Bindungsaffinität von <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651) zu verschiedenen Lipiden.....	173
7.3.4.2. Zweite Standardgruppe, Abb. 41	174
7.3.4.2.1. Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) zu verschiedenen Lipiden.....	174
7.3.4.2.2. Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (48) zu verschiedenen Lipiden	175
7.3.4.2.3. Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171) zu verschiedenen Lipiden.....	177
7.3.4.2.4. Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (96) zu verschiedenen Lipiden	178

7.3.4.2.5. Bindungsaffinität von <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651) zu verschiedenen Lipiden.....	179
7.3.4.3. Dritte Standardgruppe, Abb. 44.....	181
7.3.4.3.1. Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) zu verschiedenen Lipiden.....	181
7.3.4.3.2. Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (48) zu verschiedenen Lipiden.....	182
7.3.4.3.3. Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171) zu verschiedenen Lipiden.....	183
7.3.4.3.4. Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (96) zu verschiedenen Lipiden.....	185
7.3.4.3.5. Bindungsaffinität von <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651) zu verschiedenen Lipiden.....	186

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der epidermalen Differenzierung (MONTAGNA <i>et al.</i> , 1992).....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung einer Plasmamembran einer eukaryontischen Zelle (VOET und VOET, 1994).	9
Abb. 3: Aufbau von Gangliosiden am Beispiel des Cerebrosides (RÖMPP, 1997).....	11
Abb. 4: Zuckerstrukturen (Ganglioside), die in dieser Arbeit als mögliche Rezeptoren für die bakterielle Adhäsion getestet wurden (ABUL-MILH <i>et al.</i> , 1999; WIESNER und SWEELEY, 1995).	12
Abb. 5: Hautlipide (RÖMPP, 1997).	13
Abb. 6: Unspezifische Adhäsion – Ablösen der Bakterien durch hydrophobe Wechselwirkung.	16
Abb. 7: Spezifische Wechselwirkung – Verhinderung der bakteriellen Besiedelung.	16
Abb. 8: Teflonvorrichtung zum Abspülen von Corneozyten.....	19
Abb. 9: Der optische Biosensor IAsys plus von Affinity Sensor	25
Abb. 10: Die Doppelküvette vom IAsys plus.....	26
Abb. 11: Querschnitt durch eine Küvette mit optischen Komponenten.....	27
Abb. 12: Prinzipieller Aufbau des Resonant-Mirror-Systems.....	28
Abb. 13: Verschiebung des Resonanzwinkels während eines Messvorganges.	29
Abb. 14: Darstellung eines möglichen Bindungszyklus	30
Abb. 15: Typisches Bindungsprofil des Ligates nach der Immobilisierung des Liganden gemessen mit dem IAsys plus.....	31
Abb. 16: Schematische Darstellung des Bindungsassays an Biotin-Küvetten (Sandwich-ELISA).....	32
Abb. 17: Bindung von <i>C. group G</i> (86) an Stratum corneum.....	36
Abb. 18: Wirkung von CaCl_2 auf die Trennung von Gangliosiden.	38
Abb. 19: Auswirkung der Fließmittelzusammensetzung auf die Trennung der Ganglioside.	38
Abb. 20: Vergleich der Extraktaufarbeitungen von Keratinozyten mit und ohne Stickstoff.	41
Abb. 21: Beispiel für eine HPTLC-Platte zur Bestimmung der minimalen Konzentration an Glykolipiden für die Adhäsion von <i>C. group G</i> (86).	42
Abb. 22: Konsensussequenz der Glykolipide für <i>C. group G</i> (86).	43
Abb. 23: Chromatogramme von Gangliosidstandards und Lipidextrakten nach CuSO_4 -Färbung und Overlay Assay mit <i>C. group G</i> (86).	45
Abb. 24: Chromatogramme von dotierten Lipidextrakten nach CuSO_4 -Färbung und Overlay Assay mit <i>C. group G</i> (86).	46
Abb. 25: Einfluss der Plexigum-Konzentration auf die Bindung von <i>C. group G</i> (86) an ausgewählte Lipide bei einer Eintauchzeit von 1 min.	48
Abb. 26: Einfluss der Eintauchzeit in eine 0,5 %ige Plexigum-Lösung auf die Bindung von <i>C. group G</i> (86) an ausgewählte Lipide.....	48
Abb. 27: Auftrennung von Hautlipiden auf einer Kieselgelplatte mit einer Kombination aus drei Fließmitteln nach SCHÜRER <i>et al.</i> (1995).....	50

Abb. 28: Überprüfung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (86) an Lipide in Abhängigkeit von der Wachstumsphase am Beispiel von Cholesterol-3-sulfat.	52
Abb. 29: Beispiel für eine HPTLC-Platte mit Hautlipid-Standards nach Überschichtung mit <i>C. group G</i> (45).....	54
Abb. 30: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an verschiedene Hautlipide.....	55
Abb. 31: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (48) an verschiedene Hautlipide.....	56
Abb. 32: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171) an verschiedene Hautlipide.....	56
Abb. 33: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (96) an verschiedene Hautlipide.....	57
Abb. 34: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651) an verschiedene Hautlipide.....	57
Abb. 35: Abstufung der Bindungsstärke von Corynebakterien an Hautlipide.	58
Abb. 36: Vergleich der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) mit dem prozentualen Vorkommen von Hautlipiden nach LAMPE <i>et al.</i> , 1983	60
Abb. 37: Erstes Beispiel für eine HPTLC-Platte mit verschiedenen Lipidstandards nach Überschichtung mit <i>C. group G</i> (45).....	61
Abb. 38: Vergleich der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an Cholesterol, Stearinsäure und Cholesteryl-stearat.....	62
Abb. 39: Vergleich der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an verschiedene Cholesteryl-ester.....	64
Abb. 40: Vergleich der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an Ölsäure, Stearinsäure und Behensäure.....	65
Abb. 41: Zweites Beispiel für eine HPTLC-Platte mit Lipidstandards nach Überschichtung mit <i>C. group G</i> (45).....	66
Abb. 42: Vergleich der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an C18-Säuren mit unterschiedlicher Anzahl Doppelbindungen in cis- oder trans-Stellung.....	67
Abb. 43: Vergleich der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an Verbindungen unterschiedlicher Polarität.....	68
Abb. 44: Drittes Beispiel für eine HPTLC-Platte mit Lipidstandards nach Überschichtung mit <i>C. group G</i> (45).....	70
Abb. 45: Vergleich der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an verschiedene Sulfatverbindungen I.....	71
Abb. 46: Vergleich der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an verschiedene Sulfatverbindungen II.....	72
Abb. 47: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171) mittels Overlay-Assay an Hautextrakten des weiblichen Probandenpools.....	75
Abb. 48: Untersuchung der Lipidzusammensetzung der Extrakte des weiblichen Probandenpools nach CuSO ₄ -Detektion.....	75

Abb. 49: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171) mittels Overlay-Assay an Hautextrakten des männlichen Probandenpools.	76
Abb.50: Untersuchung der Lipidzusammensetzung der Extrakte des männlichen Probandenpools nach CuSO ₄ -Detektion.....	76
Abb. 51: Biotinylierte Substanzen der Arbeitsgruppe Lindhorst aus dem Fachbereich organische Chemie der Universität Kiel.....	78
Abb. 52: Beschichtung der Biotin-Oberfläche mit NeutrAvidin™	79
Abb. 53: Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an NeutrAvidin™	81
Abb. 54: Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an NeutrAvidin™	82
Abb. 55: Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an NeutrAvidin™	83
Abb. 56: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (48) an den biotinylierten Glykocluster N12.....	84
Abb. 57: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an biotinylierte Mannose	85
Abb. 58: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (48) an Biotin-Mannose-6-Phosphat.....	86
Abb. 59: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an Biotin-Mannose-6-Phosphat.....	87
Abb. 60: Untersuchung des Einflusses von Methanol und Chloroform auf die NeutrAvidin™-Oberfläche.....	88
Abb. 61: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an KS-IV-145	89
Abb. 62: Untersuchung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (45) an KS-IV-153	90
Abb. 63: Konsensussequenz der Glykolipide für <i>C. group G</i> (86).	95
Abb. 64: Vorbereitung einer 6-Well-Zellkulturplatte für die Zellisolierung.	147
Abb. 65: Auftrageschema für Untersuchungen mit Entwicklung (links) und ohne Entwicklung (rechts) der HPTLC-Platte.....	154

Tabellenverzeichnis

Tab . 1: Beispiele für Rezeptorsequenzen der bakteriellen Adhäsion (SHARON und OFEK, 1995, KARLSSON, 1989).....	10
Tab. 2: Eingesetzte Fließmittelgemische für die Trennung von Gangliosiden.....	39
Tab. 3: Vergleich der Lipidausbeute von Extraktionen aus Corneozyten bei Anwendung verschiedener Lösungsmittelgemische und Extraktionsbehälter.	39
Tab. 4: Vergleich der Lipidausbeute nach Extraktion aus Corneozyten und direkter Extraktion von 2 Arealen.	41
Tab. 5: Bestimmung der Bindungsaffinität von <i>C. group G</i> (86) zu ausgewählten Glykolipiden.	43

Tab. 6: Anlage zu Abb. 23, Substanzschlüssel und aufgetragene Konzentrationen.....	45
Tab. 7: Anlage zu Abb. 24, Substanzschlüssel und aufgetragene Konzentrationen.....	46
Tab. 8: Fließmittelsystem zur Auftrennung von Hautlipiden nach SCHÜRER <i>et al.</i> (1995).....	49
Tab. 9: Fließmittelsystem zur Auftrennung von Hautlipiden mit Kieselgelplatten Nano-Durasil-20 von Macherey und Nagel.	51
Tab. 10: Umrechnung der Adhäsion von C. group G (45) auf eine Standardkonzentration von 5×10^{-6} mmol.....	59
Tab. 11: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an Cholesterol, Stearinsäure und Cholesteryl-stearat mit deren Molarität.	63
Tab. 12: Untersuchung verschiedener Cholesteryl-ester bezüglich des Einflusses der Seitenkette auf die Adhäsion (Abb. 39).	63
Tab. 13: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an Cholesteryl-ester mit deren Molarität.	65
Tab. 14: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an Ölsäure, Stearinsäure und Behensäure mit deren Molarität.....	66
Tab. 15: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an Verbindungen unterschiedlicher Polarität mit deren Molarität.	68
Tab. 16: Vergleich der Polarität verschiedener Substanzen über die logP(ow)-Werte, die mittels des Kalkulationsprogrammes LogD-Suite 4.5 berechnet wurden.	69
Tab. 17: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an verschiedene Sulfatverbindungen I mit deren Molarität.....	71
Tab. 18: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an verschiedenen Sulfatverbindungen II mit deren Molarität.....	72
Tab. 19: Lipidgehalt der Hautextrakte.	73
Tab. 20: Einsatzkonzentrationen des Mischstandards für den Overlay-Assay.....	74
Tab. 21: Einsatzkonzentrationen des Mischstandards für die CuSO ₄ -Detektion.....	74
Tab. 24: Verwendete Chemikalien mit Gefahrenhinweisen.....	133
Tab. 22: Lipophile Corynebakterien	134
Tab. 23: Nicht-lipophile Corynebakterien	134
Tab. 25: Einsatzmenge von Corynebakterien für Overlay Assays.	143
Tab. 26: Kultivierung von HaCaT-Zellen.	144
Tab. 27: Passagieren von HaCaT-Zellen (Trypsinierung).	145
Tab. 28: Passagieren von HaCaT-Zellen (Ende der Trypsinierung).....	145
Tab. 29: Passagieren von HaCaT-Zellen (Waschen der Zellen nach Trypsinierung).	145
Tab. 30: Mobile Phase für Ganglioside.	154
Tab. 31: Mobile Phase für Lipide.....	154
Tab. 32: Untersuchung biotinylierter Substanzen.....	158

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers mit einer Oberfläche von ca. 1,5 bis 1,8 m² (JASTROW, 2001). Das Gewicht der Haut beträgt ca. 8 bis 12 % des Körpergewichtes (MÖLLER und MATTHIES, 1995). Die Dicke schwankt, abhängig von der Körperregion, zwischen 1,5 und 4 mm (FRITSCH, 1990).

Die Haut ist das Grenzorgan des Organismus zur Umwelt und besitzt als solches Kontakt- und Schutzfunktionen. Die Kontaktfunktion ergibt sich aus dem Vorhandensein der Sinnesrezeptoren für Wärme, Schmerz und Tastreize. Neben einem mechanischen und thermischen Schutz des Körpers bietet die Haut einen Schutz gegenüber Mikroorganismen, Schmutz sowie ultravioletter Strahlung (JASTROW, 2001; MÖLLER und MATTHIES, 1995; FRITSCH, 1990, KLOPFLEISCH *et al.*, 1987). Die wesentlichste Funktion der Haut ist die sogenannte Barrierefunktion, die Unterbindung des Stoffaustausches zwischen Organismus und Umwelt. Sie verhindert das Austrocknen des Körpers und das Eindringen körperfremder Substanzen (FRITSCH, 1990).

Neben ihren Schutzfunktionen gegenüber Umwelteinflüssen ist die Haut an verschiedenen Stoffwechsel-, Speicher- und Regulationsvorgängen beteiligt. Sie ist mit dem übrigen Körper durch den Blutkreislauf sowie durch das Lymph- und Nervensystem eng verbunden (KINDL und RAAB, 1998; MÖLLER und MATTHIES, 1995). In der Haut werden wichtige Metabolite (z. B. Cholesterin, Vitamin-D₂) gebildet und umgewandelt, z. B. werden in der Subcutis Kohlenhydrate in Lipide umgebaut und umgekehrt. Desweiteren vermittelt die Haut als Immunorgan die Ausreifung und Aktivierung von Lymphozyten bei der Immunantwort (STEIGLEDER, 1992). Die Haut dient als Speicherorgan für Fett, Wasser und Blut und fungiert durch ihre Drüsen als Ausscheidungsorgan (RÖMPP-LEXIKON CHEMIE, 1997; MÖLLER und MATTHIES, 1995).

Die Haut ist mit Blutgefäßen und Nerven sowie Sinnesorganen ausgestattet und wird von den Hautanhangsgebilden (Haare, Nägel, Schweiß- und Talgdrüsen) durchdrungen (RÖMPP-LEXIKON CHEMIE, 1997; MÖLLER und MATTHIES, 1995; LEONHARDT, 1985). Die Schweißdrüsen der menschlichen Haut sind in zwei Typen unterteilt, die apokrinen und die ekkrinen. Die apokrinen Drüsen, die erst mit der Pubertät aktiv werden, sind vorwiegend in der Achsel- und Perigenitalgegend lokalisiert (JASTROW, 2001). Sie münden in die Haarfollikel und prägen den typischen Geruch eines Individuums.

Die ekkrinen Schweißdrüsen stellen die eigentlichen Schweißdrüsen dar. Sie sind über den gesamten Körper verteilt und produzieren den wässrigen Schweiß (MÖLLER und MATTHIES, 1995).

Die menschliche Haut besteht aus drei Schichten: der Subcutis (Unterhautfettgewebe), der darüber liegenden bindegewebsartigen Dermis (Lederhaut oder Corium), sowie der Epidermis (Oberhaut), der obersten Schicht.

Die **Subcutis** (Unterhautfettgewebe) besteht aus einem lockeren, stark dehnbaren Bindegewebe mit eingelagerten Fettzellen (GRAWKRODGER, 1995). Die Subcutis ist nicht scharf vom Corium abgetrennt und stellt eine Verbindungsschicht zwischen ihm und tiefer gelegenen Körperstrukturen (z.B. Muskeln und Knochen) dar (MÖLLER und MATTHIES, 1995). Das subkutane Fettgewebe dient zur Wärmeisolierung, bietet mechanischen Schutz, ist ein Energiespeicher sowie Ort des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels. Weiterhin befinden sich in der Subcutis Blutgefäße und Nervenapparate, Haare und Schweißdrüsen.

Die **Dermis** (Corium, Lederhaut) ist ein straffes, stützendes Bindegewebe, das mit der Epidermis durch die Basalmembran verbunden ist. Ihre Dicke variiert von etwa 0,6 mm am Augenlid bis zu 3 mm oder mehr am Rücken, den Handflächen und den Sohlen (GRAWKRODGER, 1995). Sie ist gut durchblutet, von Lymphbahnen und Nerven durchzogen und gewährleistet durch Diffusion die Versorgung der gefäßfreien Epidermis (MÖLLER und MATTHIES, 1995). Von der oberen Dermissschicht reichen Zapfen (Papillen) in die Epidermis. Diese Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen beiden Zellschichten ermöglicht einen guten Stoffaustausch. Mit zunehmendem Alter verflachen die Papillen, so dass die Versorgung der Epidermis beeinträchtigt wird (RAAB und KINDL, 1991; KLIGMAN und BALLIN, 1989).

Die Dermis besteht aus sich kreuzenden, netzartig durchflochtenen Bündeln kollagener Fasern sowie elastischen Fasern. Der scherengitterartige Aufbau des Fasernetzes ermöglicht die Elastizität und Dehnbarkeit der Haut (KINDL und RAAB, 1998). Die Fasern sind in eine gelartige Grundsubstanz aus Proteoglykanen eingebettet. Die Kollagenfasern binden im jungen Stadium reichlich Wasser. Diese Fähigkeit geht mit zunehmendem Alter durch Erhöhung des Vernetzungsgrades verloren, so dass es zu strukturellen Veränderungen der Haut kommt (RAAB und KINDL, 1991).

Als äußerste Hautschicht bildet die **Epidermis** die eigentliche Schutzhülle gegenüber der Umwelt (FRITSCH, 1990). Die Dicke der Epidermis ist unterschiedlich und passt

sich der Beanspruchung an. Das Minimum wird mit 0,02 mm (Gesicht) und das Maximum mit 1 mm (Fußsohle) angegeben (JASTROW, 2001). Insgesamt beträgt sie nur ca. 3 % der Dicke der Gesamthaut (RAAB und KINDL, 1991). Die Epidermis ist ein geschichtetes, verhornendes Plattenepithel und besteht zu 90 % aus unverhornten, verhornenden und vollständig verhornten Keratinozyten (FRITSCH, 1990; MIHARA, 1988). Die Epidermis enthält außerdem Subpopulationen aus eingewanderten dendritischen Zelltypen, z.B. Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen (Jastrow, 2001; Odland, 1991). Blutgefäße enthält sie nicht, so dass die Versorgung der Epidermiszellen mit Nährstoffen und Sauerstoff mittels Diffusion durch die darunterliegende gefäßreiche Dermis erfolgt (JUNG, 1991).

Die Epidermis ist ein klassisches Proliferationsgewebe, d.h. sie unterliegt einer dauernden Erneuerung (JUNG, 1991). Sie besteht aus mehreren Einzelschichten und wächst gleichsam kontinuierlich von innen nach außen (KLOPFLEISCH *et al.*, 1987). Die verschiedenen Schichten verkörpern die Stadien des Keratinisierungsprozesses (Verhornung) der Haut. Von der Neubildung der Keratinozyten bis zum Erreichen des Stratum corneum und dem Abschilfern als Corneozyten, durchlaufen die Zellen verschiedene Differenzierungsschritte, während der die Zellen verhornen und Zellkern und Enzyme im zunehmenden Maße abgebaut werden (STEIGLEDER, 1992). Die letzte Stufe ist die Bildung der Hornschicht, von welcher fortlaufend kleine Schuppen von der Oberfläche abschilfern. Zwischen Neubildung, Nachschub und Verlust besteht ein Gleichgewichtszustand, welcher die Erhaltung der Haut in ihrer charakteristischen Struktur gewährleistet (STEINERT und FREEDBERG, 1991). Täglich gibt die menschliche Haut etwa 7,5 mg alter Hornzellen an die Umgebung ab (KLOPFLEISCH *et al.*, 1987).

Die Epidermis wird von innen nach außen in das Stratum basale (Basalschicht), Stratum spinosum (Stachelzellenschicht), Stratum granulosum (Körnerschicht), Stratum lucidum (Glanzschicht) und Stratum corneum (Hornschicht) unterteilt, wie in Abbildung 1 dargestellt. Die Basalmembran verbindet die Epidermis mit der darunter liegenden Dermis.

Das **Stratum basale** besteht aus einer Zellreihe zylindrischer Keratinozyten mit relativ großem Kern und liegt auf der Basalmembran, der Grenzschicht zwischen Dermis und Epidermis (FRITSCH, 1990). In der Basalzellschicht wird der Keratinisierungsprozeß initiiert. Hier werden ständig neue Zellen gebildet, die innerhalb von ca. 28 Ta-

gen als Schuppen von der Hautoberfläche abschilfern. Melanozyten sind zwischen den Basalzellen angeordnet und schützen die Basalzellkerne vor der UV-Strahlung durch Abgabe von Melanin in das Zytoplasma (CZARNETZKI *et al.*, 1991).

Im **Stratum spinosum** (Stachelzellenschicht) ist eine aus mehreren Zellagen bestehende Schicht, in der allmählich eine horizontale Umorientierung der Zellachse eintritt (FRITSCH, 1990). Die Keratinozyten sind über stachelig aussehende Zellfortsätze (Desmosomen) untereinander verbunden (JASTROW, 2001). Es werden Odlandbodies (Keratinosomen) ausgebildet, die Lipide und Enzyme enthalten (FRITSCH, 1990), die sie beim Übergang ins Stratum corneum in den interzellulären Raum abgeben.

Das **Stratum granulosum** (Körnerschicht) ist durch die Keratohyalinkörner gekennzeichnet, Vorläufern der Matrixsubstanz des Keratins, die im Zytoplasma entstehen. Das Stratum granulosum ist der Schauplatz der rapide ablaufenden Differenzierungsvorgänge: Abplattung der Zellen, Verschwinden der Zellkerne, eingreifende Veränderungen im Fettstoffwechsel mit Ausbildung einer zementartigen Lipidsubstanz im Interzellularraum und Verhornung (JASTROW, 2001; Fritsch, 1990).

Das **Stratum lucidum** ist eine zur Verhornungszone der Epidermis zählende Hautschicht, die besonders an Handtellern und Fußsohlen stark ausgeprägt ist, während sie an anderen Körperarealen teilweise ganz fehlt. In diesem Bereich der Epidermis verlieren die Zellen ihre Zellkerne (Karyolyse). Das Stratum lucidum ist nur wenige Zellschichten stark und zeigt ein gleichmäßiges, hellglänzendes Aussehen. Seine Aufgabe ist die Reflexion auftreffender Sonnenstrahlen.

Das **Stratum corneum** (Hornschicht) stellt das Ergebnis des Keratinisierungsprozesses dar. Die Hornzellen (Corneozyten) liegen als kernlose Zellen flach übereinander geschichtet vor. Das Stratum corneum kann je nach mechanischer Beanspruchung wenige bis mehrere hundert Zelllagen umfassen (JASTROW, 2001). Es besteht aus dem lockeren, sich ständig abschilfernden Stratum disjunctum und dem fest haftenden Stratum compactum, in dem die Nachbarzellen verzahnt sind. Der interzelluläre Raum ist durch eine feste Kittmasse aus Lipiden verschlossen (KINDL und RAAB, 1998), die Corneozyten sind sozusagen in eine intrazelluläre Lipidmatrix eingebettet. Die Hornschicht ist vergleichbar mit einer Ziegelmauer: regelmäßig angeordnete, starre, mit Keratin gefüllte Bausteine, die mit undurchlässigem Lipid-„Zement“ verbunden sind (FRITSCH, 1990).

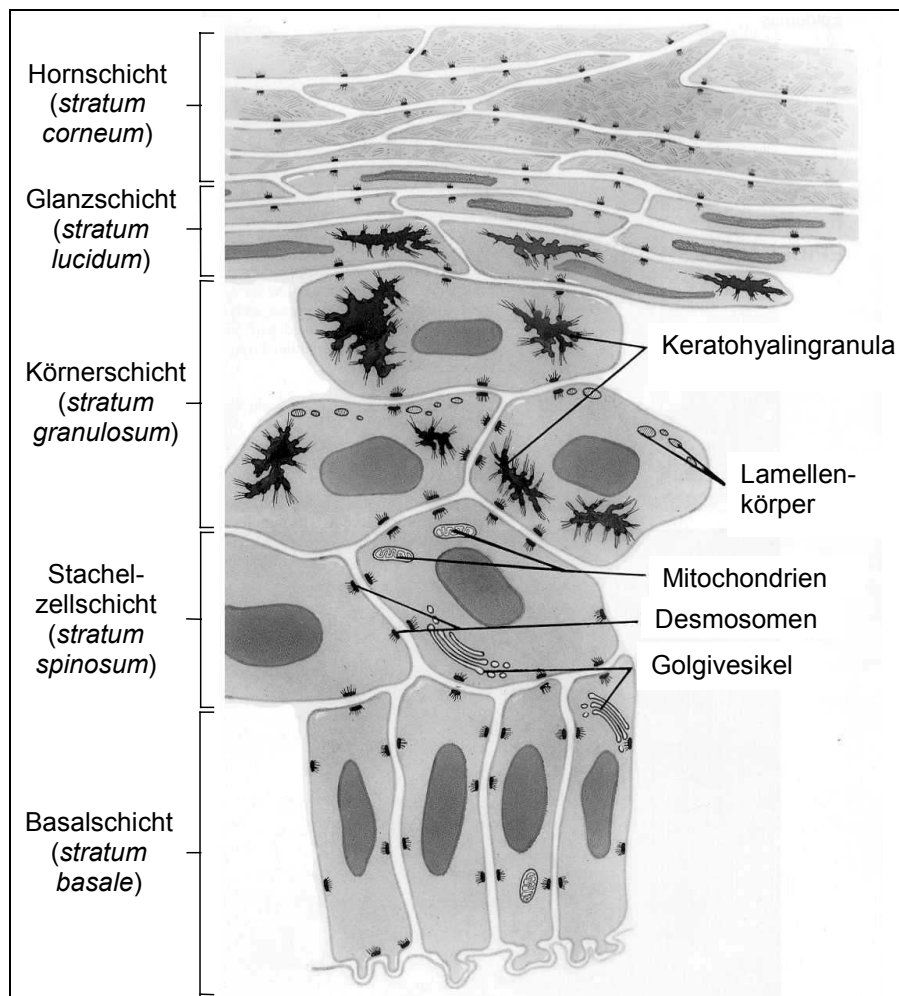


Abb. 1: Schematische Darstellung der epidermalen Differenzierung (MONTAGNA *et al.*, 1992).

1.2. Die Mikroflora der Haut

Die gesunde menschliche Haut ist an ihrer Oberfläche, dem Stratum corneum, von einer großen Anzahl kommensalisch lebender Mikroorganismen besiedelt. Aus der großen Vielfalt dieser Mikroorganismen leben nur wenige ständig auf der Haut und bilden so die residente Flora. Die Anzahl der Mikroorganismen auf der Haut ist je nach Körperregion unterschiedlich und stark vom Feuchtigkeitsgehalt und vom Nährstoffangebot abhängig. An trockenen Körperstellen ist mit einer Keimdichte von etwa 10^3 pro cm^2 zu rechnen, in der Achsel sind es 5×10^5 bis 10^6 Keime pro cm^2 (KORTING *et al.*, 1988; LEYDEN *et al.*, 1981). Die residenten Mikroorganismen leben als kleine Kolonien auf der Oberfläche des Stratum corneum und um die Haarfollikel

(LEYDEN *et al.*, 1996; BANDIS *et al.*, 1994; RENNIE *et al.*, 1991; HAUSTEIN, 1989; LEYDEN *et al.*, 1987; ECKSTEIN, 1986). Die Anzahl der Mikroorganismen pro Fläche passt sich dem jeweiligen Hautmilieu an, so dass die Ökologie dieser Körperregionen nicht durch übermäßige Kolonisierung aus dem Gleichgewicht gebracht wird (ROTH und JAMES, 1989).

Die Hauptvertreter der residenten Flora auf der humanen Haut sind Bakterien der Gattungen *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* sowie Hefen (BANDIS *et al.*, 1994; HAUSTEIN, 1989; ROTH und JAMES, 1988). Nur ca. 20 % der Bakterien sind in der Lage, in tiefere Hautschichten einzudringen. Es wird angenommen, dass die residente Flora der Haut den Körper vor Infektionen mit pathogenen Keimen schützt (BANDIS *et al.*, 1994).

Eine zweite Gruppe von Mikroorganismen besiedelt vorübergehend insbesondere exponierte Hautbereiche. Diese wird als transiente Flora bezeichnet und kann sich auf der gesunden Haut, deren Mikromilieu stark durch die residente Flora bestimmt wird, nicht dauerhaft ansiedeln. Diese Mikroorganismen verbleiben normalerweise nur wenige Tage oder Stunden auf der Haut, da sie keine optimalen Lebensbedingungen vorfinden (BANDIS *et al.*, 1994). Ihre Anzahl und Zusammensetzung variiert auf exponierter Haut sehr stark. Zu einem typischen Vertreter der transienten Hautflora gehört *Staphylococcus aureus* (HAUSTEIN, 1989).

Die menschliche Achsel stellt ein ideales Habitat für Bakterien dar, da sie durch eine optimale Kombination von Faktoren das Wachstum von Bakterien begünstigt (ORTH, 1993). Durch ihre Anatomie bietet die Achsel Schutz vor umweltbedingter Kontamination, des weiteren wird die Verdunstung von Wasser herabgesetzt, das für das bakterielle Wachstum essentiell ist. Die große Anzahl aktiver Drüsen bietet dem Bakterien ideale Wachstumsbedingungen. Ekkrine Schweißdrüsen produzieren eine Flüssigkeit, die aus Wasser, Aminosäuren, Elektrolyten und Mineralien besteht. Apokrine Schweißdrüsen (Duftdrüsen) produzieren ein Sekret, das reich an Proteinen und Lipiden ist. Durch die gerade im Bereich der Achselhöhle besonders hohe Anzahl apokriner Schweißdrüsen wird den Bakterien ein gesteigertes Nahrungsangebot zur Verfügung gestellt, wodurch eine übermäßige Vermehrung der Keime ermöglicht wird (FINKEL, 1995). Die Talgdrüsen produzieren ein dünnflüssiges Gemisch aus Triglyceriden, Fettsäuren und Wachsestern. Dieses Lipidgemisch gelangt wie das apokrine Sekret über den Haarfollikelkanal auf die Hautoberfläche. Zusätzlich

stellt die im Achselbereich vorherrschende Temperatur von 37°C und ein optimaler pH-Wert ideale Wachstumsbedingungen für Bakterien dar (LABOWS *et al.*, 1988). Der pH-Wert an der Oberfläche gesunder Haut liegt zwischen 4,0 und 6,5 (DIKSTEIN und ZLOTOGORSKI, 1994). Die Achsel hat einen höheren pH-Wert als andere Körperareale (DIKSTEIN und ZLOTOGORSKI, 1989), hier beträgt der pH-Wert 5,84 ($\pm 0,1$) bei Männern und 5,99 ($\pm 0,11$) bei Frauen (YOSIPOVITCH *et al.*, 1993). Der optimale pH-Wert für z.B. Corynebakterien liegt bei pH 6.

Frisch gebildeter apokriner Schweiß ist völlig geruchsfrei. Der charakteristische Schweißgeruch entsteht erst bei der Einwirkung von Hautbakterien (FINKEL, 1995; SHELLY *et al.*, 1953). Dabei werden im apokrinen Schweiß befindliche Substanzen von den Bakterien enzymatisch umgesetzt. Untersuchungen zeigten, dass die für den Schweißabbau verantwortlichen Bakterien zur Gruppe der sog. Gram-positiven Bakterien gehören, die den größten Teil der natürlichen Bakterienflora auf der Haut ausmachen (FINKEL, 1995). Hierzu gehören die Corynebakterien und Staphylokokken, welche für den Achselgeruch verantwortlich gemacht werden (ORTH, 1993; JACKMAN und NOBLE, 1983).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Achselflora sich geschlechtsspezifisch unterscheiden kann. Die weibliche Achselflora wird in ihrer Zusammensetzung häufig von Staphylokokken dominiert, die mit dem „sauren“ (schwächeren) Körpergeruch in Verbindung gebracht werden. Bei der männlichen Achselflora ist dieses Verhältnis genau umgekehrt, die dominanten Mikroorganismen sind hier die Corynebakterien (DERWORT, 2000; ALY und MAIBACH, 1977), die hauptsächlich für die Bildung des als „stechend, beißend“ bezeichneten Geruchs verantwortlich gemacht werden. Schweißgeruch entsteht bei einem pH von 5-8 und hat ein Maximum bei pH 6 (RENNIE *et al.*, 1990). Dieser pH-Wert liegt dicht an dem der Achsel und korreliert mit der zahlenmäßigen Überlegenheit von Corynebakterien bei Individuen mit starkem Achselgeruch (LEYDEN *et al.*, 1981). Somit sind die Corynebakterien als die eigentlichen Verursacher des unangenehmen Körpergeruchs anzusehen.

Auch andere kosmetisch relevante Mikroorganismen sind maßgeblich an der Entstehung von unangenehmen Körpergerüchen beteiligt. Brevibakterien besiedeln die Hornhaut des Fußes und führen durch Keratinolyse zu Fußgeruch, Malassezia-Hefen führen durch die Besiedelung der Kopfhaut zu Kopfgeruch und Schuppenbildung (ORTH, 1993; JACKMAN und NOBLE, 1983).

1.3. Bakterielle Adhäsion

Die bakterielle Adhäsion an die Wirtszelle stellt häufig den ersten Schritt einer Infektion dar und muss auch für die Kolonisierung der Haut durch die residente Flora postuliert werden. Dass viele Bakterien spezifisch bestimmte Gewebe infizieren, erklärt sich aus einem speziellen Repertoire an Rezeptoren auf der Oberfläche dieser Gewebe. In der Epidermis sind eine Vielzahl von Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Glykolipiden und Glykoproteinen vorhanden, die als Bindungsepitop von Bakterien genutzt werden könnten.

Bakterien besitzen die Fähigkeit, über spezifische und unspezifische Wechselwirkungen, wie z. B. Wasserstoffbrückenbindungen (PIMENTEL und MCCLELLAN, 1990), elektrische Oberflächenladung (BUSSCHER und WEERKAMP, 1987) oder hydrophobe Wechselwirkungen (DUNCAN-HEWITT, 1990), an ein Substrat zu adhären. Häufig adhären Bakterien mit einem stereospezifischen Rezeptor (z. B. Lektin) an ein Epitop (z. B. Kohlenhydrat) des Substrates (MIRELMAN und OFEK, 1986; OFEK *et al.*, 1978), dabei begrenzt die Spezifität der Adhäsionsmoleküle die Fähigkeit der Bakterien, unterschiedliche Substrate zu besiedeln. Die Rezeptoren (Adhäsine), die spezifisch an unterschiedliche Substrate adhären, sind auf Seiten der Bakterien meistens als Proteinuntereinheiten auf Fimbrien, Fibrillen, Flagellen oder anderen Zellfortsätzen exponiert bzw. auf Kapseln lokalisiert, um die Adhäsion an ein Substrat zu vermitteln.

Die Adhäsion kann ein mehrstufiger, komplexer Vorgang sein, der von der Präsentation, Orientierung und Zugänglichkeit von Adhäsine und Rezeptor abhängig ist, wie für den Hefepilz *Candida albicans* von OLLERT *et al.* (1993) gezeigt wurde. Streptokokken der Gruppe A, die mittels hydrophober Wechselwirkungen adhären (COURTNEY *et al.*, 1990), binden nicht an alle hydrophoben Oberflächen (ROSENBERG *et al.*, 1981), wenn Präsentation, Orientierung oder Zugänglichkeit des Substrates nicht adäquat sind. Nach ALLISON (1993) lagern Bakterien sich zuerst über elektrostatische und van der Waals-Kräfte (mit größerer Reichweite) locker an das Substrat und erst in einem weiteren Schritt über spezifische Wechselwirkungen der Oberflächenmoleküle von Bakterien und Substrat (mit kürzerer Reichweite) irreversibel an.

Zur Kolonisierung oder Infektion lagern sich Mikroorganismen häufig mit Oberflächenlektinen an Kohlenhydratstrukturen der Wirtszelloberfläche an (KARLSSON, 1998,

KARLSSON und STRÖMBERG, 1987). Vermutlich ist diese kohlenhydratspezifische Anlagerung auf die weite Verbreitung von Kohlenhydraten auf Zellmembranen (Abb. 2) zurückzuführen (DEAL und KRIVAN, 1994; KARLSSON, 1989; KARLSSON und STRÖMBERG, 1987). Insgesamt machen Kohlenhydrate, je nach Zelltyp, etwa 4-8 % (w/w) der Plasmamembran aus. Die Kohlenhydrate können an Proteine oder Lipide gekoppelt sein, d.h. als Glykoproteine oder Glykolipide vorliegen (SHARON und LIS, 1993). Eine Bindung an Glykolipide kann, anders als eine Bindung an Glykoproteine, die Adhäsion an die Wirtszelle gewährleisten, da Glykolipide immer in der Membran verankert sind und im Gegensatz zu Glykoproteinen generell nicht sezerniert werden. N-Acetylneuraminsäure (NANA), welche in vielen Glykolipiden und Glykoproteinen vorkommt, ist auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran auffallend stark konzentriert. Sie ist für die negative Ladung der Zelloberfläche hauptsächlich verantwortlich (GRAHAM und HIGGINS, 1998).

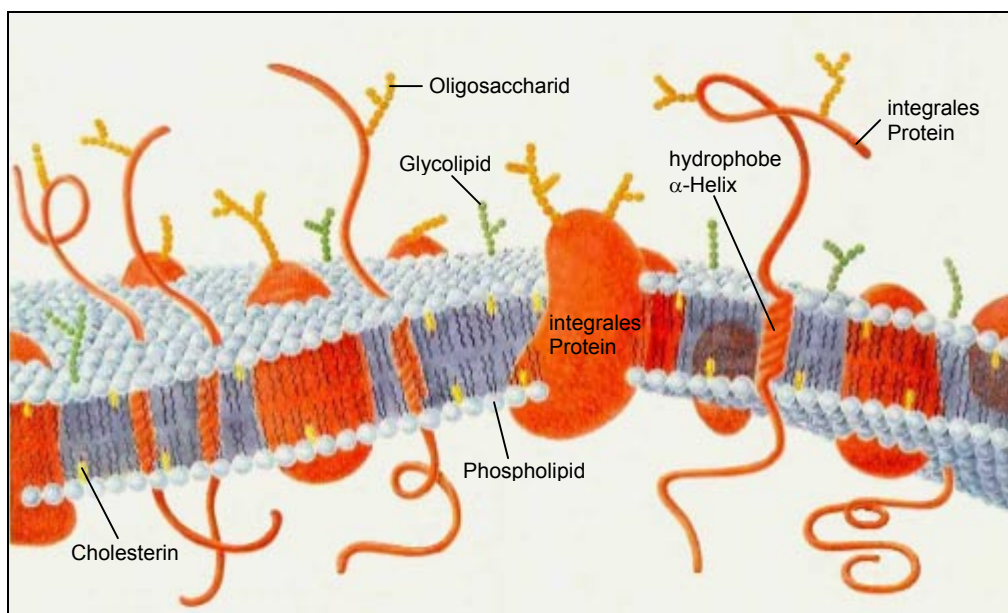


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Plasmamembran einer eukaryontischen Zelle (VOET und VOET, 1994).

Der untere Teil des Bildes zeigt den Zellinnenraum (intrazellulärer Raum), der obere Teil den Zellzwischenraum (interzellulären Raum). Die Glykolipide (grüne Perlenkette) sind an der Außenseite der Lipiddoppelschicht verankert, wobei die hydrophilen Glyko-Epitope an der Oberfläche der Matrix exponiert sind. Der Kohlenhydratanteil der Glykoproteine ist als gelbe Perlenkette dargestellt und kommt ebenfalls nur auf der äußeren Membranoberfläche vor.

Ein Bindungsepitop, welches von vielen Bakterien erkannt wird, ist das Lactose oder Gal-β-(1,4)-Glc-Motiv (KARLSSON, 1989). Glykolipide, die dieses Epitop enthalten, sind z.B. die Ganglioside. Die Lactosylceramidbindung ist interessant, weil Lactose in

gebundener Form nur in Glykolipiden vorkommt, welche in der Zellmembran vorliegen, nicht jedoch in sekretorischen Glykoproteinen. Tabelle 1 zeigt Beispiele für Bakterienspezies, die dieses Motiv zur Adhäsion nutzen.

In den Arbeiten von DELEKAT (1999) und BÜNGER (1996) wurde bereits die Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* und *S. aureus* an Corneozyten nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach enzymatischer Abspaltung von bakteriellen Oberflächenmolekülen bzw. von Oberflächenproteinen auf Corneozytenseite, *S. epidermidis* und *S. aureus* nicht mehr an humane Corneozyten adhärten (BÜNGER, 1996). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass *S. epidermidis* und *S. aureus* an Glykolipide sowie an das Hautlipid Cholesterol-3-sulfat adhärten (DELEKAT, 1999; BÜNGER, 1996).

Das Adhäsionsverhalten von Corynebakterien ist noch wenig untersucht. Von ROMERO-STEINER *et al.* (1990) konnte bereits eine Adhäsion von Corynebakterien an humane Epithelzellen nachgewiesen werden. TUE *et al.* (1998) zeigten, dass *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*) eine Bindungsaffinität zu Talgdrüsensekretlipiden (Sebumlipiden) aufweist.

Spezies	Spezifität	Ursprung des Rezeptors
<i>Escherichia coli</i>	Mannose	humane Granulozyten
<i>Escherichia coli</i>	Gal α 4Gal β Cer NANA α 3Gal	Harnröhre
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Galactose	humaner Speichel
<i>Propionibacterium acne</i> , <i>Propionibacterium granulosum</i>	Lactosylceramid Gal β 4Glc β Cer	Haut
<i>Lactobacillus fermentum</i> und viele andere	Lactosylceramid Gal β 4Glc β Cer	Dickdarm

Tab . 1: Beispiele für Rezeptorsequenzen der bakteriellen Adhäsion (SHARON und OFEK, 1995, KARLSSON, 1989).

Gal = Galactose, Glc = Glucose, Cer = Ceramid, NANA = N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)

1.4. Glykolipide

Die Glykolipide befinden sich als Membranlipide an der Oberfläche der Zellmembran, wo sie, ähnlich wie Glykoproteine, z.B. anderen Zellen als Erkennungsmerkmal und Bindungspartner (Rezeptoren) dienen. Sie gehören in die Gruppe der Sphingolipide, die Sphingosin als Alkoholkomponente statt des bei echten Fetten und Ölen vorliegenden Glycerins enthalten. Sie sind daher präziser durch die Bezeichnung Glykosphingolipide oder Glykosphingoside (kurz: Glykoside) zu charakterisieren.

Glykolipide sind Lipide, die als hydrophilen Molekülbestandteil Kohlenhydrate besitzen. Pro Lipidmolekül sind meist max. 10, in einigen Fällen jedoch bis zu 30 Monosaccharid-Einheiten gebunden. Als lipophilen Baustein enthalten Glykolipide Ceramide, die sich aus Sphingosin und einer Fettsäureeinheit zusammensetzen (Abb. 3).

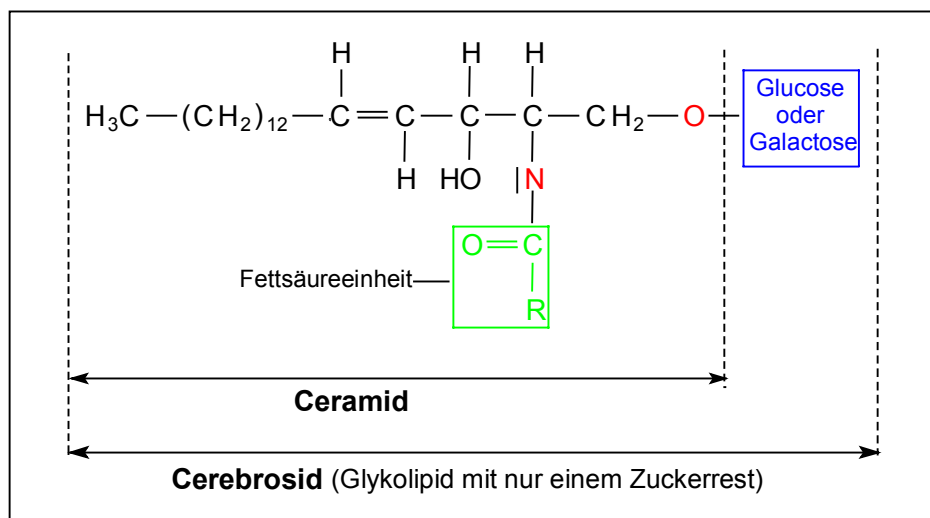


Abb. 3: Aufbau von Gangliosiden am Beispiel des Cerebrosides (RÖMPP, 1997)
R = langkettiger Alkyl-Rest

Bei den Glykolipiden unterscheidet man zwischen den Cerebrosiden (Abb. 3), die nur eine Monosaccharid-Einheit tragen (meist D-Glucose oder D-Galactose), den Sulfatiden mit ihren Sulfat-veresterten Monosacchariden und den Gangliosiden (Abb. 4), die mit (oft verzweigten) Oligosaccharid-Ketten behaftet sind (RÖMPP, 1997). Folglich unterscheiden Ganglioside und Cerebroside sich in der Anzahl der Monosaccharid-Einheiten pro Molekül und im Gehalt an NANA.

dagegen etwa 42-43 % Triglyceride, 25 % Wachsester, 15-16 % freie Fettsäuren, 12-15 % Squalen und 3 % Cholesterolester (SHEU *et al.*, 1999; SCHÜRER, 1993).

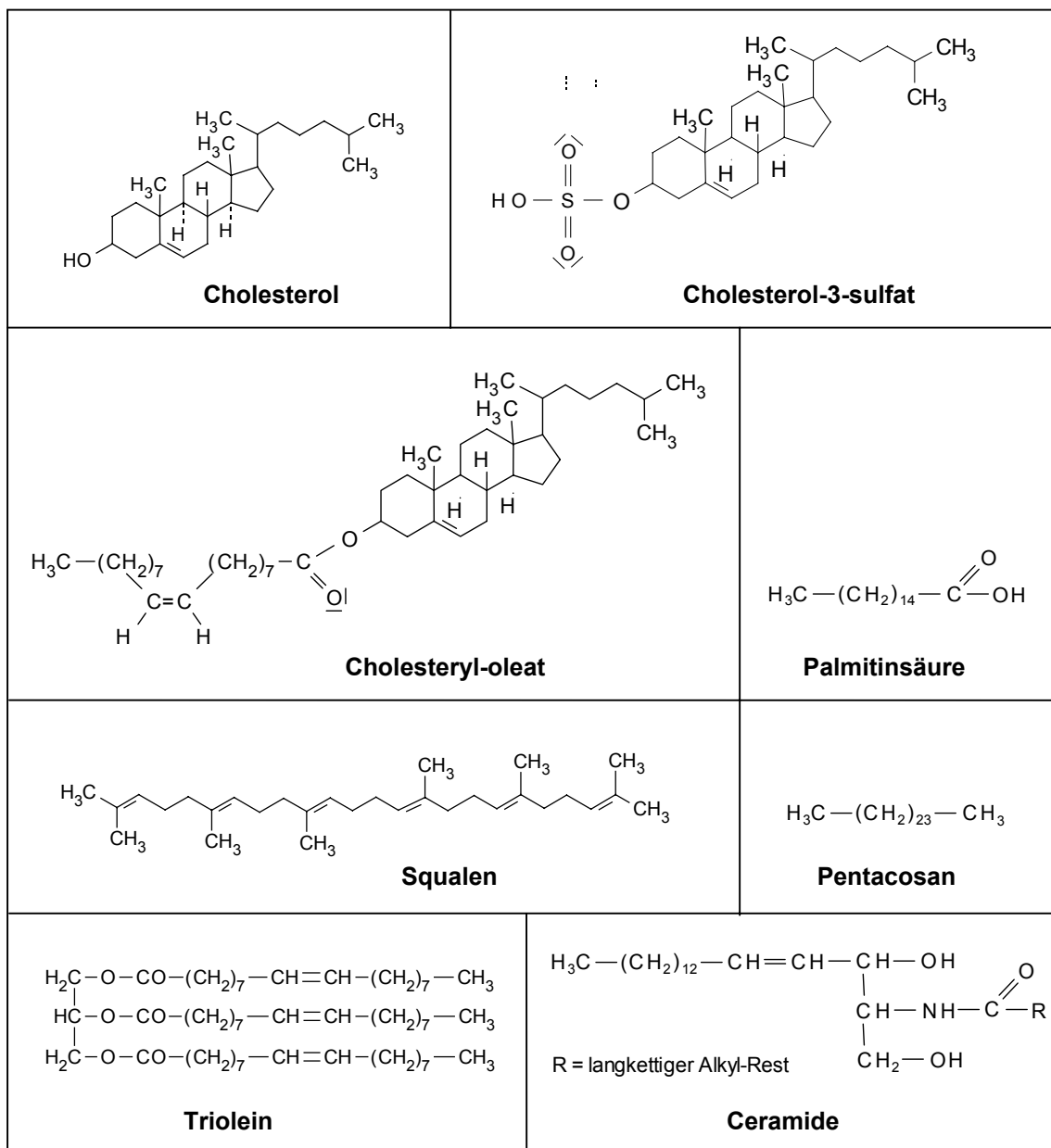


Abb. 5: Hautlipide (RÖMPP, 1997).

Die Zusammensetzung der Hautlipide wird durch die Varianz der Talgdrüsenzahl an verschiedenen Körperregionen bestimmt. So wird die Lipidkomposition der Hautoberfläche der Stirn von Talgdrüsenlipiden dominiert, während an den Talgdrüsen freien Körperregionen, wie z.B. Fußsohlen und Handinnenflächen, die Lipide ausschließlich epidermaler Herkunft sind (SHEU *et al.*, 1999; SCHÜRER, 1993).

Das Studium der Lipidzusammensetzung des Talgs ist dadurch erschwert, dass das Hautoberflächenfett eine Mischung von Talg und Hornschichtenfett darstellt. Demzufolge variiert die Zusammensetzung des Talgs nach dem Alter des Individuums sowie nach der Lokalisation der untersuchten Hautregion, da der Anteil des Hornschichtenfetts in etwa konstant, der des Talgdrüsenfetts jedoch regionsabhängig ist und über Androgene reguliert wird (FRITSCH, 1990).

Lipide sind in den unteren Epidermisschichten als Bausteine der Zellmembran enthalten. Im Laufe der epidermalen Differenzierung entstehen lipidhaltige Keratinsomen, aus denen durch biochemische Veränderungen die Barrierelipide im Stratum corneum hervorgehen. Oberhalb des Stratum corneums bilden die epidermalen Lipide zusammen mit den Talgdrüsenlipiden einen Oberflächenfilm (SCHÜRER *et al.*, 1991; MELNIK, 1990).

Die Zusammensetzung der epidermalen Hautoberflächenlipide ist das Ergebnis des Lipidstoffwechsels in der Epidermis. Während der Keratinisierung und Differenzierung kommt es zu beträchtlichen Veränderungen der epidermalen Lipidzusammensetzung. So sind die in den unteren Epidermisschichten vorkommenden polaren Lipide (hauptsächlich Phospholipide) im Stratum corneum fast nicht mehr nachzuweisen. Gleichzeitig ist ein deutlicher Anstieg der Neutrallipide (Triglyceride, freie Fettsäuren, Cholesterol und Cholesterolester) und vor allem der Sphingolipide (hauptsächlich Ceramide) zu verzeichnen. Zusätzlich werden kurzkettige Fettsäuren durch langkettige, weniger Doppelbindungen enthaltene Fettsäuren ersetzt. Die Änderungen der Lipidzusammensetzung stehen in enger Beziehung zu den biologischen Funktionen in den einzelnen Epidermisschichten.

Das qualitativ charakteristische Lipid des Talgs ist Squalen, seine Hauptmasse wird jedoch durch verschiedene Triglyceride gebildet. Letztere werden durch Esterasen von in der Haut, insbesondere den Haarfollikeln, residenten Bakterien (v.a. Propionibakterien) gespalten. Die entstandenen freien Fettsäuren bewirken das physiologische, saure Milieu der Hautoberfläche (FRITSCH, 1990). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass die Spaltung nicht ausschließlich über bakterielle Lipasen läuft.

Eine Sonderstellung nimmt das polare, amphiphatische Cholesterol-3-sulfat ein, das in der Epidermis synthetisiert wird. Obwohl es mengenmäßig unbedeutend ist, trägt es entscheidend zur Integration der Lipidlamellen im Stratum corneum bei. Palmitinsäure (C_{16:0}) stellt im Stratum corneum die bei weitem am häufigsten vorkommende Fettsäure dar (SCHÜRER *et al.*, 1991)

1.6. Ziel der Arbeit

Die Bakterien der humanen Achselflora setzen im apokrinen Schweiß enthaltene Substanzen um und tragen so zur Schweißgeruchsbildung bei. Um der Geruchsbildung entgegenzuwirken, werden Deodorantien eingesetzt, die antimikrobielle Substanzen enthalten (WOODRUFF, 1994; SEITZ und RICHARDSON, 1988), wie z.B. Triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether) (RICHARDSON und SEITZ, 1988).

Es wird zunehmend beobachtet, dass Mikroorganismen nach antimikrobieller Behandlung Resistenzen entwickeln, die durch den veränderten Selektionsdruck erklärbar sind. So wird das zunehmende Auftreten von resistenten Stämmen von *S. aureus* nach Behandlung mit Triclosan beobachtet (HEATH und ROCK, 2000; SULLER und RUSSELL, 2000; SASATSU *et al.*, 1993; UHL, 1993). Dabei wird befürchtet, dass es zu einer Kreuzresistenz gegen Antibiotika kommen kann (CHUANHUEN *et al.*, 2001; LEVY, 2001; RUSSELL, 2000).

Um die Entwicklung von Resistenzen seitens der Bakterien gegen Deodorantien zu umgehen, müssen neue Wirkstrategien gefunden werden. Bevor Bakterien die Haut besiedeln und den apokrinen Schweiß umsetzen, müssen die Bakterien zunächst an Hautzellen binden. Kann diese erste Anheftung, die bakterielle Adhäsion, verhindert oder aufgehoben werden, sind die Bakterien nicht mehr in der Lage, den Schweiß umzusetzen, und die Geruchsbildung wäre unterbunden. Die am häufigsten unter der Achsel vorkommenden und somit deorelevanten Keime sind Staphylokokken und Corynebakterien. Für Staphylokokken wurde die Adhäsion bereits von DELEKAT (1999) und BÜNGER (1996) genauer untersucht. Im Vergleich mit *S. epidermidis* ist über den Adhäsionsmechanismus von Corynebakterien an die Hautzellen nur sehr wenig bekannt. Aus diesem Grund stehen bei dieser Arbeit die Corynebakterien im Vordergrund.

Kenntnisse über die Rezeptoren der Haut, die zur Adhäsion der Bakterien führen, könnten zur Entwicklung von Anti-Adhäsiva genutzt werden, die gezielt der Besiedelung der Haut durch deorelevante Keime vorbeugen. Diese könnten als neue Deowirkstoffe eingesetzt werden und würden eine Alternative zu den bislang eingesetzten antimikrobiellen Wirkstoffen darstellen. Zur Verhinderung der bakteriellen Adhäsion gibt es zwei Möglichkeiten, wie Anti-Adhäsiva zum Einsatz kommen könnten. Anti-Adhäsiva, die unspezifische Adhäsionen aufheben sollen, müssten durch z.B. hydrophobe Eigenschaften als Konkurrent zur hydrophoben Zelloberfläche auftreten.

Dabei sollte das Bakterium die Bindung an das Anti-Adhäsivum vor der Bindung an die Zelloberfläche bevorzugen. Durch Zugabe des Anti-Adhäsivums würde das Bakterium von der Zelloberfläche wieder abgelöst werden (Abb. 6).

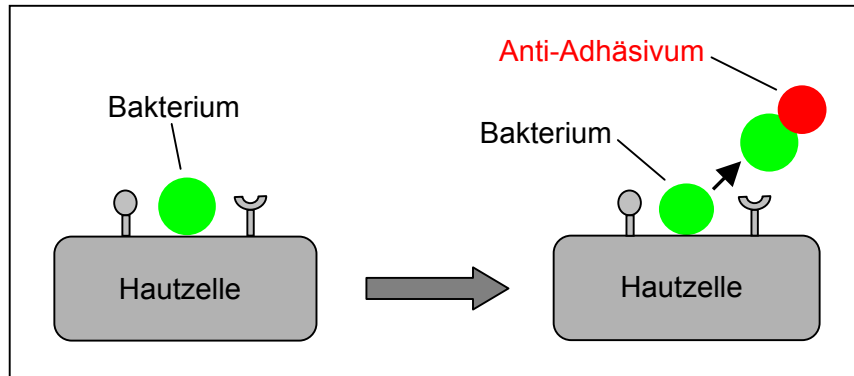


Abb. 6: Unspezifische Adhäsion – Ablösen der Bakterien durch hydrophobe Wechselwirkung.

Eine durch spezifische Wechselwirkungen initiierte Adhäsion kann durch Anti-Adhäsiva verhindert werden, die entweder die Liganden der Bakterien oder Rezeptoren auf der Zelloberfläche blockieren (Abb. 7).

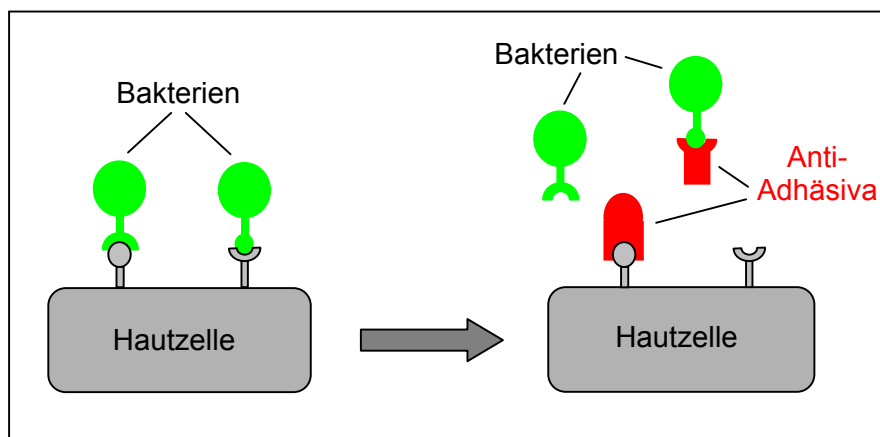


Abb. 7: Spezifische Wechselwirkung – Verhinderung der bakteriellen Besiedelung.

Der Vorteil des Einsatzes von Anti-Adhäsiva ist, dass es zu keiner Resistenzentwicklung kommen kann. Wenn sich Bakterien z.B. durch eine Veränderung ihrer Oberfläche an die Anwesenheit von Anti-Adhäsiva anpassen würden, würden sie sich gleichzeitig das Habitat nehmen, welches sie zum Überleben benötigen.

In dieser Arbeit sollen Rezeptoren der humanen Haut ermittelt und charakterisiert werden, die die Adhäsion von Corynebakterien vermitteln. Hierfür wird die Bindungsspezifität verschiedener Corynebakterien an humane Corneozyten mit verschiedenen Nachweisverfahren untersucht. *Corynebacterium jeikeium* (*C. jeikeium*) und *Corynebacterium* group G (*C. group G*) stellen die am häufigsten in der Achsel vorkommenden kutanen Corynebakterien dar. Sie werden daher als Vertreter der lipophilen Corynebakterien in dieser Arbeit untersucht. Zum Vergleich wird *Corynebacterium minutissimum* (*C. minutissimum*) als Vertreter der nicht-lipophilen Corynebakterien getestet.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen die Entwicklung von Anti-Adhäsiva als neue Deowirkstoffe unterstützen.

2. METHODEN

2.1. Sterilisation

Alle hergestellten Lösungen (z. B. Puffer) und Medien, die mit Mikroorganismen kontaminiert werden können, sowie alle Materialien, die mit Bakterienlösungen in Verbindung kommen, müssen zunächst sterilisiert werden (Anhang 7.2.1.).

2.2. Bakterienkultivierung

2.2.1. Stammhaltung

Zur Lagerung der Bakterien werden Glycerinkulturen angelegt, die bei - 20 °C (Arbeitskultur) bzw. - 80 °C (Stammkultur) eingefroren werden (Anhang 7.2.2.1.).

Hierzu wird zunächst eine Flüssigkultur angelegt. In einem Schikanekolben wird Nährmedium mit wenigen Bakterienkolonien beimpft und über Nacht bei geeigneter Temperatur geschüttelt.

Für die Arbeitskultur wird ein Teil der Bakterien aus der Flüssigkultur abzentrifugiert und bei -20 °C in einer wässrigen Lösung aus Glycerin und Magnesiumsulfat aufbewahrt.

Zur längeren Konservierung der Stämme wird ein Teil der Flüssigkultur mit Glycerin (80 %) vermischt und bei - 80 °C eingefroren.

2.2.2. Bakterienanzucht

Ein Aliquot einer - 20 °C Arbeitskultur wird auf einer geeigneten Agarplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei der optimalen Wachstumstemperatur des Bakteriums inkubiert (Anhang 7.2.2.2.).

2.2.3. Markierung von Bakterien (Färbung mit DAPI)

Für den späteren Einsatz im Overlay Assay werden die Bakterien mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt (Anhang 7.2.2.3.). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA interkaliert.

Zunächst wird eine Bakterienkultur, wie unter 2.2.2. beschrieben, auf einer Agarplatte ausgestrichen und inkubiert. Die Bakterien werden mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) von der Platte abgespült, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit PBS/Ethanol gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Thomakammer wird die benötigte Bakterienzellzahl eingestellt und zentrifugiert. Das Zellpellet wird in DAPI-Lösung aufgenommen und inkubiert. Danach werden die Zellen in PBS/Ethanol gewaschen und in PBS resuspendiert.

2.3. Gewinnung von humanen Corneozyten

Die Corneozyten als verhornte, bereits abgestorbene Zellen, können nicht kultiviert werden. Sie werden direkt vom Probanden gewonnen. Hierfür wird eine Teflonschiene (Abb. 8) mit einer Innenfläche von 37,5 cm² verwendet (Anhang 7.2.3.).

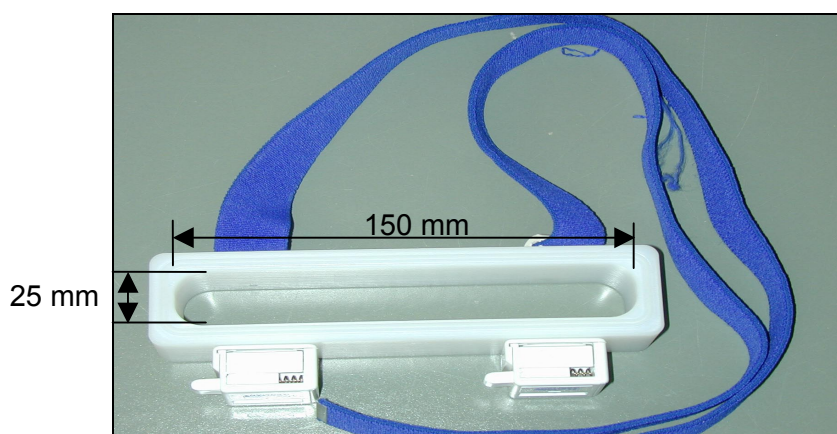


Abb. 8: Teflonvorrichtung zum Abspülen von Corneozyten

Diese wird mit Hilfe von zwei verstellbaren Gummibändern auf der Innenseite des Oberarmes eines Probanden befestigt. Anschließend wird Abspülpuffer in die Schiene gegeben und die Corneozyten mit einem teflonbeschichteten Spatel abgeschabt. Die Abspüllösung wird anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

2.4. Kultivierung von Keratinozyten (Zellkultur)

Bei den Keratinozyten handelt es sich um lebende Zellen, die im Gegensatz zu den Corneozyten kultiviert werden können. Es wurde zum einen mit der Keratinozytenzelllinie HaCaT (human adolescent calcium transformed cells), zum anderen mit primären humanen Keratinozyten gearbeitet.

2.4.1. HaCaT-Zellen

Die verwendete HaCaT-Zelllinie ist eine humane, unsterbliche, nicht tumorigene Keratinozytenzelllinie, welche durch Kultur bei erhöhter Temperatur und geringer Calciumkonzentration spontan aus normalen Keratinozyten entstand (BOUKAMP et al., 1988).

Sobald die HaCaT-Zellen in Zellkulturschalen mit Nährmedium ausgesät (kultiviert) werden, wachsen sie am Schalenboden an und vermehren sich (Anhang 7.2.4.1.). Nach Erreichen einer 90 %igen Konfluenz (d.h. wenn die Zellen den Schalenboden zu 90 % bedecken) werden die Zellen trypsinisiert, wobei sie sich vom Schalenboden lösen. Anschließend werden Aliquots in neue Zellkulturschalen ausgesät (subkultiviert). Ein Teil der Keratinozyten kann bei diesem Schritt auch für Versuche verwendet oder eingefroren werden. HaCaT-Zellen können auf diese Weise viele Male vereinzelt (passagiert) werden, ohne Veränderungen in ihrer Morphologie aufzuweisen.

2.4.2. Humane Keratinozyten

Die Isolierung der primären Keratinozyten erfolgt aus einer höchstens 24 h alten Biopsie, die unmittelbar nach der Entnahme in Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) ohne foetales Rinderserum (FCS) mit Penicillin/Streptomycin bei 4 °C gelagert wurde.

Die Keratinozyten werden zunächst isoliert und in Zellkulturschalen kultiviert (Anhang 7.2.4.2.). Bereits bei einer 70–80 % Konfluenz (d.h. die Zellen bedecken zu 70-80 % den Schalenboden) werden sie passagiert. Im Gegensatz zu den HaCaT-Zellen können die primären Keratinozyten nur ca. zweimal vereinzelt (passagiert) werden, bevor sie sich morphologisch verändern.

2.5. Isolierung von Hautlipiden

2.5.1. Isolierung von Lipiden aus Corneozyten und Keratinozyten

Die Corneozyten bzw. Keratinozyten werden in Aceton / Ethanol suspendiert, um die Lipide zu extrahieren (Anhang 7.2.5.1.). Die Suspension wird bei Raumtemperatur für 15 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Das Lösungsmittel mit den Lipiden wird mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und der Extraktionsvorgang noch zweimal wiederholt. Die Lösungsmittelextrakte der Corneozyten bzw. Keratinozyten werden in zuvor getrockneten und gewogenen 10 mL Spitzkolben vereinigt, mittels Stickstoffstrom eingeengt und der Rückstand zur Trockene gebracht. Der Lipidgehalt wird anschließend durch Differenzwägung ermittelt. Der Rückstand wird in Chloroform / Methanol aufgenommen.

2.5.2. Gewinnung von Lipiden direkt von der Hautoberfläche

Da die Lipidausbeute der Corneozyten nicht sehr ergiebig ist, werden alternativ die Lipide direkt von der Hautoberfläche des Probanden aus dem Stratum corneum extrahiert (Anhang 7.2.5.2.). Es ist dabei nicht auszuschließen, dass auch interzelluläre Lipide mit extrahiert werden.

Die Extraktion erfolgt mit einem länglichen Teflontrichter (2.3.). Dieser wird auf der Innenseite des Oberarmes eines Probanden befestigt. Anschließend wird Extraktionslösung (Aceton/Ethanol) in den Trichter gegeben und zum Abspülen der Lipide die Extraktionslösung mit einer Eppendorfpipette ein- und ausgesogen. Die hierbei gewonnene Lipidlösung wird in einem zuvor getrockneten und gewogenen 10 mL Spitzkolben mittels Stickstoffstrom eingeengt und der Rückstand zur Trockene gebracht. Der Lipidgehalt wird anschließend durch Differenzwägung ermittelt. Der Rückstand wird in Chloroform/Methanol aufgenommen.

2.6. Mikroskopische Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an das Stratum corneum

Das Stratum corneum wird aus humanen Hautbiopsien isoliert (2.4.2.) und auf einem Objektträger ausgebreitet (Anhang 7.2.6.). Nachdem es getrocknet ist (Lufttrocknung), wird es mit einem Fettstift eingekreist. Für die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird das Stratum corneum zunächst mit einer Rinderserum (BSA)-Lösung überschichtet. Nach dem Entfernen der BSA-Lösung und einer erneuten Lufttrocknung wird mit einer Bakteriensuspension überschichtet. Anschließend wird der Objektträger zum Waschen in PBS geschwenkt und zur Hitzefixierung 3 x durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen. Danach wird das Stratum corneum in Kristallviolett gefärbt. Der Objektträger wird gründlich in Wasser gespült, ein Deckglas auf das Stratum corneum gelegt und mikroskopiert.

2.7. Nachweismethode für die Adhäsion von Bakterien an immobilisierte Ganglioside und Lipide

Bei dieser Methode werden die Ganglioside und Lipide zunächst auf eine Hochleistung-Dünnschichtchromatographie (HPTLC)-Platte aufgetragen und ggf. aufgetrennt. Die bakterielle Adhäsion wird im Anschluss durch einen Überschichtungsassay (Overlay Assay) nachgewiesen. Hierfür werden die Ganglioside und Lipide auf der HPTLC-Platte mit Bakteriensuspension überschichtet und die fluoreszenzmarkierten Bakterien mit Fluoreszenzlicht detektiert.

2.7.1. Auftragen von Gangliosiden und Lipiden auf HPTLC-Platten

Als stationäre Phase für die HPTLC werden Kieselgel-Fertigplatten aus Glas verwendet (Anhang 7.2.7.1.). Für die Untersuchung der Ganglioside werden Kieselgel 60-Platten von der Firma Merck bezogen.

Für die Untersuchung der Lipide sind die Kieselgelplatten der Firma Merck nicht geeignet, da hier im Gegensatz zur Untersuchung der Ganglioside kein Plexigum verwendet wird (2.7.3). Durch das Fehlen des Plexigums können die Platten der längeren Behandlung mit wässrigen Lösungen nicht standhalten. Deshalb kommen hier

Kieselgel Nano-Durasil-20-Platten der Firma Macherey und Nagel zum Einsatz, bei denen mit Hilfe eines speziellen Bindemittels die Kieselgelschicht fester an der Glasplatte haftet. Zur Entfettung und Reinigung werden die Kieselgelplatten zunächst mit Diethylether entwickelt, um die Platten von hydrophoben Verunreinigungen zu befreien. Die Analysenlösungen werden mit Hilfe des DC-Probenautomates III von CAMAG in schmalen Banden am unteren Rand der Kieselgelplatten aufgetragen. Für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten werden mehrere Standardlösungen in Reihen nebeneinander aufgetragen, da die HPTLC-Platten für diese Untersuchung nicht entwickelt werden.

2.7.2. Dünnschichtchromatographie

Die HPTLC-Platten werden zur Auftrennung der Analyte nacheinander in verschiedenen Fließmitteln entwickelt (Anhang 7.2.7.2.). Das Fließmittel läuft dabei auf der Platte nach oben und zieht die aufgetragenen Analyte unterschiedlich weit mit.

Je nachdem welche Fließmittel gewählt werden, können die polareren Ganglioside oder die unpolaren Lipide aufgetrennt werden. Je polarer eine Substanz ist, desto besser wird sie von der polaren Kieselgelplatte festgehalten. Somit wandern die polaren Ganglioside weniger weit auf der Kieselgelplatte als die unpolaren Lipide.

2.7.3. Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen

Untersuchung der Ganglioside:

Die entwickelte HPTLC-Platte (bzw. ohne Entwicklung bei der Untersuchung der Bindungsaffinität) wird 1 min in Plexigum-Lösung getaucht und anschließend getrocknet (Anhang 7.2.7.3.). Die Plexigum-Beschichtung verbessert die anschließende BSA-Blockierung und bewirkt, dass sich die amphoteren Glykolipide auf der Kieselgelplatte ähnlich wie in der Zellmembran ausrichten (KARLSSON *et al.*, 1987), so dass hydrophile Glyko-Epitope an der Oberfläche der Matrix exponiert werden.

Die HPTLC-Platte wird für zwei Stunden in BSA-Lösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Untersuchung der Lipide:

Für die Untersuchung der Lipide entfällt die Beschichtung mit Plexigum, da hierbei die Lipide, mit Ausnahme von Cholesterol-3-sulfat, vollständig abgedeckt werden und eine Bindung von Corynebakterien verhindert wird (Anhang 7.2.7.3.).

Die entwickelte HPTLC-Platte (bzw. ohne Entwicklung bei der Untersuchung der Bindungsaffinität) wird nur für zwei Stunden in BSA-Lösung geschwenkt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren.

2.7.4. HPTLC-Overlay Assay mit DAPI-markierten Bakterien

Für den Überschichtungsassay (Overlay Assay) werden die Bakterien zunächst, wie unter 2.2.3. beschrieben, mit DAPI markiert. Die HPTLC-Platte wird in eine feuchte Kammer gelegt und für zwei Stunden mit der Bakteriensuspension überschichtet (Anhang 7.2.7.4.). Anschließend wird die Platte dreimal in PBS (pH 7,0-7,5) gewaschen, um nicht gebundene Bakterien zu entfernen.

Unter einer feuchten Kammer versteht man eine verschließbare Schale, die einen geraden Siebeinsatz besitzt. Der Boden der Schale wird mit befeuchteten Tüchern bedeckt und die HPTLC-Platte auf den Siebeinsatz gelegt. Die feuchte Kammer soll verhindern, dass das Wasser der Bakteriensuspension während der zweistündigen Überschichtung verdunstet und die Bakterien auf der HPTLC-Platte antrocknen.

Zur Detektion werden die Lipidbanden, an die sich DAPI-gefärbte Bakterien angelagert haben, durch Bestrahlung mit UV-Licht zum Fluoreszieren angeregt. Mit Hilfe eines Kamerasystems werden Bilder von den HPTLC-Platten aufgenommen.

2.7.5. Anfärben der Chromatogramme

2.7.5.1. Kupfersulfat-Färbung

Alternativ zum Overlay Assay werden Lipide mit Kupfersulfat-Färbelösung detektiert (Anhang 7.2.7.5.1.). Es handelt sich hierbei um eine unspezifische Universaldetektion, bei der alle Lipide detektiert werden. Die Kupfersulfat-Färbelösung führt bei Erwärmung auf 180°C zur Veraschung der Lipide auf dem Kieselgel, wodurch sie sich braun verfärben.

2.7.5.2. Anisaldehyd-Färbung

Anisaldehyd-Schwefelsäure ist ein Universalreagenz für Naturstoffe, das eine Farbdifferenzierung ermöglicht (Anhang 7.2.7.5.2.). Glykolipide färben sich z. B. grün oder blaugrün, Glycerophospholipide werden grau oder lila gefärbt.

Durch das Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Ekkert's Reagenz) ergeben sich nach der Erwärmung auf 90 bis 125°C unterschiedlich gefärbte Chromatogramm-Zonen, die häufig im langwelligen UV-Licht (365 nm) fluoreszieren.

2.8. Untersuchung der bakteriellen Adhäsion mit dem optischen Biosensor IAsys plus

Bei den bisherigen Untersuchungen der mikrobiellen Adhäsion mittels HPTLC an cornifizierten und kultivierten Hautzellen sowie an Standards, handelt es sich um Endpunktanalysen. Die Untersuchung der Interaktion zwischen Bakterien und Rezeptorstrukturen ist hiermit nicht möglich.

Zur Durchführung von biomolekularen Interaktionsanalysen soll daher der optische Biosensor IAsys plus (Interaction Analysis System), ein Zweikanalgerät von Affinity Sensors, getestet werden (Abb. 9).

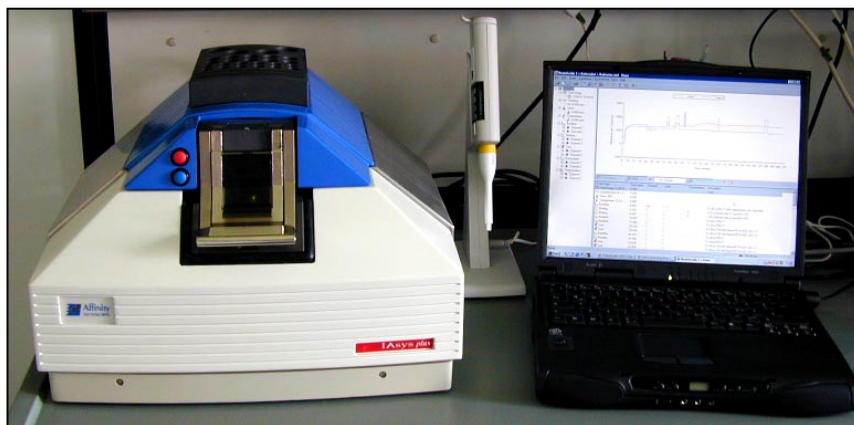


Abb. 9: Der optische Biosensor IAsys plus von Affinity Sensor

Das IAsys plus (IAsys®) ermöglicht die Durchführung von Bindungsstudien, bis hin zu einem quantitativen Zugang zur Kinetik der Interaktion zwischen unmarkierten Bindungspartnern in Echtzeit.

Die Ergebnisse aus den Bindungsstudien mit dem Biosensor IAsys plus lassen sowohl qualitative Aussagen – Bindung ja oder nein – zu, geben aber auch die Möglichkeit, die Bindung quantitativ zu bestimmen, durch z.B. die Bestimmung der Affinitätskonstanten und Vergleiche von komplexen Bindungen mit mathematischen Modellen (KIESAU, 1999).

Die Interaktion wird in einer gerührten, in sich geschlossenen Mikroküvette (Abb. 10) durchgeführt. Das Zweikanalgerät IAsys plus arbeitet mit einer Doppelküvette (zwei getrennte Probenzellen), die zwei voneinander völlig unabhängige, parallele Interaktionen ohne Kreuzkontamination ermöglicht. Die Küvette bietet die Vorteile eines minimalen Probenverbrauchs, unbegrenzter Kontaktzeit und einer einfachen Probenrückgewinnung.

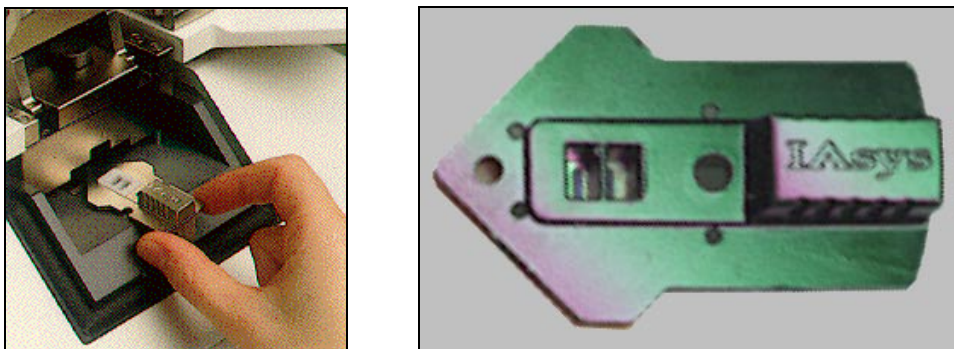


Abb. 10: Die Doppelküvette vom IAsys plus.

In Abb. 11 ist der Querschnitt durch eine Küvette dargestellt. Das obere Bild zeigt die Seitenansicht, in der die beiden getrennten Probenzellen zu sehen sind. Wenn die Küvette in das IAsys plus eingespannt wird, werden beim Schließen des Deckels die Rührer sowie zwei Teflonschläuche der Absaugvorrichtung (in Abb. 11 nicht dargestellt) in die beiden Probenzellen gesenkt. Durch das Rühren der Probe in der Küvette wird eine schnelle Durchmischung und der notwendige Massentransport zur Sensor-Oberfläche am Boden der Probenzelle gewährleistet. Die Absaugvorrichtung ermöglicht es, dass die Küvette während der gesamten Messung in dem IAsys plus verbleiben kann. Lösungen werden direkt per Knopfdruck aus der Küvette entfernt, wobei die Probenzellen voneinander unabhängig geleert werden können. Im unteren Teil der Küvette ist ein Prisma eingesetzt, das gleichzeitig den Boden der Probenzelle bildet. Das untere Bild in Abb. 11 zeigt den Querschnitt durch die Frontansicht einer Küvette. Neben Probenzelle und Prisma ist auch die Position des Lasers dar-

gestellt, der sich an der Längsseite der Küvette befindet und von dort Licht in das Prisma einstrahlt.

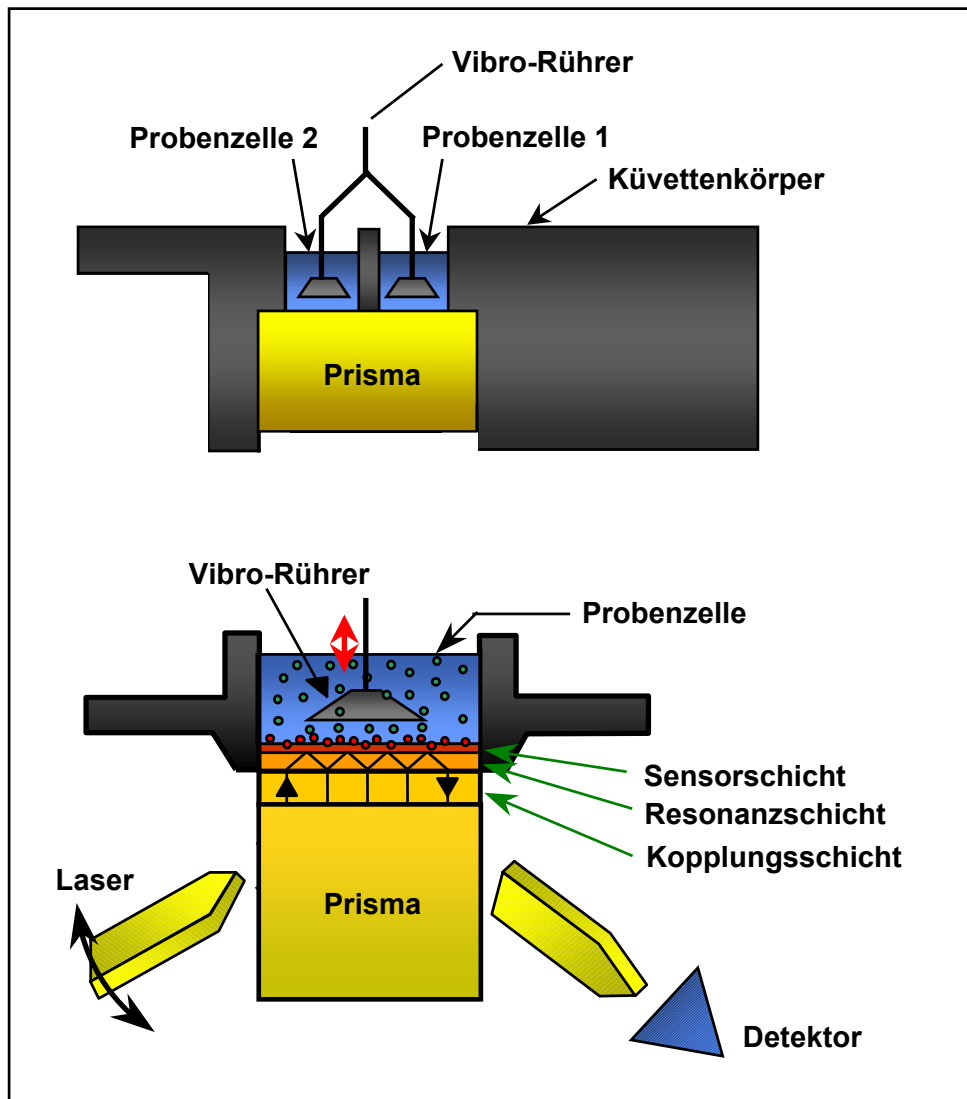


Abb. 11: Querschnitt durch eine Küvette mit optischen Komponenten.

2.8.1. Messprinzip des Resonanzspiegels

Das Messprinzip des optischen Biosensors IAsys plus basiert auf einem optischen Phänomen, dem evaneszenten Feld. Wenn Licht beim Einfall auf die Grenzfläche von einem optisch dichteren Medium (höherer Brechungsindex) zu einem optisch dünneren Medium (niedriger Brechungsindex) einen bestimmten Winkel (Grenzwinkel) überschreitet, wird es totalreflektiert (HAAS, 1988). Das dabei auftretende elektrische Feld fällt an der Grenzfläche zum optisch dünneren Medium nicht gleich

auf Null ab, sondern dringt etwa eine Wellenlänge tief in das optisch dünnere Medium ein und nimmt exponentiell an Stärke ab. Dieses Feld wird evaneszentes Feld genannt.

So ein Feld bildet sich ebenfalls aus, wenn Laserlicht in das hochbrechende Prisma (optisch dichteres Medium) einer Küvette einfällt und an dessen Grenzfläche zur Probenzelle am Übergang zum optisch dünneren Medium totalreflektiert wird. Um das evaneszente Feld zu verstärken, damit reproduzierbare Messungen möglich werden, befindet sich auf der Grenzseite des Prismas zur Probenzelle eine Resonanzstruktur, der so genannte Resonanzspiegel, welcher aus zwei Schichten besteht (Abb. 11 unteres Bild und Abb. 12). Direkt an das Prisma grenzt die niedrigbrechende Kopplungsschicht, darüber liegt die hochbrechende Resonanzschicht (Wellenleiter). Diese ist mit der Sensoroberfläche beschichtet (Boden der Probenzelle), an die Liganden immobilisiert werden können. Es werden z.Z. sechs verschiedene Sensoroberflächen angeboten.

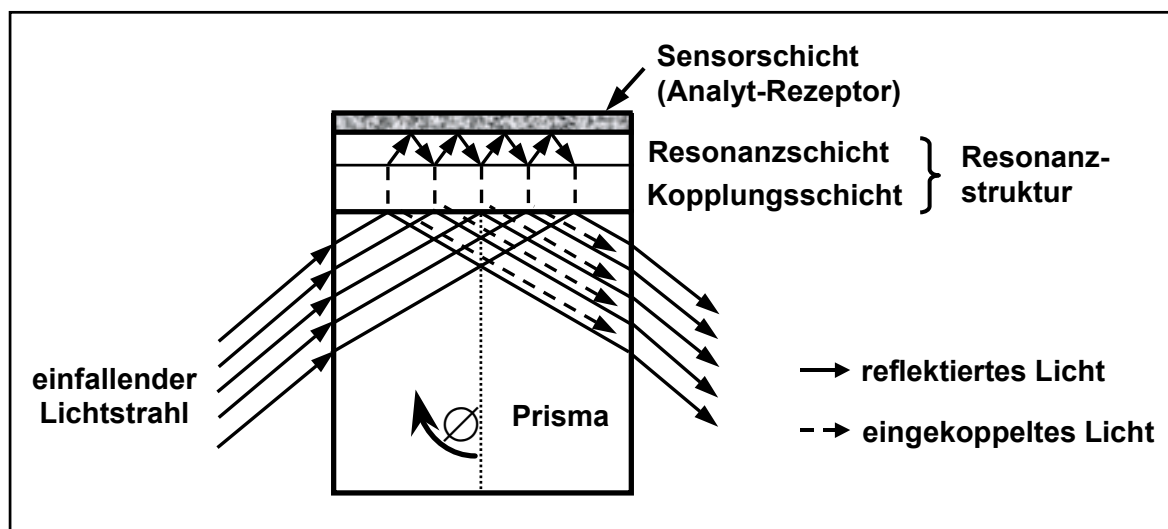


Abb. 12: Prinzipieller Aufbau des Resonant-Mirror-Systems

Normalerweise wird das Licht an der Grenzschicht zur Kopplungsschicht totalreflektiert. Nur bei einem definierten Einfallswinkel (Resonanzwinkel) überschreitet Licht die Grenzfläche zwischen Prisma und Kopplungsschicht und gelangt als evaneszente Welle in den Wellenleiter (Resonanzschicht). In der Wellenleiterschicht breitet sich die Welle weiter aus, bis sie wieder in das Prisma zurückgeführt (eingekoppelt) wird. Der Verlauf des Lichtes im Wellenleiter ist in Abb. 12 dargestellt. Die Polarisatensebene dieses eingekoppelten Lichtes wird durch optische Komponenten um 90°

gedreht, bevor das Licht auf den Detektor trifft. Ein Polarisator vor dem Detektor ermöglicht es, nur dieses Licht und nicht das an der Grenzfläche totalreflektierte Licht zu erfassen.

Wenn der Brechungsindex des Wellenleiters z.B. durch die Immobilisation eines Liganden oder die Bindung Ligand-Ligand an seiner Oberfläche verändert wird, ändert sich auch der Resonanzwinkel, bei dem es zur Fortleitung der evaneszenten Welle im Wellenleiter kommt. Somit kann die Veränderung des Brechungsindex während der Durchführung von Bindungsstudien in der Probenzelle über die Änderung des Resonanzwinkels bestimmt werden. Dabei werden Moleküle in der Probenzelle, die nicht an die Sensoroberfläche gebunden sind, nicht erfasst.

Um Änderungen des Resonanzwinkels bestimmen zu können schwingt der Laser und verändert dabei stetig den Winkel, mit dem das Licht in das Prisma einfällt. Wenn der Einfallswinkel des Lasers genau mit dem Resonanzwinkel übereinstimmt, hat das vom Detektor gemessene Licht maximale Intensität. Dies wird durch die Kurve (x, y-Achse) in Abb. 13 dargestellt, für die der Einfallswinkel des Lasers gegen die Intensität des detektierten Lichtes aufgetragen wurde.

Bei Bindungsstudien wird schließlich die Änderung des Resonanzwinkels, hervorgerufen durch z.B. Bindung oder Dissoziation von Substanzen, über den Zeitraum der Versuchsdurchführung gemessen. Entsprechend der zweiten in Abb. 13 dargestellten Kurve (x, z-Achse), ist in den Messkurven, die die Software des IAsys plus aufzeichnet, der Resonanzwinkel gegen die Zeit aufgetragen (Cammann, 2001; Cush *et al.*, 1993).

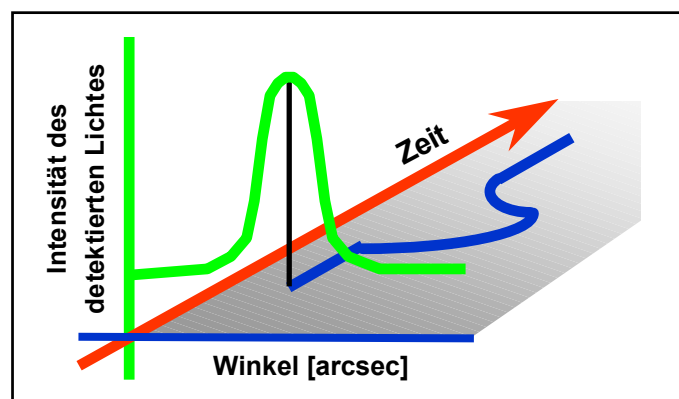


Abb. 13: Verschiebung des Resonanzwinkels während eines Messvorganges.

2.8.2. Der Bindungszyklus

Die Messung biomolekularer Wechselwirkungen mit dem optischen Biosensor IAsys plus beruht darauf, dass ein Bindungspartner (Ligand) kovalent oder durch Adsorption an die Sensoroberfläche am Boden der Probenzelle gekoppelt (immobilisiert) wird (Abb. 14: Punkt 1). Diese Bindung wird als Massezuwachs an der Sensoroberfläche detektiert, d.h. die damit einhergehende Änderung des Brechungsindex bzw. Verschiebung des Resonanzwinkels wird mittels einer spezifischen Laserreflexion abgefragt (Resonanzspiegel Affinometrie, RMA).

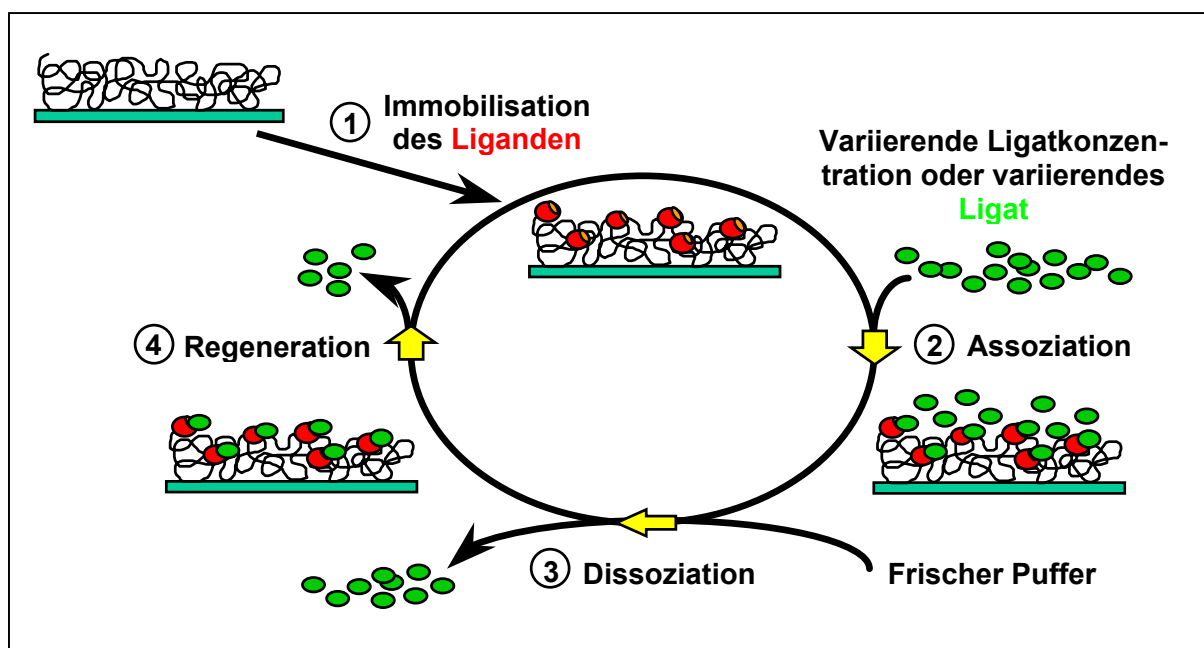


Abb. 14: Darstellung eines möglichen Bindungszyklus

Anschließend wird ein zweiter Partner (Ligat) zugefügt und seine Bindung (Assoziation) an den immobilisierten Liganden und die Bildung eines reversiblen Komplexes aus Ligand und Ligat in Lösung verfolgt (KIESAU, 1999; CUSH *et al.*, 1993). Der Fortschritt der Assoziation (Abb. 14: Punkt 2) nach Ligat-Zugabe ist dabei eine Folge der Konzentration und der molaren Masse des Ligaten sowie seiner Affinität zum Liganden (TRUTNAU, 1998).

Durch Zugabe von frischem Puffer wird anschließend die Dissoziation eingeleitet. Hierbei wird der nicht gebundene Anteil Ligat entfernt (Abb. 14: Punkt 3). Bei der nun folgenden Regenerationsphase (Abb. 14: Punkt 4) wird auch das gebundene Ligat

gänzlich losgelöst und entfernt, die Oberfläche ist bereit, den nächsten Bindungszyklus zu durchlaufen.

Die Messung einer Bindungskurve mit dem IAsys plus ist in Abb. 15 dargestellt. Dabei gliedert sich die Bindung eines Ligates an einen immobilisierten Liganden nach KIESAU (1999) in die vier folgenden Phasen:

1. Aufzeichnung der Basislinie (Bindungspuffer ohne Ligat)
2. Bindung (Zugabe des Ligates)
3. Dissoziation (Wechsel zum Bindungspuffer ohne Ligat)
4. Regenerationsphase, bei der das gebundene Ligat gänzlich losgelöst wird, damit der nächste Bindungszyklus durchlaufen werden kann.

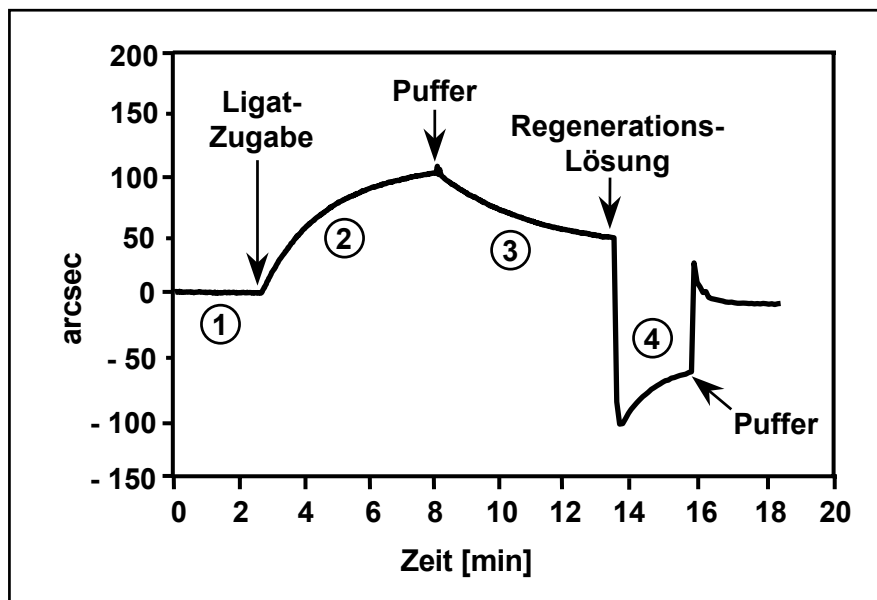


Abb. 15: Typisches Bindungsprofil des Ligates nach der Immobilisierung des Liganden gemessen mit dem IAsys plus.

Unterschiede in der Methode ergeben sich anhand der unterschiedlichen Oberflächen der Küvetten. Zu dem IAsys plus werden z.Z. sechs verschiedene Sensormatrices angeboten (Aminosilan, Biotin, Carboxylat, Hydrophob, Nicht-derivatisiert, Carboxymethyl Dextran / Carboxymethyl Dextran Selekt).

2.8.3. Der Bindungsassay an Biotin-Küvetten

Je nach gewählter Küvetten-Oberfläche kann der Bindungsassay mehr Schritte als der in 2.8.2. beschriebene Bindungszyklus umfassen. Bei der Verwendung von Biotin-Küvetten verläuft der Bindungsassay nach dem Sandwich-ELISA-Prinzip (Abb. 16). Hier wird zunächst Streptavidin bzw. Avidin oder NeutrAvidin™ an die Biotin-Oberfläche gebunden und anschließend der Ligand über einen Biotin-Rest an das Streptavidin gebunden. Damit unterteilt sich dieser Assay in fünf Schritte:

1. Immobilisierung von Streptavidin, Avidin oder NeutrAvidin™
2. Erste Bindung (Zugabe des biotinylierten Liganden)
3. Zweite Bindung (Zugabe des Ligates)
4. Dissoziation (Wechsel zum Bindungspuffer ohne Ligat)
5. Regenerationsphase, bei der entweder nur das gebundene Ligat losgelöst oder die Küvette bis auf die Biotin-Oberfläche totalregeneriert wird.

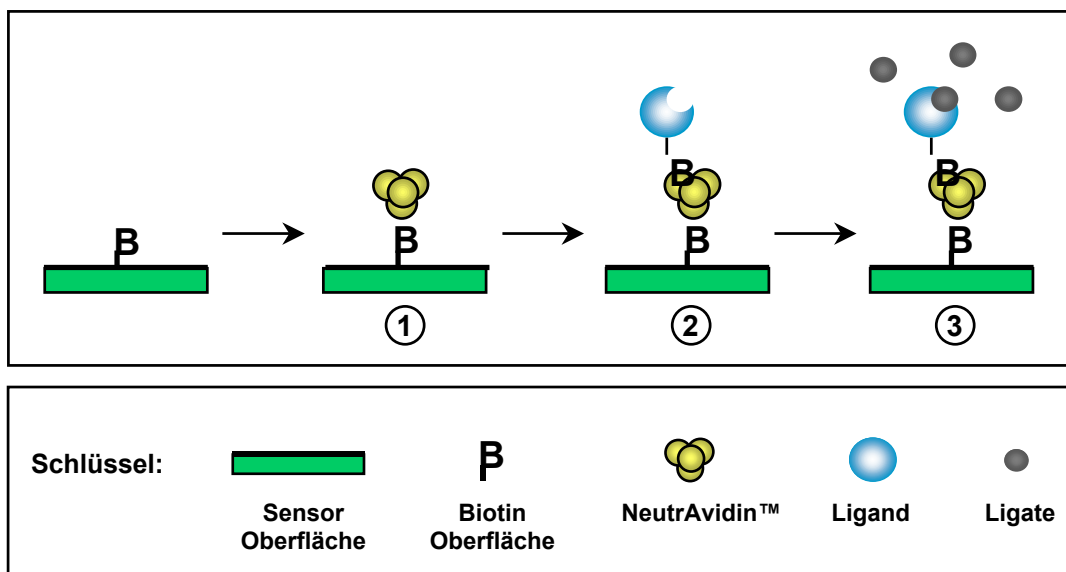


Abb. 16: Schematische Darstellung des Bindungsassays an Biotin-Küvetten (Sandwich-ELISA)

Das System des Sandwich-ELISA wird bereits für viele biologische Assays eingesetzt.

2.8.4. Bakterienaufarbeitung

Zunächst wird eine Bakterienkultur, wie unter 2.2.2. beschrieben, auf einer Agarplatte ausgestrichen und inkubiert (Anhang 7.2.8.1.). Die Bakterien werden mit PBS von der Platte abgespült, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und einmal mit Phosphat gepufferter Salzlösung + Tween (PBS/T) gewaschen.

Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Thomakammer werden geeignete Verdünnungen hergestellt.

2.8.5. Immobilisierung des NeutrAvidinTM

Eine Biotinküvette wird in das IAsys plus eingespannt (Anhang 7.2.8.2.). Da Lösungen direkt in der Küvette gerührt und über eine Absaugvorrichtung aus dem Gerät entfernt werden können, wird die Küvette während der gesamten Untersuchung nicht mehr aus dem IAsys plus entfernt.

Die Biotin-Oberfläche wird mehrmals mit PBS/T gewaschen, anschließend wird mit PBS/T 10 min equilibriert. Die Aufzeichnung wird gestartet und Temperatur, Rührerfrequenz und Datenaufnahme (0,3 – 60 sec pro Messpunkt) eingestellt. Nachdem 3 min lang die Basislinie aufgezeichnet wurde, wird NeutrAvidinTM-Lösung in die Küvette gegeben und zum Binden für 10 min in der Küvette gelassen. Anschließend wird mit PBS/T und Glycin/HCl abwechselnd gewaschen und abschließend erneut mit PBS/T die Basislinie aufgezeichnet. Die Differenz der Basislinien vor und nach der Bindungskurve entspricht der gebundenen Menge an NeutrAvidinTM auf der Biotin-Oberfläche. Hierbei gilt, dass eine Winkeländerung von 600 arcsec etwa 1 ng gebundenen Protein pro 1 mm² Oberfläche entsprechen. Die Oberfläche der Biotin-Küvette umfasst 4 mm².

Zur Kontrolle, ob die Biotin-Oberfläche vollständig mit NeutrAvidinTM belegt ist, wird für 2 min BSA-Lösung in die Küvette gegeben. Dabei darf mit dem BSA keine Bindung stattfinden, d.h. keine Bindungskurve aufgezeichnet werden. Danach wird wieder mit PBS/T gespült.

Anstelle des üblicherweise für den Biotin-Sandwich-ELISA verwendeten Streptavidins bzw. Avidins wird bei diesem Assay das NeutrAvidinTM Biotin-Bindungsprotein eingesetzt, welches sich durch seine geringeren unspezifischen Bindungseigen-

schaften auszeichnet. NeutrAvidin™ ist ein modifiziertes Avidin-Derivat, es ist im Gegensatz zum Avidin deglykosiliert. Durch das Fehlen von Kohlenhydraten ist es nicht mehr in der Lage, Lektine zu binden, bzw. die Lektin-Bindungsaktivität ist auf ein nicht detektierbares Minimum reduziert. Ein Vorteil gegenüber Streptavidin ist, dass NeutrAvidin™ keine Arg-Tyr-Asp Tripeptid-Sequenz (RYD) enthält, welche als Erkennungssequenz für Rezeptoren bei der zellulären Adhäsion fungiert. Durch das Fehlen dieser Erkennungssequenz werden nichtspezifische Bindungen an vielen Zelltypen unterdrückt, die durch Interaktionen mit Membran-Rezeptor-Molekülen zustande kommen.

Das Molekulargewicht von NeutrAvidin™ beträgt annähernd 60000 Dalton. Die spezifische Bindungsaktivität für Biotin ist ca. 14 µg/mg Protein und entspricht fast der theoretisch maximalen Aktivität. Die Löslichkeit von NeutrAvidin™ in Wasser beträgt ca. 10 mg/mL, in PBS-Puffer ist es unlöslich.

2.8.6. Bindung von biotinylierten Liganden an die NeutrAvidin™-Oberfläche

Nach dem Beschichten der Biotin-Oberfläche mit NeutrAvidin™ können die verschiedenen biotinylierten Substanzen gebunden werden (Anhang 7.2.8.3.). Zu den untersuchten PBS/T-Puffer-löslichen Substanzen gehören das biotinylierte Glykokonjugat N12 (auch Glykocluster N12), biotinylierte Mannose und biotinyliertes Mannose-6-Phosphat. Die Substanzen werden in einer Konzentration von 2 mg/mL in PBS gelöst und für ca. 10 min in die Küvette gegeben. Anschließend wird mit PBS/T gespült.

Substanzen, die in PBS/T-Puffer unlöslich sind, müssen in Methanol gelöst in die Küvette gegeben werden. Dies hat keinen Einfluss auf die NeutrAvidin™-Oberfläche, solange eine Bindungszeit von ca. 5 min nicht überschritten wird. Zu den untersuchten Substanzen gehören KS-IV-145 (biotinyliertes Methyl- α -Mannosid) und KS-IV-153 (biotinyliertes Methyl- α -Mannosid mit einer C₁₅ Lipid-Seitenkette). Nach der Bindung wird gründlich mit PBS/T gespült.

Die Differenz zwischen der Pufferlinie vor und nach der Zugabe der biotinylierten Substanzen entspricht deren gebundenen Anteil. Dabei entsprechen 600 arcsec etwa 1 ng pro 1 mm² Oberfläche bei einer Gesamtoberfläche der Biotin-Küvette von 4 mm².

2.8.7. Adhäsion von Corynebakterien

Zur Untersuchung der Bindungsaffinität werden die Corynebakterien in einer geeigneten Konzentration in PBS/T suspendiert in die Küvette gegeben (Anhang 7.2.8.4.), die zuvor mit einer biotinylierten Substanz beschichtet wurde, wie unter 2.8.6. beschrieben. Anschließend wird mit PBS/T gespült. Die Bindungskurve bzw. die daraus resultierende Verschiebung der Basislinie zeigt die Bindung von Corynebakterien an.

2.8.8. Regeneration der Biotinküvette

Es ist möglich, eine Biotinküvette mehrfach zu verwenden. Hierfür muss der gebundene NeutrAvidinTM-Ligand von der Oberfläche wieder entfernt werden (Anhang 7.2.8.5.). Eine 2 minütige Behandlung der Oberfläche außerhalb des IAsys plus mit gesättigter Kaliumhydroxidlösung ist im allgemeinen ausreichend, um das gebundene Protein komplett zu entfernen. Es ist sehr wichtig, anschließend schnell und gründlich zu waschen, um alle Spuren der Kaliumhydroxidlösung vollständig zu entfernen, bevor die Küvette wieder verwendet wird.

2.9. Statistik

Die Auswertung der unabhängigen Messdaten erfolgte mit dem zweiseitigen zwei-Stichproben Mittelwert-t-Test. Zuvor wurde mittels F-Test untersucht, ob die Standardabweichungen einen Unterschied aufweisen und in Abhängigkeit vom Ergebnis des F-Tests der Freiheitsgrad berechnet. Die statistische Sicherheit wurde für 95 % und 99 % untersucht, d. h. ein Signifikanzniveau α von 0,05 und 0,01. Für die Urteilsbildung galt:

Bei einem p-Wert $< 0,05$ war ein Unterschied signifikant, bei $p < 0,01$ war ein Unterschied hoch signifikant.

3. ERGEBNISSE

3.1. Mikroskopische Untersuchung der Adhäsion von Corynebakterien an Stratum corneum

Bei dieser Untersuchung sollte ein optischer Eindruck der Adhäsion von Corynebakterien an das Stratum corneum gewonnen werden (Abb. 17). Aus einer Biopsie wurde das Stratum corneum isoliert und auf einem Objektträger mit den Bakterien überschichtet. Bei einer anschließenden Färbung mit Kristallviolett wurden nur die Bakterien angefärbt, die toten und verhornten Corneozyten des Stratum corneums blieben farblos.

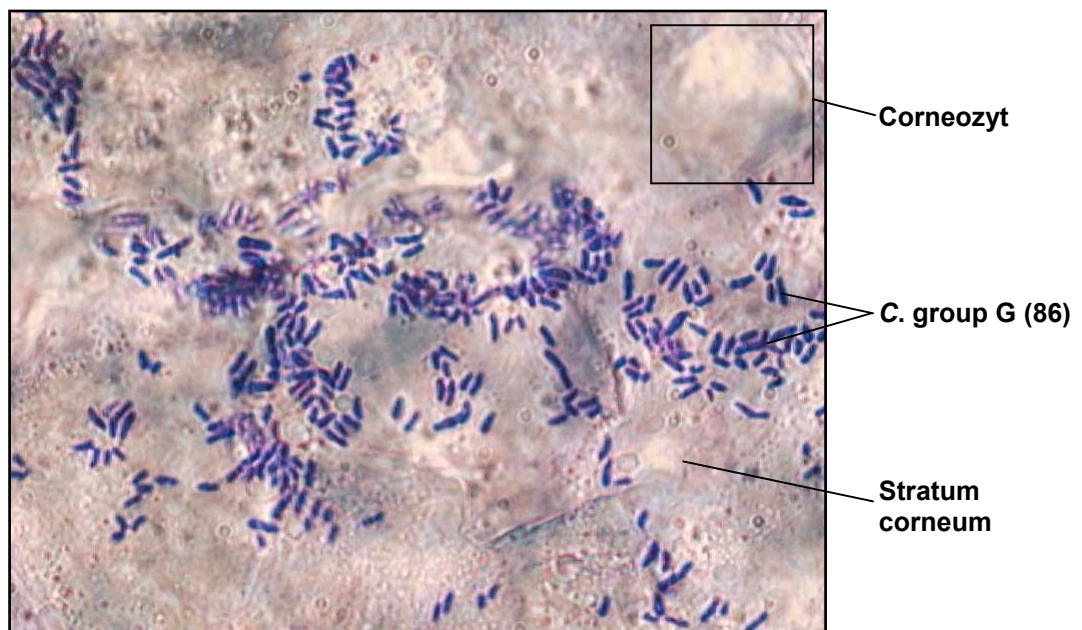


Abb. 17: Bindung von C. group G (86) an Stratum corneum.

Aufgrund der Dicke und Unregelmäßigkeit des Stratum corneums sind die einzelnen Corneozyten mikroskopisch nicht genau zu fokussieren. In der Mitte von Abb. 17 ist ein Corneozyt zu erkennen, der mit Bakterien besetzt ist. Der Nachweis für die Adhäsion von Corynebakterien (hier: C. group G (86)) an das Stratum corneum konnte erbracht werden.

3.2. Nachweis der bakteriellen Adhäsion an Ganglioside mittels HPTLC und Overlay-Assay

Aus vorangegangenen Arbeiten von DELEKAT (1999) und BÜNGER (1996) ist bekannt, dass Staphylokokken eine Bindungsaffinität zu Gangliosiden zeigen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch Corynebakterien eine Bindungsaffinität zu den Gangliosiden aufweisen.

Um die Bindungsaffinitäten für Ganglioside zu bestimmen, musste zunächst eine geeignete Methode zur Gewinnung und Aufarbeitung von Lipidextrakten aus Corneozyten und Keratinozyten gefunden werden. Die Untersuchung der Keratinozyten diente als Kontrolle, da über das Vorkommen von Gangliosiden in Corneozyten keine Angaben in der Literatur vorlagen.

3.2.1. Optimierung der Methode zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an Ganglioside mittels HPTLC

3.2.1.1. Optimierung des Fließmittels

Um die Ganglioside zu trennen, wurde ein Fließmittel gesucht, mit dem die zu den polareren Lipiden gehörenden Ganglioside auf der polaren Kieselgelplatte getrennt werden können. Der Einsatz von Reversed-Phase (RP) Kieselgelplatten war nicht möglich, da sich diese aufgrund ihrer unpolaren Oberfläche nicht mit wässrigen Bakterienlösungen überschichten lassen.

Zunächst wurde ein Fließmittelgemisch aus Chloroform (CHCl_3) / Methanol (MeOH) / 0,2 % Calciumchloridlösung (CaCl_2 -Lsg.) in H_2O (50:40:10, v/v/v) getestet, das nach WIESNER und SWEELEY (1995) besonders gut für Ganglioside geeignet ist. Eine gute Bandenschärfe bzw. Trennung der Ganglioside wurde damit nicht erreicht.

Bessere Ergebnisse brachte ein Fließmittelgemisch mit einem höheren CaCl_2 -Anteil (Abb. 18), wobei ein zu hoher CaCl_2 -Anteil dazu führte, dass die Gangliosidspots verliefen. Die beste Auftrennung zeigte sich mit einem Fließmittelgemisch aus CHCl_3 / MeOH / 2 % CaCl_2 -Lsg. in H_2O (60:40:9, v/v/v).

Eine noch bessere Trennung wurde nach Veränderung der Zusammensetzung dieses Fließmittels erzielt (Abb. 19). Die optimale Zusammensetzung lag bei CHCl_3 / MeOH / 2% CaCl_2 -Lsg. in H_2O (80:40:7, v/v/v).

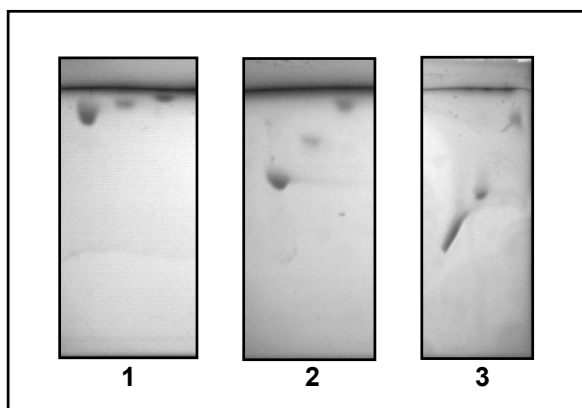


Abb. 18: Wirkung von CaCl_2 auf die Trennung von Gangliosiden.

Standards: Monosialogangliosid G_{M1} , $-G_{M2}$, und $-G_{M3}$

1. $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 0,2\% \text{ CaCl}_2\text{-Lsg. in H}_2\text{O}$ (60:40:9, v/v/v)
2. $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 2\% \text{ CaCl}_2\text{-Lsg. in H}_2\text{O}$ (60:40:9, v/v/v)
3. $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 5\% \text{ CaCl}_2\text{-Lsg. in H}_2\text{O}$ (60:40:9, v/v/v)

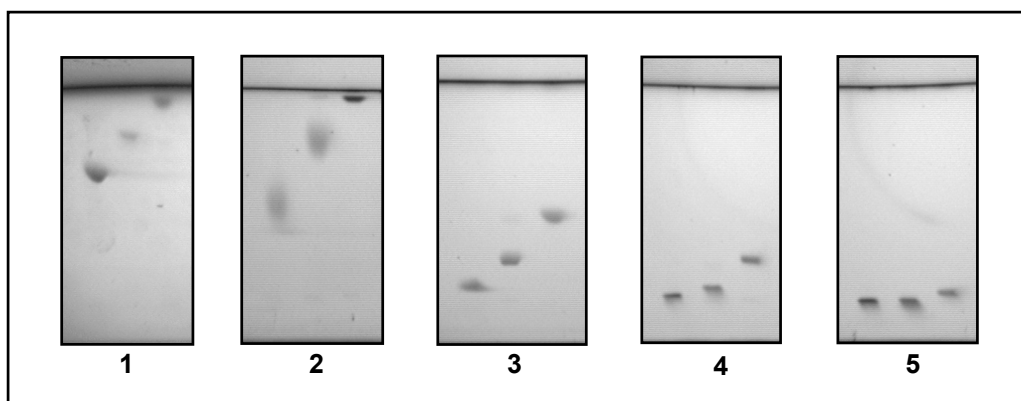


Abb. 19: Auswirkung der Fließmittelzusammensetzung auf die Trennung der Ganglioside.

Standards: Monosialogangliosid G_{M1} , $-G_{M2}$, und $-G_{M3}$

1. $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 2\% \text{ CaCl}_2\text{-Lsg. in H}_2\text{O}$ (60:40:9, v/v/v)
2. $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 2\% \text{ CaCl}_2\text{-Lsg. in H}_2\text{O}$ (70:40:8, v/v/v)
3. $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 2\% \text{ CaCl}_2\text{-Lsg. in H}_2\text{O}$ (80:40:7, v/v/v)
4. $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 2\% \text{ CaCl}_2\text{-Lsg. in H}_2\text{O}$ (90:40:4, v/v/v)
5. $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / 2\% \text{ CaCl}_2\text{-Lsg. in H}_2\text{O}$ (90:30:2, v/v/v)

Durch Einsatz eines zweiten Fließmittelgemisches konnte die Bandenschärfe erhöht werden. Somit wurden für die Trennung von Gangliosiden die in Tab. 2 aufgeführten Fließmittelgemische verwendet.

Im Folgenden wurden die HPTLC-Platten nacheinander in Fließmittel 1 und 2 entwickelt, dazwischen wurden die Platten luftgetrocknet. Die Laufstrecke wurde jeweils von der Startlinie der Substanzen gemessen.

Nr.	Fließmittel	Zusammensetzung	Laufstrecke
1	Chloroform / Methanol / 2 % CaCl ₂ -Lsg. in H ₂ O	80 : 40 : 7, v/v/v	4 cm
2	Chloroform / Ethanol / 2 % CaCl ₂ -Lsg. in H ₂ O	90 : 20 : 1, v/v/v	5 cm

Tab. 2: Eingesetzte Fließmittelgemische für die Trennung von Gangliosiden.

3.2.1.2. Optimierung der Extraktgewinnung

Für die Gewinnung von Lipidextrakten wurden zwei Methoden getestet. Zum einen wurden die Lipide aus Corneozyten, die zuvor von der Hautoberfläche gewonnen wurden, bzw. aus HaCaT- und primären Keratinozyten extrahiert. Zum anderen wurden die Lipide direkt von der Hautoberfläche extrahiert.

Für die erste Methode wurden die gewonnenen Corneozyten und Keratinozyten zunächst durch Zentrifugation vom Puffer bzw. Nährmedium getrennt. Anschließend wurden die Lipide durch Extraktion mit einem Lösungsmittelgemisch extrahiert. Als erstes wurde hierfür CHCl₃ / MeOH (2:1, v/v) getestet. Beim Extrahieren in Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen verformten sich die Röhrchen nach mehreren Stunden Kontaktzeit mit dem Lösungsmittelgemisch. Bei erneuten Untersuchungen wurden die Corneozyten der Probanden in drei Aliquots geteilt und die Extraktionen in Glas- und Polypropylenröhrchen durchgeführt. Dabei wurde die Extraktionslösung nur wenige Minuten in den Polypropylenröhrchen gelassen, um Verformungen zu vermeiden. Die Lipidausbeuten wurden miteinander verglichen (Tab. 3).

Proband	weiblich, 32 Jahre	männlich, 39 Jahre
Polypropylenröhrchen, CHCl ₃ / MeOH (2:1, v/v)	2,0 mg	3,2
Glasröhrchen, CHCl ₃ / MeOH (2:1, v/v)	1,1 mg	0,7
Glasröhrchen, Aceton / EtOH (1:1, v/v)	1,1 mg	0,8

Tab. 3: Vergleich der Lipidausbeute von Extraktionen aus Corneozyten bei Anwendung verschiedener Lösungsmittelgemische und Extraktionsbehälter.

Die Corneozyten wurden von zwei Arealen pro Proband gewonnen.

Extraktionen in Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen ergaben eine wesentlich höhere Lipidausbeute als Extraktionen, die in Zentrifugenröhrchen aus Glas durchgeführt wurden. Der Verdacht, dass durch CHCl_3 / MeOH (2:1, v/v) Inhaltsstoffe aus dem Polypropylen herausgelöst wurden, wurde durch einen Blindversuch ohne Corneozyten bestätigt. Das gleiche Ergebnis ergaben Zentrifugenröhrchen aus Polystyrol. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen nur noch Zentrifugenröhrchen aus Glas verwendet.

Für einen Vergleich mit der zweiten Methode, der direkten Extraktion von der Hautoberfläche, durfte kein Chloroform aufgrund der Giftigkeit für den Probanden verwendet werden. Aus diesem Grund wurde Aceton / EtOH (1:1, v/v) ersatzweise bei Corneozyten getestet. Die Verwendung dieses Lösungsmittelgemisches ergab die gleiche Lipidausbeute wie CHCl_3 / MeOH (2:1, v/v) (Tab. 3).

Um das Lösungsmittelgemisch einzuengen, wurden die Extrakte in zuvor gewogene 25 mL Spitzkolben gegeben, mit einem Rotationsverdampfer das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen und der Rückstand im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht. Die Lipidausbeute wurde durch Differenzwägung ermittelt und der Rückstand in CHCl_3 / MeOH (2:1, v/v) aufgenommen.

Da unbekannt war, ob sich die Lipide bei diesen Bedingungen bereits oxidieren, wurde die Aufarbeitung auch unter Stickstoff durchgeführt, d.h. in die Zentrifugenröhrchen und die Spitzkolben wurde zuvor Stickstoff geblasen. Desweiteren wurden Extrakte nicht mit dem Rotationsverdampfer, sondern direkt im Stickstoffstrom eingengt.

Die Extrakte wurden in gleicher Konzentration auf eine HPTLC-Platte aufgebracht und entwickelt. Der Extrakt, der im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht wurde, zeigte die meisten und dicksten Banden. Der Ausschluss von Sauerstoff und die Trocknung ohne Wärme und Vakuum haben offenbar bei den empfindlicheren Lipiden eine teilweise Oxidation verhindert (Abb. 20)

Um die Vollständigkeit der Extraktion zu überprüfen, wurden die Corneozyten mehrmals nacheinander mit Lösungsmittel für 15 min versetzt. Nach der dritten Extraktion waren die Corneozyten lipidfrei. Auch durch eine weitere Extraktion, bei der die Corneozyten 12 Stunden mit dem Lösungsmittel versetzt wurden, konnten keine Lipide mehr gewonnen werden.

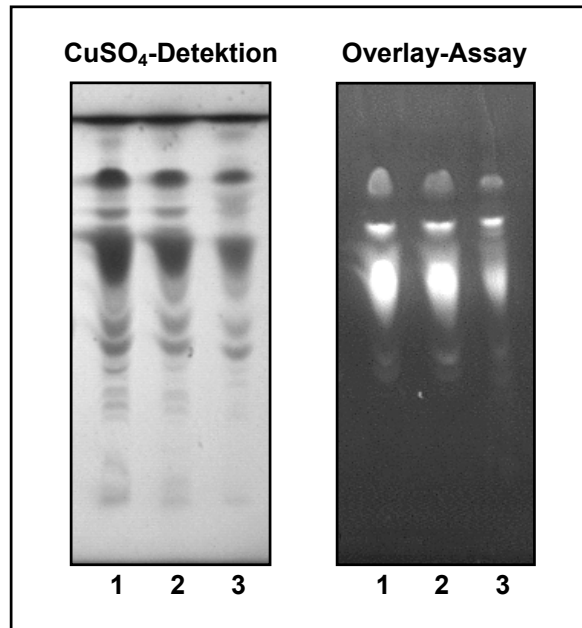


Abb. 20: Vergleich der Extraktanfarbungen von Keratinozyten mit und ohne Stickstoff.

Die Substanzen wurden am unteren Rand der Kieselgelplatten aufgetragen und in den Fließmitteln für Ganglioside entwickelt (Tab. 2). Die linke Platte wurde mit CuSO₄ detektiert. Die rechte Platte wurde mit Plexigum-Lösung, BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet und mit UV-Licht (366 nm) detektiert. Die Substanzen unterschieden sich in der Aufarbeitung:

1. Einengung des Extraktes im Stickstoffstrom.
2. Einengung mit Rotationsverdampfer, Aufarbeitung in Stickstoffatmosphäre.
3. Einengung des Extraktes mittels Rotationsverdampfer.

Da bei der Extraktion der Lipide aus Corneozyten und Keratinozyten die Lipidausbeute sehr gering war und für weitere Untersuchungen im Overlay oftmals nicht ausreichte, sollte die zweite Methode auf ihre Ergiebigkeit untersucht werden. Hierfür wurden jeweils beim gleichen Probanden Corneozyten gewonnen und Lipide direkt extrahiert (Tab. 4).

Proband	weiblich, 32 Jahre	männlich, 39 Jahre
direkte Extraktion, Aceton / EtOH (1:1, v/v)	2,9 mg	2,1 mg
Extraktion aus Corneozyten, Aceton / EtOH (1:1, v/v)	1,1 mg	0,8 mg

Tab. 4: Vergleich der Lipidausbeute nach Extraktion aus Corneozyten und direkter Extraktion von 2 Arealen.

Die Aufarbeitungen wurden in Zentrifugenröhrchen aus Glas durchgeführt.

Die direkte Extraktion von der Hautoberfläche brachte die höhere Ausbeute und wurde daher im Folgenden für die Lipidextraktgewinnung angewandt.

3.2.2. Untersuchung der Bindungsaffinität von *C. group G* (86) an Ganglioside

Der Vergleich der Bindungsaffinität von *C. group G* (86) an verschiedene Glykolipide sollte Auskunft darüber geben, welche Molekülstrukturen von *C. group G* (86) für die Adhäsion genutzt werden.

Es wurden zwölf verschiedene Glykolipidstandards, davon neun Ganglioside, in drei verschiedenen Konzentrationen (0,25 µg, 0,5 µg und 1 µg) auf HPTLC-Platten aufgetragen. Eine Entwicklung der Platten war für die Bestimmung der Bindungsaffinität nicht notwendig. Die Platte wurde mit fluoreszenzmarkiertem *C. group G* (86) überschichtet (Abb. 21).

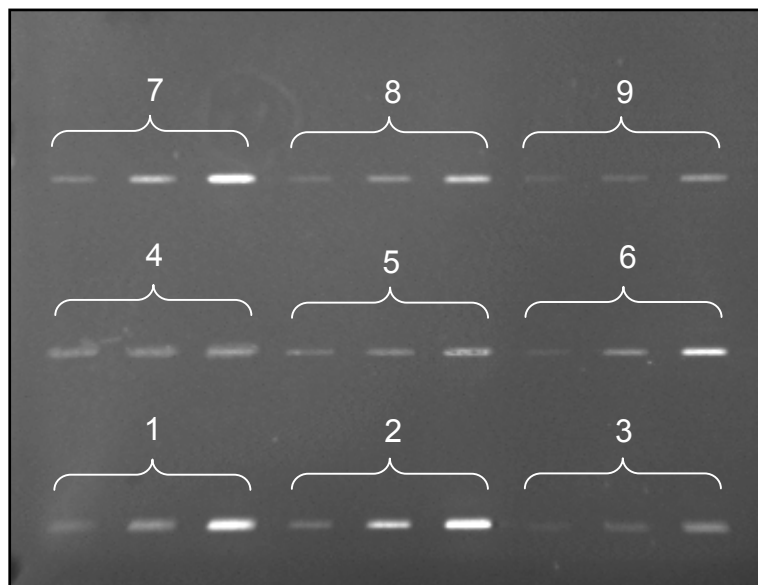


Abb. 21: Beispiel für eine HPTLC-Platte zur Bestimmung der minimalen Konzentration an Glykolipiden für die Adhäsion von *C. group G* (86).

Es wurden Standardkonzentrationen von 0,25 µg, 0,5 µg und 1 µg pro Spur von links nach rechts aufgetragen. Die Platte wurde nicht im Fließmittel entwickelt, sondern direkt mit Plexigum-Lösung, BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht (366 nm).

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 1.) Monosialogangliosid G_{M1} | 6.) Disialogangliosid G_{D1a} |
| 2.) Monosialogangliosid G_{M2} | 7.) Disialogangliosid G_{D1b} |
| 3.) Monosialogangliosid G_{M3} | 8.) Disialogangliosid G_{D2} |
| 4.) Asialogangliosid G_{M1} | 9.) Disialogangliosid G_{D3} |
| 5.) Asialogangliosid G_{M2} | |

Die Detektion erfolgte über die Fluoreszenzintensität der an die Standards adhären-ten Bakterien. Die Auswertung der Banden erfolgte mit Hilfe der ONE-Dscan™ Auswertesoftware durch die Integration der gemessenen optischen Dichte [IntOD] mittels der Gauß Integrations-Methode (Anhang 7.1.1.2). Die Bindungsaffinität zu den Stan-

dards wurde in sehr gut (+++), gut (++), weniger gut (+) und schlecht ((+)) abgestuft. Da die Adhäsion bei steigender Konzentration nicht linear verlief, wurde die Adhäsion an 1 µg Standard verglichen. Es gab keinen Standard als Negativkontrolle, da C. group G (86) an alle untersuchten Standards eine Bindungsaffinität aufwies (Tab. 5).

Standard	C. group G (86)
Asialogangliosid G _{M1}	+
Asialogangliosid G _{M2}	+
Disialogangliosid G _{D1a}	++
Disialogangliosid G _{D1b}	+++
Disialogangliosid G _{D2}	++
Disialogangliosid G _{D3}	+
Monosialogangliosid G _{M1}	+++
Monosialogangliosid G _{M2}	+++
Monosialogangliosid G _{M3}	+
Globosid	(+)
Glucocerebrosid	(+)
Lactocerebrosid	(+)

Tab. 5: Bestimmung der Bindungsaffinität von C. group G (86) zu ausgewählten Glykolipiden.

Die Untersuchung erfolgte mittels HPTLC entsprechend der Durchführung wie in Abb. 21 dargestellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und mit der ONE-Dscan™ Software ausgewertet.

In dieser Bindungsstudie konnte gezeigt werden, dass C. group G (86) mit hoher Affinität an Disialogangliosid G_{D1b}, Monosialogangliosid G_{M1} und Monosialogangliosid G_{M2} adhärierte.

Zur Erstellung einer Kohlenhydrat-Konsensussequenz wurden die Strukturen dieser drei Substanzen herangezogen, da sie die höchste Bindungsaffinität zu C. group G (86) aufgewiesen. Aus den Übereinstimmungen ergaben sich die von C. group G (86) genutzten Rezeptorstrukturen (Abb. 22).

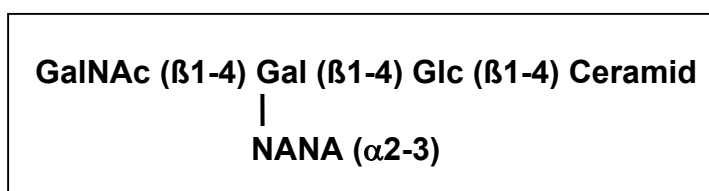


Abb. 22: Konsensussequenz der Glykolipide für C. group G (86).

Ermittelt wurde die Konsensussequenz über die Bestimmung der Bindungsaffinität von C. group G (86) zu verschiedenen Glykolipiden mittels HPTLC und Overlay-Assay (Abb. 21 und Tab. 5).

3.2.3. Untersuchung der Bindungseigenschaften von Corynebakterien an Lipidextrakte

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Auftrennung der Lipidextrakte mittels HPTLC dargestellt.

Auf einer 20 x 10 cm² großen HPTLC-Platte wurden die Lipidextrakte sowie Standards auf die linke und rechte Seite jeweils in identischen Mengen aufgetragen. Nach der Entwicklung im Fließmittel wurde die HPTLC-Platte in der Mitte getrennt. Die eine Hälfte wurde unspezifisch mit Kupfersulfat (CuSO₄)-Lösung detektiert, wodurch alle aufgetragenen Lipide sichtbar gemacht wurden. Die andere Hälfte wurde mit *C. group G* (86) überschichtet (Overlay Assay). Anschließend wurden nur die Lipidbanden, an die DAPI-gefärbte Bakterien adhäriert haben, durch Bestrahlung mit UV-Licht zum Fluoreszieren angeregt. Das Chromatogramm der „Adhäsions-positiven“ Lipide wurde mit dem Chromatogramm der gefärbten Kontrollplatte (CuSO₄-Detektion) verglichen.

Durch die Gleichbehandlung der Plattenhälften bis zur Detektion wurde gewährleistet, dass Unterschiede zwischen den Chromatogrammen auf die verschiedenen Detektionsmethoden zurückzuführen waren.

Abb. 23 zeigt die Auftrennung von fünf verschiedenen Gangliosidstandards, einem Corneozyten- und einem Keratinozyten-Lipidextrakt. Die getesteten Gangliosidstandards entsprachen den natürlich vorkommenden Gangliosiden, wobei in Abb. 23 nicht alle Ergebnisse aufgeführt sind.

Das Bindungsmuster der Bakterien zeigte bei dem Corneozyten- und Keratinozyten-Lipidextrakt deutliche Unterschiede. Beim Lipidextrakt aus Corneozyten waren keine Banden in Höhe der Ganglioside zu sehen. Statt dessen waren die Lipide vermehrt in der Fließmittelfront zu finden. Der Lipidextrakt aus Keratinozyten hatte mehrere Banden im Bereich der Gangliosidstandards, wobei nach der Detektion mit CuSO₄ mehr Banden sichtbar waren als nach dem Overlay Assay.

Im Vergleich lagen nur Asialogangliosid G_{M1} und Monosialogangliosid G_{M3} etwa auf einer Höhe mit einer Bande im Lipidextrakt aus Keratinozyten. Die anderen Standards zeigten keine Übereinstimmung. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Bande um eines der beiden Ganglioside handelte, wurde der Lipidextrakt aus Keratinozyten mit Asialogangliosid G_{M1} bzw. Monosialogangliosid G_{M3} dotiert (Abb. 24).

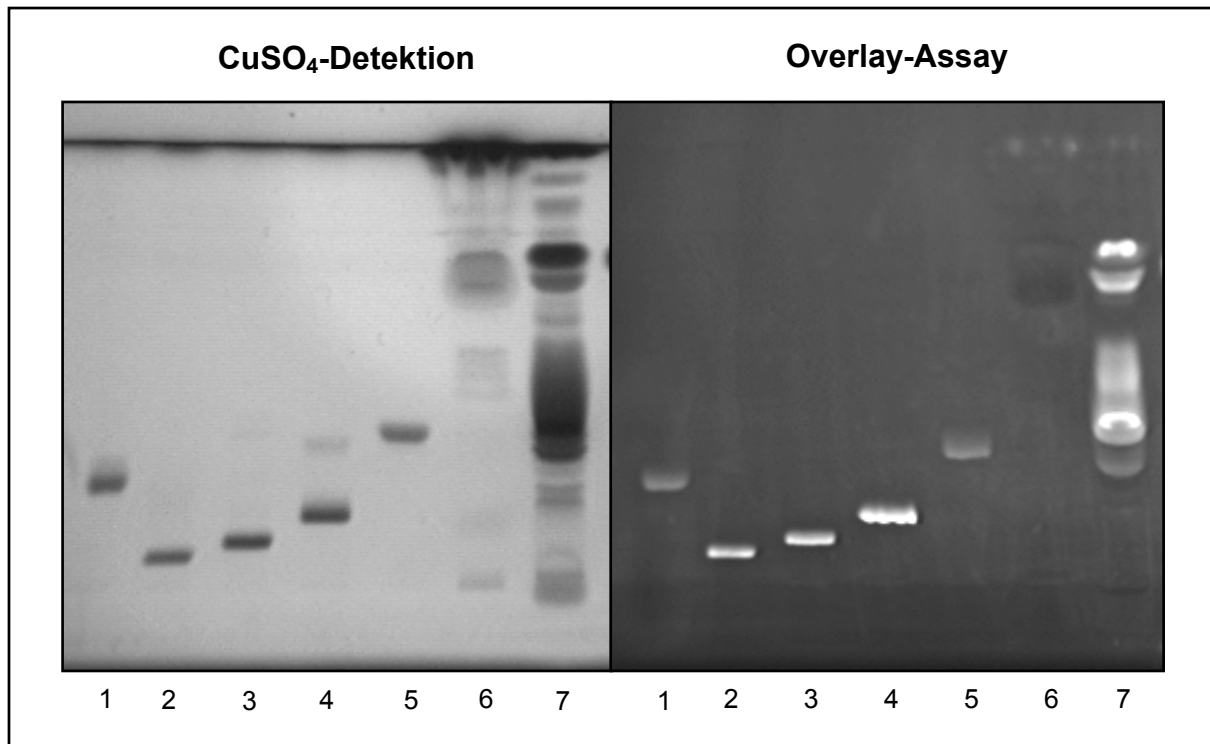


Abb. 23: Chromatogramme von Gangliosidstandards und Lipidextrakten nach CuSO₄-Färbung und Overlay Assay mit C. group G (86).

Die genaue Aufschlüsselung der Spuren befindet sich in Tab. 6. Die Substanzen wurden am unteren Rand der Kieselgelplatten aufgetragen und im Fließmittel für Ganglioside entwickelt (Tab. 2). Die linke Platte wurde mit CuSO₄-Lösung detektiert. Nach Überschichtung mit Plexigum-Lösung, BSA-Lösung und Bakterienlösung wurde die rechte Platte mit UV-Licht (366 nm) detektiert.

Nr.	Substanz	CuSO ₄ -Detektion	Overlay Assay
1	Asialogangliosid G _{M1}	2,5 µg / Spur	12,5 µg / Spur
2	Disialogangliosid G _{D3}	2,0 µg / Spur	5,0 µg / Spur
3	Monosialogangliosid G _{M1}	2,0 µg / Spur	5,0 µg / Spur
4	Monosialogangliosid G _{M2}	2,0 µg / Spur	10,0 µg / Spur
5	Monosialogangliosid G _{M3}	2,0 µg / Spur	12,5 µg / Spur
6	Lipidextrakt aus Corneozyten	200 µg / Spur	400 µg / Spur
7	Lipidextrakt aus Keratinozyten	100 µg / Spur	200 µg / Spur

Tab. 6: Anlage zu Abb. 23, Substanzschlüssel und aufgetragene Konzentrationen.

Die aufgetragenen Mengen für den Overlay-Assay ergaben sich aus Vorversuchen.

Für die Dotierung wurde der Lipidextrakt aus Keratinozyten zusammen mit jeweils einem der Standards auf eine Spur aufgetragen. Im Vergleich mit dem nicht dotierten Lipidextrakt tauchte bei den Dotierungen jeweils eine zusätzliche Bande auf. Es

konnte somit ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Bande des Keratinozyten-Lipidextraktes um Asialogangliosid G_{M1} oder Monosialogangliosid G_{M3} handelt.

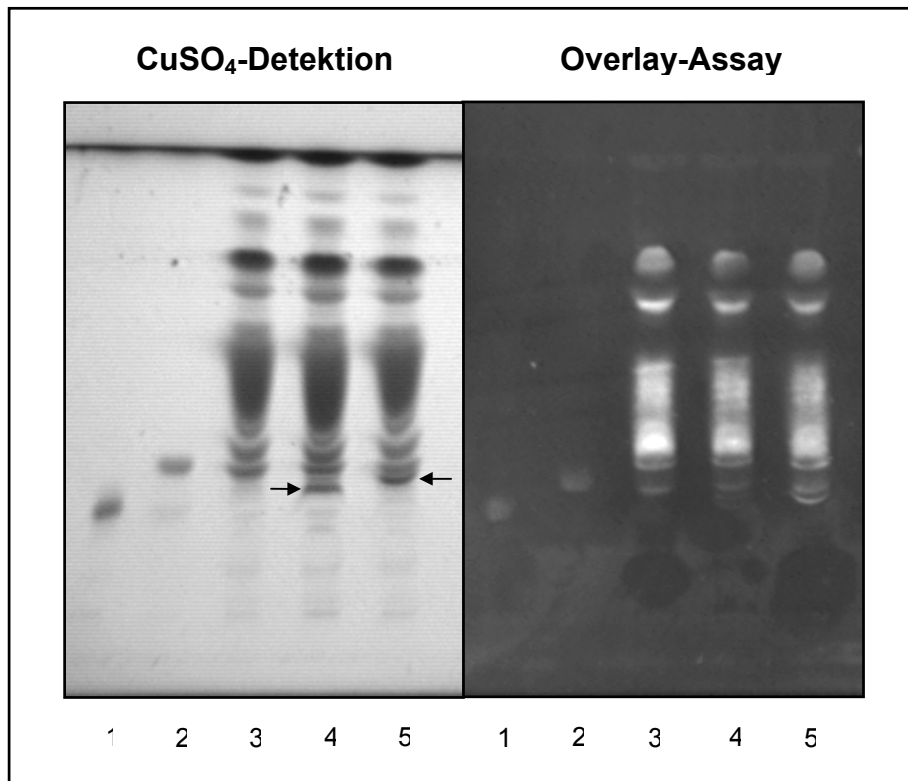


Abb. 24: Chromatogramme von dotierten Lipidextrakten nach $CuSO_4$ -Färbung und Overlay Assay mit C. group G (86).

Die genaue Aufschlüsselung der Spuren befindet sich in Tab. 7. Die Substanzen wurden am unteren Rand der Kieselgelplatten aufgetragen und im Fließmittel für Ganglioside entwickelt (Tab. 2). Die linke Platte wurde mit $CuSO_4$ -Lösung detektiert. Die rechte Platte wurde mit Plexigum-Lösung, BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet und mit UV-Licht (366 nm) detektiert.

Die beiden Pfeile zeigen auf die zusätzlichen Banden, die nach der Dotierung des Lipidextraktes mit Standards detektiert wurden.

Nr.	Substanz	$CuSO_4$ -Detektion	Overlay Assay
1	Asialogangliosid G_{M1}	2,0 μg / Spur	12,5 μg / Spur
2	Monosialogangliosid G_{M3}	2,0 μg / Spur	12,5 μg / Spur
3	Lipidextrakt aus Keratinozyten	100 μg / Spur	400 μg / Spur
4	Extrakt + Asialogangliosid G_{M1}	100 + 2,0 μg / Spur	400 + 10 μg / Spur
5	Extrakt + Monosialogangliosid G_{M3}	100 + 2,0 μg / Spur	400 + 10 μg / Spur

Tab. 7: Anlage zu Abb. 24, Substanzschlüssel und aufgetragene Konzentrationen.

Die aufgetragenen Mengen für den Overlay-Assay ergaben sich aus Vorversuchen.

Die hier nicht dargestellten Gangliosidstandards hatten sich nach der Entwicklung der HPTLC-Platte nur wenig von der Auftragsposition wegbewegt und zeigten somit keine Übereinstimmung mit den Banden des Lipidextraktes aus Corneozyten. Die Banden in Nähe der Startlinie des Keratinozyten-Lipidextraktes waren nur schwach nach der CuSO_4 -Detektion zu sehen und konnten nicht identifiziert werden.

3.3. Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an Lipide mittels HPTLC und Overlay Assay

Die vorangegangenen Untersuchungen mit Gangliosiden haben gezeigt, dass diese gute Bindungspartner für *C. group G* (86) sind. In Lipidextrakten aus Corneozyten und Keratinozyten konnten sie jedoch nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden im Folgenden die Lipide bezüglich ihrer Eigenschaft als Bindungspartner für Corynebakterien untersucht.

Die Auftrennung der Lipidextrakte mit einem polaren Fließmittelgemisch führte zu einer Substanzansammlung in der Fließmittelfront (Abb. 23 und Abb. 24), bei der es sich um weniger polare bis unpolare Hautlipide handeln musste. Diese sollten im Folgenden durch die Wahl eines weniger polaren bis unpolaren Fließmittelgemisches aufgetrennt und untersucht werden.

Wie in Abb. 23 und Abb. 24 zu sehen, wurden die weniger polaren Substanzen in der Fließmittelfront nur mit der CuSO_4 -Lösung detektiert. Es musste daher zunächst untersucht werden, wodurch die Detektion mittels Overlay Assay bei diesen Substanzen gehemmt wurde.

3.3.1. Optimierung der Methode zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an Lipide mittels HPTLC / Overlay Assay

3.3.1.1. Untersuchung des Einflusses von Plexigum auf den Overlay Assay mit Lipiden

Nachdem die HPTLC-Platten im Fließmittel entwickelt wurden, unterteilte sich der Overlay Assay in drei Schritte. Als erstes wurden die HPTLC-Platten in Plexigum-Lösung getaucht. Anschließend wurden durch Überschichtung mit BSA-Lösung un-

spezifische Bindungsstellen blockiert, bevor die HPTLC-Platten mit Bakterienlösung überschichtet wurden.

Es war unwahrscheinlich, dass die BSA-Blockierung die Anlagerung von *C. group G* (86) an die weniger polaren und unpolaren Lipide verhindert hat. Statt dessen wurde vermutet, dass durch die Überschichtung mit Plexigum Bindungsstellen an den Lipiden blockiert wurden. In der Schicht aus Plexigum sollten sich die amphoteren Glykolipide ähnlich wie in der Zellmembran ausrichten, so dass hydrophile Glyko-Epitope an der Oberfläche der Matrix exponiert werden (KARLSSON *et al.*, 1987). Um zu untersuchen, ob weniger polare bzw. unpolare Lipide, die keine hydrophilen Glyko-Epitope besitzen, durch Plexigum abgedeckt und so für Bakterien unzugänglich gemacht wurden, wurde Plexigum unterschiedlich lange in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (Abb. 25 und Abb. 26). Es wurden vier Lipide getestet, die als Hautlipide bekannt sind.

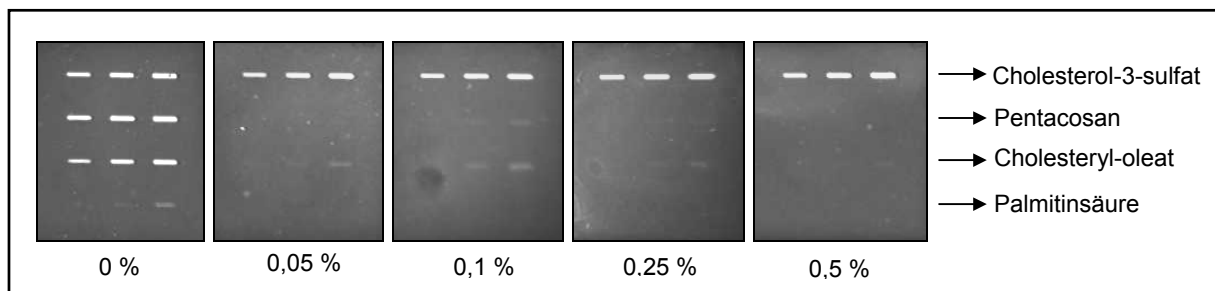


Abb. 25: Einfluss der Plexigum-Konzentration auf die Bindung von *C. group G* (86) an ausgewählte Lipide bei einer Eintauchzeit von 1 min.

Es wurden Standardkonzentrationen von 1 μg , 2 μg und 4 μg pro Spur von links nach rechts aufgetragen. Die Platten wurde nicht im Fließmittel entwickelt, sondern direkt mit verschiedenen Konzentrationen Plexigum-Lösung BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht (366 nm).

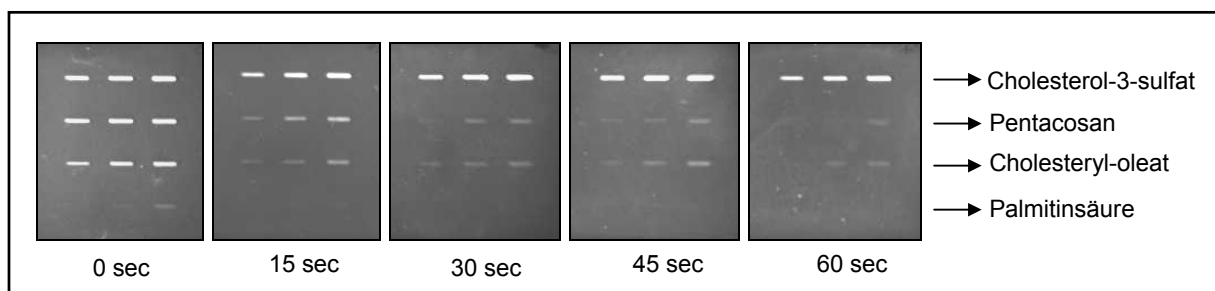


Abb. 26: Einfluss der Eintauchzeit in eine 0,5 %ige Plexigum-Lösung auf die Bindung von *C. group G* (86) an ausgewählte Lipide.

Durchführung wie bei Abb. 25, hier wurde jedoch die Eintauchzeit in das Plexigum variiert.

Die Untersuchung ergab, dass bereits eine geringe Konzentration von 0,05 % Plexigum die Bindung von C. group G (86) an Lipide, mit Ausnahme von Cholesterol-3-sulfat, stark behinderte. Eine verkürzte Eintauchzeit der HPTLC-Platten in die Plexigum-Lösung ergab eine bessere Bindung, das beste Ergebnis wurde aber ohne Plexigum erzielt.

Bei den untersuchten Hautlipiden unterstützte Plexigum nicht die Ausrichtung auf der Platte, sondern deckte die Lipide ab und verhinderte dadurch die Bindung von C. group G (86). Für die weiteren Untersuchungen von Lipiden wurde kein Plexigum verwendet.

3.3.1.2. Optimierung der HPTLC-Platten und Anpassung des Fließmittels

Für die Auftrennung von Hautlipiden auf Kieselgelplatten ist nach SCHÜRER *et al.* (1995) bereits folgende Fließmittelkombination bekannt:

Nr.	Fließmittel	Zusammensetzung	Laufstrecke
1	Chloroform / Methanol / H ₂ O	95 : 15 : 5, v/v/v	1 cm
2	n-Hexan / Diethylether / Eisessig	80 : 20 : 7, v/v/v	3,5 cm
3	Petroleumbenzin	100 %ig	6 cm

Tab. 8: Fließmittelsystem zur Auftrennung von Hautlipiden nach SCHÜRER *et al.* (1995)

Die Entwicklung der HPTLC-Platten erfolgt nacheinander in allen drei Fließmitteln, dazwischen werden die Platten luftgetrocknet.

Nach der Entwicklung in den drei Fließmitteln aus Tab. 8 wurde die in Abb. 27 dargestellte Auftrennung mit einer Kieselgel 60 HPTLC-Platte von Merck erhalten. Alle Hautlipide waren ausreichend voneinander getrennt, nur Pentacosan war in der Fließmittelfront mitgelaufen und konnte nicht eindeutig detektiert werden.

Bei den vorhergehenden Untersuchungen der Glykolipide wurden diese durch die Beschichtung mit Plexigum nicht nur ausgerichtet, gleichzeitig wurden die Kieselgelplatten durch die Kunststoffschicht vor wässrigen Lösungen geschützt. Die folgenden Überschichtungen mit BSA- und Bakterien-Lösung hatten keinen zerstörenden Einfluss auf die Kieselgelschicht.

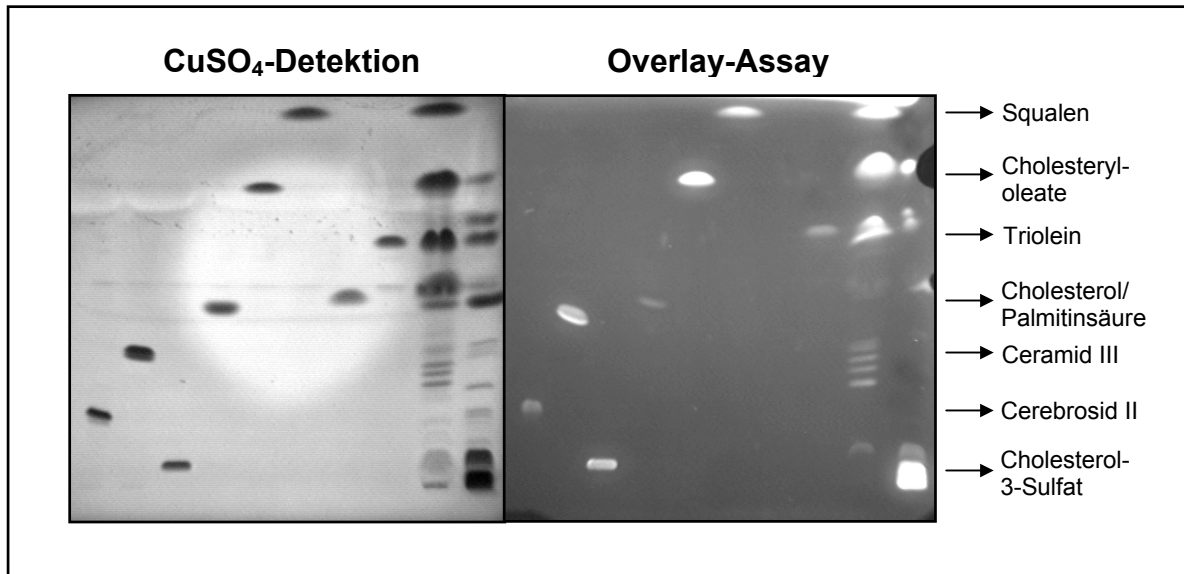


Abb. 27: Auftrennung von Hautlipiden auf einer Kieselgelplatte mit einer Kombination aus drei Fließmitteln nach SCHÜRER *et al.* (1995).

Die Substanzen wurden am unteren Rand der Kieselgelplatten aufgetragen und mit einer Kombination aus drei Fließmitteln für Lipide entwickelt (Tab. 8). Die linke Platte wurde mit CuSO₄-Lösung detektiert. Die rechte Platte wurde mit BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet und mit UV-Licht (366 nm) detektiert. Der Overlay-Assay wurde mit C. group G (86) durchgeführt.

Überschichtungen mit BSA- und Bakterien-Lösung ohne Plexigum führten bei den meisten HPTLC-Platten zur Ablösung der Kieselgelschicht von der Glasplatte und somit zur Zerstörung des Chromatogramms. In Abb. 27 ist die Ablösung der Kieselgelschicht nach dem Overlay-Assay am rechten Rand der HPTLC-Platte zu erkennen.

Als Ersatz für die Kieselgelplatten G 60 von Merck wurden die Kieselgelplatten Nano-Durasil-20 von Macherey und Nagel getestet. Diese enthalten einen zusätzlichen Binder, der das Kieselgel auf der Glasplatte fixieren soll.

Einer Überschichtung mit BSA- und Bakterien-Lösung hielten die Platten stand, zeigten aber nicht das gleiche Trennergebnis bei Lipiden wie die Platten von Merck. Nach Einsatz des zweiten Fließmittelgemisches fluoreszierte der gesamte Bereich der Platte, der mit dem Fließmittel in Kontakt gekommen war. Eine Auswertung war nicht mehr möglich. Durch einen Austausch von n-Hexan gegen Isooctan in Kombination mit einem Austausch von Wasser gegen Eisessig im ersten Fließmittelgemisch, konnte das Problem behoben werden. Damit ergab sich für die weiteren Untersuchungen folgendes Fließmittelsystem:

Nr.	Fließmittel	Zusammensetzung	Laufstrecke
1	Chloroform / Methanol / Eisessig	95 : 15 : 5, v/v/v	1 cm
2	Isooctan / Diethylether / Eisessig	80 : 20 : 7, v/v/v	3,5 cm
3	Petroleumbenzin	100 %ig	6 cm

Tab. 9: Fließmittelsystem zur Auftrennung von Hautlipiden mit Kieselgelplatten Nano-Durasil-20 von Macherey und Nagel.

3.3.1.3. Untersuchung des Einflusses der Wachstumsphase von Bakterien und der Nährmedien auf den Overlay-Assay

Um zu gewährleisten, dass bei den folgenden Untersuchungen die Bedingungen für alle Versuche identisch waren, sollte der Einfluss der Wachstumszeiten und der Wachstumsmedien der Bakterien untersucht werden. Es wurde stellvertretend für alle verwendeten Bakterien *C. group G* (86) getestet.

Auf zwei Columbia + Tween (Co+T)-Agarplatten wurden je 10 µl einer *C. group G* (86) Arbeitskulturer ausgestrichen und jeweils eine Platte 24 h und eine Platte 48 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (Methoden 2.2.2.). Desweiteren wurde zwei Flüssigkulturen angesetzt (siehe auch Methoden 2.2.1). Hierfür wurden je 20 ml allgemeines Corynebakterien (AC)-Medium in Schikanekolben vorgelegt und mit 10 µl *C. group G* (86) Arbeitskulturer angeimpft. Jeweils eine Flüssigkultur wurde 24 h und eine 3,5 h bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler bei etwa 200 Umdrehungen pro Minute (RPM) geschüttelt, um die Bakterien mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Die vier Ansätze wurden zeitversetzt angeimpft, so dass alle gleichzeitig den Endpunkt der Inkubation erreichten. Die Bakterien wurden mittels Thomakammer ausgezählt und von allen vier Ansätzen die gleiche Bakterienanzahl für den Overlay Assay eingesetzt.

Als Standardsubstanzen wurden auf die HPTLC-Platten neun Hautlipide in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen: Cholesterol, Cholesterol-3-sulfat, Cholesteryl-oleat, Palmitinsäure, Triolein, Squalen, Pentacosan, Ceramid III und Ceramid IV. Die HPTLC-Platten wurden für diese Untersuchung nicht im Fließmittel entwickelt. Abb. 28 zeigt als Beispiel die Ergebnisse der Untersuchung der Bindungsintensität von *C. group G* (86), gemessen in als optische Dichte (OD), an jeweils 2 µg und 4 µg Cholesterol-3-sulfat. Die anderen Standards führten zu ähnlichen Ergebnissen.

Aus Abb. 28 wird ersichtlich, dass die optimalen Adhäsionseigenschaften bei *C. group G* (86) nach 48 h auf C+T-Agarplatte und nach 24 h in AC-Flüssigmedium erreicht waren.

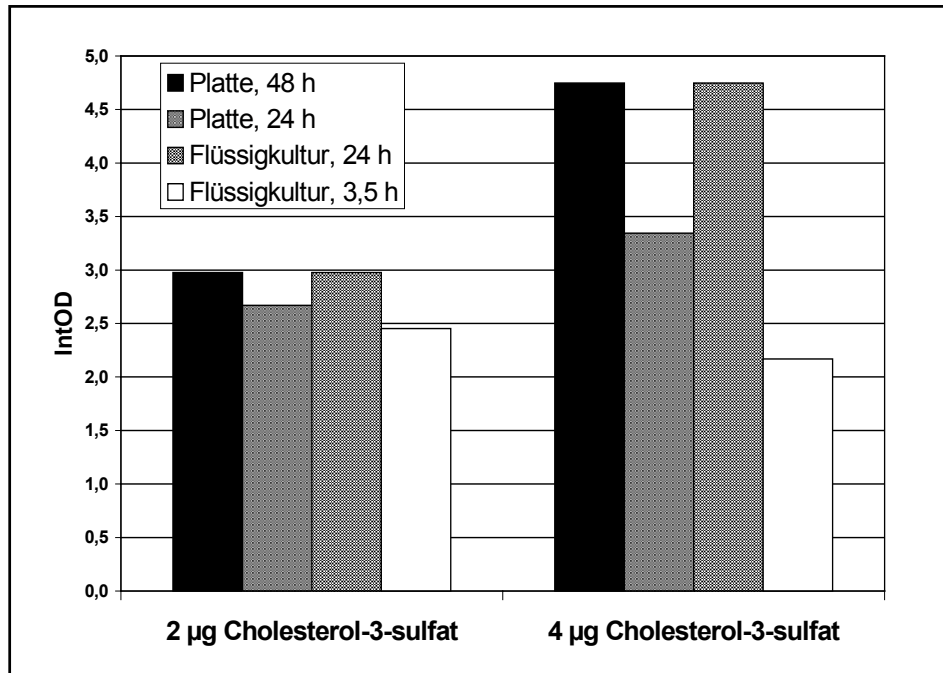


Abb. 28: Überprüfung der Bindungsaffinität von *C. group G* (86) an Lipide in Abhängigkeit von der Wachstumsphase am Beispiel von Cholesterol-3-sulfat.

2 µg und 4 µg Cholesterol-3-sulfat wurden auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und mit BSA-Lösung sowie Bakterienlösung überschichtet. *C. group G* (86) wurde nach unterschiedlich langer Inkubationszeit auf Co+T-Agarplatten und in AC-Nährmedium eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht (366 nm). Die Auswertung der fluoreszierenden Banden erfolgte mit der ONE-Dscan™ Software über die Integration der optischen Dichte [IntOD].

Durch Wachstumskurven von DERWORT (2000) ist bekannt, dass die Bakterien nach 3,5 h Anzucht im Flüssigmedium in der log-Phase sind. Nach 24 h Anzucht auf der Agarplatte sind die Bakterien wahrscheinlich nicht mehr in der log-Phase. Dennoch waren nach 24 h Anzucht auf Agarplatte die Adhäsionseigenschaften noch nicht optimal. Desweiteren war die Aufarbeitung der Bakterien suspension nach 3,5 h schwierig, da die Bakterien stark verklumpten und durch fluoreszierende Artefakte den Overlay Assay störten.

Nach 48 h Wachstumszeit auf einer Co+T-Agarplatte bzw. 24 h im AC-Medium zeigte *C. group G* (86) identische und reproduzierbare Bindungsintensitäten an die Standards. Aus diesem Grund wurden die Bakterien für die weiteren Untersuchungen bei 37 °C ca. 45 h auf Agarplatten inkubiert.

3.3.2. Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien zu Hautlipiden

Nach der Anpassung der Methode wurden die Bindungsaffinitäten verschiedener Corynebakterien an Hautlipide untersucht. Eine aktuelle Achselstudie, die im Rahmen einer Diplomarbeit (DERWORT, 2000) im Labor Deo/Mikrobiologie der Beiersdorf AG durchgeführt wurde, identifizierte *C. group G* und *C. jeikeium* als die am häufigsten vorkommenden Corynebakterien unter der Achsel. Beide zählen zu den lipophilen Corynebakterien. Um die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen mit anderen Adhäsionsuntersuchungen im Labor Deo/Mikrobiologie vergleichen zu können, wurde auf das bisher eingesetzte *C. group G* (86), aus einer weiter zurückliegenden Achselstudie, zugunsten neuer Bakterien verzichtet.

In den Studien zur Bindungsaffinität sollten Typusstämme und Achselisolate beider Bakterienarten, *C. group G* und *C. jeikeium*, untersucht werden. Da von *C. group G* kein Typusstamm existiert, wurde nur der Typusstamm von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) eingesetzt. Bei den verwendeten Achselisolaten handelte es sich um die in der Achselstudie von DERWORT (2000) isolierten Stämme *C. group G* (45), *C. group G* (48) und *C. jeikeium* (96). Desweiteren wurde der Typusstamm *C. minutissimum* (DSMZ 20651) als Vertreter der nicht-lipophilen Bakterien eingesetzt.

Für die Vergleiche der Bindungsaffinitäten der Bakterien an die Hautlipide wurden diese auf HPTLC-Platten aufgetragen und jeweils mit einem der fünf Bakterienstämme überschichtet. Diese wurden zuvor mit DAPI fluoreszenzmarkiert. Die HPTLC-Platten wurden unter UV-Licht fotografiert (Abb. 29).

Die Abb. 30-34 zeigen die grafische Darstellung der Bindungsaffinität der fünf untersuchten Bakterienstämme an neun verschiedene Hautlipide. Für die Gruppe der Ceramide wurden Ceramid III und Ceramid IV getestet. Zur Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an Hautlipide wurden jeweils neun verschiedene Konzentrationen getestet: 10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng, 2000 ng und 4000 ng. Es wurden alle Bestimmungen fünffach unabhängig durchgeführt.

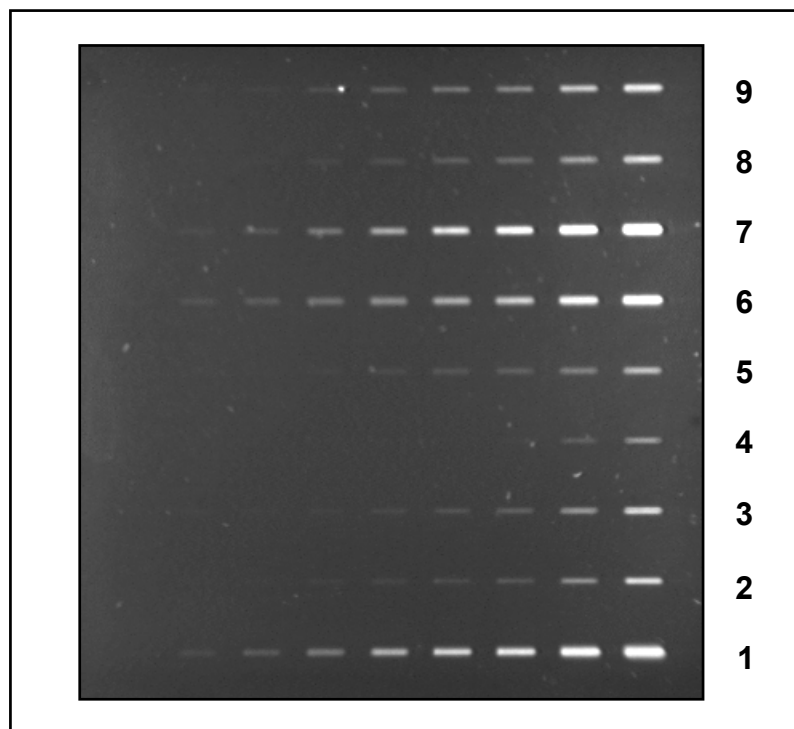


Abb. 29: Beispiel für eine HPTLC-Platte mit Hautlipid-Standards nach Überschichtung mit C. group G (45).

Es wurden Standardkonzentrationen von 10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng, 2000 ng und 4000 ng pro Spur von links nach rechts aufgetragen. Die Platte wurde nicht im Fließmittel entwickelt, sondern gleich mit BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet. Detektiert wurde mit UV-Licht (366 nm), ausgewertet wurde mit der ONE-Dscan™ Software. Die Bestimmung wurde fünffach unabhängig durchgeführt.

- | | |
|-------------------|--------------------------|
| 1.) Pentacosan | 6.) Cholesteryl-oleat |
| 2.) Squalen | 7.) Cholesterol-3-sulfat |
| 3.) Triolein | 8.) Ceramid III |
| 4.) Palmitinsäure | 9.) Ceramid IV |
| 5.) Cholesterol | |

In Abb. 29 ist bereits visuell zu erkennen, dass Cholesterol-3-sulfat (Spur 7), Cholesteryl-oleat (Spur 6) und Pentacosan (Spur 1) die besten Bindungseigenschaften zeigten. Bei ihnen konnte bereits bei einer Standardkonzentration von 50 ng eine Bindung ausgemacht werden (aufgrund der Fotoqualität nicht zu erkennen). Palmitinsäure (Spur 4) zeigte dagegen die schlechteste Bindungsaffinität, erst bei einer Standardkonzentration von 1 µg wurde eine sehr schwache Bindung durch die Auswertesoftware erkannt.

Die Auswertung der Bindungsaffinität erfolgte nicht visuell, sondern mit der ONE-Dscan™ Auswertesoftware mittels Integration der gemessenen optischen Dichte [IntOD]. Es wurden jeweils die Fluoreszenzintensitäten der Adhäsionsversuche an 2 µg Standard miteinander verglichen, da erst bei dieser Konzentration eine deutliche

Bindung an alle untersuchten Hautlipide zu beobachten war. Die Ergebnisse sind in Abb. 30-34 dargestellt.

Obwohl alle Platten gleich behandelt wurden, waren die Standardabweichungen der über die Fluoreszenzintensität ermittelten Adhäsionsrate recht hoch. Da die Möglichkeit eines internen Standards nicht gegeben war, wurden nur die Standards miteinander verglichen, die auf der gleichen HPTLC-Platte aufgetragen worden waren. Auch bei Schwankungen in der Bindungsaffinität von Platte zu Platte, konnte das Bindungsmuster auf einer Platte als gleichbleibend angesehen werden. Die relativen Verhältnisse der einzelnen Daten konnten wiederum in einer Mehrfachbestimmung miteinander verglichen werden.

Die Standards wurden nach ihrer Masse und nicht nach Molarität auf die HPTLC-Platten aufgetragen und die Adhäsion bezogen auf die Masse ausgewertet. Der Grund hierfür war das nicht zu bestimmende Molekulargewicht der Ceramide. Das gleiche Problem bestand bereits bei den Gangliosiden, die auf dem Ceramid aufgebaut sind. Um Vergleiche ziehen zu können haben bereits KARLSSON und STRÖMBERG (1987) bei ihren Gangliosid-Untersuchungen die Masse anstelle der Molarität herangezogen.

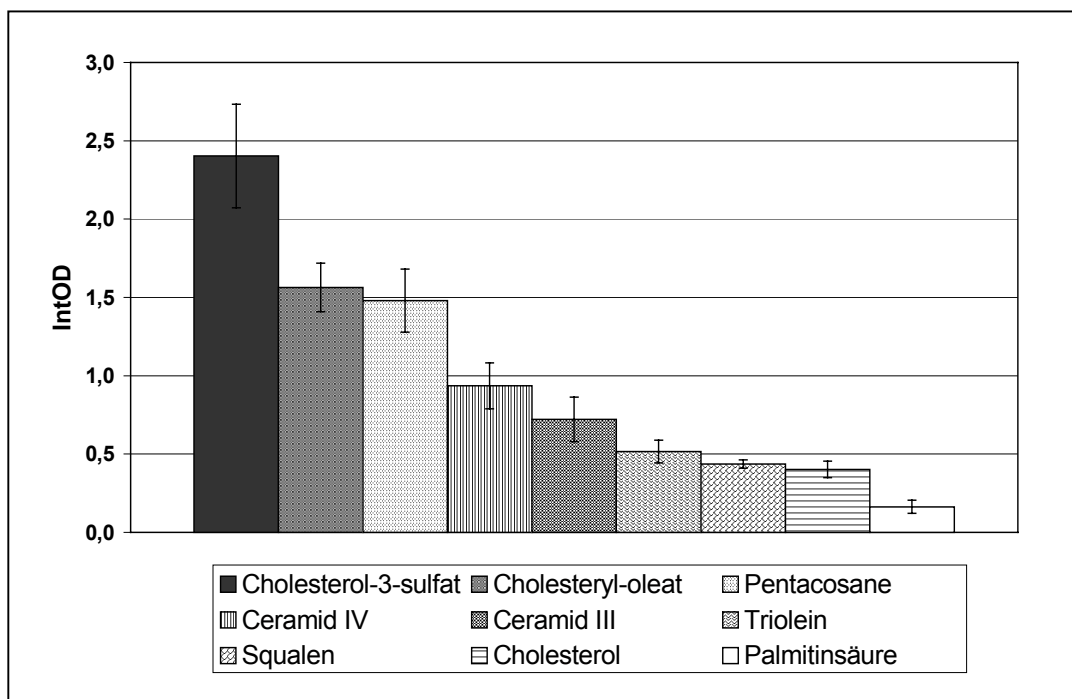


Abb. 30: Untersuchung der Bindungsaffinität von C. group G (45) an verschiedene Hautlipide.

Die Untersuchung mit HPTLC und Overlay-Assay wurde nach Abb. 29 durchgeführt. Ausgewertet wurde die Bindungsaffinität von C. group G (45) zu jeweils 2 µg der neun Hautlipide durch die Integration der optischen Dichte [IntOD]. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen.

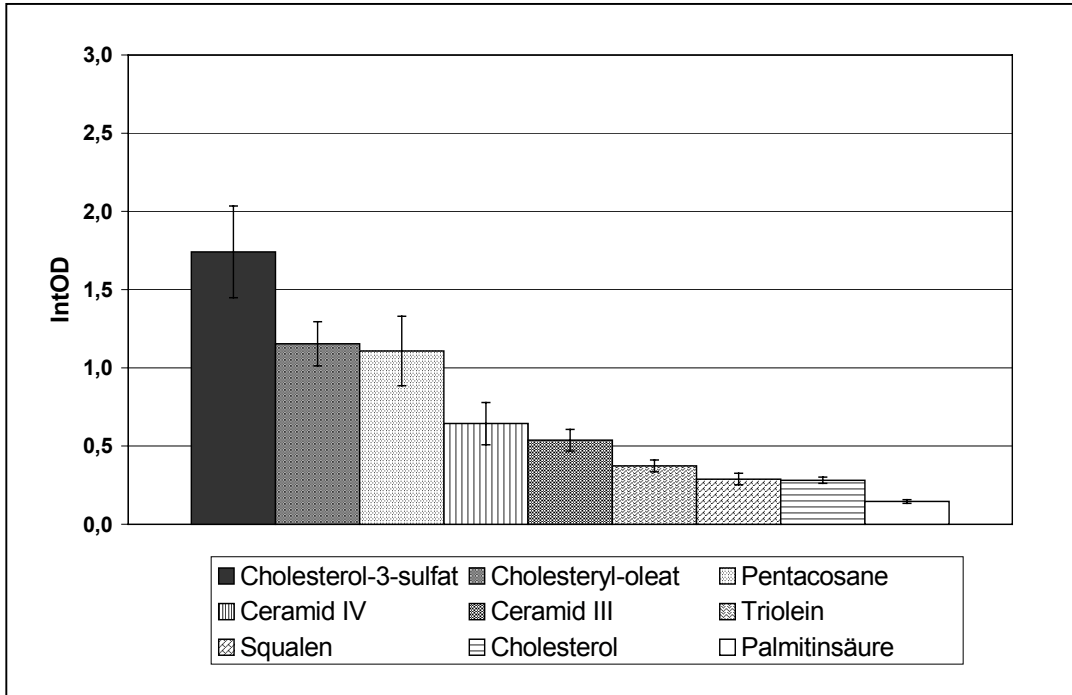


Abb. 31: Untersuchung der Bindungsaffinität von C. group G (48) an verschiedene Hautlipide.

Durchführung nach Abb. 29, ausgewertet wurde die Bindungsaffinität von C. group G (48) zu jeweils 2 µg der neun Hautlipide durch die Integration der optischen Dichte [IntOD]. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen.

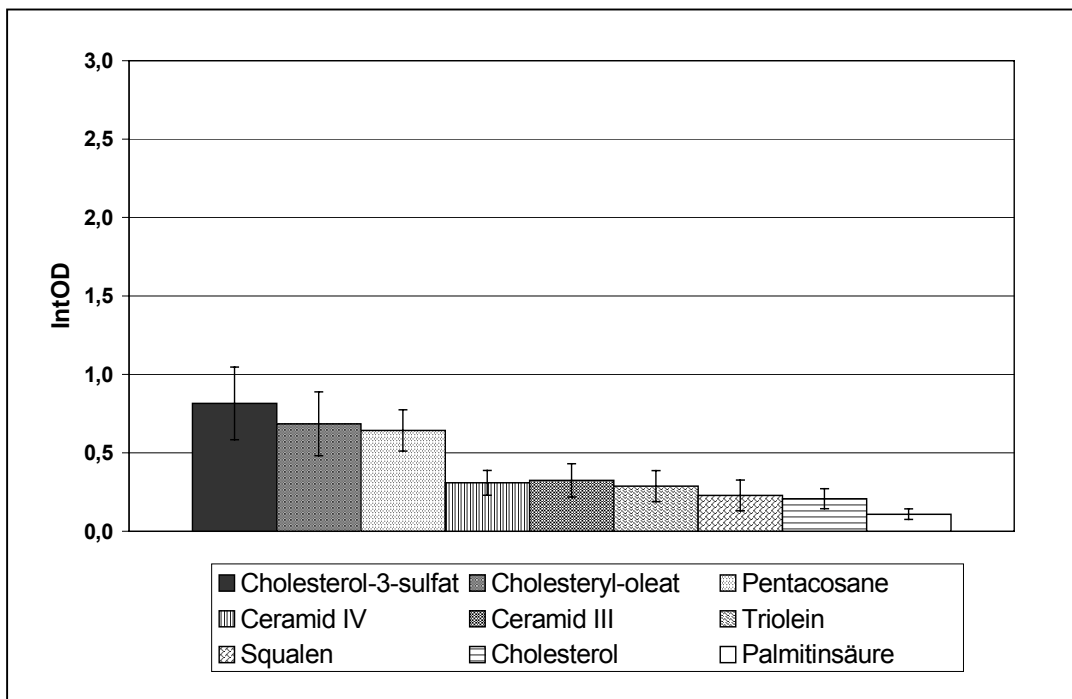


Abb. 32: Untersuchung der Bindungsaffinität von C. jeikeium (DSMZ 7171) an verschiedene Hautlipide.

Durchführung nach Abb. 29, ausgewertet wurde die Bindungsaffinität von C. jeikeium (DSMZ 7171) zu jeweils 2 µg der neun Hautlipide durch Integration der optischen Dichte [IntOD]. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen.

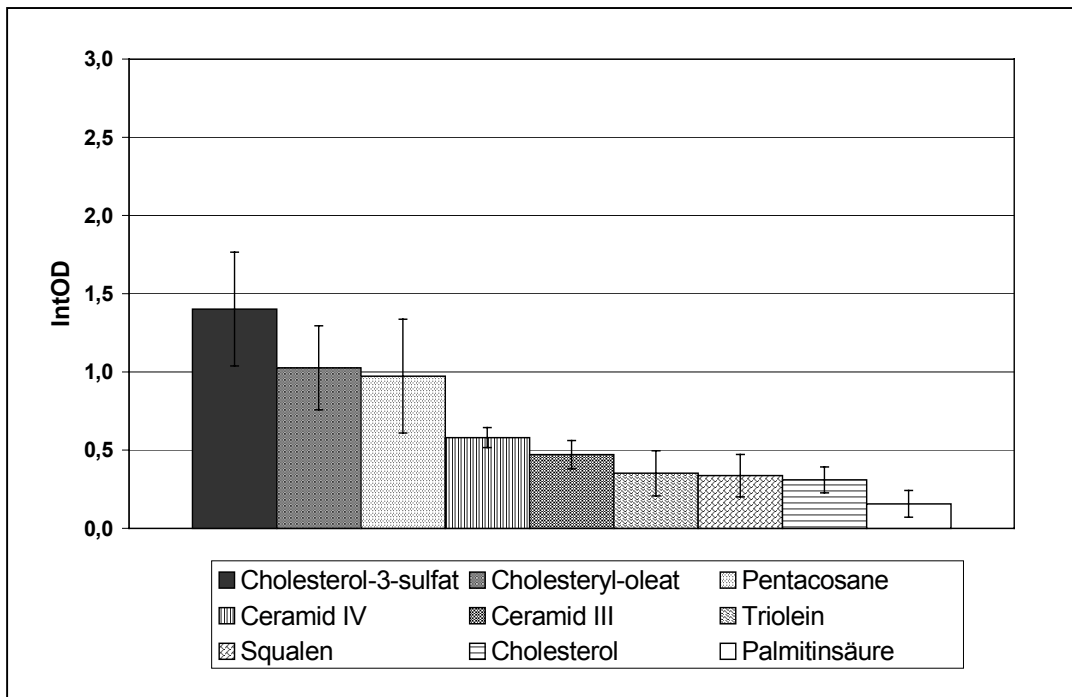


Abb. 33: Untersuchung der Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (96) an verschiedene Hautlipide.

Durchführung nach Abb. 29, ausgewertet wurde die Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (96) zu jeweils 2 µg der neun Hautlipide durch die Integration der optischen Dichte [IntOD]. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen.

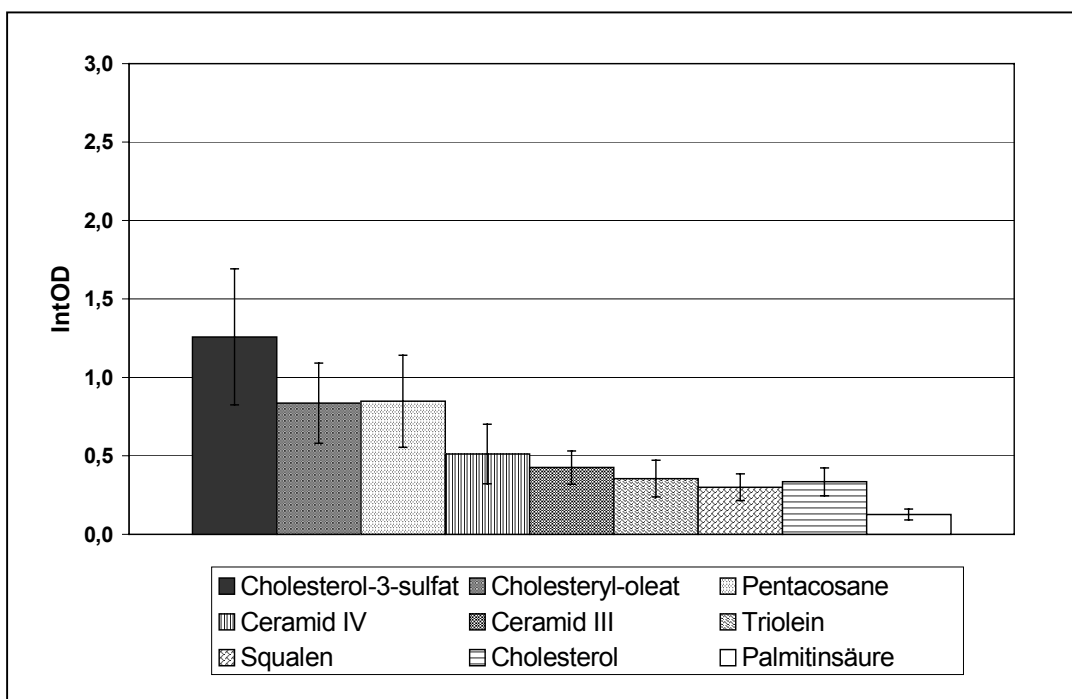


Abb. 34: Untersuchung der Bindungsaffinität von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) an verschiedene Hautlipide.

Durchführung nach Abb. 29, ausgewertet wurde die Bindungsaffinität von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) zu jeweils 2 µg der neun Hautlipide durch Integration der optischen Dichte [IntOD]. Mittelwerte aus 5 unabh. Versuchen.

Die Corynebakterien zeigten unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den verschiedenen Hautlipid-Standards. Eine Abstufung der Bindungsstärke ergab für jedes Bakterium ein Bindungsmuster. Ein Vergleich zeigte, dass dieses Bindungsmuster für alle untersuchten Bakterien nahezu gleich war. Am stärksten adhärirten alle getesteten Bakterien an Cholesterol-3-sulfat, gefolgt von Cholesteryl-oleat, Pentacosan, Ceramide (III+IV), Triolein, Squalen, Cholesterol und Palmitinsäure, an die alle Bakterien am schwächsten adhärirten. Ausnahmen ergeben sich nur bei *C. minutissimum* (DSMZ 20651), bei dem die Bindung an Pentacosan besser war, als die an Cholesteryl-oleat und die an Cholesterol besser als die an Squalen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abb. 30-34 bezüglich der Abstufung der Bindungsaffinität aller getesteten Corynebakterien zu Standardkonzentrationen von 2 µg, ergab folgendes Bild (Abb. 35):

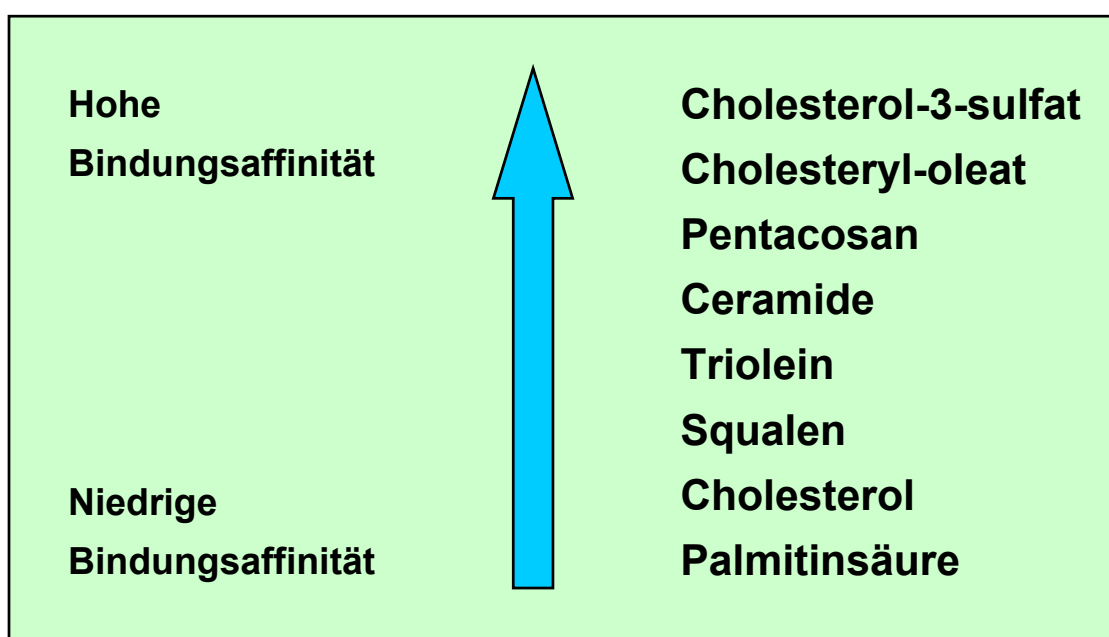


Abb. 35: Abstufung der Bindungsstärke von Corynebakterien an Hautlipide.
Ermittelt aus den Ergebnissen der Abb. 30-34.

Die Ergebnisse zeigen, dass Cholesterol-3-sulfat die höchste Bindungsaffinität für Corynebakterien aufwies. Dabei adhärirte *C. group G* (45) am stärksten, gefolgt von *C. group G* (48), *C. jeikeium* (96), *C. minutissimum* (DSMZ 20651) und *C. jeikeium* (DSMZ7171). In der gleichen Reihenfolge adhärirten die Bakterien auch an Cholesteryl-oleat, Pentacosan, Ceramide (III+IV) und Triolein. An Squalen, Cholesterol und Palmitinsäure adhärirten *C. jeikeium* (96) und *C. minutissimum* (DSMZ 20651)

besser als C. group G (48), insgesamt gesehen zeigten aber alle untersuchten Bakterien nahezu das gleiche Bindungsmuster.

Um auch die Molaritäten mit einzubeziehen, wurden die Adhäsionsdaten von 2 µg Standard auf Standardkonzentrationen von 5×10^{-6} mmol umgerechnet (Tab. 10). Da die Konzentrationsreihen nicht linear waren, kann diese Hochrechnung nur einen Eindruck über den Einfluss der Molmasse auf das Ergebnis vermitteln. Die Ceramide wurden hierbei natürlich nicht berücksichtigt, da ihnen keine Molmasse zuzuordnen ist.

Standards	Adhäsion [IntOD]	Molarität [mmol]	Umrechnung der Adhäsion auf 5×10^{-6} mmol Standard
Cholesterol-3-sulfat	2,4028	$4,3 \times 10^{-6}$	2,7940
Cholesteryl-oleat	1,5636	$3,1 \times 10^{-6}$	2,5219
Pentacosan	1,4794	$5,7 \times 10^{-6}$	1,2977
Triolein	0,5163	$2,3 \times 10^{-6}$	1,1224
Squalen	0,4364	$4,9 \times 10^{-6}$	0,4453
Cholesterol	0,4018	$5,2 \times 10^{-6}$	0,3863
Palmitinsäure	0,1634	$7,8 \times 10^{-6}$	0,1047

Tab. 10: Umrechnung der Adhäsion von C. group G (45) auf eine Standardkonzentration von 5×10^{-6} mmol.

Diese Werte sind nur Annäherungen, da die Adhäsion nicht linear ansteigt.

Es ergab sich aus den Adhäsions-Daten nach Umrechnung auf eine Standardkonzentration von 5×10^{-6} mmol die gleiche Abstufung der Bindungsaffinität der Corynebakterien an die Lipide (ausgenommen Ceramide), wie aus den experimentellen Daten bei einer Standardkonzentration von 2 µg ermittelt. Wenngleich dies nur als eine Annäherung gesehen werden kann, zeigen die Daten doch, dass aus einer Versuchsdurchführung mit Molaritäten dasselbe Ergebnis gezogen worden wäre.

Um die Bindungsaffinität besser bewerten zu können, wurden die Ergebnisse der Adhäsionsversuche mit dem prozentualen Vorkommen der Lipide in der Haut nach LAMPE *et al.* (1983) in Beziehung gesetzt (Abb. 36). Für die in der Literatur als eine Gruppe gerechneten Ceramide wurden die Daten des Ceramid IV herangezogen.

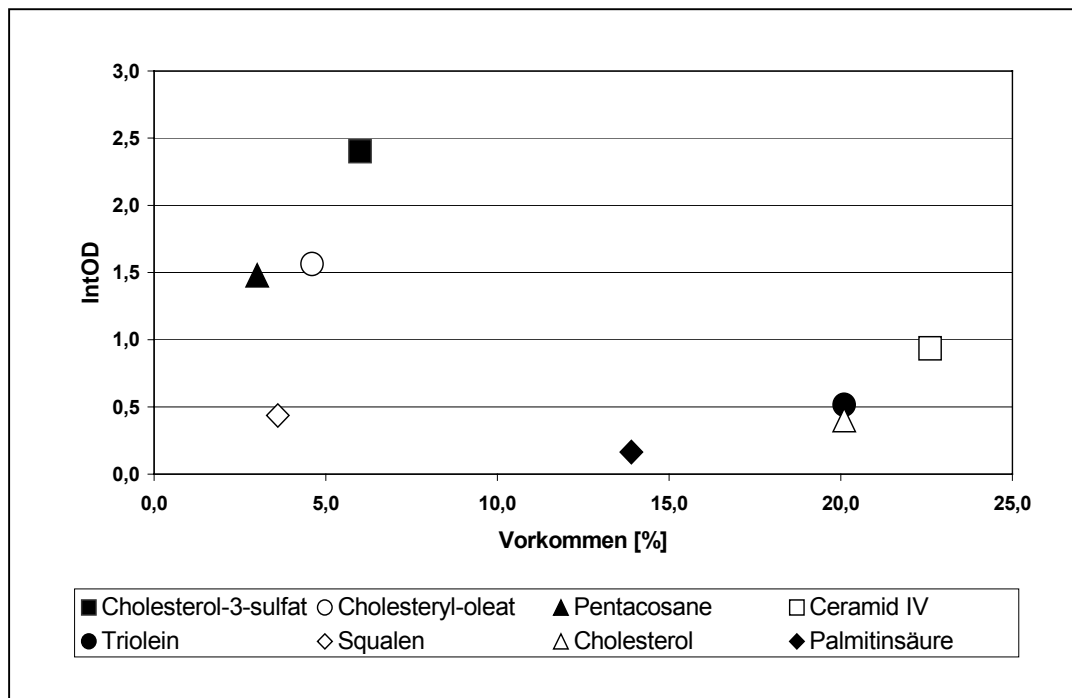


Abb. 36: Vergleich der Bindungsaffinität von *C. group G* (45) mit dem prozentualen Vorkommen von Hautlipiden nach LAMPE *et al.*, 1983

Die Bindungsaffinität von *C. group G* (45) an jeweils 2 µg der Standards wurde in fünffach-Bestimmungen gemessen, durch Integration der optischen Dichte [IntOD] berechnet und gegen die prozentuale Verteilung der Lipide in der Haut aufgetragen.

Die Standards der Hautlipide, an die die Bakterien eine stärkere Bindung zeigten (Cholesterol-3-sulfat, Cholesteryl-oleat, Pentacosan), sind in der Haut nur in geringer Menge vertreten. Die in größeren Mengen in der Haut vorkommenden Lipide (Ceramide, Triolein, Cholesterol, Palmitinsäure) waren dagegen schlechtere Bindungspartner. Squalen nimmt eine Mittelstellung ein, es gehört zu den schlechteren Bindungspartnern und ist nur in geringer Menge in der Haut vorhanden.

3.3.3. Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an strukturverwandte Lipide zur genaueren Charakterisierung der genutzten Rezeptorstruktur

Bei Betrachtung der Ergebnisse aus Kapitel 3.3.2 wurde deutlich, dass Corynebakterien nur schwach an Cholesterol gebunden hatten, dafür aber stark an Cholesterol-3-sulfat und Cholesteryl-oleat. Daraus ergab sich die Frage, welchen Einfluss der Sulfat- und Oleat-Rest auf die Adhäsion haben. Um dies zu untersuchen, wurden ver-

schiedene Verbindungen im Overlay-Assay getestet, die eine Strukturverwandschaft mit Cholesterol-3-sulfat bzw. Cholesteryl-oleat haben.

Die Standards wurden in verschiedenen Konzentrationen über die HPTLC-Platten verteilt aufgetragen und nicht im Fließmittel entwickelt. Auch hier wurden wieder nur die Standards untereinander verglichen, die auf der gleichen Platte aufgetragen und untersucht wurden, da kein interner Standard eingesetzt werden konnte. Da mehr Standards getestet werden sollten, als auf eine HPTLC-Platte passten, wurden insgesamt drei verschiedene Standardkombinationen aus jeweils neun Lipid-Standards pro HPTLC-Platte ausgewählt und mit jedem der oben genannten Corynebakterien fünffach-Bestimmungen durchgeführt. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden nur die Ergebnisse der Bestimmungen mit *C. group G* (45) dargestellt.

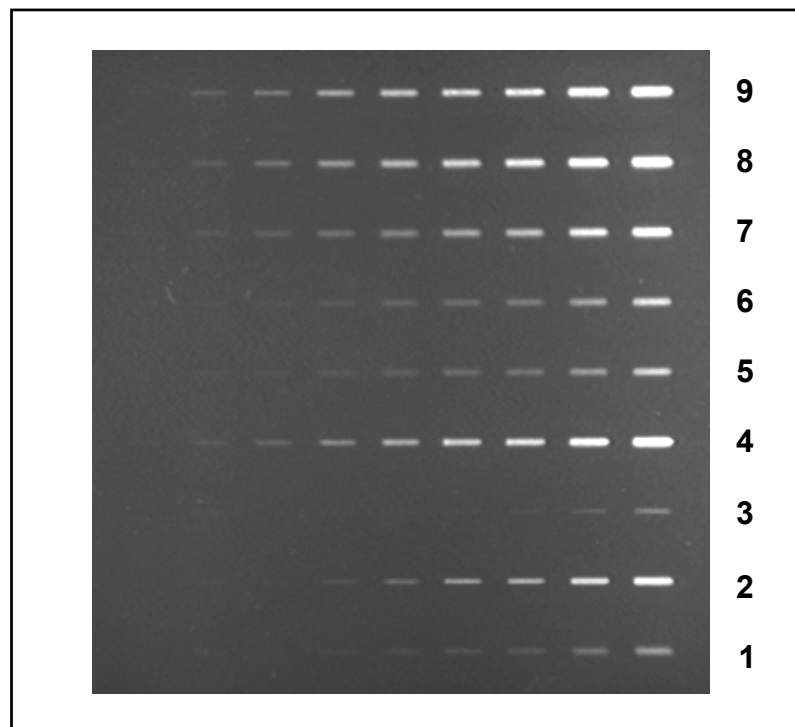


Abb. 37: Erstes Beispiel für eine HPTLC-Platte mit verschiedenen Lipidstandards nach Überschichtung mit *C. group G* (45).

Es wurden Standardkonzentrationen von 10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng, 2000 ng und 4000 ng pro Spur von links nach rechts aufgetragen. Die Platte wurde nicht im Fließmittel entwickelt sondern gleich mit BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet. Detektiert wurde mit UV-Licht (366 nm), ausgewertet wurde mit der ONE-Dscan™ Software. Die Bestimmung wurde fünffach unabhängig durchgeführt.

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| 1.) Cholesterol | 6.) Cholesteryl-acetat |
| 2.) Stearinsäure | 7.) Cholesteryl-n-decylat |
| 3.) Ölsäure | 8.) Cholesteryl-stearat |
| 4.) Behensäure | 9.) Cholesteryl-behenat |
| 5.) Cholesteryl-formate | |

Abb. 37 zeigt die Bindungsaffinität von *C. group G* (45) zu Cholesterol, verschiedenen Cholesterylestern und Fettsäuren, die untersucht wurden. Für die Rezeptorcharakterisierung wurden aus dieser Auswahl drei Abb. erstellt, in denen einzelne Standards miteinander verglichen wurden. Abb. 38 zeigt zunächst den Vergleich Cholesterol, Stearinsäure und Cholesteryl-stearat.

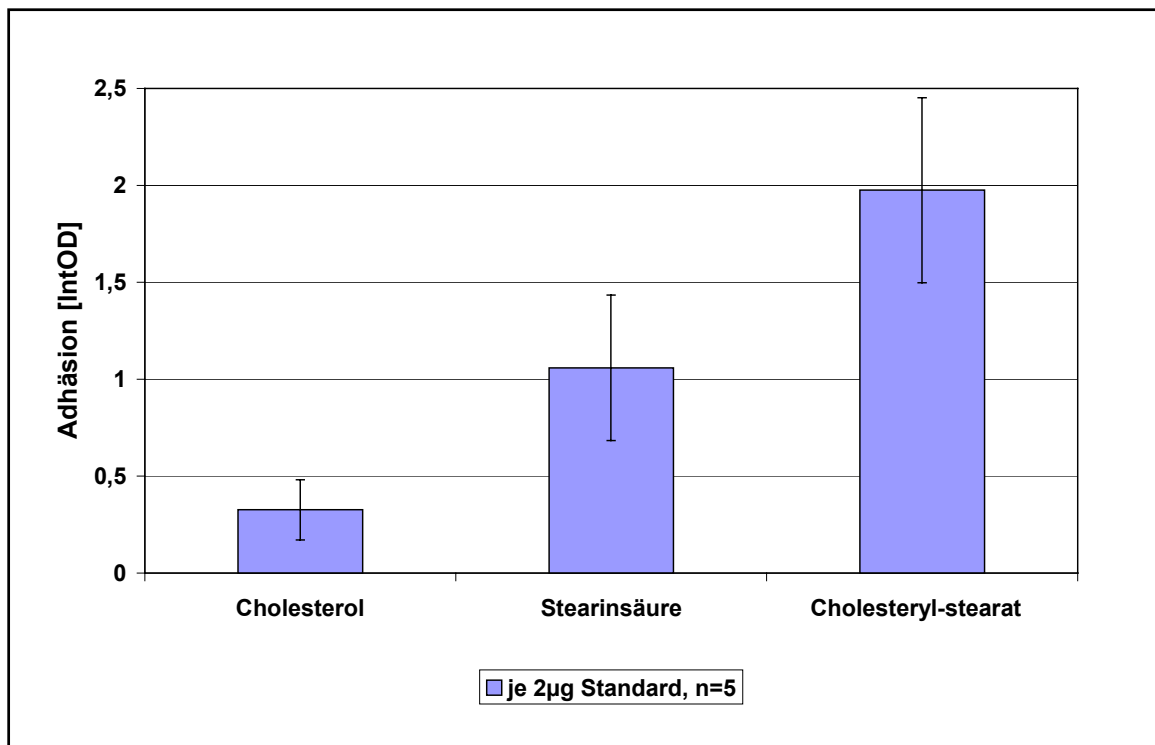


Abb. 38: Vergleich der Bindungsaffinität von *C. group G* (45) an Cholesterol, Stearinsäure und Cholesteryl-stearat.

Die Bindungsaffinität von *C. group G* (45) an jeweils 2 µg der Standards wurde durch Integration der gemessenen optischen Dichte [IntOD] berechnet und aufgetragen.

Cholesterol / Stearinsäure = hoch signifikanter Unterschied

Stearinsäure / Cholesteryl-stearat = hoch signifikanter Unterschied

Cholesterol / Cholesteryl-stearat = hoch signifikanter Unterschied

C. group G (45) und auch die anderen untersuchten Bakterienstämme (siehe Rohdaten im Anhang) wiesen eine bessere Adhäsion an Cholesteryl-stearat als an Cholesterol oder Stearinsäure auf. Dabei zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,1$) zwischen der Adhäsion von *C. group G* (45) an Cholesterol und Stearinsäure (18 C-Atome) sowie an Stearinsäure und Cholesteryl-stearat (18 C-Atome in der Seitenkette). Der Unterschied zwischen der Adhäsion von *C. group G* (45) an Cholesterol und Cholesteryl-stearat war somit ebenfalls hoch signifikant.

Die Daten in Abb. 38 beziehen sich auf die aufgetragenen Standardmengen und nicht auf die Molarität, wie bereits unter 3.2.2. erklärt. In Tab. 11 sind die Molaritäten für eine Standardkonzentration von 2 µg aufgelistet.

Standard	Molmasse [g/mol]	Adhäsion [IntOD] an 2 µg Standard	Molarität bezogen auf 2 µg Standard
Cholesterol	386,7	0,3260	5,2 E-6 mmol
Stearinsäure	284,5	1,0584	7,0 E-6 mmol
Cholesteryl-stearat	653,1	1,9747	3,1 E-6 mmol

Tab. 11: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an Cholesterol, Stearinsäure und Cholesteryl-stearat mit deren Molarität.

Die Molmasse von Cholesteryl-stearat entspricht etwa der Summe der Molmasse von Cholesterol und Stearinsäure. Somit haben 2 µg Cholesteryl-stearat eine niedrigere Molarität als 2 µg Cholesterol oder Stearinsäure. Würde man die drei Standards in der gleichen Molarität für die HPTLC mit Overlay Assay einsetzen, würde im Verhältnis mehr Cholesteryl-stearat zum Einsatz kommen. Dies hätte vermutlich wiederum eine stärkere Adhäsion durch mehr Corynebakterien an Cholesteryl-stearat zur Folge. Bei Angabe von Molaritäten würde somit der Unterschied in der Intensität der Adhäsion zwischen Cholesteryl-stearat und Cholesterol bzw. Stearinsäure in Abb. 38 noch deutlicher werden. Ein Widerspruch ist damit zu den Ergebnissen der Untersuchungen bezogen auf 2 µg Standards nicht gegeben.

Für alle folgenden Untersuchungen wurde der Einfluss der Molaritäten auf das Ergebnis untersucht. Da kein Ergebnis durch den Bezug der Adhäsion auf die Molarität eingeschränkt oder widerlegt wurde, wird die Molarität im Folgenden nicht mehr aufgegriffen. In den angeführten Tabellen 13-15 und 17-18 kann die Molarität nachgelesen werden.

Standard	Seitenkette
Cholesteryl-format	C ₁ -Rest
Cholesteryl-acetat	C ₂ -Rest
Cholesteryl-n-decylat	C ₁₀ -Rest
Cholesteryl-stearat	C ₁₈ -Rest
Cholesteryl-behenat	C ₂₂ -Rest

Tab. 12: Untersuchung verschiedener Cholesteryl-ester bezüglich des Einflusses der Seitenkette auf die Adhäsion (Abb. 39).

Als zweites wurden Cholesteryl-ester, deren Fettsäure-Reste sich in der Kettenlänge unterschieden, miteinander verglichen (Abb. 39). Die Anzahl der C-Atome der Seitenketten ist in Tab. 12 aufgelistet.

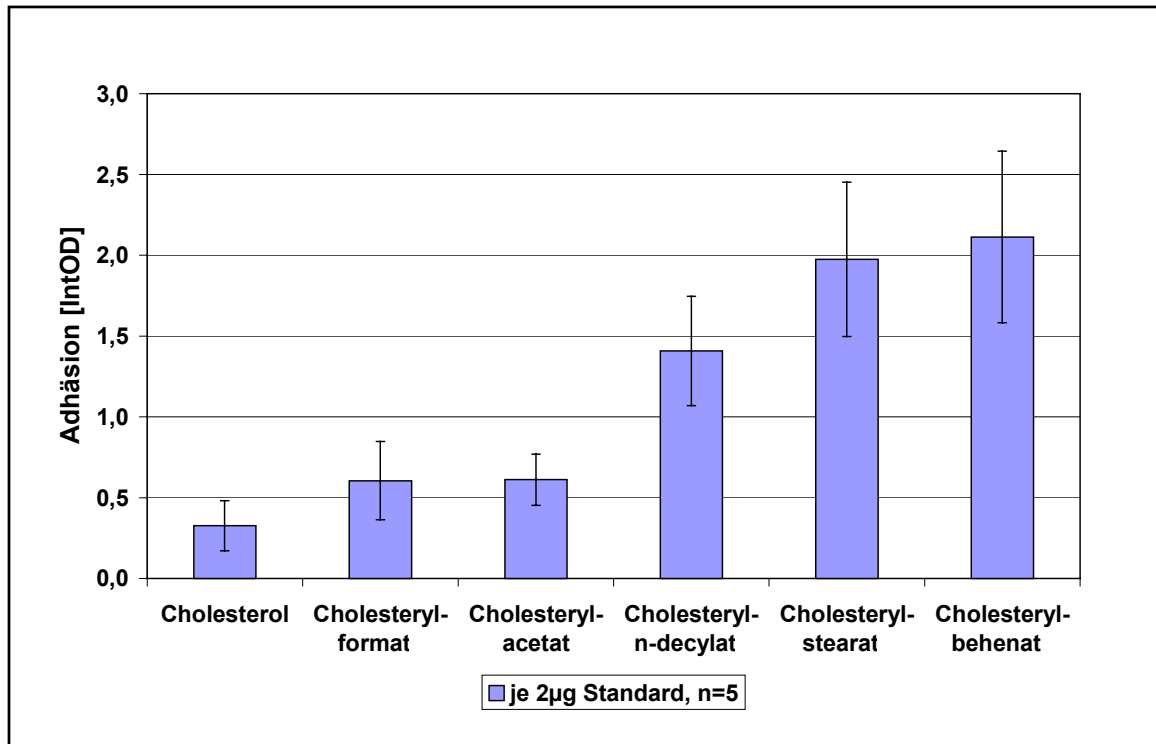


Abb. 39: Vergleich der Bindungsaffinität von C. group G (45) an verschiedene Cholesteryl-ester.

Die Bindungsaffinität von C. group G (45) an jeweils 2 µg der Standards wurde durch Integration der gemessenen optischen Dichte [IntOD] berechnet und aufgetragen.

Cholesteryl-acetat / Cholesteryl-n-decylat = hoch signifikanter Unterschied

Mit steigender Anzahl der C-Atome in der Seitenkette stieg auch die Bindungsaffinität von C. group G (45) an die verschiedenen Cholesteryl-ester. Es zeigte sich zwischen Cholesterol, Cholesteryl-format und Cholesteryl-acetat kein signifikanter Unterschied. Dagegen wurde ein hoch signifikanter Unterschied zwischen Cholesteryl-acetat und Cholesteryl-n-decylat festgestellt. Zwischen Cholesteryl-stearat und Cholesteryl-behenat war kein signifikanter Unterschied mehr zu verzeichnen.

Tab. 13 zeigt die Molarität bezogen auf 2 µg Standard. Wie bereits bei den vorhergehenden Untersuchungen brachte auch hier ein Vergleich der Molaritäten keinen Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchungen bezogen auf 2 µg Standards.

Standard	Molmasse [g/mol]	Adhäsion [IntOD] an 2 µg Standard	Molarität bezogen auf 2 µg Standard
Cholesterol	386,7	0,3260	5,2 E-6 mmol
Cholesteryl-format	414,7	0,6049	4,8 E-6 mmol
Cholesteryl-acetat	428,7	0,6110	4,7 E-6 mmol
Cholesteryl-n-decylat	540,9	1,4076	3,7 E-6 mmol
Cholesteryl-stearat	653,1	1,9747	3,1 E-6 mmol
Cholesteryl-behenat	709,2	2,1131	2,8 E-6 mmol

Tab. 13: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an Cholesteryl-ester mit deren Molarität.

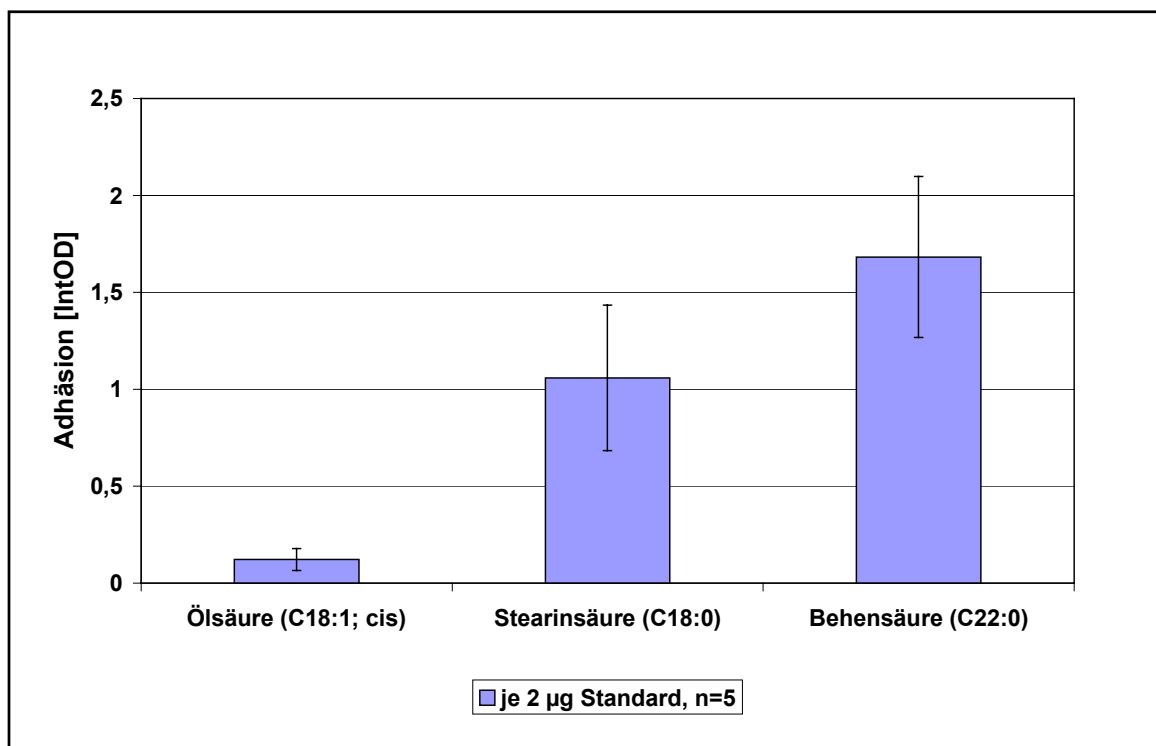


Abb. 40: Vergleich der Bindungsaffinität von C. group G (45) an Ölsäure, Stearinsäure und Behensäure.

Die Bindungsaffinität von C. group G (45) an jeweils 2 µg der Standards wurde durch Integration der optischen Dichte [IntOD] berechnet und aufgetragen.

Ölsäure / Stearinsäure = hoch signifikanter Unterschied

Stearinsäure / Behensäure = signifikanter Unterschied

In der letzten Auswahl von Standards dieser Gruppierung wurden drei Fettsäuren miteinander verglichen (Abb. 40). Hierbei handelte es sich um die zwei gesättigten Fettsäuren Stearinsäure (C 18:0) und Behensäure (C 22:0), sowie die ungesättigte Ölsäure (C 18:1). C. group G (45) adhärte deutlich besser an Stearinsäure als an Ölsäure, der Unterschied war hoch signifikant. An Behensäure adhärte C. group G (45) signifikant besser als an Stearinsäure. Tab. 14 zeigt auch hier, dass sich das

Ergebnis bezogen auf die Molaritäten nicht ändert. Der einzige Unterschied zwischen Ölsäure und Stearinsäure ist die Doppelbindung zwischen dem neunten und zehnten C-Atom der Ölsäure. Der Einfluss der Doppelbindung wurde daher auf einer anderen HPTLC-Platte genauer untersucht.

Standard	Molmasse [g/mol]	Adhäsion [IntOD] an 2 µg Standard	Molarität bezogen auf 2 µg Standard
Ölsäure (C18:1; cis)	282,5	0,1222	7,1 E-6 mmol
Stearinsäure (C18:0)	284,5	1,0584	7,0 E-6 mmol
Behensäure (C22:0)	340,6	1,6821	5,9 E-6 mmol

Tab. 14: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an Ölsäure, Stearinsäure und Behensäure mit deren Molarität.

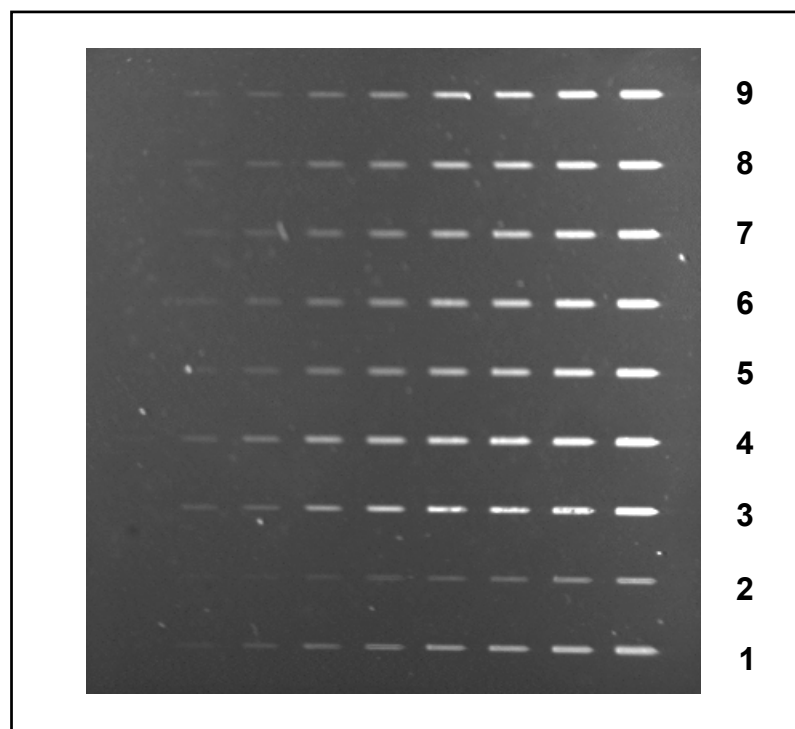


Abb. 41: Zweites Beispiel für eine HPTLC-Platte mit Lipidstandards nach Überschichtung mit C. group G (45).

Es wurden Standardkonzentrationen von 10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng, 2000 ng und 4000 ng pro Spur von links nach rechts aufgetragen. Die Platte wurde nicht im Fließmittel entwickelt sondern gleich mit BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet. Detektiert wurde mit UV-Licht (366 nm), ausgewertet wurde mit der ONE-Dscan™ Software. Die Bestimmung wurde fünffach unabhängig durchgeführt.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1.) Cholesteryl-chlorid | 6.) Cholesteryl-elaidat |
| 2.) Cholesteryl-chlorformiat | 7.) Cholesteryl-linoleat |
| 3.) Cholesterol-3-sulfat | 8.) Cholesteryl-linolelaidat |
| 4.) Cholesteryl-stearat | 9.) Cholesteryl-linolenat |
| 5.) Cholesteryl-oleat | |

Auf der nächsten HPTLC-Platte (Abb. 41) wurden neun weitere Lipid-Standards miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in zwei Gruppen (Abb. 42-43) dargestellt. Bei der ersten Gruppe wurde der Einfluss von Doppelbindungen in der Seitenkette auf die Adhäsion von *C. group G* (45) an Cholesteryl-ester untersucht (Abb. 42).

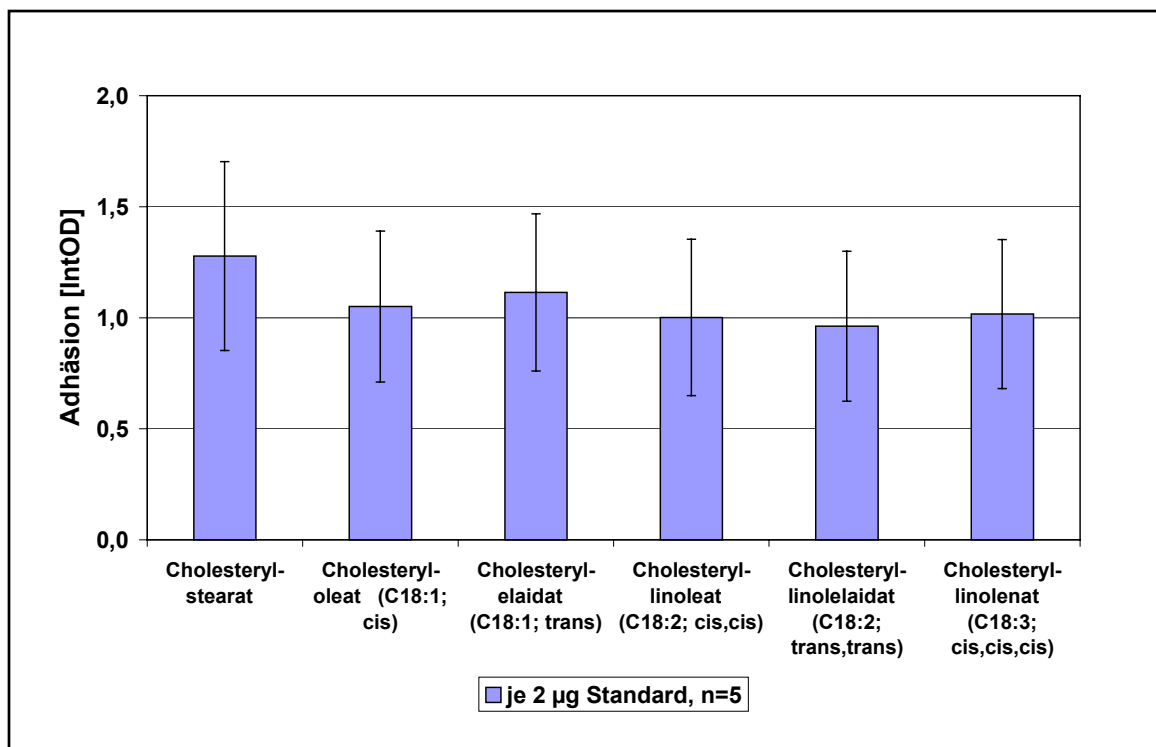


Abb. 42: Vergleich der Bindungsaffinität von *C. group G* (45) an C18-Säuren mit unterschiedlicher Anzahl Doppelbindungen in cis- oder trans-Stellung.

Die Bindungsaffinität von *C. group G* (45) an jeweils 2 µg der Standards wurde durch Integration der gemessenen optischen Dichte [IntOD] berechnet und aufgetragen. Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Adhäsion.

Zwischen den Cholesteryl-estern mit einer, zwei und drei Doppelbindungen in der Seitenkette in cis- oder trans-Stellung sowie Cholesteryl-stearat mit gesättigter Seitenkette war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Adhäsion von *C. group G* (45) festzustellen. Die Molmassen waren nahezu identisch und hatten daher keinen Einfluss.

Abb. 43 stellt die Ergebnisse der Untersuchung von Cholesteryl-estern mit unterschiedlich polaren Resten dar. Wie zuvor bei der Untersuchung der Adhäsion an Hautlipide, zeigte *C. group G* (45) eine höhere Bindungsaffinität zu Cholesterol-3-sulfat als zu Cholesteryl-oleat. Die Bindung an Cholesteryl-chlorid war am

schwächsten, mit einem signifikanten Unterschied zu Cholesterol-3-sulfat. Da sich die Bindung an Cholesteryl-chlorformiat nur unwesentlich von der an Cholesteryl-chlorid unterschied, wurden die Ergebnisse der Adhäsion von C. group G (45) an Cholesteryl-chlorformiat hier nicht dargestellt.

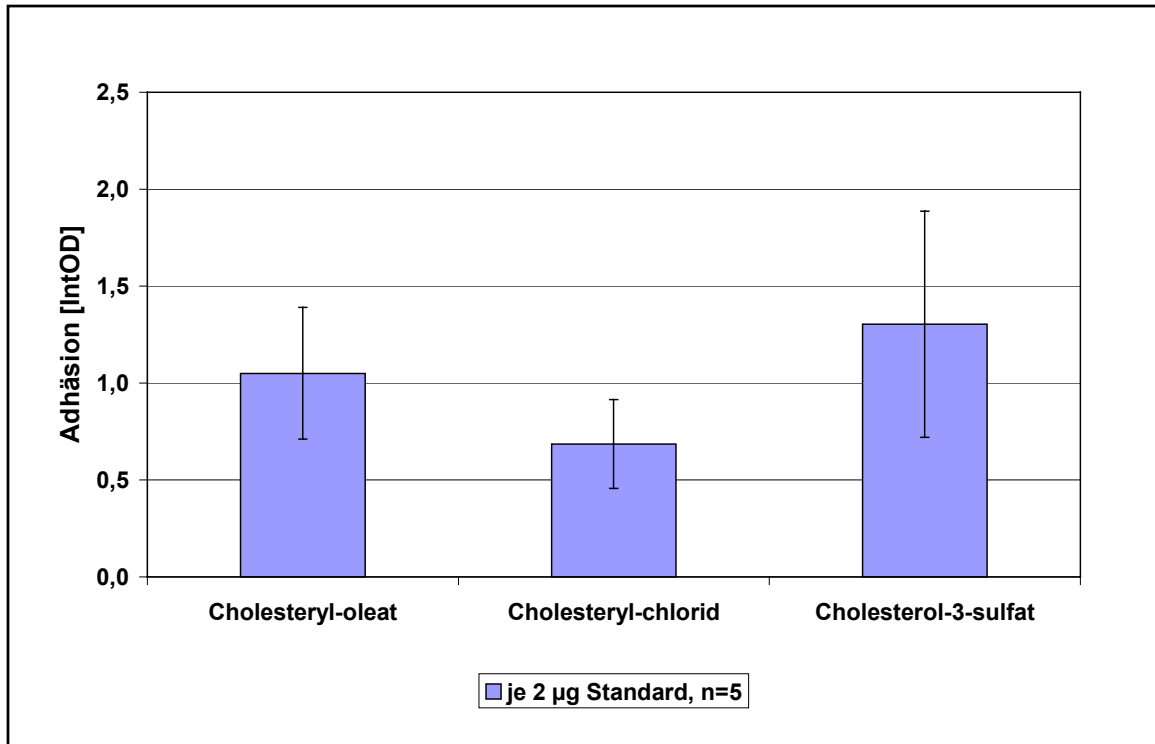


Abb. 43: Vergleich der Bindungsaffinität von C. group G (45) an Verbindungen unterschiedlicher Polarität.

Die Bindungsaffinität von C. group G (45) an jeweils 2 µg der Standards wurde durch Integration der gemessenen optischen Dichte [IntOD] berechnet und aufgetragen.

Cholesteryl-chlorid / Cholesterol-3-sulfat = signifikanter Unterschied

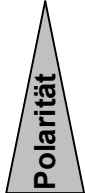
Standard	Molmasse [g/mol]	Adhäsion [IntOD] an 2 µg Standard	Molarität bezogen auf 2 µg Standard
Cholesteryl-oleat	651,1	1,0503	3,1 E-6 mmol
Cholesteryl-chlorid	405,1	0,6858	4,9 E-6 mmol
Cholesterol-3-sulfat	465,7	1,3030	4,3 E-6 mmol

Tab. 15: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an Verbindungen unterschiedlicher Polarität mit deren Molarität.

Um die drei Substanzen bezüglich ihrer Polarität miteinander vergleichen zu können, wurden der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient logP(ow) dieser Substanzen mittels des Kalkulationsprogrammes LogD-Suite 4.5 berechnet (Tab. 16). Mit diesem

Programm ist es möglich, die Polarität für fast jede organische Struktur zu berechnen. Je größer der $\log P(ow)$ -Wert, desto geringer ist die Polarität der Substanz.

Standard	$\log P(ow)$ -Werte
Cholesteryl-oleat	18,69
Cholesteryl-chlorid	11,48
Cholesterol	9,85
Cholesterol-3-sulfat	6,04



Tab. 16: Vergleich der Polarität verschiedener Substanzen über die $\log P(ow)$ -Werte, die mittels des Kalkulationsprogrammes LogD-Suite 4.5 berechnet wurden.

Der kleinste Zahlenwert in der Tab. entspricht der polarsten Substanz, der größte Zahlenwert der unpolarsten Substanz. Werden die Substanzen nach ihrer Polarität sortiert, ergibt sich folgende Reihenfolge: Cholesterol-3-sulfat, Cholesteryl-chlorid und Cholesteryl-oleat. Die höchste Polarität besitzt Cholesterol-3-sulfat, bei Cholesteryl-oleat ist sie am geringsten.

Ein Vergleich bezüglich der Adhäsion zeigt, dass es sich bei den beiden Substanzen mit der höchsten Bindungsaffinität zu Corynebakterien zum einen um die polarste und zum anderen um die unpolarste Substanz aus der Reihe handelt.

Zum Vergleich wurde in Tab. 16 zusätzlich der $\log P(ow)$ -Wert von Cholesterol aufgeführt. Obwohl Cholesterol keinen polaren Rest trägt, ist Cholesterol polarer als Cholesteryl-chlorid, aber unpolarer als Cholesterol-3-sulfat.

Auf der letzten HPTLC-Platte (Abb. 44) wurden abermals neun Lipid-Standards miteinander verglichen. Hierbei handelte es sich um verschiedene Sulfat-Ester wie Cholesterol-3-sulfat, Galactocerebrosid-sulfat und Fettsäure-sulfat-ester unterschiedlicher Kettenlänge. Diese Verbindungen wurden ausgewählt, um den Einfluss von Sulfatresten auf die Adhäsion zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 45-46 dargestellt. Der Vergleich von Cholesterol, Magnesiumsulfat und Cholesterol-3-sulfat (Abb. 45) zeigte, dass C. group G (45) am besten an die Kombination Cholesterol + Sulfat-Rest adhärierte. Der Unterschied der Bindungsaffinität zu Cholesterol und Cholesterol-3-sulfat war hoch signifikant. Zu Magnesiumsulfat wurde keine Bindungsaffinität von C. group G (45) nachgewiesen.

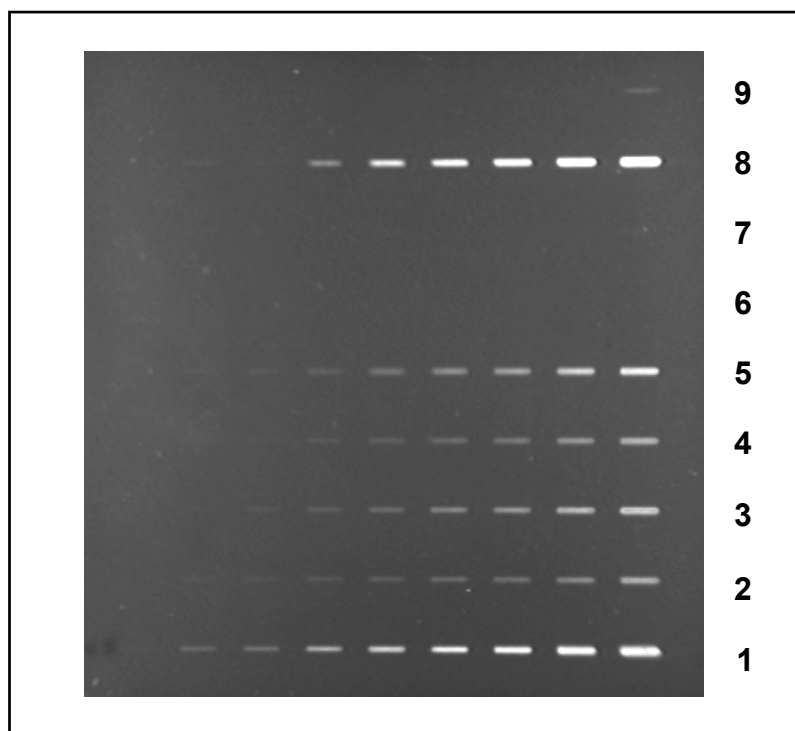


Abb. 44: Drittes Beispiel für eine HPTLC-Platte mit Lipidstandards nach Überschichtung mit C. group G (45).

Es wurden Standardkonzentrationen von 10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng, 2000 ng und 4000 ng pro Spur von links nach rechts aufgetragen. Die Platte wurde nicht im Fließmittel entwickelt sondern gleich mit BSA-Lösung und Bakterienlösung überschichtet. Detektiert wurde mit UV-Licht (366 nm), ausgewertet wurde mit der ONE-Dscan™ Software. Die Bestimmung wurde fünffach unabhängig durchgeführt.

- | | |
|------------------------------|----------------------|
| 1.) Cholesterol-3-sulfat | 6.) Magnesiumsulfat |
| 2.) Cholesterol | 7.) Tetradecylsulfat |
| 3.) Galactocerebrosid I | 8.) Octadecylsulfat |
| 4.) Galactocerebrosid II | 9.) Dodecylsulfat |
| 5.) Galactocerebrosid-sulfat | |

Zwischen Galactocerebrosid-sulfat und Galactocerebrosid II gab es einen signifikanten Unterschied in der Adhäsionseffizienz. Dabei zeigte sich (Abb. 45), dass C. group G (45) eine höhere Bindungsaffinität zu Galactocerebrosid-sulfat hatte. Im Vergleich mit Cholesterol und Cholesterol-3-sulfat hat C. group G (45) auch hier besser an die Sulfat-Verbindung adhärirt. An Cholesterol-3-sulfat adhärirte C. group G (45) hoch signifikant stärker als an Cholesterol.

Zwischen Galactocerebrosid-sulfat und Galactocerebrosid II war kein signifikanter Unterschied. Ein Vergleich von Cholesterol-3-sulfat mit Galactocerebrosid-sulfat zeigte aufgrund der hohen Standardabweichungen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

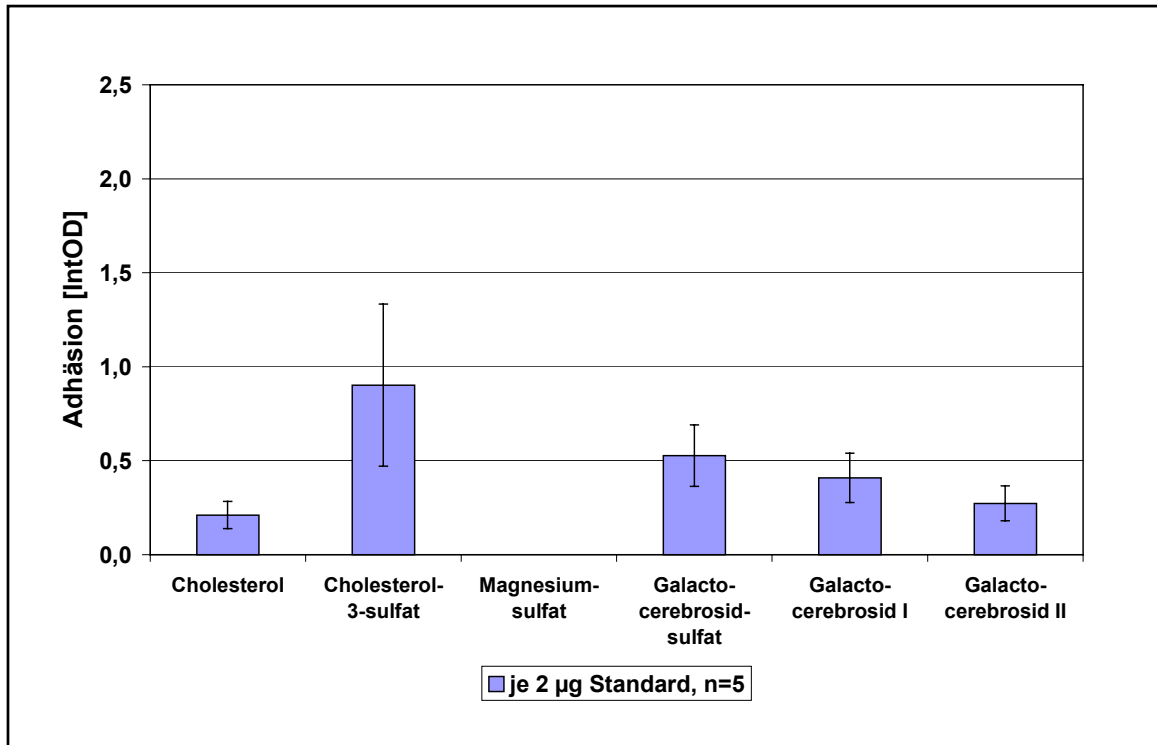


Abb. 45: Vergleich der Bindungsaffinität von C. group G (45) an verschiedene Sulfatverbindungen I.

Die Bindungsaffinität von C. group G (45) an jeweils 2 µg der Standards wurde durch Integration der optischen Dichte [IntOD] berechnet und aufgetragen.
 Cholesterol / Cholesterol-3-sulfat = hoch signifikanter Unterschied
 Galactocerebrosid II / Galactocerebrosidsulfat = signifikanter Unterschied

Standard	Molmasse [g/mol]	Adhäsion [IntOD] an 2 µg Standard	Molarität von 2 µg Standard
Cholesterol	386,7	0,2112	5,2 E-6 mmol
Cholesterol-3-sulfat	465,7	0,9017	4,3 E-6 mmol
Magnesiumsulfat	120,4	-	1,7 E-7 mmol

Tab. 17: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an verschiedene Sulfatverbindungen I mit deren Molarität.

Abb. 46 zeigt den Vergleich verschiedener Fettsäure-sulfat-ester mit unterschiedlicher Kettenlänge der Fettsäuren. An die beiden Fettsäure-sulfat-ester mit zwölf und vierzehn C-Atomen zeigte C. group G (45) keine Bindungsaffinität. Erst bei Octadecylsulfat, einem Fettsäure-sulfat-ester mit 18 C-Atomen, wurde eine gute Bindungsaffinität von C. group G (45) festgestellt. Im Vergleich zu Cholesterol-3-sulfat war die Bindungseffizienz an Octadecylsulfat höher, allerdings nicht signifikant.

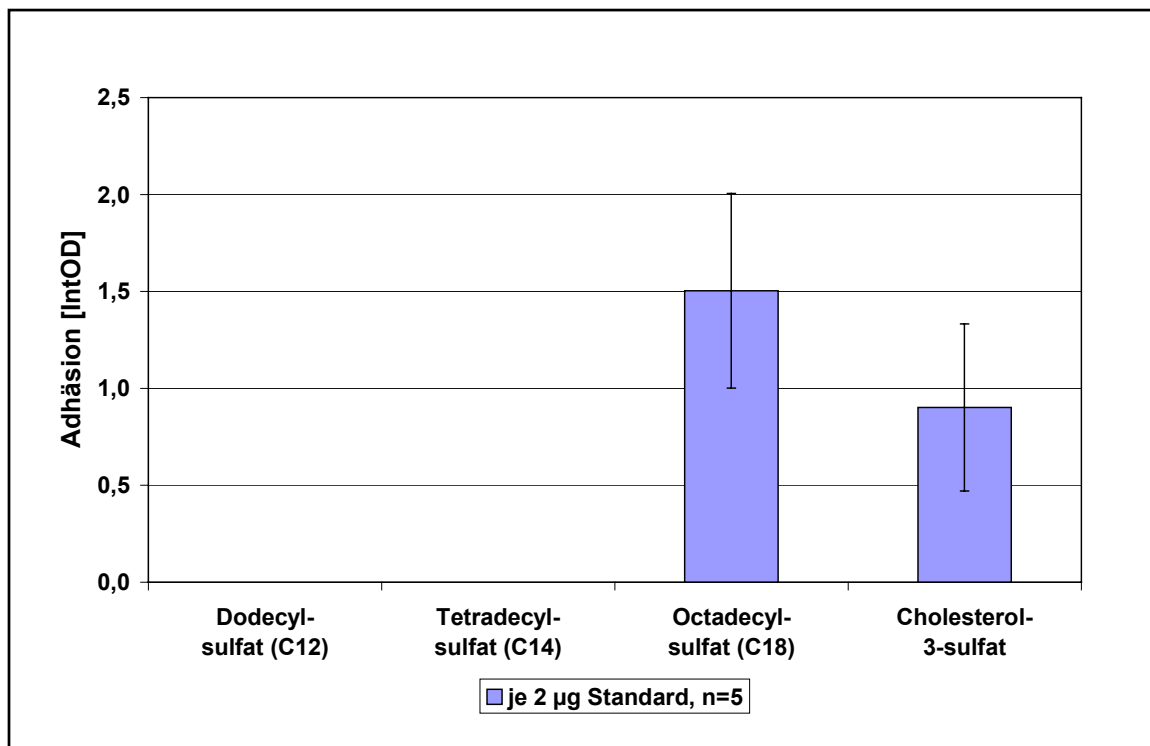


Abb. 46: Vergleich der Bindungsaffinität von C. group G (45) an verschiedene Sulfatverbindungen II.

Die Bindungsaffinität von C. group G (45) an jeweils 2 µg der Standards wurde durch Integration der gemessenen optischen Dichte [IntOD] berechnet und aufgetragen. Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Adhäsion.

Standard	Molmasse [g/mol]	Adhäsion [IntOD] an 2 µg Standard	Molarität von 2 µg Standard
Dodecylsulfat	288,4	-	6,9 E-6 mmol
Tetradecylsulfat	316,4	-	6,3 E-6 mmol
Octadecylsulfat	372,6	1,5034	5,4 E-6 mmol
Cholesterol-3-sulfat	465,7	0,9017	4,3 E-7 mmol

Tab. 18: Vergleich der Adhäsions-Daten von C. group G (45) an verschiedenen Sulfatverbindungen II mit deren Molarität.

3.3.4. Untersuchung von Probandenextrakten

Zum Abschluss der HPTLC- und Overlay-Assay-Untersuchungen wurde ein Probandentest durchgeführt, bei dem 20 Probanden (10 weibliche und 10 männliche) verschiedener Altersgruppen Lipide von der Hautoberfläche des Oberarms extrahiert wurden. Die Hautextrakte wurden mittels HPTLC aufgetrennt und im anschließenden Overlay-Assay mit Corynebakterien überschichtet. Diese Untersuchung sollte Aufschluss über Unterschiede der Bindungsaffinität von Corynebakterien an die Lipide der Probanden hinsichtlich Alter, Geschlecht und Lipidzusammensetzung geben.

Zunächst wurden die Hautextrakte mit Stickstoff zur Trockene gebracht und die Ausbeute an Lipid-Rückstand durch Differenzwägung ermittelt (Tab. 19). Die Lipidextrakte wurden alle auf eine Konzentration von 10 mg/mL mit Chloroform / Methanol (2:1, v/v) eingestellt.

Nr.	Alter	Spendergeschlecht	Lipidausbeute
1	20	weiblich	4,88 mg
2	27	weiblich	8,43 mg
3	30	weiblich	7,28 mg
4	31	weiblich	4,23 mg
5	38	weiblich	7,66 mg
6	42	weiblich	7,30 mg
7	46	weiblich	9,38 mg
8	52	weiblich	7,99 mg
9	54	weiblich	4,62 mg
10	61	weiblich	3,24 mg
11	25	männlich	2,37 mg
12	28	männlich	4,29 mg
13	29	männlich	5,16 mg
14	34	männlich	5,67 mg
15	42	männlich	5,63 mg
16	45	männlich	8,37 mg
17	40	männlich	2,34 mg
18	53	männlich	7,41 mg
19	55	männlich	9,14 mg
20	61	männlich	11,08 mg

Tab. 19: Lipidgehalt der Hautextrakte.

Die Hautextrakte wurden durch die Abspülung von 4 Arealen pro Proband gewonnen, 2 Areale pro Oberarm.

Zur Beurteilung der Lipidzusammensetzung wurde ein Mischstandard eingesetzt, der sich aus sieben Hautlipid-Standards zusammensetzte. Der Mischstandard wurde in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, so dass für jeden Standard eine Eichreihe vorlag. Die Einsatzkonzentrationen des Mischstandards variierten je nachdem, ob eine CuSO_4 -Detektion oder ein Overlay-Assay durchgeführt wurde (Tab. 20 und Tab. 21).

Mischstandard	Konzentrationen auf der HPTLC-Platte / Overlay-Assay					
	A	B	C	D	E	F
Cholesterol	1 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg	10 µg
Cholesteryl-oleat	0,5 µg	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg
Cholesterol-3-sulfat	0,5 µg	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg
Palmitinsäure	0,5 µg	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg
Pentacosan	0,5 µg	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg
Squalen	1 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg	10 µg
Triolein	1 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg	10 µg

Tab. 20: Einsatzkonzentrationen des Mischstandards für den Overlay-Assay.

Die Buchstaben entsprechen den Bezeichnungen in den Abb. der HPTLC-Platten nach Overlay-Assay.

Mischstandard	Konzentrationen auf der HPTLC-Platte / CuSO_4-Detektion					
	A	B	C	D	E	F
Cholesterol	0,4 µg	0,8 µg	1,6 µg	2,4 µg	3,2 µg	4,0 µg
Cholesteryl-oleat	0,2 µg	0,4 µg	0,8 µg	1,4 µg	1,8 µg	2,2 µg
Cholesterol-3-sulfat	0,2 µg	0,4 µg	0,8 µg	1,4 µg	1,8 µg	2,2 µg
Palmitinsäure	0,2 µg	0,4 µg	0,8 µg	1,4 µg	1,8 µg	2,2 µg
Pentacosan	0,2 µg	0,4 µg	0,8 µg	1,4 µg	1,8 µg	2,2 µg
Squalen	0,4 µg	0,8 µg	1,6 µg	2,4 µg	3,2 µg	4,0 µg
Triolein	0,4 µg	0,8 µg	1,6 µg	2,4 µg	3,2 µg	4,0 µg

Tab. 21: Einsatzkonzentrationen des Mischstandards für die CuSO_4 -Detektion.

Die Buchstaben entsprechen den Bezeichnungen in den Abb. der HPTLC-Platten nach CuSO_4 -Detektion.

Die folgenden Abb. zeigen HPTLC-Platten nach dem Overlay-Assay mit Corynebakterien und nach CuSO_4 -Detektion. Es wurden jeweils alle Extrakte der weiblichen Probanden und alle Extrakte der männlichen Probanden zusammen auf HPTLC-Platten aufgetragen.

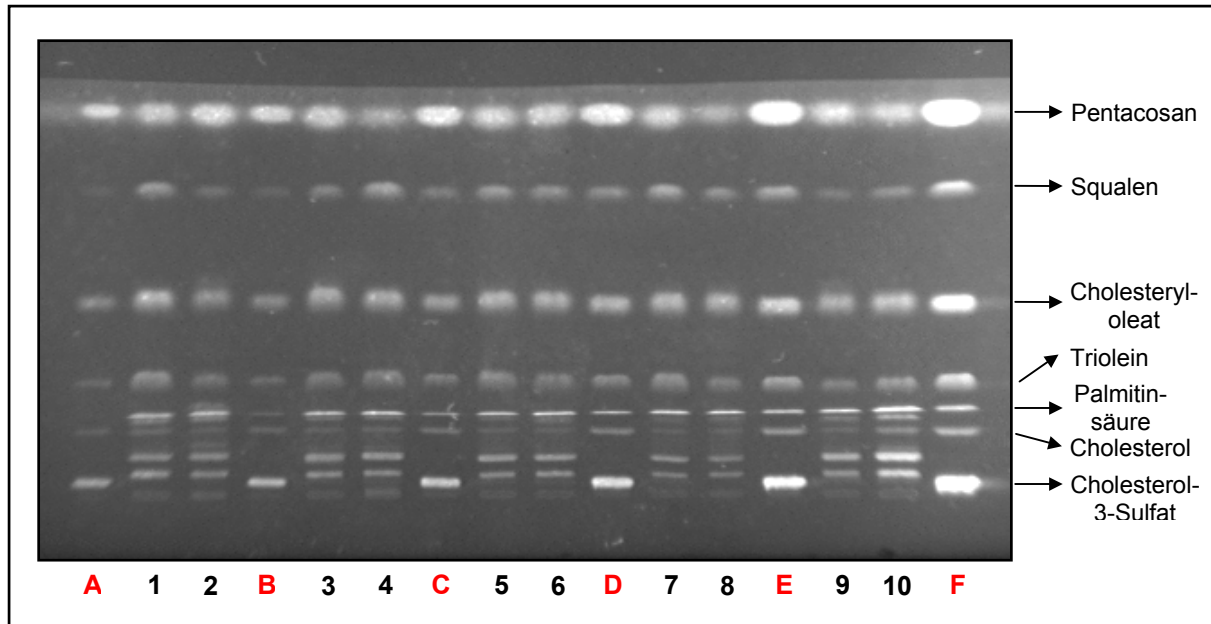


Abb. 47: Untersuchung der Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) mittels Overlay-Assay an Hautextrakten des weiblichen Probandenpools.

Die Zahlen bzw. die Buchstaben unter der Abb. entsprechen den Probanden bzw. den Konzentrationen des Mischstandards aus den Tab. 20-21. Von den Hautextrakten wurden jeweils 100 µg pro Spur aufgetragen.

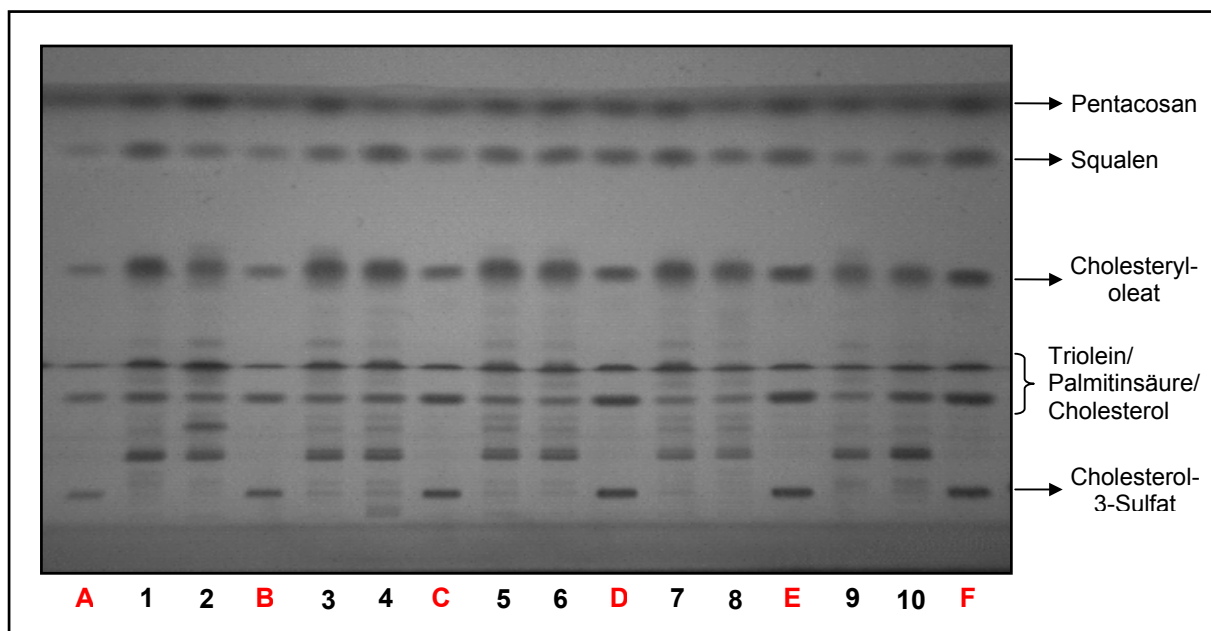


Abb. 48: Untersuchung der Lipidzusammensetzung der Extrakte des weiblichen Probandenpools nach CuSO₄-Detektion.

Die Zahlen bzw. die Buchstaben unter der Abb. entsprechen den Probanden bzw. den Konzentrationen des Mischstandards aus den Tab. 20-21. Von den Hautextrakten wurden jeweils 40 µg pro Spur aufgetragen.

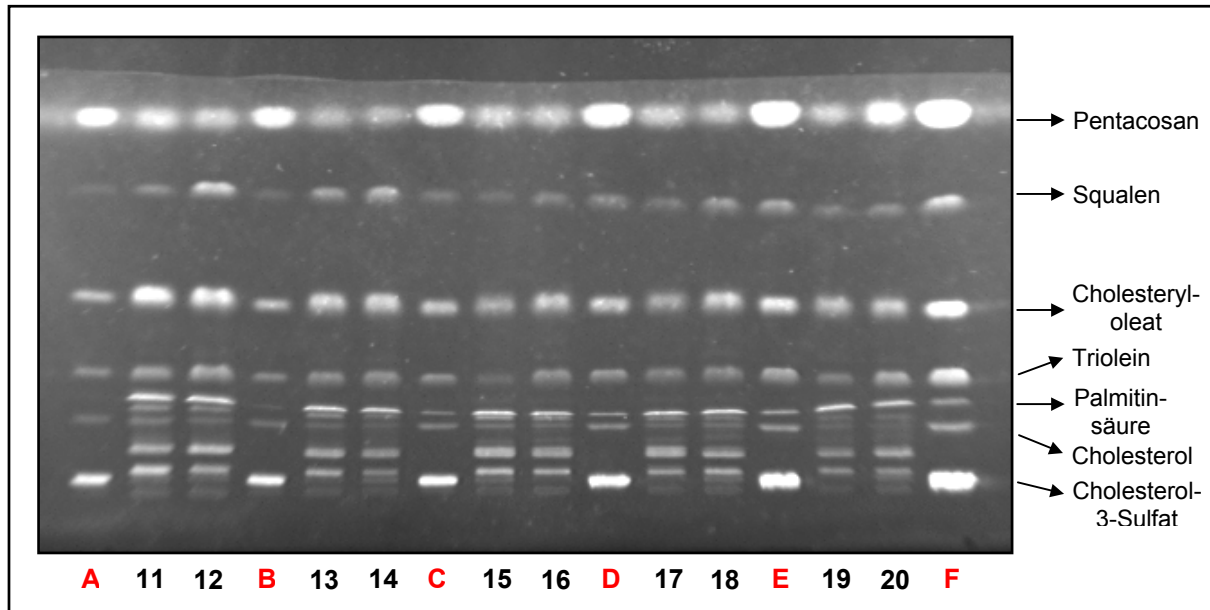


Abb. 49: Untersuchung der Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) mittels Overlay-Assay an Hautextrakten des männlichen Probandenpools.

Die Zahlen bzw. die Buchstaben unter der Abb. entsprechen den Probanden bzw. den Konzentrationen des Mischstandards aus den Tab. 20-21. Von den Hautextrakten wurden jeweils 100 µg pro Spur aufgetragen.

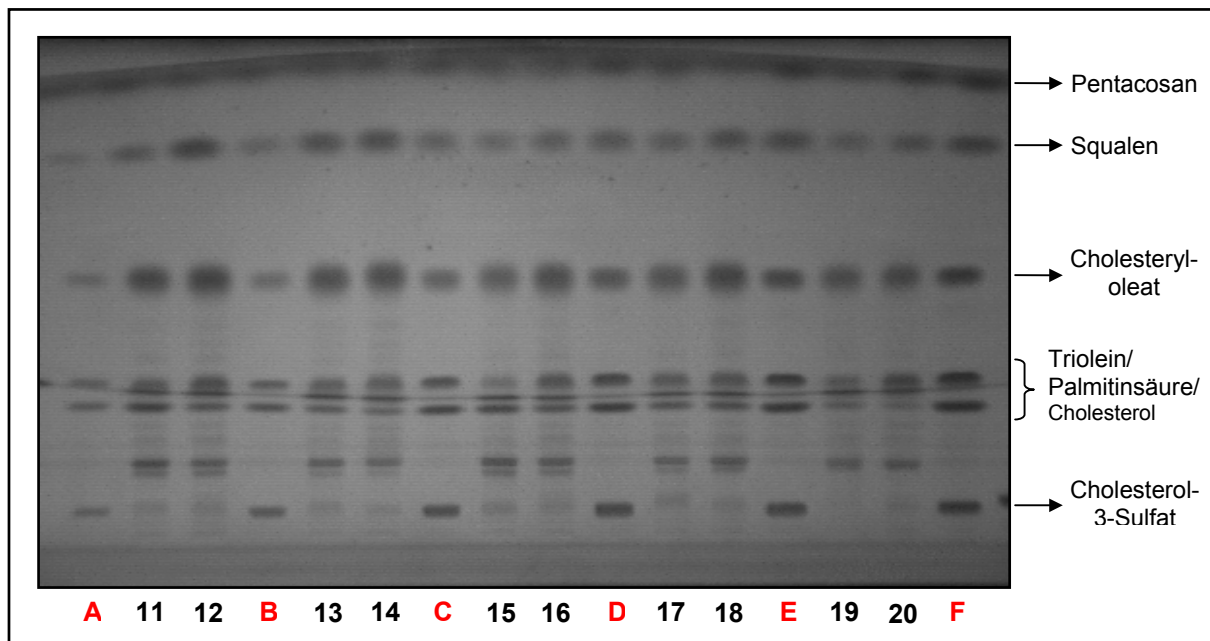


Abb.50: Untersuchung der Lipidzusammensetzung der Extrakte des männlichen Probandenpools nach CuSO₄-Detektion.

Die Zahlen bzw. die Buchstaben unter der Abb. entsprechen den Probanden bzw. den Konzentrationen des Mischstandards aus den Tab. 20-21. Von den Hautextrakten wurden jeweils 40 µg pro Spur aufgetragen.

Die Lipidzusammensetzung der Hautextrakte war einheitlich (siehe CuSO₄-Detektion). Auch die Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) wies visuell keine großen Unterschiede zwischen den Probanden auf. Bei der Auftrennung ist auffällig, dass die Banden im Bereich der Substanzflecken von Triolein, Palmitinsäure und Cholesterol nicht immer getrennt wurden (Abb. 48 und 50).

Es wurde versucht, eine genaue Auswertung der Bindungsintensität von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) mit dem CAMAG TLC Scanner 3 + CATS-Software (Anhang 7.1.1.2) durchzuführen. Dies scheiterte an den teilweise zu dicht liegenden Substanzbanden, deren Intensitätsspeaks sich überlagerten. Pentacosan konnte aufgrund einer Grundstrahlung der Fließmittelfront nicht ausgewertet werden. Ein weiteres Problem waren die trotz einheitlicher Entwicklungsbedingungen nicht gleichmäßigen Auftrennungen, wodurch die Zuordnung der Peaks für die CATS-Software unmöglich war.

Eine Mehrfachbestimmung mit den fünf verschiedenen Bakterienstämmen entfiel aufgrund der teilweise zu geringen Extraktmengen, da für die automatische Auftragung mit dem CAMAG DC-Probenautomat III ein zu großer Vorlauf und Nachlauf benötigt wurde.

3.4. Untersuchung der bakteriellen Adhäsion mit dem optischen Biosensor IAsys plus

Für die Untersuchungen mit dem optischen Biosensor IAsys plus musste zunächst eine geeignete Küvetten-Oberfläche gewählt werden. Zur Auswahl standen sechs verschiedene Oberflächen: Aminosilan, Biotin, Carboxylat, Hydrophob, Nichtderivatisiert, Carboxymethyl Dextran / CMD Selekt.

Bei den zu untersuchenden Substanzen handelte es sich um Hautlipide, d. h. die Oberfläche der Küvette musste geeignet sein, Lipide zu binden. Aus diesem Grund wurde die hydrophobe Küvette gewählt. Ihre Oberfläche war mit Alkan-Ketten beschichtet, an die über hydrophobe Wechselwirkungen unpolare Substanzen wie die Hautlipide binden konnten.

Erste Untersuchungen wurden mit dieser Küvette durchgeführt, scheiterten aber an Produktionsfehlern, die vom Hersteller nicht behoben werden konnten. Die hydrophobe Küvette ist daher vom Hersteller aus dem Programm genommen worden.

Als Alternative wurde die Biotin Küvette gewählt. Diese wurde zunächst mit NeutrA-vidin™ und anschließend mit einem biotinylierten Liganden gekoppelt. Nach Zugabe des Ligates (Bakterien), sollte dessen Bindung an die Liganden untersucht werden. Da Hautlipide nicht mit Biotin-Resten zu erwerben waren, wurden noch einmal Zuckerstrukturen als Rezeptoren aufgegriffen, nachdem sich bei den Gangliosiden eine gute Bindungsaffinität der Corynebakterien gezeigt hatte. Getestet wurden biotinylierte Mannose und Biotin-Mannose-Phosphat. Untersuchungen von MAST (2001) haben gezeigt, dass Mannose ein guter Bindungspartner für Corynebakterien ist. Desweiteren wurden von der Arbeitsgruppe Lindhorst aus dem Fachbereich organische Chemie der Universität Kiel biotinyliertes Methyl- α -Mannosid, biotinyliertes Methyl- α -Mannosid mit einem C₁₅ Lipid-Rest und ein biotinylierter Glykocluster mit 5 Mannose-Einheiten zur Verfügung gestellt (Abb. 51).

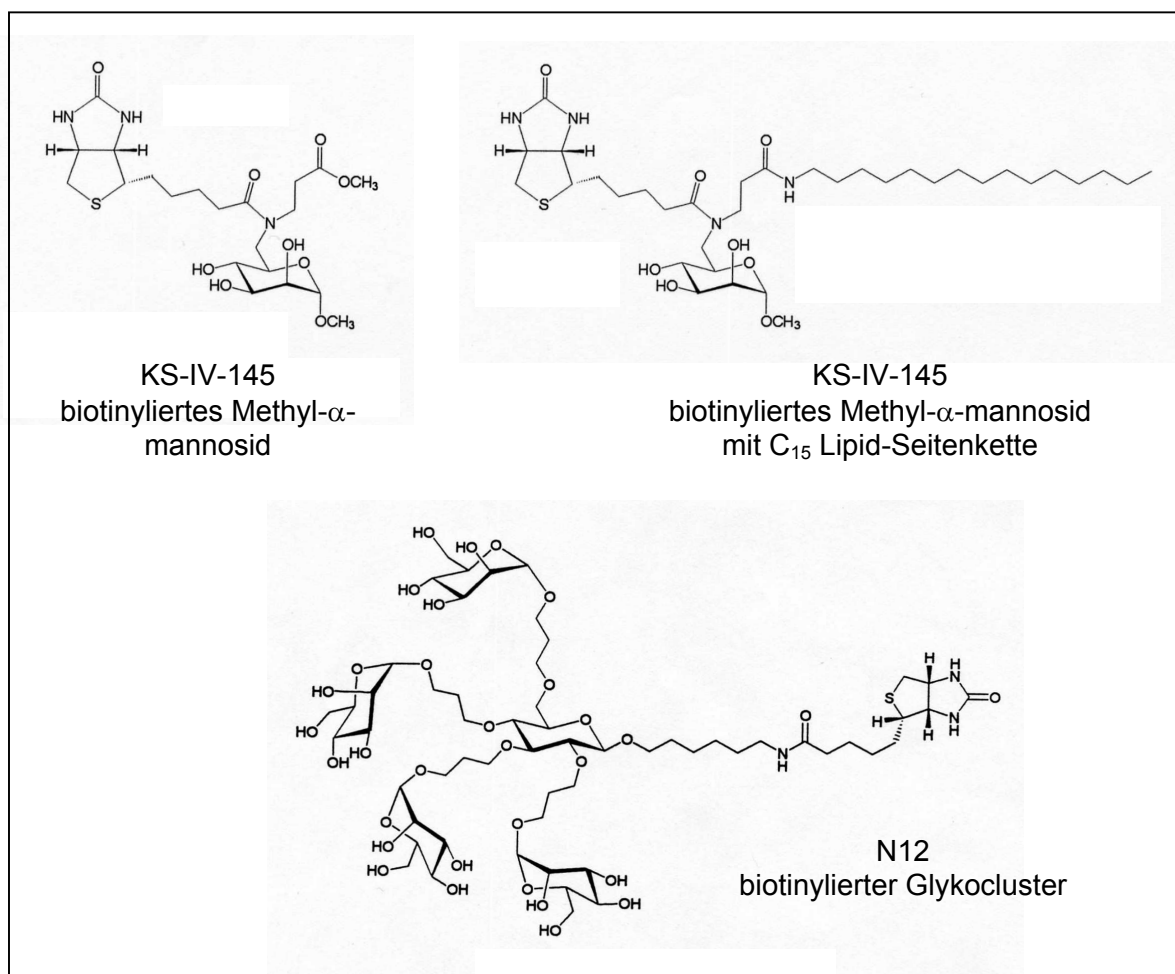


Abb. 51: Biotinylierte Substanzen der Arbeitsgruppe Lindhorst aus dem Fachbereich organische Chemie der Universität Kiel.

3.4.1. Vorbereitung der Küvette: Anlagerung von NeutrAvidin™ an die Biotin-Oberfläche

Zunächst musste NeutrAvidin™ an die Biotin-Oberfläche der Küvette gebunden werden. Dieser Vorgang ist im folgenden Diagramm dargestellt.

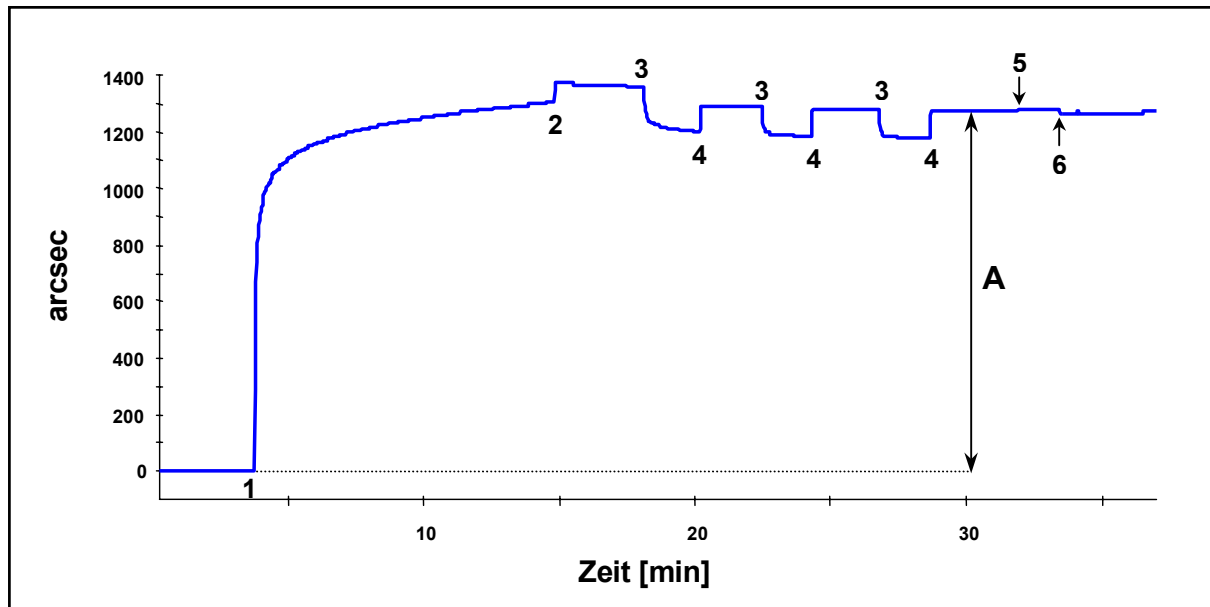


Abb. 52: Beschichtung der Biotin-Oberfläche mit NeutrAvidin™

0. Start mit PBS/T
1. Bindung von NeutrAvidin™ (in H₂O)
2. Spülen mit PBS/T
3. Regeneration mit Glycin/HCl
4. Spülen mit PBS/T
5. Zugabe von BSA in PBS/T
6. Spülen mit PBS/T

Die Aufzeichnung der Bindungskurve wurde mit PBS/T-Puffer in der Küvette gestartet. Der Resonanzwinkel der daraus resultierenden Basislinie diente als Ausgangswert für die Berechnung der Winkelzunahme während der anschließenden Bindung von NeutrAvidin™. Die Bindung des NeutrAvidins™ wurde als Massezuwachs an der Sensoroberfläche detektiert und als Zunahme des Resonanzwinkels verzeichnet (Methoden 2.8.2.).

Beim Abspülen des NeutrAvidin™-Überschusses mit PBS/T war ein weiterer Anstieg der Kurve bzw. des Resonanzwinkels zu verzeichnen. Ursache hierfür war, dass NeutrAvidin™ in PBS/T-Puffer unlöslich ist und somit in H₂O gelöst werden musste.

Im Vergleich zum H₂O hatte der PBS/T-Puffer mehr Masse durch die gelösten Salze. Diese Masse wurde im Bereich des evaneszenten Feldes mit gemessen.

Massenänderungen, hervorgerufen durch das Lösungsmittel, konnten ignoriert werden, solange nach jedem Schritt die Basislinie erneut mit PBS/T-Puffer aufgezeichnet wurde.

Um die nicht gebundenen NeutrAvidin™-Moleküle zu entfernen, wurde dreimal mit einer 100 mM Glycin-Lösung gewaschen, die mit HCl auf einen pH-Wert von 3,1 eingestellt war. Da die Glycin-Lösung ebenfalls nicht in PBS/T, sondern in H₂O gelöst war, wurde keine Massenzunahme sondern eine Massenabnahme registriert. Auch hier wurde abschließend immer mit PBS/T-Puffer gespült.

Für die Berechnung der Zunahme des Resonanzwinkels wurde nach der Bindung von NeutrAvidin™ bzw. nach den Waschschrinen wieder mit PBS/T gemessen. Der Unterschied zwischen dem Resonanzwinkel dieser neuen Basislinie und der alten Basislinie entsprach dem gebundenen NeutrAvidin™ (A).

Abschließend wurde durch die Zugabe von BSA (in PBS/T) getestet, ob die gesamte Biotin-Oberfläche mit NeutrAvidin™ bedeckt oder noch unspezifische Bindungsstellen frei waren.

Bei allen folgenden Untersuchungen wurden die Küvetten zuvor nach dieser Methode mit NeutrAvidin™ gecoatet.

3.4.2. Untersuchung der Bindungsaffinität der Corynebakterien zur NeutrAvidin™-Oberfläche

Für die weiteren Untersuchungen war es erforderlich, zunächst die Bindungsaffinität von Corynebakterien an die NeutrAvidin™-Oberfläche zu überprüfen. Bei der folgenden Anlagerung der biotinylierten Substanzen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund z. B. sterischer Hinderungen ein Teil der NeutrAvidin™-Oberfläche für die Bakterien zugänglich blieb. Dies hätte zur Folge, dass die Bindungskurve der Bakterien sich aus Bindungen an die biotinylierten Substanzen und an NeutrAvidin™ zusammensetzen würde. Aus diesem Grund wurden die Corynebakterien direkt auf die NeutrAvidin™-Oberfläche gegeben und das Bindungsverhalten beobachtet. Es wurden 10 µL Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 2×10^{10} Bakterien/mL in die Küvette gegeben, die Konzentration in der Küvette betrug 2×10^8 Bakte-

rien. Die folgenden Ergebnisse wurden nach einer Doppelbestimmung erhalten, d.h. es wurden zwei voneinander unabhängige Bestimmungen in verschiedenen Küvetten durchgeführt.

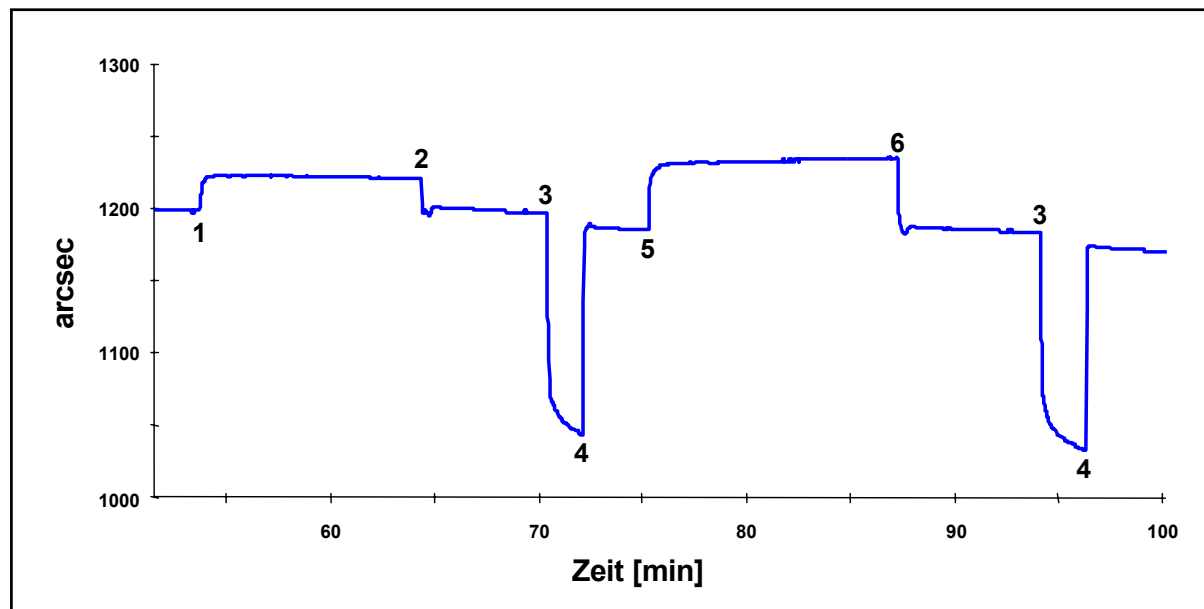


Abb. 53: Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an NeutrAvidin™

0. Start mit PBS/T
1. Zugabe von C. group G (45) in PBS/T
2. Spülen mit PBS/T (Keine Änderung der Response)
3. Regeneration mit Glycin/HCl
4. Spülen mit PBS/T
5. Zugabe von C. group G (48) in PBS/T
6. Spülen mit PBS/T (Keine Änderung der Response)

Abb. 53 zeigt die Bindungskurven von C. group G (45) und C. group G (48). Beide Bakterienstämme ließen sich durch PBS/T-Puffer vollständig wieder von der NeutrAvidin™-Oberfläche entfernen. Die Basislinien vor der Zugabe der Bakterien und nach dem Spülen mit PBS/T-Puffer lagen auf gleicher Höhe, bei C. group G (45) bei ca. 1200 arcsec und bei C. group G (48) bei ca. 1180 arcsec. Da keine Änderung des Resonanzwinkels messbar war, war somit keine spezifische Anlagerung von C. group G (45) und C. group G (48) an NeutrAvidin™ erfolgt.

Abb. 54 zeigt die Bindungskurven von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) und *C. jeikeium* (DSMZ 7171) auf der gleichen NeutrAvidin™-Oberfläche, auf der zuvor C. group G (45) und C. group G (48) nicht gebunden hatten.

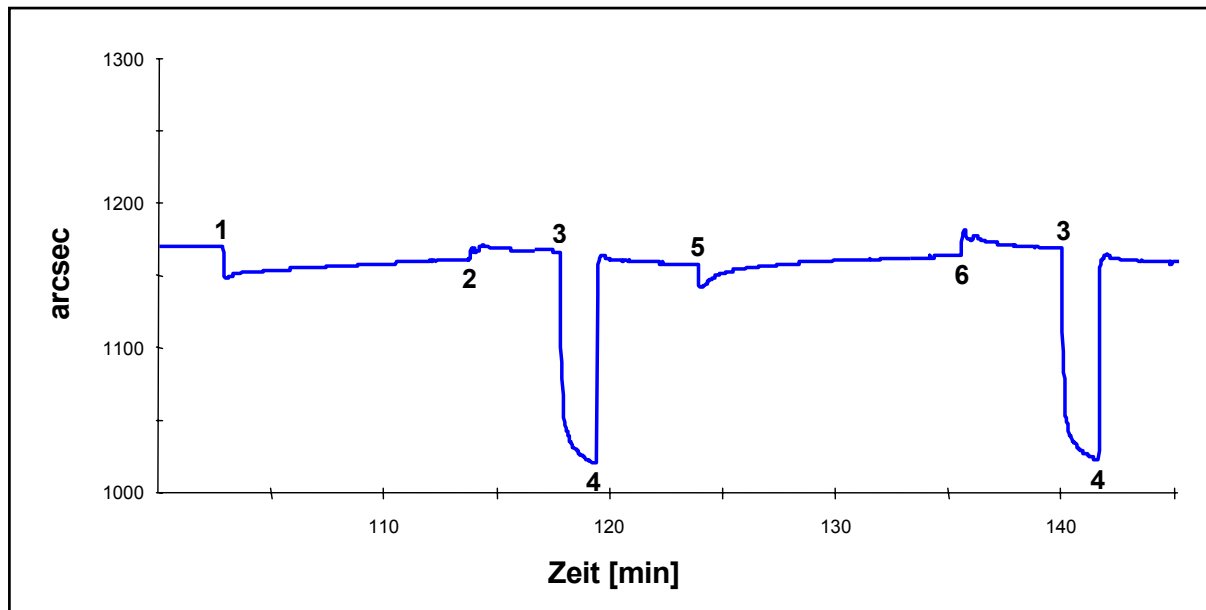


Abb. 54: Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an NeutrAvidin™

0. Start mit PBS/T
1. Zugabe von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) in PBS/T
2. Spülen mit PBS/T (Keine Änderung der Response)
3. Regeneration mit Glycin/HCl
4. Spülen mit PBS/T
5. Zugabe von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) in PBS/T
6. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 11,1 arcsec)

Auch bei *C. minutissimum* (DSMZ 20651) wurde keine Bindungsaffinität zu NeutrAvidin™ gefunden. Die Basislinien vor und nach der Bakterienzugabe lagen auf gleicher Höhe, es gab keine spezifische Bindung.

C. jeikeium (DSMZ 7171) dagegen zeigte eine schwache Bindungsaffinität zur NeutrAvidin™-Oberfläche. Die Basislinie war nach Zugabe von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) um 11,1 arcsec höher als vorher. Es handelte sich hierbei nur um eine geringe Erhöhung des Resonanzwinkels, dennoch musste davon ausgegangen werden, dass eine Bindung an das NeutrAvidin™ stattgefunden hat.

Im Vergleich zu *C. group G* (45) und *C. group G* (48) gab es bei der Zugabe von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) und *C. jeikeium* (DSMZ 7171) zunächst einen Abfall der Kurve, obwohl die Bakterien in PBS/T suspendiert waren. Hierfür konnte keine Erklärung gefunden werden.

Wie bei *C. jeikeium* (DSMZ 7171) war die Basislinie auch bei *C. jeikeium* (96) nach der Bakterienzugabe angestiegen (Abb. 55). Hier war eine Zunahme des Resonanzwinkels von 3,4 arcsec zu verzeichnen. Diese Winkelzunahme war sehr gering, es

konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass *C. jeikeium* (96) an die NeutrAvidin™-Oberfläche gebunden hat.

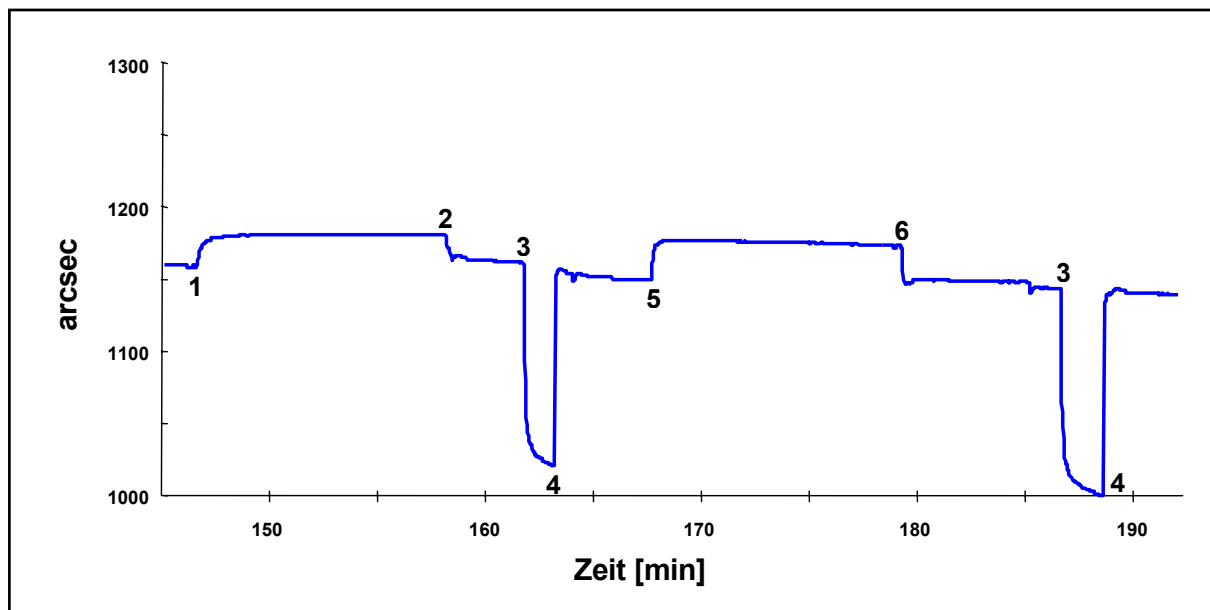


Abb. 55: Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an NeutrAvidin™

0. Start mit PBS/T
1. Zugabe von *C. jeikeium* (96) in PBS/T
2. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 3,4 arcsec)
3. Regeneration mit Glycin/HCl
4. Spülen mit PBS/T
5. Zugabe von *C. group G* (45) in PBS/T
6. Spülen mit PBS/T (Keine Änderung der Response)

Die Abb. 53-55 wurden in einer Küvette nacheinander aufgezeichnet. Um die Qualität der NeutrAvidin™-Oberfläche abschließend noch einmal zu testen, wurde wieder *C. group G* (45) zugegeben. Wie bereits beim ersten Mal (Abb. 53) zeigte *C. group G* (45) keine Bindungsaffinität zur NeutrAvidin™-Oberfläche (Abb. 55).

Aufgrund der schwachen Bindung von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) und *C. jeikeium* (96) an die NeutrAvidin™-Oberfläche und dem noch nicht geklärten Abfall der Kurven nach Zugabe von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) und *C. jeikeium* (DSMZ 7171) in PBS/T, wurden im Folgenden nur *C. group G* (45) und *C. group G* (48) getestet. Bei beiden Bakterienstämmen konnte eine Bindung an die NeutrAvidin™-Oberfläche ausgeschlossen werden.

3.4.3. Anlagerung von biotinylierten Substanzen an die NeutrAvidin™-Oberfläche und Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien

Vor der Anlagerung der biotinylierten Substanzen wurden die Biotin Küvette mit NeutrAvidin™ wie unter 3.4.1. beschrieben beschichtet, die Zunahme des Resonanzwinkels betrug 1217 arcsec. Da das Programm für die Beschichtung mit dem biotinylierten Glykocluster N12 in einer neuen Datei gespeichert wurde, begann die anschließende Messung wieder annähernd bei 0 arcsec. In Abb. 56 ist die Anlagerung des biotinylierten Glykoclusters N12 an die NeutrAvidin™-Oberfläche dargestellt (Beispiel für eine von vier Durchführungen).

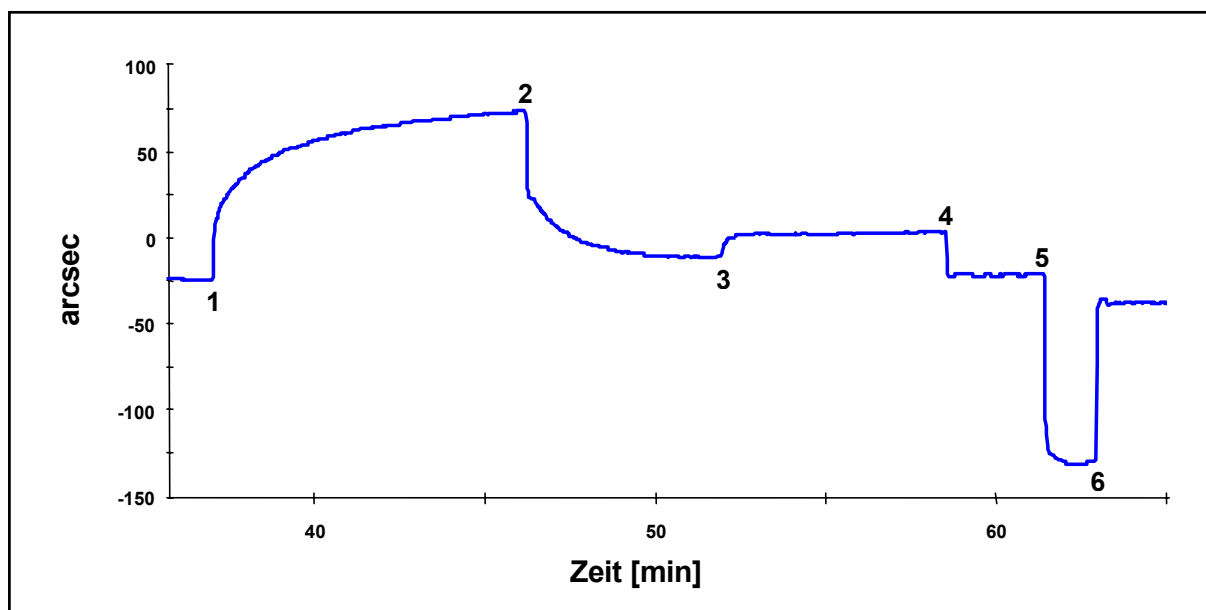


Abb. 56: Untersuchung der Bindungsaffinität von C. group G (48) an den biotinylierten Glykocluster N12

0. Start mit PBS/T
1. Bindung des biotinylierten Glykoclusters N12
2. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 14,3 arcsec)
3. Bindung von C. group G (48) in PBS/T
4. Spülen mit PBS/T (Keine Änderung der Response)
5. Regeneration mit Glycin/HCl
6. Spülen mit PBS/T

Die Zunahme des Resonanzwinkels durch die Bindung des biotinylierten Glykoclusters N12 betrug 14,3 arcsec. Wie dem weiteren Kurvenverlauf zu entnehmen ist, zeigte C. group G (48) keine Bindungsaffinität zu dem Glykocluster. Eingesetzt wurden 2×10^9 Bakterien/mL, die Konzentration in der Küvette betrug 2×10^7 Bakterien. Die Basislinie vor der Bindung des Glykoclusters und nach dem Abspülen der Bakte-

rien lagen auf einer Höhe. Durch das Abspülen der Bakterien wurde auch der Glykocluster wieder von der NeutrAvidin™-Oberfläche entfernt.

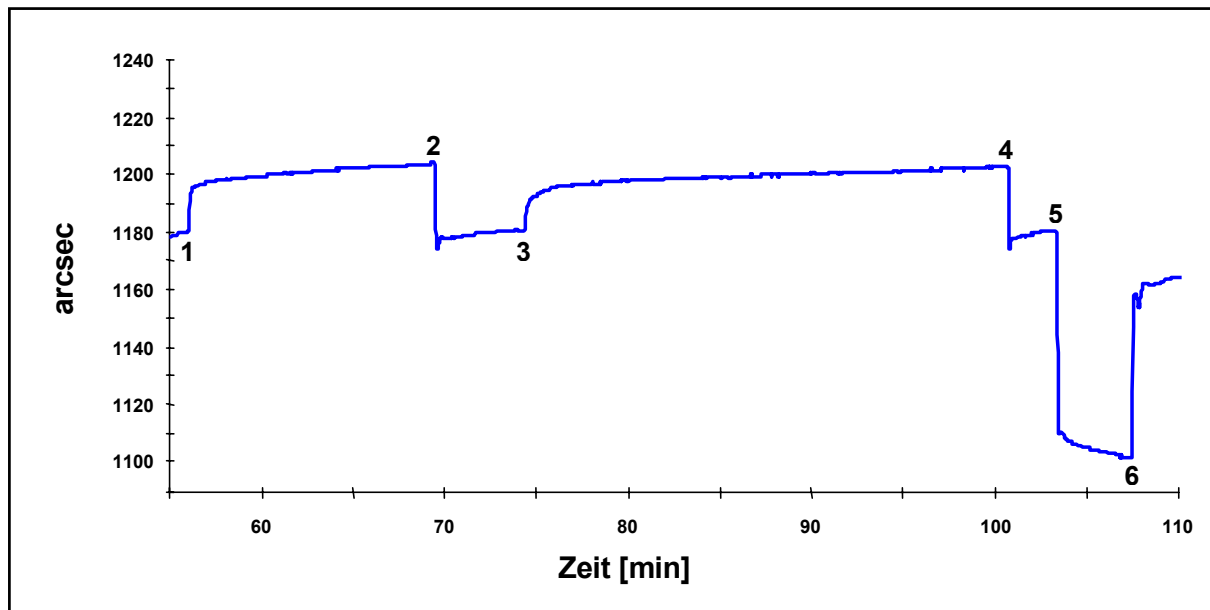


Abb. 57: Untersuchung der Bindungsaffinität von C. group G (45) an biotinylierte Mannose

0. Start mit PBS/T
1. Bindung der biotinylierten Mannose
2. Spülen mit PBS/T (Keine Änderung der Response)
3. Bindung von C. group G (45) in PBS/T
4. Spülen mit PBS/T (Keine Änderung der Response)
5. Regeneration mit Glycin/HCl
6. Spülen mit PBS/T

Als nächstes sollte eine biotinylierte Mannose an eine NeutrAvidin™-Oberfläche gebunden werden (Abb. 57). Die Zunahme des Resonanzwinkels durch die Bindung von NeutrAvidin™ betrug 1193 arcsec. Eine Bindung der biotinylierten Mannose kam nicht zustande. Zur Kontrolle wurde anschließend die Bindungsaffinität von C. group G (45) überprüft, die Konzentration in der Küvette lag bei 2×10^8 Bakterien. Es gab keine Bindung des Bakterienstammes. Dieses Ergebnis konnte durch eine Wiederholung des Versuches bestätigt werden.

Dagegen kam eine Bindung von Biotin-Mannose-6-Phosphat an die NeutrAvidin™-Oberfläche zustande (Abb. 58). Diese brachte eine Änderung des Resonanzwinkels um 51,5 arcsec.

Nach Zugabe von *C. group G* (48) mit einer Konzentration von 2×10^7 Bakterien in der Küvette änderte sich der Resonanzwinkel um 9,7 arcsec aufgrund der Bindung von *C. group G* (48) an Mannose-6-Phosphat.

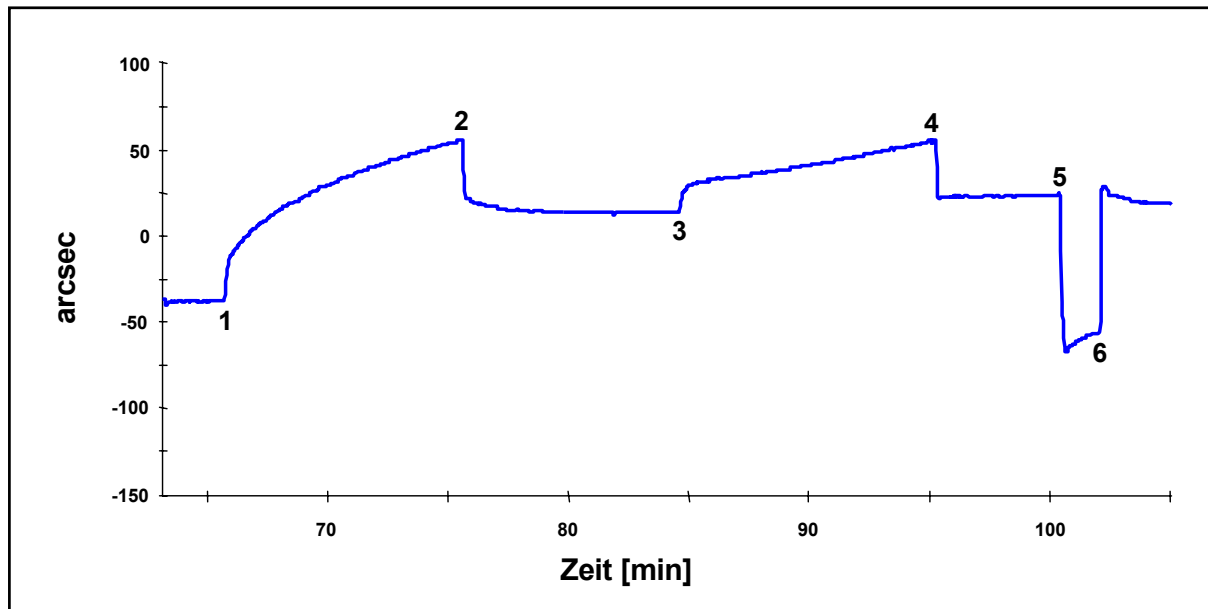


Abb. 58: Untersuchung der Bindungsaffinität von *C. group G* (48) an Biotin-Mannose-6-Phosphat

0. Start mit PBS/T
1. Bindung von Biotin-Mannose-6-Phosphat
2. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 51,5 arcsec)
3. Bindung von *C. group G* (48) in PBS/T
4. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 9,7 arcsec)
5. Regeneration mit Glycin/HCl
6. Spülen mit PBS/T

Bei Wiederholung dieses Versuches mit *C. group G* (45) konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden (Abb. 59). Die Bindung von Biotin-Mannose-6-Phosphat an die NeutrAvidin™-Oberfläche erhöhte den Resonanzwinkels nur um 21,7 arcsec. Der Grund hierfür liegt vermutlich an den vom Hersteller nicht einwandfrei produzierten Biotin-Oberflächen der Küvetten. Die Produktionsschwierigkeiten hielten über den gesamten Zeitraum dieser Untersuchungen an.

Durch die Bindung von *C. group G* (45) an Biotin-Mannose-6-Phosphat änderte sich der Resonanzwinkel um 83,5 arcsec, es wurde also mehr *C. group G* (45) gebunden als zuvor *C. group G* (48). *C. group G* (45) wurde mit 2×10^8 Bakterien in der Küvette in einer höheren Konzentration eingesetzt als *C. group G* (48) mit einer Konzentration von 2×10^7 Bakterien in der Küvette.

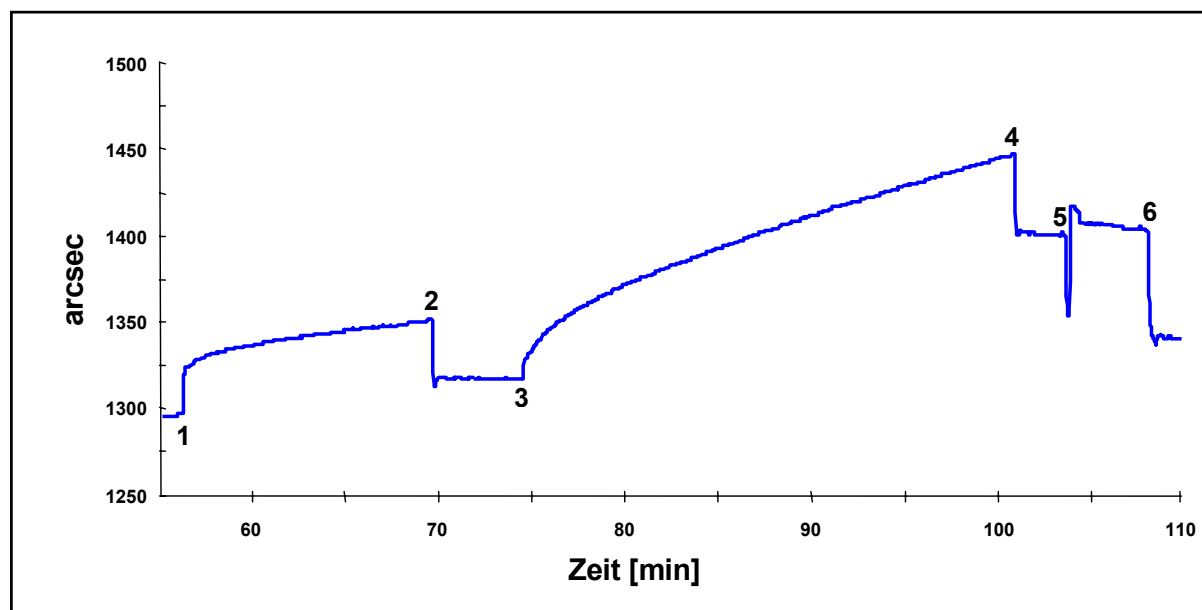


Abb. 59: Untersuchung der Bindungsaffinität von C. group G (45) an Biotin-Mannose-6-Phosphat

0. Start mit PBS/T
1. Bindung von Biotin-Mannose-6-Phosphat
2. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 21,7 arcsec)
3. Bindung von C. group G (45) in PBS/T
4. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 83,5 arcsec)
5. Regeneration mit Glycin/HCl
6. Spülen mit PBS/T

3.4.4. Untersuchung des Einflusses von Methanol auf die NeutrAvidin™-Oberfläche

Als nächstes wurden die biotinylierten Substanzen KS-IV-145 und KS-IV-153 aus dem Arbeitskreis von Prof. Lindhorst untersucht. Diese Substanzen waren nicht in PBS/T-Puffer, sondern in Methanol löslich. Da die Methode bislang nur mit PBS/T-Puffer löslichen Substanzen durchgeführt worden war, musste zunächst überprüft werden, welchen Einfluss Methanol auf die NeutrAvidin™-Oberfläche hatte.

Hierfür wurde eine Biotin Küvette mit NeutrAvidin™ beschichtet und anschließend ein Aliquot Methanol zu dem PBS/T-Puffer in der Küvette zugegeben (Abb. 60). Nach dem Spülen der Küvette mit PBS/T-Puffer wurden die Basislinien vor und nach der Methanol Zugabe miteinander verglichen. Beim ersten Versuch wurde Methanol 2 min in der Küvette gelassen. Die Basislinien lagen vorher und nachher auf gleicher Höhe, die NeutrAvidin™-Oberfläche schien unverändert. Beim zweiten Versuch wur-

de Methanol für 10 min in der Küvette gelassen. Hiernach war der Resonanzwinkel um 46,9 arcsec gestiegen.

Um zukünftig auch Substanzen untersuchen zu können, die nur in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurde der Einfluss von Chloroform auf die NeutrAvidin™-Oberfläche getestet (Abb. 60).

Zunächst wurde ein Aliquot Chloroform zu dem PBS/T-Puffer in die Küvette zugegeben. Beide Lösungen waren nicht miteinander mischbar, wurden aber kontinuierlich im Gerät ineinander verrührt. Die aufgezeichnete Kurve zeigte kein neues Plateau wie sonst nach einem Lösungsmittelwechsel, sondern stieg erst an und nahm dann wieder ab. Um eine Fehlermeldung des Gerätes zu vermeiden, wurde sofort wieder mit PBS/T-Puffer gespült. Ein erneuter Versuch mit einem vollständigen Austausch des PBS/T-Puffer gegen Chloroform führte ebenfalls zu Schwankungen in der Kurve. Bei einer anderen Küvette wurde das Programm nach Chloroform Zugabe aufgrund einer Fehlermeldung sofort abgebrochen. Eine Untersuchung von Chloroform löslichen biotinylierten Substanzen ist damit nicht möglich.

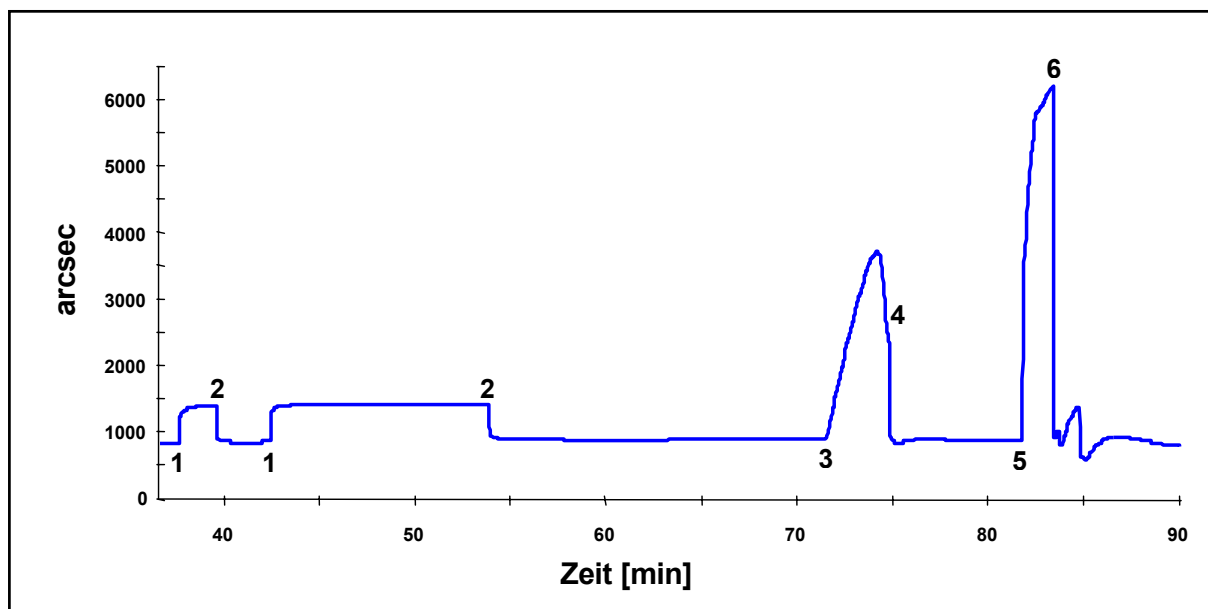


Abb. 60: Untersuchung des Einflusses von Methanol und Chloroform auf die NeutrAvidin™-Oberfläche

0. Start mit PBS/T
1. Zugabe von Methanol (1:5 verdünnt mit PBS/T)
2. Spülen mit PBS/T (nach 10 min MeOH Änderung der Response um 46,9 arcsec)
3. Zugabe von Chloroform (1:5 verdünnt mit PBS/T)
4. Spülen mit PBS/T
5. Zugabe von Chloroform (unverdünnt)
6. Spülen mit PBS/T

3.4.5. Anlagerung von Methanol löslichen biotinylierten Substanzen an die NeutrAvidin™-Oberfläche und Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien

Als erstes wurde die Bindung von KS-IV-145 an die NeutrAvidin™-Oberfläche untersucht (Abb. 61). Dafür wurde KS-IV-145 zu dem PBS/T-Puffer in der Küvette zugegeben, so dass eine 1:5 Verdünnung vorlag (genaue Einsatzmenge siehe Tab. 32). Die Bindungszeit betrug ca. 3 min, anschließend wurde mit PBS/T-Puffer gespült. Beim zweiten Schritt wurde die Bindungszeit auf 5 min erhöht und beim letzten Schritt auf eine Bindungszeit von ca. 2 min verkürzt wobei KS-IV-145 in der Küvette nur noch 1:3 verdünnt wurde.

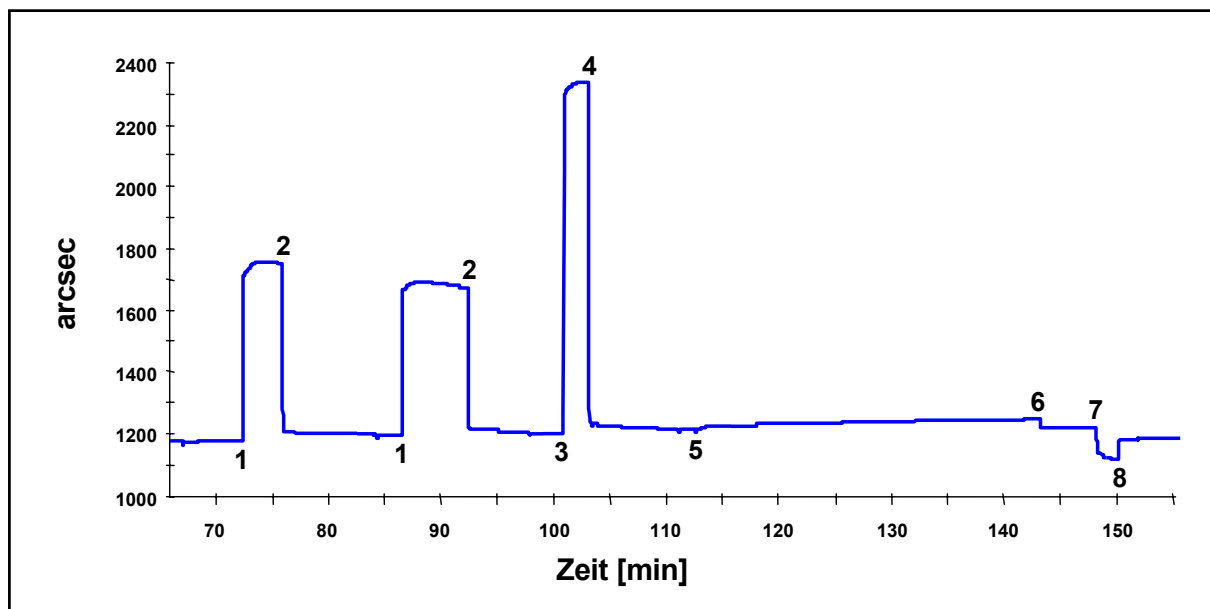


Abb. 61: Untersuchung der Bindungsaffinität von C. group G (45) an KS-IV-145

0. Start mit PBS/T
1. Bindung von KS-IV-145 (1:5 verdünnt mit PBS/T)
2. Spülen mit PBS/T
3. Bindung von KS-IV-145 (1:3 verdünnt mit PBS/T)
4. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 33,2 arcsec)
5. Bindung von C. group G (45) in PBS/T
6. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 10,7 arcsec)
7. Regeneration mit Glycin/HCl
8. Spülen mit PBS/T

Die Bindung von KS-IV-145 an die NeutrAvidin™-Oberfläche erhöhte den Resonanzwinkel um 33,2 arcsec. Nach Zugabe von C. group G (45) in einer Konzentration von 2×10^8 Bakterien in der Küvette, änderte sich der Resonanzwinkel um 10,7 arcsec aufgrund der Bindung von C. group G (45) an KS-IV-145.

Abschließend wurde die Bindungsaffinität von *C. group G* (45) an KS-IV-153 untersucht (Abb. 62). KS-IV-153 wurde wie zuvor KS-IV-145 in drei Schritten an die NeutrAvidin™-Oberfläche gebunden. Dabei ergab sich eine Winkelzunahme von 102,2 arcsec. Das anschließend zugegebene *C. group G* (45) erhöhte bei einer Konzentration von 2×10^8 Bakterien in der Küvette den Resonanzwinkel um weitere 228,8 arcsec, d.h. es hat eine Bindung stattgefunden.

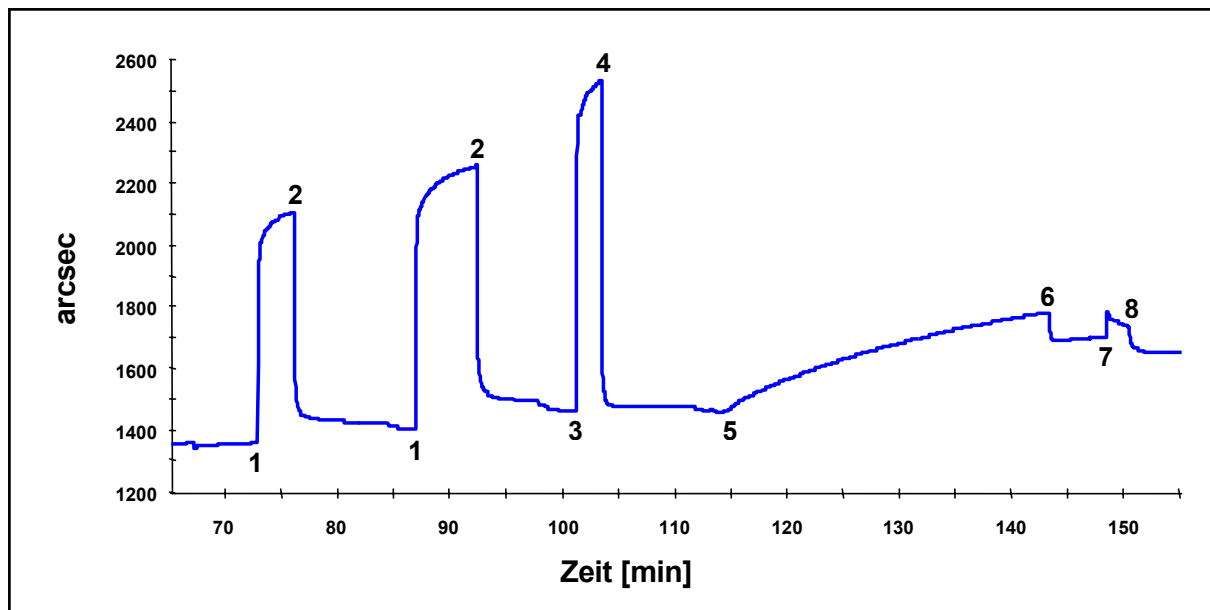


Abb. 62: Untersuchung der Bindungsaffinität von *C. group G* (45) an KS-IV-153

0. Start mit PBS/T
1. Bindung von KS-IV-153 (1:5 verdünnt mit PBS/T)
2. Spülen mit PBS/T
3. Bindung von KS-IV-153 (1:3 verdünnt mit PBS/T)
4. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 102,2 arcsec)
5. Bindung von *C. group G* (45) in PBS/T
6. Spülen mit PBS/T (Änderung der Response um 228,8 arcsec)
7. Regeneration mit Glycin/HCl
8. Spülen mit PBS/T

4. DISKUSSION

4.1. Bakterielle Adhäsionseigenschaften an Ganglioside

Um die Ganglioside mittels HPTLC untersuchen zu können, musste zunächst ein geeignetes Fließmittel gefunden werden, mit dem die Ganglioside ausreichend getrennt wurden. Dabei musste das Fließmittel polar genug sein, um die polaren Ganglioside auf der polaren Kieselgelplatte mitzuziehen.

KARLSSON und STRÖMBERG (1987) verwendeten für neutrale Ganglioside ein Fließmittelgemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser, für saure Ganglioside aus Chloroform, Methanol und 2,5 M Ammoniak. Als geeigneter erwies sich in dieser Arbeit eine Kombination aus Chloroform, Methanol und Calciumchlorid in Wasser (WIESNER und SWEELEY, 1995; CAMBRON und LESKAWA, 1990; KNIEP und MÜHLRADT, 1990; SAITO *et al.*, 1985; RÖSNER, 1980). Die optimale Zusammensetzung wurde ermittelt und durch den Einsatz eines zweiten Fließmittelgemisches aus Chloroform, Ethanol und Calciumchlorid eine ausreichende Trennung und eine gute Bandenschärfe erreicht.

Es zeigte sich, dass bei Chromatogrammen nach der Entwicklung im Fließmittel im Vergleich zu Chromatogrammen ohne chromatographische Auftrennung die Adhäsion von Corynebakterien stark abgeschwächt war. Es musste für Overlay Assays eine wesentlich höhere Konzentration der Standards aufgetragen werden, um eine Adhäsion beobachten zu können. Dieser Effekt könnte durch das Zerlaufen der Substanzflecken verursacht worden sein. Je polarer die Fließmittel waren, um so weiter liefen die Ganglioside, wodurch die Auftrennung deutlich verbessert wurde, aber um so stärker zerliefen sie auch. In den Fließmittelgemischen wurden deshalb so wenig Methanol, Ethanol und Calciumchlorid-Lösung wie möglich im Verhältnis zu Chloroform eingesetzt, so dass die Trennung der Ganglioside jedoch gewährleistet war. Die geringe gemessene Intensität der Adhäsion nach dem Overlay Assay kann gegebenenfalls auch auf die Detektionsmethode zurückgeführt werden. Die Detektion durch DAPI, einem Fluoreszenzfarbstoff mit dem die Bakterien zuvor markiert werden, ist weitaus weniger empfindlich als die Detektion mit radioaktiv markierten Bakterien (KARLSSON und STRÖMBERG, 1987). Bei radioaktiver Markierung kann die Bindung an Glykolipide bereits als negativ angesehen werden, wenn 1 µg nicht zur Bindung ausreicht (KARLSSON und STRÖMBERG, 1987).

Für die Gewinnung von Hautextrakten, mit denen auch die Glykolipide erfasst werden sollten, wurden zwei Methoden miteinander verglichen. Bei der direkten Extraktion wurden die Lipide mit Ethanol / Aceton von der Hautoberfläche des Oberarmes gespült. Für die Gewinnung der Lipide aus Corneozyten wurden diese vom Oberarm mit Citratpuffer abgeschabt und anschließend mit Lösungsmittel extrahiert (nach BÜNGER, 1996). Hierfür wurden Chloroform / Methanol und Ethanol / Aceton getestet. Mit beiden Lösungsmittelgemischen wurde die gleiche Ausbeute erzielt. Aufgrund der Giftigkeit für den Probanden durfte Chloroform / Methanol nicht als Extraktionsmittel bei der direkten Extraktion von der Hautoberfläche eingesetzt werden. Eine Extraktion mit Aceton / Ethanol war für die Probanden unbedenklich.

Ein Vergleich der Methoden zeigte, dass die Lipidausbeute mit der direkten Extraktion von der Hautoberfläche mehr als doppelt so hoch war als die Ausbeute mit der Extraktion von Lipiden aus abgeschabten Corneozyten. Die Ursache hierfür könnte in der Zusammensetzung der erfassten Lipide liegen.

Prinzipiell können in den Hautextrakten z.B. epidermale Lipide und Sebumlipide enthalten sein. Die Corneozyten enthalten in ihrer Zellmembran Lipide (v.a. Phospholipide). Desweiteren werden im Stratum granulosum die lipidhaltigen Odland-Körperchen synthetisiert. Diese verschmelzen beim Übergang zum Stratum corneum mit der Zellmembran und ergießen ihren Inhalt in den Interzellularraum. Hier schichten sich die Lipide zu breiten, interzellulären Lamellen um (FRITSCH, 1990). Das Talgdrüsensekret (Sebum) ist eine komplexe Mischung von Lipiden, welches einen flüssigen Film über der Hautoberfläche bildet. Nach der Sekretion mischt es sich mit den interzellulären Lipiden und bildet den Hautoberflächen-Lipidfilm (SHEU *et al.*, 1999).

Es stellt sich die Frage, welchen Ursprung die Lipide hatten, die mit den beiden Extraktionsmethoden erfasst wurden. Bei der Extraktion der isolierten Corneozyten wurde wahrscheinlich der größte Lipidanteil aus der Zellmembran der Corneozyten gewonnen, da das Extraktionsmittel die Corneozyten von allen Seiten benetzte. Nicht bekannt war, wieviele interzelluläre Lipide bzw. Sebumlipide noch an den Corneozyten hafteten und bei der Extraktion miterfaßt wurden. Anzunehmen ist jedoch, dass der Anteil an Sebumlipiden gering war, da sich auf dem Arm relativ wenig Talgdrüsen befinden. Im Vergleich liegt die Anzahl der Talgdrüsen in der Haut des Armes bei 10 ± 9 , in der Haut der Brust bei 24 ± 13 , des Rückens bei 38 ± 25 und des Gesichts bei 560 ± 42 (SCHÜRER, 1993). Obwohl sich Achsel und Oberarm bezüglich der Anzahl

der Talgdrüsen unterscheiden, wurde dennoch die Lipidextraktion am Oberarm durchgeführt. Das Areal in der Achselhöhle war zu klein, um ausreichend Lipidextrakt zu gewinnen. Desweiteren befinden sich unter der Achsel wesentlich mehr Bakterien als auf dem Arm, welche die folgenden Untersuchungen hätten beeinträchtigen können.

Bei der direkten Extraktion von der Hautoberfläche wurden vermutlich mehr interzelluläre Lipide und Sebumlipide erfasst als bei der Extraktion der isolierten Corneozyten, da der Hautoberflächen-Lipidfilm direkt mit dem Extraktionsmittel aufgenommen wurde. Außer durch die höhere Lipidausbeute qualifizierte sich diese Methode durch den Vorteil, dass das gleiche Lipidspektrum erfasst wurde, welches auch den Bakterien zur Adhäsion an die Hautoberfläche zur Verfügung steht.

Neben den Hautextrakten aus Corneozyten bzw. von der Hautoberfläche wurden auch Hautextrakte aus HaCaT-Zellen bzw. primären Keratinozyten gewonnen. Keratinozyten, die in den Hautschichten unter dem Stratum corneum zu finden sind, werden kein direktes Ziel der bakteriellen Adhäsion sein, es sei denn, es liegt eine Verletzung der Haut vor. Interessant war es jedoch zu verfolgen, ob Lipidstrukturen, an die Bakterien bei den Corneozyten adhäreren, schon in den Keratinozyten ausgebildet sind, bzw. ob sich während der terminalen Differenzierung das Muster ändert.

Für die Anfärbung der Bakterien wurde der DNA interkalierende Farbstoff DAPI ausgewählt. Voraussetzung für den Farbstoff war, dass er leicht in die Bakterien hinein diffundiert, aber nicht mehr heraus zu waschen war. Außerdem durfte der Farbstoff sich nicht an die Bakterienoberfläche anlagern, weil sonst die Gefahr bestand, für die Adhäsion wichtige Molekülstrukturen abzudecken und so die Adhäsion zu behindern oder gar zu blockieren. Es wurden 5×10^9 Bakterien/mL für eine $10 \times 10 \text{ cm}^2$ große HPTLC-Platte verwendet, in Anlehnung an KARLSSON und STRÖMBERG (1987), die 10^8 Bakterien/mL für eine $5 \times 5 \text{ cm}^2$ große Platte einsetzten.

Bakterien nutzen häufig Kohlenhydratstrukturen der Wirtszelloberfläche zur Kolonisierung oder Infektion. Dabei binden die Bakterien mit Oberflächenlektinen (Proteinrezeptoren) spezifisch an die Kohlenhydratstrukturen des eukaryontischen Wirtes (KARLSSON, 1998; KARLSSON und STRÖMBERG, 1987). Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* tragen diese Lektine oft auf Fimbrien (MUHLDOFFER und HACKER, 1994; WESTERLUND *et al.*, 1993; HACKER, 1992; SHARON, 1987, KLEMM, 1985). Bei

Gram-positiven Keimen wie Staphylokokken und Corynebakterien sind Lektine auf der Bakterienoberfläche exponiert (MERRITT und AN, 2000).

Die Mikroorganismen erkennen nicht nur terminale Kohlenhydratsequenzen, sondern auch nonterminale Sequenzen. Viele Bakterien können spezifisch an Lactosylceramide binden. Unter den Lactosylceramidbindern sind dabei sowohl Gram-negative, als auch Gram-positive Bakterien, welche die verschiedensten Gewebetypen kolonisieren. Das Lactose oder Gal- β -(1,4)-Glc-Motiv, das von vielen Bakterien erkannt wird (KARLSSON, 1989), ist z.B. in Gangliosiden enthalten.

Durch Untersuchungen von DELEKAT (1999) und BÜNGER (1996) wurde bereits eine Bindungsspezifität von *S. epidermidis* und *S. aureus* an Ganglioside nachgewiesen. Desweiteren konnte eine Affinität zu Cholesterol-3-sulfat und den Ceramiden gezeigt werden. MAST (2001) und BÜNGER (1996) und wiederum fanden eine Inhibition der Adhäsion von Staphylokokken und Corynebakterien in Gegenwart von Polysacchariden, die aus Glucose und Mannose aufgebaut waren.

Aus diesem Grund wurden zunächst die Ganglioside als Vertreter der Glykolipide bezüglich der Adhäsion von Corynebakterien untersucht.

Um zu untersuchen, ob Corynebakterien an Ganglioside adhäreren, wurden verschiedene Ganglioside mit HPTLC und Overlay-Assay getestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass *C. group G (86)* eine große Affinität zu den getesteten Gangliosiden hatte. Um die Bindungsaffinitäten von *C. group G (86)* zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen der Gangliosidstandards eingesetzt. Durch einen Vergleich der Strukturen der Ganglioside im Zusammenhang mit der Affinität zu *C. group G (86)* wurde das bevorzugte Bindungsepitop bestimmt. Als Standardsubstanzen wurden zwei Asialoganglioside (G_{M1} und G_{M2}), vier Disialoganglioside (G_{D1a} , G_{D1b} , G_{D2} und G_{D3}), drei Monosialoganglioside (G_{M1} , G_{M2} und G_{M3}) sowie die drei Glykolipide Globosid, Glucocerebrosid und Lactocerebrosid verwendet. Als Gemeinsamkeit haben alle das Gal- β (1,4)-Glc-Motiv, ein Bindungsepitop welches von vielen Bakterien erkannt wird (KARLSSON, 1989).

Es wurde bei allen getesteten Standards bereits bei einer Konzentration von 0,25 μ g eine Bindung von *C. group G (86)* nachgewiesen (in Abb. 21 aufgrund der Qualität des Fotos evt. nicht zu erkennen), dennoch konnten Unterschiede in der Fluoreszenzintensität und damit der Bindungsaffinität über die One D-scan Auswertesoftware

ware ermittelt werden. Eine sehr gute Bindung zeigte C. group G (86) an Disialogangliosid G_{D1b} und die beiden Monosialoganglioside G_{M1} und G_{M2} . Eine gute Bindung wurde an Disialoganglioside G_{D1a} und G_{D2} nachgewiesen. An die Asialoganglioside G_{M1} und G_{M2} , Disialoganglioside G_{D3} und Monosialoganglioside G_{M3} war die Bindung von C. group G (86) weniger gut und an die drei Glykolipide Globosid, Glucocerebroside und Lactocerebroside im Verhältnis gering.

Die Strukturen von Disialogangliosid G_{D1b} und Monosialoganglioside G_{M1} sowie G_{M2} , an die C. group G (86) mit hoher Affinität adhärte, wurden miteinander verglichen. Aus den Übereinstimmungen wurde die Kohlenhydrat-Konsensussequenz abgeleitet, d.h. die von C. group G (86) genutzte Rezeptorstruktur. Diese entspricht der Struktur des Monosialogangliosids G_{M2} .

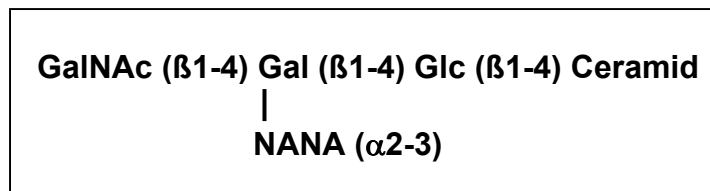


Abb. 63: Konsensussequenz der Glykolipide für C. group G (86).

Die geringere Bindungsaffinität an die Asialoganglioside G_{M1} und G_{M2} weist darauf hin, dass die N-Acetylneuraminsäure (NANA) eine entscheidende Rolle in der Darstellung des Bindungsepitopes zu spielen scheint. Beide Asialoganglioside besitzen keine NANA und zeigen eine deutlich geringere Bindungsaffinität zu C. group G (86), als die getesteten Ganglioside mit NANA. Daraus folgt, dass saure Glykolipide eine höhere Affinität zu C. group G (86) aufweisen, was auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen sein könnte.

Das beschriebene Epitop enthält die Gal- α -(1,4)-Glc-Minimalsequenz, die von vielen Bakterien erkannt wird (KARLSSON, 1989 und 1986). Da Bakterien fähig sind, an Kohlenhydratsequenzen zu binden, die nonterminal in der Kohlenhydratkette angeordnet sind, spielen die benachbarten Sequenzen eine große Rolle. Sie können die Affinität eines Bindungsmotives verstärken oder verringern.

Die höchste Affinität zeigte C. group G (86) zu Disialogangliosid G_{D1b} . An seiner Galactose-Einheit sitzen zwei NANAs und am GalNAc-Ende ist es mit Galactose (β 1-3) verknüpft. Die Bindungsaffinität zu Disialogangliosid G_{D2} war trotz des zweiten NANA an der Galactose-Einheit schwächer, hier fehlte die Galactose (β 1-3)-Verknüpfung am GalNAc-Ende im Vergleich zu Disialogangliosid G_{D1b} . Disialogangliosid G_{D1a} mit

einer (β 1-3)-Verknüpfung von Gal-NANA an das GalNAc- Ende zeigte ebenfalls eine Schwächung der Affinität.

Durch DELEKAT (1999) wurde bereits gezeigt, dass *S. epidermidis* die gleiche Kohlenhydrat-Konsensussequenz bevorzugt zur Anlagerung nutzt wie *C. group G* (86). Es war wenig überraschend, dass *C. group G* (86) und *S. epidermidis* an das gleiche Epitop adhären, da auch in der Literatur für verschiedene Bakterienarten oft die gleichen Rezeptorsequenzen nachgewiesen wurden. An Lactosylceramide binden z. B. verschiedene Bakterienstämme der Gattungen *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium* oder *Shigella* (KARLSSON, 1989).

Die Untersuchung von Hautextrakten hinsichtlich des Vorkommens von Gangliosiden und deren Bindungsaffinität zu *C. group G* (86) zeigte bei Extrakten aus Corneozyten und Keratinozyten sehr unterschiedliche Bindungsmuster. Der Lipidextrakt der Corneozyten zeigte auf der gesamten Laufstrecke der Gangliosidstandards keine einzige Bande.

Bei dem Lipidextrakt der Keratinozyten waren dagegen eine ganze Reihe von Banden auf Höhe der Gangliosidstandards nach der Detektion mit Kupfersulfat zu sehen. Im Overlay Assay adhärierte *C. group G* (86) jedoch nur an eine Bande in Höhe der Asialogangliosid G_{M1} - und Monosialogangliosid G_{M3} -Standards. Desweiteren wurde oberhalb von Monosialogangliosid G_{M3} eine Substanz mit einer Bartbildung (leading) detektiert, d. h. eine geringe Menge der Substanz war vorausgelaufen. In diesem Bereich befand sich die Bande von Asialogangliosid G_{M2} . Bei der Bande in Höhe der Asialogangliosid G_{M1} - und Monosialogangliosid G_{M3} -Standards konnte durch eine Dotierung des Hautextraktes aus Keratinozyten ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eines der beiden Ganglioside handelt. Eine Dotierung mit Asialogangliosid G_{M2} konnte aufgrund der Bartbildung des Hautextraktes auf gleicher Höhe nicht durchgeführt werden.

Durch eine Anfärbung der Hautextrakte mit Anisaldehyd, bei der Glykolipide grün gefärbt werden, konnten keine Ganglioside nachgewiesen werden. Die Schlussfolgerung daraus war, dass entweder keine Ganglioside in den Extrakten vorhanden waren oder deren Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze der Methode lag.

Für letzteres sprechen Untersuchungen bezüglich des Vorkommens von Gangliosiden in Corneozyten und Keratinozyten. SKRIVANEK *et al.* (1985) fanden bei Untersuchungen geringe Mengen Ganglioside in Keratinozyten. Mit G_{M1} -Antiserum konnte

mittels Immunofluoreszenz an Human-Hautschnitten nachgewiesen werden, dass Keratinozytenmembranen des Stratum spinosum und Stratum granulosum G_{M1} enthalten. Der gesamte Gehalt an Gangliosiden liegt aber nur bei 0,1 μg Sialinsäure / mg Trockengewicht des Gewebes für die humane Epidermis des Beines und des Bauches und bei 0,25 μg Sialinsäure / mg Trockengewicht des Gewebes für die humane Epidermis der Brust (SKRIVANEK *et al.*, 1993). In Humanhaut-Biopsien ermittelte SKRIVANEK *et al.* (1993) Ganglioside in der folgenden prozentualen Verteilung für humane Epidermis der Brust: G_{M3} (37 %), G_{M1} (8 %), G_{D3} (33 %), G_{D2} (13 %) und G_{T1b} (9 %).

Da der Keratinozyt im Rahmen der Differenzierung einer massiven Veränderung in der Lipidzusammensetzung unterliegt (SCHÜRER, 1993), unterscheidet sich die Lipidzusammensetzung in Corneozyten und Keratinozyten stark. Die membranständigen Phospholipide z. B. machen etwa 25 % der Gesamtlipide des Stratum basale aus, jedoch nur ca. 1 % der Gesamtlipide des Stratum corneums (SCHÜRER *et al.*, 1995). Auch die Glykolipide werden im Laufe der Differenzierung gespalten und sind im Stratum corneum nur noch in Spuren enthalten (WERTZ, 1992). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Gehalt an Gangliosiden in Keratinozyten und Corneozyten tatsächlich unterhalb der Nachweisgrenze der Methode lag.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Ganglioside mit dem Gal- β (1,4)-Glc-Motiv ein mögliches Bindungsepitop für Bakterien besitzen, wie z. B. auch Untersuchungen mit *S. epidermidis* (DELEKAT, 1999; BÜNGER, 1996), *S. aureus* (SCHWAB *et al.*, 1997), *Propionibacterium freudenreichii* und *Propionibacterium granulosum* (STRÖMBERG *et al.*, 1988), *Pseudomonas aeruginosa* (PANJWANI *et al.*, 1990), *Escherichia coli* (ISOBE *et al.*, 1996) sowie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ABUL-MILH *et al.*, 1999) zeigten. In Overlay-Assays mit Standardsubstanzen konnte eindeutig eine Bindungsaffinität der untersuchten Corynebakterien zu Gangliosiden nachgewiesen werden.

Eine Bindung von Corynebakterien an Ganglioside in Hautextrakten konnte nicht nachgewiesen werden, da möglicherweise die Nachweisgrenze der Methode zu unempfindlich war. Daraus lässt sich folgern, dass Ganglioside auch nicht in ausreichender Menge in der Haut enthalten sind, um als Rezeptorstrukturen für Bakterien in Frage zu kommen.

4.2. Bakterielle Adhäsionseigenschaften an Lipide

Nach den vorangegangenen Untersuchungen der Ganglioside erschienen nichtglycosylierte epidermale Lipide und Sebumlipide, aufgrund ihres hohen Anteils in der Haut, als mögliche Rezeptorstrukturen wahrscheinlicher. Sie machen 10-14 % des Trockengewichtes der gesamten Epidermis und 8-10 % des Trockengewichtes des Stratum corneums aus (SCHÜRER, 1993).

ISOBE *et al.* (1996) stellten für Ganglioside fest, dass nicht nur der Zuckerrest, sondern auch der Ceramid Anteil die Bindung von *Escherichia coli* beeinflusste. In Versuchen mit HPTLC und anschließendem Overlay Assay zeigte TUE *et al.* (1998) bereits, dass *C. bovis* an Lipide adhärert. Einen Beweis für die Adhäsion von *Candida albicans* ans Stratum corneum über spezifische Lipide erbrachten LAW *et al.* (1997).

Durch die mikroskopische Untersuchung der Anlagerung von Corynebakterien an Stratum corneum sollte zunächst ein optischer Eindruck gewonnen werden. Hierfür wurde Stratum corneum aus einer Biopsie gewonnen und auf einem Objektträger direkt mit den Bakterien überschichtet.

Die hexagonalen Corneozyten waren unter dem Mikroskop gut erkennbar und die Corynebakterien durch die Anfärbung mit Kristallviolett deutlich von den nicht gefärbten Corneozyten zu unterscheiden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bakterien an das Stratum corneum adhärten. Die Corynebakterien lagerten sich sowohl direkt an die Corneozytenoberfläche als auch im Bereich des Sebum-haltigen Interzellularraumes an. Wo die Corynebakterien bevorzugt adhärten, konnte visuell nicht bestimmt werden.

Diese Untersuchung basiert auf einer Methode, die von LAW *et al.* (1997) durchgeführt wurde. Sie inkubierten Stratum corneum von Schweinen mit *Candida albicans* und konnten eine Bindung an das Stratum corneum lichtmikroskopisch nachweisen.

Zur genaueren Untersuchung der Adhäsion wurde wie bei den Gangliosiden mit HPTLC und Overlay Assay gearbeitet. Bei der Auftrennung der Hautextrakte mit einem polaren Fließmittelgemisch kam es zu einer Substanzansammlung in der Fließmittelfront nach Detektion mit Kupfersulfat. Hierbei musste es sich um weniger polare bis unpolare Hautlipide handeln. Um auch Hautlipide aufzutrennen, wurden die HPTLC-Platten mit drei verschiedenen weniger polaren Fließmittelgemischen nach SCHÜRER *et al.* (1995) entwickelt. Eine Detektion mit CuSO_4 zeigte die ge-

wünschte Auftrennung der Lipide. Nach einem Overlay Assay mit Corynebakterien konnte nur eine Bindungsaffinität zu Cholesterol-3-sulfat nachgewiesen werden.

Auch für *S. epidermidis* konnte BÜNGER (1996) an Cholesterol-3-sulfat und Ceramide aus Hautextrakten eine Bindungsaffinität nachweisen. Er führte dies auf eine Bindung durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen zurück, da *S. epidermidis* nicht an Cholesterol adhärierte (DELEKAT, 1999; BÜNGER, 1996). Eine Bindung von *S. epidermidis* an andere Hautlipide konnte nicht nachgewiesen werden (DELEKAT, 1999; BÜNGER, 1996).

Untersuchungen von TUE *et al.* (1998) ergaben jedoch für Corynebakterien ein anderes Ergebnis. Sie zeigten eine Bindung von *C. bovis* an verschiedene Lipide. Die von TUE *et al.* (1998) verwendete Methode entsprach der Bestimmung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an Ganglioside. Die Lipidstandards wurden auf die Kieselgelplatte aufgetragen und nicht im Fließmittel entwickelt, sondern gleich mit Plexigum, BSA und radioaktiv markierten Bakterien behandelt. Dennoch mussten TUE *et al.* (1998) mit 50 µg eine sehr hohe Standardkonzentration auf die Kieselgelplatte auftragen um eine Bindung beobachten zu können. Aufgrund der hohen Konzentrationen kann hierbei nicht mehr von einer spezifischen Bindung ausgegangen werden. Nach KARLSSON und STRÖMBERG (1987) sind für die meisten spezifischen Interaktionsstudien mit radioaktiv markierten Bakterien Bindungen an Glykolipide, die keine Rezeptoren sind, komplett negativ bei einem Niveau ≥ 10 µg. Bei nicht radioaktiver Detektion werden Glykolipide als negativ angesehen, wenn 1 µg nicht zur Bindung ausreicht.

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass Corynebakterien durchaus an Hautlipide adhäreren können, möglicherweise aber die Bindung beim Overlay Assay nachteilig beeinflusst wurde.

Die Untersuchung von Gangliosiden mittels HPTLC und Overlay Assay beinhaltet die Überschichtung des Chromatogramms mit einer Kunststoffschicht. Gewöhnlich verwendet man hierfür Polyisobutylmethacrylat (Plexigum) in Aceton, Diethylether oder n-Hexan. Nach der Behandlung wird das Chromatogramm luftgetrocknet (ABUL-MILH *et al.*, 1999; CAMBRON und LESKAWA, 1990; KNIEP und MÜHLRADT, 1990; STRÖMBERG *et al.*, 1988; SAITO *et al.*, 1985). Plexigum verhindert das Ablösen des Kieselgels von der Glasplatte während der Inkubation und der Waschschrte und reduziert unспе-

fische Bindungsstellen des Kieselgels (Hintergrundsignale), wodurch die folgende Blockierung mit BSA optimiert wird. Desweiteren werden die Glykolipide im Plexigum analog zur Zellmembran ausgerichtet, d. h. mit den Zuckern von der Kieselgelplatte weg in Richtung der Bindungspartner (YIU und LINGWOOD, 1992; KARLSSON und STRÖMBERG, 1987).

Bei ihren Untersuchungen stellten KARLSSON und STRÖMBERG (1987) fest, dass zu wenig Plexigum zu erhöhten Hintergrundsignalen führte und zu viel Plexigum die Glykolipide überdeckte und die Adhäsion von Bindungspartnern blockierte. Selbst bei einer optimalen Beschichtung mit 0,5 % Plexigum zeigten Glykolipide mit einem und zwei Zuckern hin und wieder fälschlicherweise keine Bindung. KARLSSON und STRÖMBERG (1987) vermuteten, dass die hydrophile Seite des Moleküls (Ceramid) nicht immer schnell genug die Drehung und Plazierung des Moleküls in dem trocknenden Plexigum auslösen konnte.

Damit ist vorstellbar, dass bei der Untersuchung der Lipide mittels Overlay-Assay diese durch das Plexigum nicht ausgerichtet, sondern wie in eine Membran eingeschlossen wurden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Plexigum untersucht. Es wurden Kieselgelplatten mit Lipidstandards unterschiedlich lange und mit verschiedenen Konzentrationen von Plexigum behandelt. Es zeigte sich, dass nur auf den Kontrollplatten ohne Plexigum-Beschichtung eine Bindung von Corynebakterien an alle Lipidstandards zu beobachten war. Mit Plexigum-Behandlung adhärten die Corynebakterien nur an Cholesterol-3-sulfat. Damit wurde bestätigt, dass durch die Plexigum-Schicht die Adhäsion der Bakterien an die meisten Lipide verhindert wurde. Die Untersuchungen der Lipide wurden deshalb ohne Plexigum-Beschichtung durchgeführt.

Das Phänomen, dass Plexigum auch für Ganglioside nicht nur von Vorteil für die Ausrichtung ist, sondern sogar Bindungen verhindern kann, zeigten YIU und LINGWOOD (1992) durch unterschiedliche Konzentrationen und Einwirkzeiten. Sie wiesen darauf hin, dass Plexigum die Konformation von Glykolipid-Oligosacchariden verändern kann. Dennoch ist für Gangliosid-Untersuchungen der Einsatz von Plexigum zu empfehlen, der Einfluss von Plexigum auf die Untersuchung von Lipiden wurde aber bislang unterschätzt.

Plexigum wurde auch eingesetzt, um die Kieselgelschicht bei den Überschichtungen und Waschschrinen vor dem Ablösen zu schützen. Ohne Plexigum-Beschichtung waren die bislang verwendeten Kieselgelplatten von Merck nicht mehr stabil genug.

Nach den Überschichtungen mit BSA und Bakterien zerfiel die Kieselgelschicht, eine Auswertung war nicht mehr möglich.

Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen mit Nano-Durasil-20 Kieselgelplatten von Macherey und Nagel durchgeführt. Sie besaßen einen speziellen Binder, mit dem das Kieselgel fest genug auf der Glasplatte fixiert wurde. Probleme gab es bei diesen Platten zunächst mit dem Fließmittelgemisch, durch das der gesamte Kontaktbereich fluoreszierte. Durch den Austausch von n-Hexan gegen Isooctan und Wasser gegen Eisessig konnte dieses Problem behoben werden.

Die Bindungsaffinität von Corynebakterien an Lipide wurde für einen lipophilen Typusstamm (*C. jeikeium* (DSM 7171)), drei lipophile Achselisolate (*C. group G* (45), *C. group G* (48), *C. jeikeium* (96)) und einen nicht-lipophilen Typusstamm (*C. minutissimum* (DSM 20651)) untersucht.

Die Adhäsion von Corynebakterien an Hautlipide wurde mit HPTLC und Overlay-Assay untersucht. Die Standards wurden nicht im Fließmittel entwickelt, sondern in Konzentrationsreihen über die ganze HPTLC-Platte verteilt aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mittels der ONE-Dscan™ Auswertesoftware. Es wurden jeweils die Fluoreszenzintensitäten der Adhäsionsversuche an 2 µg Standard miteinander verglichen, da erst bei dieser Konzentration eine Bindung an alle untersuchten Hautlipide zu beobachten war. Dabei wurde die Adhäsion immer bezogen auf die Masse der Standards untersucht und nicht bezogen auf deren Molarität. Der Grund hierfür war das nicht zu bestimmende Molgewicht der Ceramide. Das gleiche Problem bestand bereits bei den Gangliosiden, so dass auch hier die Auswertung der Adhäsion bezogen auf die aufgetragene Masse der Gangliosidstandards erfolgte, wie es auch in Literaturstellen üblich ist (ISOBE *et al.*, 1996; ÅNGSTRÖM *et al.*, 1994; Panjwani *et al.*, 1990; Strömberg *et al.*, 1988; KARLSSON und STRÖMBERG, 1987). Auch TUE *et al.* (1998) haben bei ihren Untersuchungen verschiedener Lipidstandards die Anzahl der adhärenierten Bakterien pro 50 µL Lipid verglichen.

Da sich die in dieser Arbeit getesteten Lipide teilweise in ihren Molgewichten deutlich unterschieden, schien es sinnvoll, die Molgewichte zu diskutieren. Obwohl die Funktion von Adhäsion und Masse nicht linear und somit eine Umrechnung in Molarität nicht korrekt war, wurde eine rechnerische Annäherung an die Molarität vorgenommen. Es ergaben sich hierbei keine widersprüchlichen Ergebnisse zur Masse, weshalb die Molarität im Folgenden vernachlässigt werden kann.

Der Vergleich der verschiedenen Corynebakterien hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens zeigte, dass sie im wesentlichen an die gleichen Lipidstrukturen adhäreren, jedoch mit unterschiedlicher Bindungsintensität. Die verschiedenen Bakterienarten wiesen Unterschiede in der Bindungsaffinität zu den verschiedenen Hautlipiden auf. Dennoch war die Abstufung der Bindungsstärke, mit der die Bakterien an die Standards banden, nahezu gleich. Die Ergebnisse zeigten, dass Cholesterol-3-sulfat die beste Bindungsaffinität für Corynebakterien aufwies gefolgt von Cholesteryl-oleat und Pentacosan. Eine gute Bindungsaffinität wurde zu den Ceramiden, eine weniger gute Bindung an Triolein, Squalen und Cholesterol festgestellt. An Palmitinsäure zeigten alle Corynebakterien eine schlechte Bindungsaffinität. Damit wurde ein anderes Ergebnis erhalten als von TUE *et al.* (1998). Sie fanden heraus, dass *C. bovis* nahezu die gleiche Bindungsaffinität zu Cholesterol, Cholesteryl-oleat und Squalen aufwies. Dies ist damit zu erklären, dass TUE *et al.* (1998) bei einem Einsatz von 50 µg Lipidstandard aller Wahrscheinlichkeit nach keine spezifische Bindungen erhalten hatten. Möglicherweise nutzt *C. bovis* auch ein anderes Habitat als *C. jeikeium*, *C. group G* und *C. minutissimum*.

Von allen untersuchten Bakterienstämmen zeigte *C. group G* (45) die höchste Affinität und *C. jeikeium* (DSM 7171) die niedrigste Affinität zu den Hautlipiden. *C. group G* (48), *C. jeikeium* (96) und *C. minutissimum* (DSM 20651) adhärerten in dieser Reihenfolge mit abnehmender Bindungsaffinität an Cholesterol-3-sulfat, Cholesteryl-oleat, Pentacosan, Ceramide (III+IV) und Triolein. Bei Squalen, Cholesterol und Palmitinsäure war die Reihenfolge zwischen *C. group G* (48), *C. jeikeium* (96) und *C. minutissimum* (DSM 20651) unterschiedlich, dadurch wurde das Bindungsmuster aber nicht verändert.

Ein interessantes Ergebnis brachte der Vergleich der Abstufung der Bindungsstärke von *C. group G* (45) mit dem prozentualen Vorkommen der Lipide in der Haut (LAMPE *et al.*, 1983). Hierbei zeigte sich, dass die Bakterien an die Hautlipide stark adhärerten, die in der Haut nur in geringerer Menge vertreten sind (Cholesterol-3-sulfat, Cholesteryl-oleat, Pentacosan). Die in größeren Mengen in der Haut vorkommenden Lipide (Ceramide, Triolein, Cholesterol, Palmitinsäure) waren dagegen schlechtere Bindungspartner. Squalen nimmt eine Mittelstellung ein, es gehört zu den schlechteren Bindungspartnern und ist nur in geringer Menge in der Haut vorhanden. Dies könnte bedeuten, dass die Corynebakterien nicht nur in der

Lage sind, verschiedene Rezeptoren zu nutzen, sondern sich an das Vorkommen der Lipide in der Haut angepaßt haben. Der Vorteil der optimalen Anpassung an das Habitat ist, dass Schwankungen in der Lipidzusammensetzung keinen Einfluss auf die Besiedelung haben.

Bei dem Vergleich der Bindungsintensitäten im Zusammenhang mit der Struktur der Hautlipide fiel auf, dass die Corynebakterien an Cholesterol-3-sulfat und Cholesteryl-oleat stark gebunden haben, aber nur schwach an Cholesterol. Die gute Bindung der Corynebakterien an Cholesterol-3-sulfat ist vermutlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen, wie dies auch schon für *S. epidermidis* beschrieben wurde (DELEKAT, 1999). Um genauer zu untersuchen, welchen Einfluss der Sulfat- und Oleat-Rest auf die Adhäsion ausüben, wurden verschiedene Verbindungen, die eine Strukturverwandtschaft mit Cholesterol-3-sulfat und Cholesteryl-oleat haben, hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität getestet. Aufgrund der Übersichtlichkeit werden im Folgenden nur die Ergebnisse der Bindungsaffinität von *C. group G (45)* diskutiert.

Als erstes wurden Cholesterol, Stearinsäure und Cholesteryl-stearat miteinander verglichen. Die Bindungsaffinität von *C. group G (45)* an Cholesteryl-stearat war signifikant höher ($p < 0,1$) als an Stearinsäure und es bestand sogar ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zu Cholesterol, an das *C. group G (45)* nur schwach adhärierte. An Stearinsäure war die Affinität signifikant höher als an Cholesterol. Damit wurde zum einen gezeigt, dass Cholesterol und Stearinsäure einzeln eine schwächere Bindungsaffinität zu Corynebakterien haben als in Kombination im Cholesteryl-stearat. Zum anderen zeigte die freie Fettsäure Stearinsäure mit 18 C-Atomen eine bessere Affinität als Cholesterol und somit auch als Palmitinsäure mit 16 C-Atomen. Palmitinsäure wurde im Rahmen der Hautlipide untersucht und zeigte die schlechteste Affinität zu Corynebakterien, also auch schlechter als Cholesterol. Das bedeutet, dass eine längere Fettsäure einen positiven Einfluss auf die Bindungsstärke hat und dass ein wesentlicher Unterschied zwischen einer Kettenlänge mit 16 und 18 C-Atomen liegt. TUE *et al.* (1998) fanden eine höhere Bindungsaffinität an Cholesterol als an Stearinsäure, was aber wieder auf die unspezifische Bindung bei ihren Untersuchungen zurückgeführt werden kann. MAST (2001) untersuchte die relative Adhäsionsrate von Corynebakterien an Corneozyten mit einem durchflußzytometrischen Adhäsionsassay. Sie zeigte, dass eine Zugabe verschiedener freier Fettsäuren die relative Adhäsionsrate erhöhte, d. h. durch die freien Fettsäuren mehr

Bakterien an die Corneozyten adhärirten. Dabei war die Adhäsionsrate nach Zugabe von Behensäure höher als nach Zugabe von Palmitinsäure.

Um den Einfluss der Kettenlänge im Cholesteryl-ester zu verdeutlichen, wurden Cholesterol und Cholesteryl-ester mit unterschiedlich langen Fettsäureresten untersucht. Dabei handelte es sich um gesättigte Fettsäuren. Es zeigte sich zwischen Cholesterol, Cholesteryl-format und Cholesteryl-acetat kein signifikanter Unterschied. Dieser wurde erst zwischen Cholesteryl-acetat und Cholesteryl-n-decylat festgestellt, wobei die Bindungsaffinität von *C. group G (45)* zu Cholesteryl-n-decylat höher war als an Cholesteryl-acetat. Der Unterschied zwischen Cholesteryl-acetat (niedrige Bindungsaffinität) und Cholesteryl-stearat (hohe Bindungsaffinität) konnte als hoch signifikant eingestuft werden. Zwischen Cholesteryl-stearat und Cholesteryl-behenat war ein Unterschied statistisch nicht mehr wahrscheinlich. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Bindungsstärke von *C. group G (45)* an Cholesteryl-estern mit der Länge der Seitenkette zunimmt und ab einer Seitenkette mit 18 C-Atomen die maximale Adhäsion nahezu erreicht ist.

Zwischen den freien Fettsäuren Stearinsäure (niedrigere Bindungsaffinität) und Behensäure war ein Unterschied noch wahrscheinlich, was bedeutet, dass die maximale Adhäsion von Corynebakterien vermutlich erst bei Behensäure erreicht war. Ein Vergleich der gesättigten Stearinsäure mit der einfach ungesättigten Ölsäure zeigte einen hoch signifikanten Unterschied, wobei *C. group G (45)* stärker an Stearinsäure adhärirte. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Ölsäure für viele lipophile Bakterien einen Wachstumsfaktor darstellt, Stearinsäure aber keinen Einfluss auf das Wachstum hat (SMITH, 1970). Möglicherweise nutzen die Corynebakterien Ölsäure aus diesem Grund nicht zur Adhäsion wie Stearinsäure.

Desweiteren sollte untersucht werden, welchen Einfluss Doppelbindungen in der Seitenkette von Cholesteryl-estern auf die Adhäsion ausüben. Hierfür wurden Cholesteryl-stearat und Cholesteryl-oleat mit weiteren Cholesteryl-estern verglichen, die ebenfalls Seitenketten von 18 C-Atomen besaßen, aber jeweils mit einer, zwei oder drei Doppelbindungen in cis- oder trans-Stellung. Es wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der Adhäsion von *C. group G (45)* an diese Verbindungen festgestellt.

Um den Einfluss des Sulfat-Restes auf die Bindungsaffinität von Corynebakterien zu untersuchen, wurden verschiedene Sulfatverbindungen getestet. Ein Vergleich von Cholesterol-3-sulfat mit Cholesterol zeigte eine höhere Bindungsaffinität von *C. group G (45)* an Cholesterol-3-sulfat mit einem signifikanten Unterschied. Da *C. group G (45)* an Magnesiumsulfat nicht gebunden hat, zeigt sich wie bei Cholesteryl-oleat, dass Cholesterol und Sulfat-Rest einzeln eine schwache bis keine Bindungsaffinität zu Corynebakterien haben und erst die Verbindung der beiden eine hohe Bindungsaffinität zu *C. group G (45)* aufweist. Ein Vergleich von Cholesterol-3-sulfat mit Galactocerebrosidsulfat zeigte aufgrund der hohen Standardabweichungen keinen signifikanten Unterschied. Zwischen Galactocerebrosidsulfat und Galactocerebrosid I + II gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Es wurde nur ein wahrscheinlicher Unterschied zwischen Galactocerebrosidsulfat und Galactocerebrosid II festgestellt.

An Fettsäure-sulfat-ester mit zwölf und vierzehn C-Atomen zeigte *C. group G (45)* keine Bindungsaffinität. Erst bei Octadecylsulfat, einem Fettsäure-sulfat-ester mit achtzehn C-Atomen, wurde eine gute Bindungsaffinität von *C. group G (45)* beobachtet. Auch hier zeigt sich, dass die Kettenlänge für die Adhäsion von Corynebakterien entscheidend ist. Im Vergleich mit Cholesterol-3-sulfat war die Bindungseffizienz an Octadecylsulfat höher, allerdings nicht signifikant.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die guten Bindungseigenschaften des Cholesterol-3-sulfat durch polare Eigenschaften hervorgerufen werden. Hierfür wurde die Bindungsaffinität von *C. group G (45)* zu Cholesteryl-3-sulfat, Cholesteryl-chlorid und Cholesteryl-oleat miteinander verglichen, da die drei Verbindungen Reste mit unterschiedlicher Polarität besitzen. Die Berechnung der Polarität über den $\log P(ow)$ -Wert ergab folgende Einstufung. Cholesterol-3-sulfat hat den niedrigsten $\log P(ow)$ -Wert (6,04) und war damit in dieser Gruppierung die polarste Substanz, gefolgt von Cholesteryl-chlorid (11,48) und Cholesteryl-oleat (18,69), der unpolarsten Substanz. Ein Vergleich bezüglich der Adhäsion zeigte, dass Cholesterol-3-sulfat die stärkste Bindungsaffinität zu *C. group G (45)* aufwies. Cholesteryl-oleat war aus dieser Gruppe die Substanz mit der zweithöchsten Adhäsionseffizienz, Cholesteryl-chlorid zeigte die schwächste Bindungsaffinität. Damit waren Cholesteryl-oleat und Cholesteryl-chlorid bezüglich der Adhäsion im Vergleich zur Polarität vertauscht. Die Polarität scheint somit nicht ausschlaggebend für die Adhäsionseffizienz zu sein.

Bei einem abschließend durchgeführten Probandentest wurden Hautextrakte von männlichen und weiblichen Probanden unterschiedlichen Alters hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht. Die Lipidausbeute bei den Probanden war sehr unterschiedlich, unabhängig vom Alter oder Geschlecht. Ein Zusammenhang zwischen Alter und Trockenheit der Haut, bezogen auf die Ausbeute, war nicht vorhanden.

Die Lipidextrakte wurden mittels HPTLC-Overlay Assay untersucht wobei zum einen Lipide nach der HPTLC-Auftrennung mit Kupfersulfat-Lösung detektiert wurden, zum anderen Lipide nach dem Overlay Assay durch die adhärenierten fluoreszenzmarkierten Bakterien mit UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Visuell wurde bei allen Probanden die gleiche Verteilung der Hautlipide gefunden, d.h., in allen Probandenextrakten fanden sich die zuvor untersuchten Hautlipide. Aufgrund der zu dicht liegenden Substanzbanden und der Überlagerung der Intensitätspeaks war eine quantitative Auswertung mit dem CAMAG TLC III Scanner nicht möglich.

SAINT LÉGER *et al.* (1988) fanden bei ihren Untersuchungen eine altersabhängige Änderung der Lipidzusammensetzung im Stratum corneum, so z.B. eine Abnahme von Cholesteryl-estern und Triglyceriden. Die visuelle Auswertung dieser Chromatogramme war nicht geeignet, Änderungen in der Lipidzusammensetzung zu bestimmen.

Der Probandentest lässt darauf schließen, dass die Bindungsmuster der verschiedenen Probanden sehr ähnlich sind. Die geringen Unterschiede hinsichtlich des Adhäsionsverhaltens sind vor allem von Bedeutung für die Anwendung von Anti-Adhäsiva, z. B. als neuartige Deodorantien. Diese könnten durch die Blockierung verschiedener Bindungsepitope die Adhäsion mehrerer Bakterienarten gleichzeitig inhibieren und würden dabei nicht auf eine Gruppe von Anwendern beschränkt sein (z. B. Alter, Geschlecht). Wenn Unterschiede aufgetreten wären, wäre es fraglich, ob der Einsatz eines oder weniger Wirkstoffe ausreichen würde, die Adhäsion zu inhibieren bzw. aufzuheben. Ein Ziel für die Entwicklung neuer Anti-Adhäsiva sollte auf jeden Fall sein, mit einem geringen Aufwand an Wirkstoffen eine breite Anwendung zu erzielen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Cholesteryl-ester bzw. Cholesterol-3-sulfat bessere Bindungspartner waren als ihre Einzelverbindungen. Die Bindungsaffinität von Cholesteryl-estern stieg mit der Länge der Seitenkette (Maximum bei 18 C-Atomen nahezu erreicht), wobei Doppelbindungen keinen Einfluss auf die Adhäsion

ausübten. Bei den freien Fettsäuren wirkte sich eine Doppelbindung dagegen negativ auf die Bindungsaffinität aus. Desweiteren nahm die Bindungsaffinität bei freien Fettsäuren mit Kettenlängen über 18 C-Atomen noch weiter zu. Eine Zunahme der Bindungsaffinität in Abhängigkeit von der Kettenlänge wurde auch für Fettsäure-sulfat-ester beobachtet.

Neben Cholesterol-3-sulfat und Cholesteryl-oleat zeigten die Corynebakterien auch eine sehr gute Bindungsaffinität zu Pentacosan. Pentacosan kann als Alkankette nicht direkt mit den freien Fettsäuren in Zusammenhang gesehen werden, da der Einfluss der Säuregruppe nicht weiter untersucht wurde. Dennoch zeigt es, dass die Bakterien auch an eine völlig unpolare Verbindung adhären, d. h. die Hydrophobizität eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Adhäsion darstellt.

Die Polarität schien dagegen keinen Einfluss auf die Adhäsion zu haben, da sowohl das polare Cholesterol-3-sulfat als auch unpolare Cholesteryl-oleat gute Bindungspartner für Corynebakterien darstellten. Weniger gut war dagegen die Bindungsaffinität von Corynebakterien an das polarere Cholesteryl-chlorid.

Ein Probandentest zeigte, dass die Bindungsmuster der Corynebakterien an die Hautlipide der Probanden sich sehr ähnelten. Dies bedeutet für die Entwicklung von Anti-Adhäsiva, dass keine Einschränkungen durch z.B. Alter und Geschlecht der Anwender bezüglich des Einsatzes als neuartiges Deodorant bestehen würde.

4.3. Einsatz des optischen Biosensor IAsys plus zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion

Der Einsatz optischer Biosensoren wurde bereits für die Untersuchungen von molekularen Interaktionen etabliert (PURVIS *et al.*, 1997/a; PURVIS *et al.*, 1997/b). Der große Vorteil dieser Methode ist die Messung der Interaktion zwischen unmarkierten Bindungspartnern in Echtzeit. Das bedeutet, dass Bakterien als Bindungspartner nicht mehr wie beim Overlay-Assay mit DAPI gefärbt werden müssen. Durch den Einsatz von MeOH beim Färben werden die Bakterien abgetötet und es kann zu Veränderungen der Zellwand kommen. Für Untersuchungen im IAsys plus können die Bakterien somit lebend eingesetzt werden. Desweiteren ermöglichen die Messungen mit dem optischen Biosensor IAsys plus einen quantitativen Zugang zur Bindungskinetik.

Aufgrund der verschiedenen Oberflächen der Küvetten des optischen Biosensors IAsys plus konnte bereits eine große Auswahl von Bindungspartnern untersucht werden, z.B. Antikörper-Antigen, Protein-DNA, Enzym-Inhibitor und viele andere (IVANOV *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*; 2001; WEBSTER *et al.*, 2001; ATHANASSOPOULOU *et al.*, 1999). Für verschiedene experimentelle Situationen steht eine Auswahl von sechs unterschiedlichen Oberflächen zur Verfügung: Aminosilan, Biotin, Carboxylat, Hydrophob, Nicht-derivatisiert, Carboxymethyl Dextran / Carboxymethyl Dextran Selekt. Jede Oberfläche bietet eine andere Möglichkeit der Liganden-Immobilisation.

Für die Untersuchung der Adhäsion von Corynebakterien an Hautlipide mit dem IAsys plus sollten die Lipide an die Küvetten-Oberfläche gebunden und anschließend mit Bakterien überschichtet werden. Hierbei stellte sich zunächst die Frage, ob auch ganze Corneozyten an eine Küvetten-Oberfläche gecoatet werden können, um den Bakterien die Lipide wie auf der Hautoberfläche anzubieten, d. h. gebunden in den Corneozyten-Membranen. Dieses ist jedoch aufgrund der Größe der Zellen nicht möglich. Sie würden aus dem nur etwa 200 nm großen evaneszenten Feld, in dem die Messung stattfindet, herausragen, d. h. Bindungen an die Zellen außerhalb des Feldes würden nicht mehr gemessen werden. Somit sollten die reinen Lipidstandards an die Küvetten-Oberfläche gecoatet werden. Um Lipide zu binden, schien die hydrophobe Küvette am geeignetsten. Ihre Oberfläche ist mit Alkan-Ketten beschichtet, an die über hydrophobe Wechselwirkungen unpolare Substanzen wie die Hautlipide binden können und Lipid-Monolayer ausbilden.

Welche Bedeutung Lipid-Monolayer für Zell-Membran Studien haben, zeigten ATHANASSOPOULOU *et al.* (1999). Sie untersuchten die Interaktionen von Cholera Toxin B subunit und Monosialogangliosid G_{M1} , wobei sie Monosialogangliosid G_{M1} zusammen mit Dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC), einem Phospholipid, auf die hydrophobe Oberfläche schichteten. Der gemischte Lipid-Layer sollte eine natürliche Biomembran nachahmen, wobei Monosialogangliosid G_{M1} und DOPC in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen getestet wurden. Die Bindungsspezifität von Cholera Toxin B subunit an Monosialogangliosid G_{M1} zeigten HPTLC-Untersuchungen mit anschließendem Overlay Assay (CAMBRON und LESKAWA, 1990), die zur Quantifizierung von Monosialogangliosid G_{M1} dienten. Untersuchungen an gemischten Lipid-Monolayern würden sich beim Overlay-Assay als schwierig gestalten, da hier eine Ausrichtung des Layers auf der porösen Kieselgeloberfläche nicht gegeben ist.

Bei dem Versuch, Hautlipide auf die hydrophobe Küvetten-Oberfläche zu immobilisieren, zeigten sich erhebliche Schwierigkeiten. Diese ließen sich auf Produktionsfehler der Küvetten zurückführen. Da die hydrophobe Oberfläche sich in der Vergangenheit als instabil zeigte, sollte zur Unterteilung der Oberfläche ein Gitter auf den Küvettenboden geklebt werden. Das Aufkleben des Gitters konnte vom Hersteller nicht optimiert werden, so dass entweder zu viel Kleber die Oberfläche blockierte oder durch zu wenig Kleber unter dem Gitter Hohlräume entstanden. Diese Produktionsfehler konnte der Hersteller auch nach längerer Zeit nicht beheben, so dass die Hydrophobe Küvette während des letzten Teils der Durchführung dieser Arbeit aus dem Programm des Herstellers genommen wurde.

Eine andere Möglichkeit stellte die Immobilisierung an Biotin Küvetten dar. Für diesen Assay wird auf die Biotin-Oberfläche zunächst Streptavidin gebunden und anschließend der Ligand (z.B. Lipid) über einen Biotin-Rest an das Streptavidin gebunden. Dieses System des Sandwich ELISA wird bereits für viele biologische Assays eingesetzt und ist auch für das IAsys plus weitestgehend etabliert (LAITINEN *et al.*, 2001; ZIMMER *et al.*, 2000; SASSOON *et al.*, 2001). Nachteilig an dieser Methode ist, dass die Liganden einen Biotin-Rest tragen müssen. Da Hautlipide nicht mit Biotin-Resten zu erwerben waren, sollten noch einmal Zucker als Rezeptoren getestet werden, nachdem sich bei den Gangliosiden eine gute Bindungsaffinität zu den Corynebakterien gezeigt hatte. Getestet wurden biotinylierte Mannose, Biotin-Mannose-Phosphat, biotinyliertes Methyl- α -Mannosid und biotinyliertes Methyl- α -Mannosid mit einem C₁₅ Lipid-Rest. Untersuchungen von MAST (2001) haben gezeigt, dass Mannose ein guter Bindungspartner für Corynebakterien ist. Bakterien können spezifisch über Mannose an Glykoproteine binden (KARLSSON, 1989), dabei tragen die meisten Bakterien mehr als nur eine Bindungsspezifität.

In jüngsten Untersuchungen wurde Multivalenz als ein Prinzip der bakteriellen Adhäsion aufgrund von Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen bezeichnet (LINDHORST, 2000/a; LINDHORST, 2000/b). Wurden Moleküle mit mehreren Kohlenhydrateinheiten, sogenannte Glykokonjugate oder Glykocluster, als Bindungspartner angeboten, wurde ein Clustereffekt beobachtet, d. h. eine verstärkte inhibitorische Wirksamkeit im Vergleich zu Monosacchariden (LINDHORST, 2000/a). Ein biotinylierter Glykocluster mit 5 Mannose-Einheiten wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Prof. Lindhorst

synthetisiert und zur Verfügung gestellt, um den Einfluss dieses Clustereffektes auf die Bindungsaffinität von Corynebakterien mit dem IAsys plus zu untersuchen.

Der erste Schritt für Untersuchungen mit Biotin Küvetten ist die Anlagerung des Streptavidins. Anstelle von Streptavidin bzw. Avidin wurde für die Untersuchungen von Zuckern NeutrAvidin™ eingesetzt. Im Gegensatz zum Streptavidin und Avidin enthält es weder Kohlenhydrate noch RYD Erkennungssequenzen (= Arg-Tyr-Asp Tripeptid-Sequenz).

Die Bindung des NeutrAvidins™ an die Biotin-Oberfläche sollte bei einer vollständigen Anlagerung eine Winkelzunahme um etwa 1000 bis 1200 arcsec zur Folge haben (persönliche Mitteilung Dr. Peter Kiesau, Affinity Sensors Division; IAsys Protokoll 1.4 Biotin). Hier zeigten sich die ersten Schwierigkeiten, da fast alle erworbenen Biotin Küvetten nur eine viel geringere Anlagerung des NeutrAvidins™ von 400 bis 600 arcsec zuließen. Die gebundene Menge an NeutrAvidin™ war für die anschließende Messungen nicht mehr ausreichend. Dieses Problem ließ sich abermals auf einen Produktionsfehler zurückführen. Die Biotin-Oberfläche wurde seit kurzem durch einen aufgeklebten Rahmen reduziert. Beim Kleben dieses Rahmens tauchten die gleichen Schwierigkeiten auf wie zuvor beim Gitter der Hydrophoben Küvetten. Für die folgenden Untersuchungen musste auf Restbestände von Biotin Küvetten zurückgegriffen werden, die mit keinem Rahmen versehen waren. Eine Lieferung fehlerfreier Küvetten war dem Hersteller bis zum Abschluss des praktischen Teils dieser Arbeit nicht mehr möglich. Aus diesem Grund konnten von den folgenden Untersuchungen teilweise nur Einfachbestimmungen durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind somit nicht abgesichert und sollen nur als Ausblick verstanden werden.

Zunächst musste überprüft werden, ob Corynebakterien eine Bindungsaffinität an die NeutrAvidin™-Oberfläche aufweisen. Bei der folgenden Anlagerung der biotinylierten Substanzen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund z. B. sterischer Hinderungen ein Teil der NeutrAvidin™-Oberfläche für die Bakterien zugänglich blieb. Dies hätte zur Folge, dass die Bindungskurve der Bakterien sich aus Bindungen an die biotinylierten Substanzen und an NeutrAvidin™ zusammensetzen würde. Aus diesem Grund wurden die Corynebakterien direkt auf die NeutrAvidin™-Oberfläche gegeben und das Bindungsverhalten untersucht.

Hierbei wurde eine schwache Bindung von *C. jeikeium* (DSM 7171) und *C. jeikeium* (96) an das NeutrAvidin™ beobachtet. Aufgrund dieser schwachen Bindungsaffinität und dem noch nicht geklärten Abfall der Bindungskurven nach Zugabe von *C. minutissimum* (DSM 20651) und *C. jeikeium* (DSM 7171) in PBS/T, wurde nur mit *C. group G* (45) und *C. group G* (48) weiter getestet. Bei beiden Bakterienstämmen wurde keine Bindung an die NeutrAvidin™-Oberfläche beobachtet.

Im Folgenden wurden fünf verschiedene Zuckerverbindungen getestet, wobei es sich bei allen Substanzen um Mannose-Verbindungen handelte.

Als erstes sollte biotinylierte Mannose an NeutrAvidin™ gebunden werden. Auch nach mehreren Versuchen wurde keine Winkelveränderung und somit auch keine Bindung gemessen. Zur Kontrolle wurde *C. group G* (45) zugegeben, das ebenfalls keine Bindung zeigte und somit die Abwesenheit von Mannose bestätigte. MAST (2001) konnte im Adhäsionsassay an Corneozyten eine anti-adhäsive Wirkung von Mannose gegen *C. group G* nachweisen, d.h. eine Bindungsaffinität von *C. group G* an Mannose. Aus welchem Grund die biotinylierte Mannose nicht an die NeutrAvidin™-Oberfläche gebunden hat, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre eine Verunreinigung des Standards mit freiem Biotin, hervorgerufen durch eine mangelhafte Aufreinigung des Standards nach der Biotinylierung. Freies Biotin reagiert wesentlich schneller mit der NeutrAvidin™-Oberfläche als gebundenes Biotin, d.h. im Fall einer Verunreinigung würden die Bindungsstellen des NeutrAvidins™ von dem freien Biotin besetzt werden.

Eine Anlagerung des biotinylierten Mannose-6-Phosphat Standards war im Gegensatz zur biotinylierten Mannose möglich. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, bei der das biotinylierte Mannose-6-Phosphat einmal mit 51,5 arcsec und einmal mit 21,7 arcsec an die NeutrAvidin™-Oberfläche gebunden hat. Die anschließende Überschichtung mit Corynebakterien ergab für den ersten Versuch eine Winkeländerung von 9,7 arcsec mit *C. group G* (48) in einer Konzentration von 2×10^7 Bakterien pro 4 mm^2 Oberfläche und für den zweiten Versuch eine Winkeländerung von 83,5 arcsec mit *C. group G* (45) in einer Konzentration von 2×10^8 Bakterien pro 4 mm^2 Oberfläche. Hier zeigt sich, dass die Anlagerung an das NeutrAvidin™ bei zwei Versuchen nicht reproduzierbar war. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Erwartungsgemäß hätten beim zweiten Versuch weniger Corynebakterien binden müssen, da auch weniger Mannose-6-Phosphat als Bindungspartner zur

Verfügung stand. Dennoch haben im zweiten Versuch etwa acht mal so viele Bakterien gebunden wie im ersten Versuch. Da mit *C. group G* (45) und (48) zwei verschiedene Achselisolate verwendet wurden, sind Unterschiede in der Bindungsstärke nicht auszuschließen. Bei vorhergehenden Untersuchungen mit HPTLC und Overlay Assay haben die beiden Corynebakterien ähnliche Bindungsmuster gezeigt. Generell kann gesagt werden, dass Corynebakterien eine Bindungsaffinität zu Mannose-6-Phosphat besitzen (MAST, 2001) wobei Mannose-6-Phosphat tendentiell im Adhäsionsassay eine höhere inhibitorische Wirksamkeit zeigte als Mannose, d.h. die Bindungsaffinität von Corynebakterien zu Mannose-6-Phosphat stärker war als zu Mannose.

Der biotinylierte Glykocluster N12 ließ sich an die NeutrAvidin™-Oberfläche anlagern, wurde aber nach der anschließenden Überschichtung mit Corynebakterien wieder abgespült. Eine Erklärung für diesen Effekt könnte in einer Konkurrenz zwischen Avidin und bakteriellem Streptavidin um den Biotin-Rest des Ligates liegen (persönliche Mitteilung Dr. Peter Kiesau, Affinity Sensors Division). Dies würde bedeuten, dass nach Zugabe der Bakterien der biotinylierte Glykocluster N12 bevorzugt an das Streptavidin der Bakterienoberfläche binden und beim Spülen der Küvette mit den Bakterien entfernt werden würde. Dagegen spricht aber, dass z. B. beim biotinylierten Mannose-6-Phosphat diese Art von Konkurrenz nicht aufgetreten ist.

Für die letzten zwei Verbindungen musste der Assay umgestaltet werden. Da beide Substanzen nicht in Puffer sondern in Methanol löslich sind, wurde die NeutrAvidin™-Oberfläche auf ihre Stabilität gegen Methanol getestet. Bei Zugabe von Methanol wurde nach einem Zeitraum von 10 Minuten eine Zunahme des Resonanzwinkels verzeichnet. Aus diesem Grund wurden die beiden Substanzen KS-IV-145 und KS-IV-153 nur für kurze Zeit, aber jeweils mehrmals nacheinander auf die NeutrAvidin™-Oberfläche gegeben. Dabei ergab sich für KS-IV-145 eine Winkelveränderung um 33,2 arcsec und für KS-IV-153 um 102,2 arcsec. Anschließend wurde mit *C. group G* (45) in einer Konzentration von 2×10^8 Bakterien pro 4 mm^2 Oberfläche überschichtet. Für KS-IV-145 brachte dies eine Winkelveränderung um 10,7 arcsec bei KS-IV-153 um 228,8 arcsec. Vergleicht man die Strukturen von KS-IV-145 und KS-IV-153 miteinander, unterscheiden sie sich um eine hydrophobe Kohlenstoffkette aus 15 C-Atomen. Es ist vorstellbar, dass *C. group G* (45) bevorzugt an die unpolare Verbindung

dung KS-IV-153 bindet, wie im Versuch beobachtet. Ohne Mehrfachbestimmungen kann bei den durchgeführten Untersuchungen aber generell keine verbindliche Aussage gemacht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchungen mit dem optischen Biosensor IAsys plus aufgrund der Schwierigkeiten des Herstellers mit den Hydrophoben- und zwischenzeitlich auch mit den Biotin-Küvetten, noch nicht aussagekräftig sind. Dennoch bieten sie einen Einblick in die Möglichkeiten, die sich durch diese Messmethode ergeben können. Viele Arbeitsgruppen haben bereits sehr erfolgreich mit dem IAsys plus gearbeitet. Für viele experimentelle Situationen (z.B. Antikörper-Antigen, Protein-DNA, Enzym-Inhibitor u.v.a.) sind bereits Methoden etabliert.

Da bislang noch keine Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen vorlagen, die sich mit der Adhäsion von Corynebakterien an Hautlipide bzw. biotinylierte Zuckerstrukturen beschäftigten, wurde mit dieser Messanordnung Neuland betreten. Davon ausgehend müsste für eine angemessene und umfassende Methodenentwicklung ein größerer Zeitrahmen gerechnet werden als er bei dieser Arbeit zur Verfügung stand. Daher sind weiter Untersuchungen mit dem optischen Biosensor IAsys plus auf diesem Arbeitsgebiet zu empfehlen, vorausgesetzt, die Küvetten sind vom Hersteller wieder problemlos lieferbar.

4.4. Zusammenfassende Diskussion

Vor der Entwicklung von Anti-Adhäsiva als neue Deowirkstoffe ist eine genaue Kenntnis der Rezeptorstrukturen, über die deorelevante Keime an die Haut in der Achsel binden, unerlässlich. In dieser Arbeit wurden zwei Substanzgruppen, Glykolipide und Lipide, als Rezeptorstrukturen untersucht.

Glykolipide bzw. Ganglioside besitzen das Gal- β -(1,4)-Glc-Motiv, welches von vielen Bakterien erkannt wird (KARLSSON, 1989). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die untersuchten Corynebakterien eine Bindungsaffinität zu den Gangliosiden aufwiesen. Es zeigte sich aber, dass Ganglioside nur in sehr geringer Menge in der Haut enthalten sind (SKRIVANEK *et al.*, 1993) und somit nicht für die Adhäsion von Corynebakterien an die Haut relevant erscheinen. Dennoch besteht die Möglichkeit,

dass Ganglioside eine anti-adhäsive Wirksamkeit aufweisen, wenn Bakterien die Adhäsion an Ganglioside der Adhäsion an Hautrezeptoren vorziehen.

Die Untersuchung der Adhäsion von Corynebakterien an Hautlipide ergab, dass die getesteten Corynebakterien eine hohe Bindungsaffinität zu Cholesterol-3-sulfat und Cholesteryl-oleat besaßen aber eine niedrige Bindungsaffinität zu Cholesterol. Zur weiteren Untersuchung wurden strukturell ähnliche Lipidsubstanzen getestet, um den Einfluss der Seitenkette auf die Adhäsion von Corynebakterien zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass die Bindungsaffinität von Corynebakterien zu Cholesteryl-estern mit der Länge der Seitenkette anstieg, wobei Doppelbindungen in der Seitenkette keinen Einfluss auf die Adhäsion ausübten. Bei den freien Fettsäuren wirkte sich eine Doppelbindung in der Seitenkette negativ auf die Bindungsaffinität aus. Eine Zunahme der Bindungsaffinität in Abhängigkeit von der Kettenlänge wurde auch für Fettsäure-sulfat-ester beobachtet. Corynebakterien zeigten auch eine gute Bindungsaffinität zu Pentacosan. Dies zeigt, dass die Hydrophobizität eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Adhäsion darstellt. Die Polarität schien dagegen keinen Einfluss auf die Adhäsion zu haben.

In einem Probandentest konnte gezeigt werden, dass die Bindungsmuster der Corynebakterien an die Hautlipide der Probanden sich sehr ähnelten. Für ein Anti-Adhäsiva würde dies ein breites Wirkungsspektrum bedeuten, ohne Einschränkungen durch z.B. Alter und Geschlecht der Anwender.

5. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

5.1. Zusammenfassung

Die Bakterien der humanen Achselflora setzen im apokrinen Schweiß enthaltene Substanzen um und tragen so zur Bildung des charakteristischen Schweißgeruchs bei. Um der Geruchsbildung entgegenzuwirken, werden Deodorantien mit antimikrobiellen Substanzen eingesetzt, die bei den Bakterien zur Resistenzentwicklung führen. Eine neue Wirkstrategie für Deodorantien, die keine Resistenzen verursachen würde, ist der Einsatz von Anti-Adhäsiva.

Bevor Bakterien apokrinen Schweiß umsetzen können, müssen sie zunächst an Hautzellen binden. Wenn die Bakterien nicht an die Haut adhärieren können, sind sie nicht mehr in der Lage den Schweiß umzusetzen und es käme zu keiner Geruchsbildung. Die Unterbindung der bakteriellen Adhäsion kann durch Anti-Adhäsiva erreicht werden. Diese können zum einen durch die Aufhebung der unspezifischen Adhäsion aufgrund von z.B. hydrophober Wechselwirkung, zum anderen durch die Verhinderung der bakteriellen Besiedelung über spezifische Wechselwirkungen wirken.

Um Anti-Adhäsiva entwickeln zu können, werden zunächst Kenntnisse über die Rezeptorstrukturen der Haut benötigt, an die die deorelevanten Keime, Staphylokokken und Corynebakterien, adhärieren. Als mögliche Rezeptorstrukturen wurden in dieser Arbeit Glykolipide und Lipide untersucht. Es wurden dafür Corynebakterien eingesetzt, da über ihren Adhäsionsmechanismus nur sehr wenig bekannt ist. Für Staphylokokken liegen bereits mehrere Ergebnisse über ihr Bindungsverhalten an Haut vor.

Die Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien erfolgte mittels HPTLC-Auftrennung und Overlay-Assay. Hierfür wurden Glykolipide und Lipide auf HPTLC-Platten aufgetragen und mit fluoreszenzmarkierten Corynebakterien überschichtet. Nach Detektion mit UV-Licht konnte die Bindungsaffinität gemessen werden.

Alternativ sollte ein optischer Biosensor (IASys plus) für Adhäsionsuntersuchungen getestet werden. Aufgrund von Problemen bei der Herstellung der IASys-Küvetten seitens des Herstellers, konnten mit dieser Methode jedoch noch keine aussagekräftigen Ergebnisse gewonnen werden.

Aus den Untersuchungen von Glykolipiden und Lipiden als mögliche Rezeptorstrukturen lässt sich folgendes ableiten.

Corynebakterien weisen eine Bindungsaffinität zu den untersuchten Glykolipiden auf. Es zeigte sich aber, dass Glykolipide nur in sehr geringer Menge in der Haut enthalten sind. Somit scheinen sie nicht für die Adhäsion von Corynebakterien an die Haut relevant zu sein. Dennoch kann das Zuckermotiv für die Entwicklung von Anti-Adhäsiva genutzt werden.

Die Untersuchung der Adhäsion an Hautlipide ergab, dass Corynebakterien eine hohe Bindungsaffinität zu Cholesterol-3-sulfat und Cholesteryl-oleat aufweisen aber eine niedrige Bindungsaffinität zu Cholesterol. Weitere Untersuchungen mit strukturell ähnlichen Lipiden führten zu dem Schluss, dass die Länge der hydrophoben Seitenkette von Cholesteryl-estern einen Einfluss auf die Adhäsion von Corynebakterien hat. Die Corynebakterien zeigten an Verbindungen mit längerer Seitenkette eine höhere Affinität. An Pentacosan wurde ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass die Hydrophobizität eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Adhäsion spielt. Die Polarität schien dagegen keinen Einfluss auf die Adhäsion zu haben ebenso wie Doppelbindungen in der Seitenkette. Cholesterol-3-sulfat behält bezüglich der hohen Bindungsaffinität eine Sonderstellung.

In einem Probandentest konnte gezeigt werden, dass die Bindungsmuster der Corynebakterien an die Hautlipide der Probanden sich sehr ähnelten. Für ein Anti-Adhäsiva würde dies ein breites Wirkungsspektrum bedeuten, ohne Einschränkungen durch z.B. Alter und Geschlecht der Anwender.

5.2. Summary

Bacteria of the human axillary flora contribute to the formation of the characteristic malodour by metabolising substances from the apocrine sweat gland. To counteract the formation of body odour deodorants with anti-microbial substances are inserted. This may cause the development of resistance against these biocides in bacteria. A new strategy for deodorants which can not cause the development of resistance is the insertion of anti-adhesives.

Before bacteria can metabolise the apocrine sweat they must bind (adhere) to the cells of the skin. If the bacteria can not adhere to the skin, they will not metabolise the sweat and malodour will not be developed. The bacterial adhesion can be prevented with anti-adhesives. These have two modes of action. First anti-adhesives can prevent the unspecific adhesion promoted by hydrophobic interaction. Second they can prevent the bacterial colonisation caused by specific interactions.

Knowledge about the receptor-structure on the human skin used by staphylococci and corynebacteria are required to develop anti-adhesives. Glycolipids and lipids are investigated in this work as possible structures of receptors. Corynebacteria are investigated in more detail since their mechanism of adhesion is not well understood. About the binding-behaviour of staphylococci on the skin several results are available.

The binding-affinity of corynebacteria was investigated by separation with HPTLC (high performance thin layer chromatography) and a subsequent overlay-assay. Glycolipids and lipids were applied on the HPTLC-plates and after separation coated with corynebacteria which were fluorescence-labelled. The binding-affinity was measured after detection with UV-light.

Alternative an optical biosensor (IASys plus) should be tested for the investigation of the adhesion. Results could not have been obtained with this method because the manufacturer had problems to make available the cuvettes for the IASys plus.

Due to the investigations from glycolipids and lipids as possible receptor-structures the following results can be deduced.

Corynebacteria show a binding-affinity to the investigated glycolipids but these glycolipids contribute only to a small amount to the skin-lipids. Thus glycolipids are not rele-

vant for the adhesion of corynebacteria to the skin. However, the motive of carbohydrates can be used for the development of anti-adhesives.

The investigation of the adhesion to skin-lipids showed that corynebacteria have a high binding-affinity to cholesterol-3-sulfat and cholesteryl-oleat but a low binding-affinity to cholesterol. Further investigations with structural similar lipids showed that the length of the hydrophobe lateral chain has an influence on the adhesion of corynebacteria. The corynebacteria showed a higher affinity to compounds with a longer lateral chain. A high binding-affinity to pentacosane was observed as well. Due to this result it can be concluded that the hydrophobicity plays an important role for bacterial adhesion. The polarity and double-bindings in the lateral chain seem to have no influence on the adhesion. Cholesterol-3-sulfat has a special position concerning the binding-affinity.

In tests with volunteers it could be shown that the motifs of binding of the corynebacteria to skinlipids are very similar. An anti-adhesive would have a wide field of activity without restrictions due to age or sex of the user.

6. LITERATUR

- ABUL-MILH, M.; PARADIS, S.-É.; DUBREUIL, J. D.; JACQUES, M.: Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography, *Infect. Immun.* 67, 4983-4987, 1999.
- ALLISON, D. G.: Biofilm-associated exopolysaccharides, *Microbiol. Eur.* 1, 16-19, 1993.
- ALY, R.; MAIBACH, H.: Aerobic microbial flora of intertriginous skin, *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 97-100, 1977.
- ÅNGSTRÖM, J; TENEBERG, S.; KARLSSON, K.-A.: Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* and *Clostridium tetani*: Evidence for overlapping epitopes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11859-11863, 1994.
- ATHANASSOPOULOU, N; DAVIES, R. J.; EDWARDS, P. R.; YEUNG, D.; MAULE, C. H.: Cholera toxin and G_{M1}: a model membrane study with IAsys, *Biochem. Soc. Trans.* 27, 340-343, 1999.
- BANDIS, H.; KÖHLER, W.; EGGERS, H. J.; PULVERER, G.: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994.
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, A.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 2001
- BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNING, J.; MARKHAM, A.: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell Biol.* 106, 761-771, 1988.
- BÜNGER, J.: Adhäsion von Mikroorganismen an Human-Haut, Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg, 1996.
- BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.: Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata, *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 165-173, 1987.

- CAMBRON, L. D.; LESKAWA, K. C.: A sensitive method to quantitate gangliosides of the gangliotetraose series directly on chromatograms using peroxidase conjugated cholera toxin, *Stain Technol.* 65, 293-297, 1990.
- CAMMANN, K.: Instrumentelle Analytische Chemie – Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 2001.
- CHUANCHUEN, R.; BEINLICH, K.; HOANG, T. T.; BECHER, A.; KARKHOFF-SCHWEIZER, R. R.; SCHWEIZER, H. P.: Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45, 428-432, 2001.
- COURTNEY, H. S.; HASTY, D.; OFEK, I.: Hydrophobicity of group A streptococci and relationships to adhesion of streptococci to host cells, In: Doyle, R. J. and Rosenberg, M. (eds.), *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, American Society for Microbiology, Washington, 361-386, 1990.
- CUSH, R.; CRONIN, J. M.; STEWART, W. J.; MAULE, C. H.; MOLLOY, J.; GODDARD, N. J.: The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions, Part I: Principle of operation and associated instrumentation, *Biosens. Bioelectron.* 8, 347-353, 1993.
- CZARNETZKI, B.; KERL, H.; STERRY, W.: *Dermatologie und Vererologie mit Repetitorium*, Verlag Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1991.
- DEAL, C. D.; KRIVAN, H. C.: Solid-phase binding of microorganisms to glycolipids and phospholipids, *Methods Enzymol.* 236, 346-353, 1994.
- DELEKAT, T.: Charakterisierung und Identifizierung mikrobieller Wirtsrezeptoren, die die Adhäsion von Mikroorganismen an humane Hautzellen vermitteln, Diplomarbeit im Studiengang Biotechnologie der TU Braunschweig, 1999.
- DERWORT, C.: Nachweis der Differenzierung von Bakterien der Hautflora mit molekularbiologischen, biochemischen und kulturellen Methoden, Diplomarbeit im Fachbereich naturwissenschaftliche Technik der Fachhochschule Hamburg, 2000.

- DIKSTEIN, S.; ZLOTOGORSKI, A.: Measurement of skin pH, *Acta. Derm. Venerol. Suppl. (Stockh.)* 185, 18-20, 1994.
- DIKSTEIN, S.; ZLOTOGORSKI, A.: Skin surface hydrogen ion concentration (pH), In: Leveque, J. L. (ed.), *Cutaneous investigation in health and disease*, Marcel Dekker Inc., New York, 59-77, 1989.
- DUNCAN-HEWITT, W.: Nature of the hydrophobic effect, In: Doyle, R. J.; Rosenberg, M. (eds.), *Microbial cell surface hydrophobicity*, American Society for Microbiology, Washington, 39-73, 1990.
- ECKSTEIN, R. A.: *Biokosmetik*, Linde Eckstein KG, Oberasbach, 1986.
- FINKEL, P.: Deodorantien; In: Umbach, W. (Hrsg.), *Kosmetik*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 360-371, 1995.
- FRITSCH, P.: *Dermatologie*, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1990.
- GOTTENBOS, B.; GRIJPMA, D. W.; van der MEI, H. C.; FEIJEN, J.; BUSSCHER, H. J.: Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria, *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 7-13, 2001.
- GRAHAM, J. M.; HIGGINS, J. A.: *Molekularbiologische Membrananalyse*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.
- GRAWKRODGER, D.: *Dermatologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1995.
- HAAS, U.: *Physik für Pharmazeuten und Mediziner*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1988.
- HACKER, J.: Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections, *Can. J. Microbiol.* 38, 720-727, 1992.
- HAUSTEIN, U. F.: Bakterielle Hautflora, Wirtsabwehr und Hautinfektionen, *Dermatol. Monatsschr.* 175, 665-680, 1989.
- HEATH, R. J.; ROCK, C. O.: A triclosan-resistant bacterial enzyme, *Nature* 406, 145-146, 2000.

- ISOBE, T.; NAIKI, M.; HANDA, S.; TAKI, T.: A simple assay method for bacterial binding to glycosphingolipids on a polyvinylidene difluoride membrane after thin-layer chromatography blotting and *in situ* mass spectrometric analysis of the ligands, *Anal. Biochem.* 236, 35-40, 1996.
- IVANOV, Y. D.; KANAEVA, I. P.; GNEDENKO, O. V.; POZDNEV, V. F.; SHUMYANTSEVA, V. V.; SAMENKOVA, N. F.; KUZNETSOVA, G. P.; TEREZA, A. M.; SCHMID, R. D.; ARCHAKOV, A. I.: Optical biosensor investigation of interactions of biomembrane and water-soluble cytochromes P450 and their redox partners with covalently immobilized phosphatidylethanolamine layers, *J. Mol. Recognit.* 14, 185-196, 2001.
- JACKMAN, R.; NOBLE, W.: Normal axillary skin microflora in various populations, *Clin. Exp. Dermatol.* 8, 259-268, 1983.
- JASTROW, H.: Haut und Hautanhangsgebilde, Skript zum 16. Kurstag des Histologiekurses der Uni Mainz, In: Histologischer Atlas im Internet, <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/Histology/Haut.html>, Stand: April 2001.
- JUNG, E. G.: Dermatologie, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1991.
- KARLSSON, K.-A.: Animal glycolipids as attachment sites for microbes, *Chem. Phys. Lipids* 42, 153-172, 1986.
- KARLSSON, K.-A.: Preparation of total nonacid glycolipids for overlay analysis of receptors for bacteria and viruses and for other studies, *Methods Enzymol.* 138, 212-220, 1987.
- KARLSSON, K.-A.: Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria, *Annu. Rev. Biochem.* 58, 309-350, 1989.
- KARLSSON, K.-A.: Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates, *Mol. Microbiol.* 29, 1-11, 1998.
- KARLSSON, K.-A.; STRÖMBERG, N.: Overlay and solid-phase analysis of glycolipid receptors for bacteria and viruses, *Methods Enzymol.* 138, 220-232, 1987.
- KIESAU, P.: Real-time-bioprocess-monitoring mit optischen Biosensoren, BIOforum-Forschung und Entwicklung, Git Verlag, Darmstadt, 1999.

- KIESAU, P.: Neue Applikationen mit dem IAsys Affinitätssensor, *Biospektrum-Industrie-Applikationen*, 5, 505-506, 1999.
- KINDL, G.; RAAB, W.: *Licht und Haut*, 4. Auflage, Govi-Verlag, Eschborn, 1998.
- KLEMM, P.: Fimbrial adhesions of *Escherichia coli*, *Rev. Infect. Dis.* 7, 321-340, 1985.
- KLIGMAN, A. M.; BALIN, A. K.: Aging of human skin, In: Balin, A. K. und Kligman, A. M. (eds), *Aging and the skin*, Raven Press, New York, 1-42, 1989.
- KLOPFLEISCH, R.; KOCH, E. R.; MAYWALD, A.: *Mit Haut und Haaren – Ein kritischer Kosmetik-Ratgeber*, Verlag Kiepenheuer und Witsch, Köln, 1987.
- KNIEP, B.; MÜHLRADT, P. F.: Immunochemical detection of glycosphingolipids on thin-layer chromatograms, *Anal. Biochem.* 188, 5-8, 1990.
- KOBAYASHI, K.; MATSUURA, E.; LIU, Q.; FURUKAWA, J.; KAIHARA, K.; INAGAKI, J.; ATSUMI, T.; SAKAIRI, N.; YASUDA, T.; VOELKER, D. R.; KOIKE, T.: A specific ligand for beta(2)-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages, *J. Lipid Res.* 42, 697–709, 2001.
- KORTING, H. C.; LUKACS, A.; BRAUN-FALCO, O.: *Mikrobielle Flora und Geruch der gesunden menschlichen Haut*, *Hautarzt* 39, 564-568, 1988.
- LABOWS, J.N.; *et al.*: Axillary Odor. Determination, Formation and Control, In: Felger, C.; Laden, K. (eds.), *Antiperspirants and Deodorants, Cosmetic Science and Technology Series, Second Edition*, Marcel Dekker Inc., New York, 20, 59-82, 1988.
- LAITINEN, O. H.; MARTTILA, A.; AIRENNE, K. J.; KULIK, T.; LIVNAH, O.; BAYER, E. A.; WILCHEK, M.; KULOMAA, M. S.: Biotin induces tetramerization of a recombinant monomeric avidin. A model for protein-protein interactions, *J. Biol. Chem.* 276, 8219–8224, 2001.
- LAMPE, M. A.; BURLINGAME, A. L.; WHITNEY, J.; WILLIAMS, M. L.; BROWN, B. E.; ROITMAN, E.; ELIAS, P. M.: Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations, *J. Lipid Res.* 24, 120-130, 1983.

- LAW, S.; FOTOS, P. G.; WERTZ, P. W.: Skin surface lipids inhibit adherence of *Candida albicans* to stratum corneum; *Dermatology* 195, 220-223, 1997.
- LEONHARDT, H.: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1985.
- LEVY, S. B.: Antibacterial household products: cause for concern, *Emerg. Infect. Dis.* 7, 512-515, 2001.
- LEYDEN, J. J.; MCGINLEY, K. J.; FOGLIA, A. N.; WAHRMAN, J. E.; GROPPER, C. N.; VOWELS, B. R.: A new method for in vivo evaluation of antimicrobial agents by translocation of complex dense populations of cutaneous bacteria, *Skin. Pharmacol.* 9, 60-68, 1996.
- LEYDEN, J. J.; MCGINLEY, K. J.; NORDSTROM, K. M.; WEBSTER, G. F.: Skin microflora, *J. Invest. Dermatol.* 88, 65-72, 1987.
- LEYDEN, J. J.; MCGINLEY, K. J.; HÖLZLE, E.; LABOWS, J.; KLIGMAN, A. M.: The microbiology of the human axilla and its relationship to axillary odor, *J. Invest. Dermatol.* 77, 413-416, 1981.
- LINDHORST, T. K.: Struktur und Funktion von Kohlenhydraten, Chemie in unserer Zeit, 34, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2000/a.
- LINDHORST, T. K.: Wenn Zucker-Attrappen Bakterien zum Narren halten, Spektrum der Wissenschaft, 16-21, 2000/b.
- MAST, M.: Bakterielle Adhäsion an Haut: Untersuchungen zum Adhäsionsmechanismus von Corynebakterien an humane Corneozyten, Diplomarbeit im Studiengang Biotechnologie der Fachhochschule Giessen Friedberg, 2001.
- MELNIK, B. C.: Biochemie und Pathobiochemie des epidermalen Lipidstoffwechsels, Thieme Verlag, Stuttgart, 1990.
- MERRITT, K.; AN, Y. H: Factors influencing bacterial adhesion, In: An, Y. H.; Friedman, R. J. (eds.), Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications, Human Press Totowa, NJ, 2000.

- MIHARA, M.: Scanning electron microscopy of skin surface and the internal structure of corneocyte in normal human skin. An application of the osmium-dimethyl sulfoxide-osmium method, *Arch. Dermatol. Res.* 280, 293-299, 1988.
- MIRELMAN, D.; OFEK, I.: Introduction to microbial lectins and agglutinins. In: Mirelman, D. (ed.), *Microbial lectins and agglutinins*, John Wiley & Sons, New York, 1-19, 1986.
- MÖLLER, H.; MATTHIES, W.: Die Haut; In: Umbach, W. (Hrsg.), *Kosmetik*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, 25-32, Stuttgart, 1995.
- MONTAGNA, W.; KLUGMAN, A. M.; CARLISLE, K. S.: *Atlas of normal human skin*, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- MUHLDORFER, I.; HACKER, J.: Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence, *Microb. Pathog.* 16, 171-181, 1994.
- ODLAND, G. F.: Structure of Skin, In: Goldsmith, L. A. (ed.), *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin*, Oxford University Press, Oxford, 1, 3-62, 1991.
- OFEK, I.; BEACHEY, E. H.: Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* 22, 247-254, 1978.
- OLLERT, M. W.; SÖHNCHEN, R.; KORTING, H. C.; OLLERT, U.; BRÄUTIGAM, S.; BRÄUTIGAM, W.: Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes, *Infect. Immun.* 61, 4560-4568, 1993.
- ORTH, D. S.: *Handbook of Cosmetic Microbiology*, Marcel Dekker Inc., *Cosmetic Science and Technology Series* 12, 221-315, 1993.
- PANJWANI, N.; ZAIDI, T. S.; GIGSTAD, J. E.; JUNGALWALA, F. B.; BARZA, M.; BAUM, J.: Bindung of *Pseudomonas aeruginosa* to neutral glycosphingolipids of rabbit corneal epithelium, *Infect. Immun.* 58, 114-118, 1990.
- PIMENTEL, G. C.; McCLELLAN, A. L.: *The hydrogen bond*, W. H. Freeman, San Francisco, 1990.

- PURVIS, D. R.; POLLARD-KNIGHT, D.; LOWE, C. R.: Direct immunosensors, In: Price, C. P.; Newman, D. J. (eds.): *Principles and Practice of Immunoassay* (2nd Ed.), Macmillan Reference, London, 511, 513-543, 1997/a.
- PURVIS, D. R.; POLLARD-KNIGHT, D.; LOWE, P. A.: Applications to clinical, bioprocess and environmental samples, In: Ramsay, G. (ed.), *Commercial Biosensors*, Chapter 5, John Wiley & Sons, New York, 1997/b.
- RAAB, W.; KINDL, U.: *Pflegekosmetik – Ein Leitfaden*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991.
- RENNIE, P. J.; GOWER, D. B.; HOLLAND, K. T.: In-vitro and in-vivo studies of human axillary odour and the cutaneous microflora, *Br. J. Dermatol.* 124, 596-602, 1991.
- RENNIE, P. J.; GOWER, D. B.; HOLLAND, K. T.; MALLET, A. I.; WATKINS, W.: The skin microflora and the formation of human axillar odour, *Int. J. Cosmet. Sci.* 12, 197-207, 1990.
- RICHARDSON, D.; SEITZ, E.: Deodorant ingredients, In: Felger, C.; Laden, K. (eds.): *Antiperspirants and Deodorants*, Marcel Dekker Inc., New York, 345-391, 1988.
- RÖMPP-LEXIKON CHEMIE; Falbe, J.; Regitz, M.; (Hrsg.), 10. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997.
- ROMERO-STEINER, S.; WITEK, T.; BALISH, E.: Adherence of skin bacteria to human epithel cells, *J. Clin. Microbiol.* 28, 27-31, 1990.
- RÖSNER H.: A new thin-layer chromatographic approach for separation of multisialogangliosides. Novel gangliosides fractions in the embryonic chicken brain, *Anal. Biochem.* 109, 437-442, 1980.
- ROSENBERG, M.; PERRY, A.; BAYER, E. A.; GUTNICK, D. L.; ROSENBERG, E.; OFEK, A.: Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane, *Infect. Immun.* 33, 29-33, 1981.
- ROTH, R. R.; JAMES, W. D.: Microbial ecology of the skin, *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 441-464, 1988.

- ROTH, R. R.; JAMES, W. D.: Microbiology of the skin: resident flora, ecology, infection, *J. Am. Acad. Dermatol.* 20, 367-390, 1989.
- RUSSELL, A. D.: Do biocides select for antibiotic resistance? *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 227-233, 2000.
- SAINT LÉGER, D.; FRANÇOIS, A. M.; LÉVÊQUE, J. L.; STOUDEMAYER, T. J.; GROVE, G. L.; KLIGMAN, A. M.: Age-associated changes in stratum corneum lipids and their relation to dryness, *Dermatologica* 177, 159-164, 1988.
- SAITO, M.; KASAI, N.; YU, R. K.: *In situ* immunological determination of basic carbohydrate structures of gangliosides on thin-layer plates, *Anal. Biochem.* 148, 54-58, 1985.
- SASATSU, M.; SHIMIZU, K.; NOGUCHI, N.; KONO, M.: Triclosan-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet.* 341, 756-759, 1993.
- SASSOON, J.; LILIE, H.; BAUMANN, U.; KOHLI, J.: Biochemical characterization of the structure-specific DNA-binding protein Cmb1 from *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Mol. Biol.* 309, 1101-1105, 2001.
- SCHÜRER, N. Y.; ELIAS, P. M.: The biochemistry and function of stratum corneum lipids, *Adv. Lipid Res.* 24, 27-56, 1991.
- SCHÜRER, N. Y.: Die fette Haut, *Z. Hautkrankheiten* 68, 636-640, 1993.
- SCHÜRER, N. Y.; SCHLIEP, V.; BARLAG, K.: Quantitative screening of human stratum corneum lipids by sequential one-dimensional thin layer chromatography, *Exp. Dermatol.* 4, 46-51, 1995.
- SCHWAB, U.; THIEL, H.-J.; STEUHL, K.-P.; DOERING, G.: Binding of *Staphylococcus aureus* to fibronectin and glycolipids on corneal surfaces, *Ger. J. Ophthalmol.* 5, 417-421, 1997.
- SEITZ Jr., E. P.; RICHARDSON, D. I.: Deodorant ingredients, *Cosmet. Sci. Technol. Ser.* 7, 345-390, 1988.
- SHARON, N.: Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease, *FEBS Lett.* 217, 145-157, 1987.

- SHARON, N.; LIS, H.: Kohlenhydrate und Zellerkennung, *Spektrum der Wissenschaft* 3, 66-74, 1993.
- SHARON, N.; OFEK, I.: Identification of receptors for bacterial lectins by blotting techniques, *Methods Enzymol.* 253, 91-98, 1995.
- SHELLY, W.; HURLEY, H.; NICHOLAS, A.: Axillary odor: experimental study of the role of bacteria, apocrine, sweat and deodorants, *Arch. Dermatol. Suppl.* 68, 443-446, 1953.
- SHEU, H.-M.; CHAO, S.-C.; WONG, T.-W.; LEE, Y.-Y.; TSAI, J.-C.: Human skin surface lipid film: an ultrastructural study and interaction with corneocytes and intercellular lipid lamellae of the stratum corneum, *Br. J. Dermatol.* 140, 385-391, 1999.
- SKRIVANEK, J. A.; KING, D.; DaSILVA, D.; JHANG, Y. J.; PHELPS, R.; SCHWARTZ, E.: Isolation and identification of gangliosides of human epidermis, *Microchem. J.* 47, 240-244, 1993.
- SKRIVANEK, J. A.; KING, D.; PHELPS, R.; SCHWARTZ, E.; FLEISCHMAJER, R.: Localization and identification of gangliosides of human epidermis, *J. Invest. Dermatol.* 84, 318, 1985.
- SMITH, R. F.: Fatty acid requirements of human cutaneous lipophilic corynebacteria, *J. Gen. Microbiol.* 60, 259-263, 1970.
- STEIGLEDER, G. K.: Dermatologie und Venerologie, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
- STEINERT, P. M.; FREEDBERG, I. M.: Molecular and cellular biology of keratins, In: Goldsmith L. A. (ed.), *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin*, Oxford University Press, Oxford, 113-167, 1991.
- STENZALY-ACHTERT, S.; SCHÖLERMANN, A.; SCHREIBER, J.; DIECK, K. H.; RIPPKE, F.; BIELFELDT, S.: Axillary pH and influence of deodorants, *Skin Res. Technol.* 6, 87-91, 2000.

- STRÖMBERG, N.; RYD, M.; LINDBERG, A. A.; KARLSSON, K.-A.: Studies on the binding of bacteria to glycolipids. Two species of propionibacterium apparently recognize separate epitopes on lactose of lactosylceramide, *FEBS Lett.* 232, 193-198, 1988.
- SULLER, M. T.; RUSSELL, A. D.: Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 11-18, 2000.
- TRUTNAU, H.-H.: Biomolekulare Interaktions-Analytik, Sonderdruck aus LaborPraxis-Journal für Labor und Analytik, 22, 1998.
- TUE, C. J.; BOJAR, R. A.; HOLLAND, K. T.: The adhesion of cutaneous microorganisms to human skin lipids, *Dermatology* 196, 71-72, 1998.
- UHL, S.: Triclosan-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet.* 342, 248-253, 1993.
- VOET, D.; VOET, J. G.: Biochemie, WILEY-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994.
- WEBSTER, C. I.; PACKMAN, L. C.; GRAY, J. C.: HMG-1 enhances HMG-I/Y binding to an A/T-rich enhancer element from the pea plastocyanin gene, *Eur. J. Biochem.* 268, 3154-3162, 2001.
- WERTZ, P. W.: Epidermal lipids, *Semin. Dermatol.* 11, 106-113, 1992.
- WESTERLUND, B.; VAN DIE, I.; HOEKSTRA, W.; VIRKOLA, R.; KORHONEN, T. K.: P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* as multifunctional adherence organelles, *Zentralbl. Bakteriol.* 278, 229-237, 1993.
- WIESNER, D. A.; SWEELEY, C. C.: Characterization of gangliosides by two dimensional high-performance thin-layer chromatography, *Anal. Chim. Acta.* 311, 57-62, 1995.
- WOODRUFF, J.: On the scent of deodorant trends, *Manuf. Chem.*, 34-38, 1994.
- YIU, S. C.; LINGWOOD, C. A.: Polyisobutylmethacrylate modifies glycolipid binding specificity of verotoxin 1 in thin-layer chromatogram overlay procedures, *Anal. Biochem.* 202, 188-192, 1992.

YOSIPOVITCH, G.; TUR, E.; COHEN, O.; RUSECKI, Y.: Skin surface pH in intertriginous areas in NIDDM patients. Possible correlation to candidal intertrigo, *Diabetes Care* 16, 560-563, 1993.

ZIMMER, S.; STOCKER, A.; SARBOLOUKI, M. N.; SPYCHER, S. E.; SASSOON, J.; AZZI, A.: A novel human tocopherol-associated protein: cloning, in-vitro expression and characterization, *J. Biol. Chem.* 275, 25672-25680, 2000.

7. ANHANG

7.1. Material

7.1.1. Geräte und Software

7.1.1.1. Bakterienstammhaltung, Kultivierung und Identifikation

Agarmat: Agarklav & Tecnomat	Integra Instruments
Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer
CO ₂ -Gefrierschrank (-80 °C)	GFL
Densimat	Bio Mérieux
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Inkubationskammer	Pharmacia Biotech
Inkubationsschrank	Heraeus 2540 EL
Inkubator Shaker Innova 2000	New Brunswick Scientific
Laminarflow	Prettl Laminarflow-Prozeßtechnik GmbH
Pipette (1000 mL)	Eppendorf
Pipette (100 mL)	Eppendorf
Schikanekolben (150 mL)	Schott
Zentrifugen	Eppendorf 5415C und Heraeus Sepatech Medifuge

7.1.1.2. HPTLC und Overlay Assay

DC-Probenautomat III	CAMAG, Version 2.13
DC-Trennkammer (20x10x8 cm)	Dargatz
DC-Tauchkammer (20x10x2 cm)	Dargatz
Feuchte Kammer	Pharmacia Biotech
Fotoprinter	Digital Graphic Printer UP-D860E
Fotosystem	Gel Print 2000i; Bio Photonics [®] Cooperation
Hamilton-Spritze (100 µL)	Linomat Syringe, CAMAG
LogD-Suite 4.5 (Polaritätsberechnung)	Advanced Chemistry Development
Mikroskop	Olympus BX50

ONE-Dscan™	© 1994 Scanalytics, Division of CSPI
pH-Meter	763 Multi-Calimatik, Knick
Rotationsverdampfer	Heidolph VV 2000
Schneidegerät für HPTLC-Platten	Dargratz
Schwenktisch	WT12; Biometra
Thermomixer	Eppendorf 5436
TLC Scanner 3 + CATS-Software	CAMAG, Version 4.06
UV-Lampe 366 nm	Faust
Vortex-Mischer	VF2, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
Waagen	Sartorius Universalwaage, Analysenwaage
Zählkammern	nach Thoma und nach Neubauer
Zentrifugen	Eppendorf 5415C und Heraeus Sepatech Medifuge

7.1.1.3. IAsys plus

Finnpipette®	Labsystems
IAsys plus	Affinity Sensors
IAsys plus Software	Affinity Sensors
Hamilton-Spritze (100 µL)	Linomat Syringe, CAMAG

7.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Es wurden Chemikalien der Firmen Merck, Sigma, Boehringer Mannheim und Röhm verwendet. Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden analyserein (p.A.) eingesetzt.

7.1.2.1. Chemikalien

Chemikalie	Firma	Gefahrensymbol*	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	Merck	F	11	9-16-23.2-33
Albumin, Bovine	Sigma			
Calciumchlorid	Merck	X _i	36	22-24
Chloroform	Merck	X _n	22-38-40-48/20/22	36/37
Citronensäure	Merck	X _i	36	24/25
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole)	Sigma	X _i	36/37/38	26-36
Diethylether	Merck	F ⁺	12-19	9-16-29-33
Essigsäure (100%)	Merck	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	Merck	F	11	7-16
Glycin	Merck			
n-Hexan	Merck	F, X _n	11-48/20	9-16-24/25-29-51
Isooctan	Merck			
Kaliumchlorid	Merck	-	-	-
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck	-	-	-
Kaliumhydroxid-Plätzchen	Merck			
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck	X _n	22-36/38	22
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck	-	-	-
Methanol	Merck	F, T	11-23/25	7-16-24-45
Natriumchlorid	Merck	-	-	-
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)	Merck	-	-	-
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck	X _n	22-36/37/38	-
NeutrAvidin™	Pierce	-	-	-
Petroleumbenzin	Merck	F, X _n	11-52/53-65	9-16-23.2-24-33-62
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck	C	34	26-36/37/39-45
Plexigum P28	Röhm GmbH			
Salzsäure, 37 %	Merck	C	34-37	26-36/37/39-45
Triton® X-100	Merck	X _n	22-41	24-26-39
Tween 20	Merck			
Tween 80	Merck			

Tab. 24: Verwendete Chemikalien mit Gefahrenhinweisen

* E : Explosionsgefährlich C : Ätzend X_i : Reizend
O : Brandfördernd T : Giftig N : Umweltgefährlich
F : Leichtentzündlich T⁺ : Sehr giftig
F⁺ : Hochentzündlich X_n : Gesundheitsschädlich

7.1.2.2. Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Herkunft
<i>C. jeikeium</i>	DSM 7171	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ)
<i>C. jeikeium</i>	Achselisolat (96)	C. Derwort, Labor Deo/Mikrobiologie, Beiersdorf AG
<i>C. group G</i>	Achselisolat (86)	H. Franke, Labor Claim Support, Beiersdorf AG
<i>C. group G</i>	Achselisolat (45)	C. Derwort, Labor Deo/Mikrobiologie, Beiersdorf AG
<i>C. group G</i>	Achselisolat (48)	C. Derwort, Labor Deo/Mikrobiologie, Beiersdorf AG

Tab. 22: Lipophile Corynebakterien

Spezies	Stamm	Herkunft
<i>C. minutissimum</i>	DSM 20651	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ)

Tab. 23: Nicht-lipophile Corynebakterien

7.1.2.3. Reagenzien für die Bakterienkultivierung

Columbia-Agar Base	Merck
D(+)-Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	Merck
Hirn-Herz-Bouillon	Merck
Tween® 80	Merck

7.1.2.4. Glykolipide (HPTLC)

Ceramid III
 Ceramid IV
 Cholesterol-3-Sulfat
 Cholesteroleat
 Glucocerebrosid

Galactocerebroside Typ II
Asialogangliosid G_{M1}
Asialogangliosid G_{M2}
Disialogangliosid GD_{D1a}
Disialogangliosid GD_{D1b}
Disialogangliosid GD_{D2}
Disialogangliosid GD_{D3}
Monosialogangliosid G_{M1}
Monosialogangliosid G_{M2}
Monosialogangliosid G_{M3}
Globopentaosylceramid

Alle Glykolipide wurden über die Firma Sigma bezogen.

7.1.2.5. Biotinylierte Substanzen (IASys plus)

α -D-Mannose-sp-Biotin (Spacer (sp) = $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}-$), GlycoTech

α -D-Mannose-6-Phosphat-sp-Biotin (sp = $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}-$), GlycoTech

Glykocluster N12 (bestehend aus 5 Mannose-Einheiten), Arbeitskreis (AK) Lindhorst

KS-IV-145 (biotinyliertes Methyl- α -Mannosid), AK Lindhorst

KS-IV-153 (biotinyliertes Methyl- α -Mannosid mit C_{15} Lipid-Seitenkette), AK Lindhorst

7.1.2.6. Reagenzien für die Zellkultur

- Culture Freezing Medium DMSO von Gibco BRL (Art.-Nr. 11101-011), 50 mL mit Glycerin
Empfohlene Lagerung bei: $-5\text{ }^\circ\text{C}$ bis $-20\text{ }^\circ\text{C}$
- Dispase II von Boehringer Mannheim, (Art.-Nr. 295 825), 100 mL (1x) steril, $> 2,4$ Units/ml, (neutral Protease, Grade II).
5 mL Aliquots werden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

- DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) (1X), Flüssig (High Glucose) von Gibco BRL (Art.-Nr. 41966-29), 500 mL
mit L-Glutamin, 4500 mg/l D-Glukose, mit Natriumpyruvat
Empfohlene Lagerung bei: +2 °C bis +8 °C
- FCS (Foetal Bovine(Calf) Serum) von Gibco BRL (Art.-Nr.10270-106)
- KGM BulletKit w/o Ca⁺⁺ (Keratinocyte Growth Medium Kit, ohne Ca²⁺, ohne Serum) von Clonetics (Art.-Nr. CC-3112), 500 mL
Die Lagerung des Basismediums KBM (Keratinocyte Basal Medium, Art.-Nr. CC-3104) erfolgt bei 4 °C, die Supplemente werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Erst unmittelbar vor dem Gebrauch des Mediums werden 0,1 mM Calciumchlorid und die Supplemente (Art.-Nr. CC-4131) zugesetzt.
Wichtig: Das Gentamycin aus den Supplementen wird verworfen und durch 50 Einheiten/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin ersetzt.
- PBS (Dulbecco's PBS) ohne Ca²⁺/Mg²⁺ von Cell Concept (Art.-Nr. 3-05F29-I)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung von Gibco BRL (Art.-Nr. 15070-022), 100 mL
5000 Einheiten/mL Penicillin und 5000 µg/mL Streptomycin, als Penicillin G (Na-Salz) und Streptomycin-Sulfat, Hergestellt in physiologischer Kochsalzlösung.
Empfohlene Lagerung bei: -5 °C bis -20 °C
- Trypanblau-Lösung, 0,4 % von Gibco BRL (Art.-Nr. 15250-061)
Hergestellt in 0,85 % Kochsalzlösung, membranfiltriert, für Zellzahlbestimmung
Empfohlene Lagerung bei: +15 °C bis +30 °C
Hinweis: Dieses Produkt ist potentiell giftig!
- Trypsin Solution (2,5 %) von Boehringer Mannheim (Art.-Nr. 210 234), 100 mL
steril, ~ 150 Units/ml
- Trypsin-EDTA (1X), Flüssig von Gibco BRL (Art.-Nr. 25300-054), 100 mL
0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter Puck's Salzlösung A
Empfohlene Lagerung bei: -5 °C bis -20 °C

7.1.2.7. Verbrauchsmaterial

Eppendorfreaktionsgefäß (2000 mL)	Eppendorf
Eppendorfreaktionsgefäß (1500 mL)	Eppendorf
Kieselgel H 60-Platten	Merck
Kieselgel Nano-Durasil-20	Macherey und Nagel
Zellkulturflaschen	Nunc
API Coryne-Testsystem	Bio Mérieux
Cryotube (1,5 mL)	Nalgene
Impfösen	Fisher Scientific
Pasteurpipetten, Plastik	Brand
Petrischalen	Fisher Scientific
Pipettenspitzen (1000 mL)	Eppendorf
Pipettenspitzen (100 mL)	Eppendorf

7.1.3. Medien, Puffer und Lösungen

7.1.3.1. Feste und flüssige Medien zur Anzucht von Corynebakterien

AC-Medium: 37 g Hirn-Herz-Bouillon
 5 g D(+)-Glucose
 1 mL Tween 80
Mit dest. H₂O auf 1000 mL auffüllen und autoklavieren.

Co-Agarplatten: 184,5 g Columbia Agar Base
 13,5 g Hefeextrakt
 9,0 g D(+)-Glucose
Mit dest. H₂O auf 4500 mL auffüllen.
Nach dem Autoklavieren auf 50°C abkühlen lassen und
gießen (17 mL/Platte).

Co+T-Agarplatten: 184,5 g Columbia Agar Base
13,5 g Hefeextrakt
9,0 g D(+)-Glucose
5,0 g Tween 80 (ca. 1 %)
Mit dest. H₂O auf 4500 mL auffüllen.
Nach dem Autoklavieren auf 50°C abkühlen lassen und
gießen (17 mL/Platte).

Columbia Agar Base:

Pankreatisches Pepton (Casein) 10,0 g/l
Peptisches Pepton 5,0 g/l
Hefeextrakt 5,0 g/l
Fleischextrakt 3,0 g/l
Stärke 1,0 g/l
Natriumchlorid 5,0 g/l
Agar 11,0 g/l

7.1.3.2. Puffer und Lösungen für die Bakterienaufarbeitung und Färbung

PBS (10x), pH 7,0-7,5: 80 g NaCl
2 g KCl
17,6 g Na₂HPO₄
2,4 g KH₂PO₄
Mit dest. H₂O auf 1000 mL auffüllen.
Zur Verwendung 1:10 verdünnen und autoklavieren.

PBS/Ethanol (2:1): 60 mL PBS (1 x)
30 mL Ethanol (96 %ig)

DAPI-Lösung: 10 µg 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) werden in 1
mL Methanol gelöst.

7.1.3.3. Sterile Puffer und Lösungen für die Zellkultur

- 200 mM Calciumchlorid-Lösung für KGM-Nährmedium:
2,22 g Calciumchlorid ad 100 mL mit dest. Wasser, autoklavieren
- Dispase-Lösung (6,5 mL, > 1,8 Units/ml):
5 mL Aliquot Dispase II (7.1.2.6.) + 1,5 mL PBS (7.1.2.6.)
- Ethanol 70 % (5mL):
3 mL reiner Ethanol + 1,5 mL PBS (7.1.2.6.)
- DMEM-Nährmedium zur Lagerung von Biopsien (100 mL):
100 mL DMEM + 1 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung
(= 50 Einheiten/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin)
- DMEM-Nährmedium für HaCaT-Zellen: (100 mL)
90 mL DMEM + 10 mL FCS (= 10 %) + 1 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung
(= 50 Einheiten/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin)
- KGM-Nährmedium (500 mL):
500 mL KGM-Medium + mitgelieferte Supplemente (ohne Gentamycin)
+ 250 µL Calciumchlorid (200mM) + 5 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung
(= 50 Einheiten/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin)
- Stop-Lösung (100 mL):
90 mL PBS (7.1.2.6.) + 10 mL FCS (= 10 %)
+ 1 mL Penicillin-Strepto-mycin-Lösung
(= 50 Einheiten/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin)
- Trypsin-Lösung 0,5 %, ~ 30 Units/ml (12,5 mL):
2,5 mL Trypsin (2,5 %) + 10 mL PBS (7.1.2.6.)

7.1.3.4. Puffer für die Corneozytenabspülung

Citratpuffer: 8,4 g Citronensäure (44 mM)
 19,5 g Na₂HPO₄ x 2H₂O (0,11 M)
 Mit dest. H₂O auf 1000 mL auffüllen (ca. pH 5,5); autoklavieren.

Abspülpuffer (Corneozyten): 0,05% Triton X-100 (autoklaviert) in Citratpuffer (s.o.)

7.1.3.5. Puffer und Lösungen für die HPTLC

Plexigum-Lösung: 0,5 % Plexigum P28 (Polyisobutylmethacrylate, Röhm GmbH)
 in Diethylether

PBS-Puffer: siehe 7.1.3.2

BSA-Lösung: 2 % BSA in PBS-Puffer (7.1.3.2., autoklaviert)
 Die fertige BSA-Lösung darf nicht autoklaviert werden da
 sonst das BSA ausfällt.

Chloroform / Methanol	(2 : 1, v/v)
Chloroform / Methanol / 2 % Calciumchloridlg.	(80 : 40 : 7, v/v/v)
Chloroform / Ethanol / 2 % Calciumchloridlg.	(90 : 20 : 1, v/v/v)
Chloroform / Methanol / Eisessig	(95 : 15 : 5, v/v/v)
Isooctan / Diethylether / Eisessig	(80 : 20 : 7, v/v/v)

Kupfersulfat-Färbelösung: wässrige Lösung mit 10 % (w/v) Kupfersulfat Penta-
 hydrat und 8 % (v/v) Phosphorsäure

Anisaldehyd-Schwefelsäure Färbelösung:

1 mL 4-Methoxybenzaldehyd
 2 mL konz. Schwefelsäure
 100 mL Eisessig

Die Lösung ist im Kühlschrank gelagert mehrere Wochen haltbar.

7.1.3.6. Puffer und Lösungen für die Untersuchungen mit dem IAsys plus

NeutrAvidin™: 2 mg/mL in dest. H₂O (autoklaviert)

PBS-Puffer: siehe 7.1.3.2

PBS/T-Puffer: PBS-Puffer (7.1.3.2.) + 0,05 % Tween 20 (autoklaviert)

Glycin/HCl-Lösung: Glycin 100 mM in dest. H₂O (autoklaviert) lösen und mit verdünnter HCl auf pH = 3 einstellen.

10 N NaOH-Lösung

gesättigte KOH-Lösung

7.1.4. Entsorgung eingesetzter Chemikalien und Einwegartikel

Alle Medien, Lösungen und Einwegartikel, die mit Bakterien in Kontakt gekommen sind, wurden zunächst autoklaviert.

Die Entsorgung der eingesetzten Chemikalien und Einwegartikel erfolgte über die zentrale Entsorgung der Beiersdorf AG entsprechend dem Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz (KrW-/AbfG).

Die Laborabfälle werden zunächst nach der internen Labor-Entsorgungsrichtlinie (US-9421-01) eingeklassifiziert. Diese Entsorgungsrichtlinie basiert auf dem KrW-/AbfG und der Gefahrgut Verordnung Straße (GGVS). Anschließend erteilt die Abfall-Verwertungs Gesellschaft mbH (AVG) ihr schriftliches Einverständnis für die Übernahme und Entsorgung der Abfälle. Der Abfalltransport von der Beiersdorf AG zur AVG erfolgt über ein von BDF beauftragtes Transportunternehmen.

7.2. Arbeitsvorschriften

7.2.1. Sterilisation

Alle Lösungen und Medien sowie alle Verbrauchsmaterialien, die mit Bakterien in Kontakt kommen sollen, werden vor Gebrauch durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 2,1 bar sterilisiert.

7.2.2. Bakterienkultivierung

7.2.2.1. Anlage von Glycerinkulturen

Für die Anlage von Glycerinkulturen von Corynebakterien wird zunächst eine Flüssigkultur angelegt. 20 mL AC-Nährmedium werden in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss (Schikanekolben) mit wenigen Corynebakterien beimpft. Der Kolben wird über Nacht bei 37 °C und 200 RPM in einem Warmluftschüttler geschüttelt.

Arbeitskultur:

2 mL der Flüssigkultur werden bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 400 µL Magnesiumsulfat (10 mM) und 800 µL Glycerin (80 %) aufgenommen. Die Suspension wird in ein Kryoröhrchen überführt und bei - 20 °C gelagert.

Stammkultur:

Für die Lagerung werden 800 µL Flüssigkultur mit 800 µL Glycerin (80 %) vermischt und in einem Kryoröhrchen bei - 80 °C eingefroren.

7.2.2.2. Kultur auf Agarplatte

Lipophile Corynebakterien:

10 µL einer -20 °C Arbeitskultur (7.2.2.1) werden auf einer Co+T-Agarplatte ausgestrichen und ca. 40 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nicht-lipophile Corynebakterien:

10 µL einer -20 °C Arbeitskulturs (7.2.2.1) werden auf einer Co-Agarplatte ausgestrichen und ca. 40 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

7.2.2.3. Markierung von Bakterien (Färbung mit DAPI)

10 µL einer Arbeitskulturs werden wie unter 7.2.2.2 beschrieben auf einer Agarplatte ausgestrichen und ca. 40 h inkubiert. Auf die Agarplatte werden 2 mL PBS gegeben, die Bakterien mit einem Drigalskispatel von der Agarplatte gelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wird 5 min bei einer RZB von 2900 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1 mL PBS/Ethanol (2:1) resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Thomakammer wird die gewünschte Bakterienmenge abgenommen und 5 min bei einer RZB von 2900 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 mL DAPI-Lösung pro 5×10^9 Bakterien aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur im Thermomixer bei 1000 RPM inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal in 1 mL PBS/Ethanol (2:1) gewaschen und mit PBS auf ein geeignetes Endvolumen verdünnt (Tab. 25).

Größe der HPTLC-Platte	Bakterienanzahl	Endvolumen
5 x 5 cm ²	$1,3 \times 10^9$	2,5 mL
10 x 10 cm ²	5×10^9	10 mL
10 x 20 cm ²	1×10^{10}	20 mL

Tab. 25: Einsatzmenge von Corynebakterien für Overlay Assays.

7.2.3. Gewinnung von humanen Corneozyten

Zunächst wird eine längliche Teflonschiene (Innenfläche 37,5 cm²) mit Hilfe von zwei verstellbaren Gummibändern auf der Innenseite des Oberarmes eines Probanden befestigt. Anschließend werden 6 mL Abspüllösung in die Schiene gegeben und 2,5 min mit einem teflonbeschichteten Spatel abgeschabt. Es werden zwei Areale abgeschabt, auf jedem Oberarm eins. Die Abspüllösung beider Areale wird in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt.

7.2.4. Kultivierung von Keratinozyten (Zellkultur)

7.2.4.1. HaCaT-Zellen

7.2.4.1.1. Kultivierung

Die Anzucht der HaCaT-Zellen erfolgt in DMEM-Nährmedium mit FCS bei 37 °C in 5 %iger CO₂ / 95 % Luftatmosphäre bei 90 % Luftfeuchtigkeit.

Zunächst wird die Zellzahl der HaCaT-Zelllösung bestimmt. Hierfür wird ein 10 µL Aliquot der Zelllösung mit 10 µL Trypanblau-Lösung (0,4 % in PBS) gemischt, in einer Neubauerzählkammer die lebenden Zellen ausgezählt und die Zellzahl berechnet. Tote Zellen werden von Trypanblau vollständig gefärbt, während lebende Zellen für Trypanblau impermeabel sind. Die Gesamtzellzahl errechnet sich aus:

$$\text{Zellzahl aus 16 Kleinquadraten} \times 2 \text{ (= Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 / 1 \text{ ml}$$

Die Zellsuspension wird mit DMEM-Medium auf ein geeignetes Volumen verdünnt und ausgesät (Tab. 26).

Zellkulturflasche	DMEM-Medium	Zellzahl beim Aussähen
25 cm ²	5 mL	5 x 10 ⁴ bis 5 x 10 ⁵
75 cm ²	15 mL	5 x 10 ⁵ bis 5 x 10 ⁶

Tab. 26: Kultivierung von HaCaT-Zellen.

Das Medium wird 2 bis 3 mal pro Woche durch frisches, auf Raumtemperatur vorgewärmtes Medium ersetzt. Sobald die Zellen zu 90 % konfluent sind, werden sie passagiert. Die Zellen werden, je nach Wachstumszeit und abhängig von der ausgesäten Zellzahl, alle 2 bis 7 Tage gesplittet.

7.2.4.1.2. Passagieren

Nach Erreichen einer 90 %igen Konfluenz werden die Zellen gesplittet. Wird mit dem Passagieren gewartet, bis die Zellen vollständig konfluent sind, können die untersten Keratinozyten absterben oder ausdifferenzieren.

Zunächst wird das Medium abgesaugt. Die Zellen werden wenige Sekunden (max. ½ min!) mit Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen, um tote bzw. nicht adhärente Zellen zu entfernen.

Zellkulturflasche	Trypsin-EDTA-Lösung
25 cm ²	1 mL
75 cm ²	3 mL

Tab. 27: Passagieren von HaCaT-Zellen (Trypsinierung).

Nach erneuter Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung (Tab. 27) erfolgt eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank, um die adhärent wachsenden Zellen vom Kulturgefäßboden zu lösen.

Nach mikroskopischer Überprüfung (die Zellen haben sich abgerundet) wird die Trypsinierung durch Zugabe von Stop-Lösung (PBS mit FCS und Penicillin-Streptomycin) beendet (Tab. 28).

Zellkulturflasche	Stop-Lösung
25 cm ²	6 mL
75 cm ²	15 mL

Tab. 28: Passagieren von HaCaT-Zellen (Ende der Trypsinierung).

Die Zellen werden vorsichtig mit der Pipette suspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturflasche wird mit Stop-Lösung ausgespült (Tab. 29) und diese mit der Zellsuspension vereint.

Zellkulturflasche	Stop-Lösung zum Nachspülen
25 cm ²	3 mL
75 cm ²	5 mL

Tab. 29: Passagieren von HaCaT-Zellen (Waschen der Zellen nach Trypsinierung).

Die Zentrifugation der Zellen erfolgt für 10 min bei einer RZB von 400 x g und 4°C. Die Zellen werden einmal mit Stop-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 1 mL DMEM-Nährmedium aufgenommen und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt (7.2.4.1.1 Kultivierung). Die gewünschte Zellzahl wird abgenommen und in eine neue Zellkulturflasche gegeben (Zellzahl beim

Aussähen siehe 7.2.4.1.1 Kultivierung). Anschließend wird mit DMEM-Nährmedium auf 5 mL bzw. 15 mL, je nach Größe der Zellkulturflasche, aufgefüllt.

7.2.4.1.3. Einfrieren

HaCaT-Zellen können in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Vor dem Aussäen der Zellsuspension in neue Kulturschalen wird ein Aliquot abgenommen und für 10 min bei einer RZB von 400 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellzahl sollte dabei zwischen 1-5 x 10⁶ Zellen liegen. Das Pellet wird in 1 mL Culture Freezing Medium DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen für 30 min bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Anschließend wird die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff gelagert.

7.2.4.1.4. Auftauen

Das Auftauen der Zellen sollte so schnell wie möglich erfolgen. Hierzu werden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und in ein 37 °C Wasserbad überführt. Nach Beenden des Auftauvorganges wird durch Zugabe von DMEM-Nährmedium die gewünschte Zellzahl pro mL eingestellt und die Zellen ausgesät. Um die Zellen vom DMSO zu befreien, sollte bereits am nächsten Tag, wenn die Keratinozyten angewachsen sind, das Medium durch frisches ersetzt werden.

7.2.4.2. Humane Keratinozyten

7.2.4.2.1. Isolierung epidermaler Keratinozyten

Die folgenden Arbeiten werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Pipetten und Einmalwaren sowie Lösungen und Medien müssen steril sein und TC (TissueCulture) - Qualität haben. Das Präparationsbesteck (Schere und Pinzette) wird bis zum Gebrauch in reinem Ethanol gelagert und nach den einzelnen Arbeitsschritten mit Ethanol 70 % eingesprüht.

Die groben Präparationsschritte und das Abtrennen der Epidermis von der Dermis erfolgen in zwei 10 cm Petrischalen, die jeweils mit 13 mL PBS gefüllt sind. Sämtliche Inkubationsschritte sowie das Vereinzeln der Zellen erfolgen in einer 6-Well-Zellkulturplatte, diese wird wie in Abb. 64 dargestellt vorbereitet.

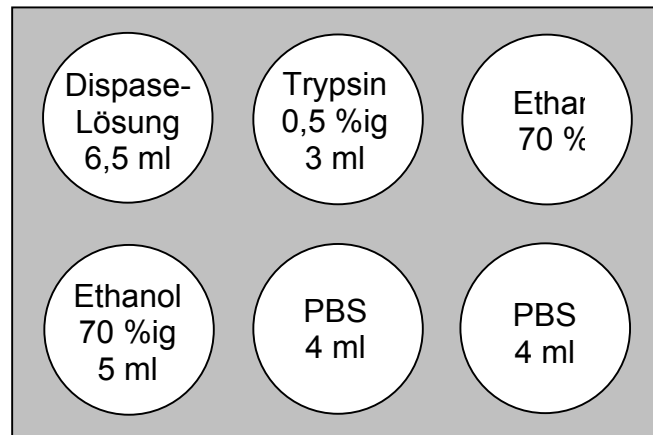


Abb. 64: Vorbereitung einer 6-Well-Zellkulturplatte für die Zellisolierung.

Zur Aufarbeitung wird die Biopsie in die erste 10 cm Petrischale gegeben, welche mit 13 mL PBS gefüllt ist. Zunächst werden Fettgewebe und Dermisanteile mit dem Präparationsbesteck (Schere und Pinzette) weitestgehend entfernt, anschließend wird die Biopsie in etwa 5 x 5 mm große Stücke geschnitten. Für eine oberflächliche Entkeimung werden die präparierten Stücke kurz in 70%igen Ethanol (6-Well-Platte) getaucht und danach in PBS (6-Well-Platte) zwischengelagert.

7.2.4.2.1.1. *Dispase-Verdau*

Die Biopsiestücke werden aus dem PBS in 6,5 mL Dispase (> 1,8 Units/ml, 6-Well-Platte) überführt und 2 h bei 37°C in 5 %iger CO₂ / 95 % Luftatmosphäre bei 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zuvor werden die Wells mit dem 70 %igen Ethanol und dem benutzten PBS abgesaugt.

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Hautstücke zur weiteren Präparation in die zweite Petrischale (mit 13 mL PBS) überführt. Die Epidermis wird mit Hilfe einer spitzen Pinzette und einer Pasteurpipette von der Dermis abgetrennt. Hierfür wird die Dermis mit der Pasteurpipette am Petrischalenboden fixiert und die Epidermis vorsichtig mit der Pinzette abgezogen. Die Dermis wird verworfen und die Epidermis in PBS (6-Well-Platte) zwischengelagert.

7.2.4.2.1.2. Trypsin-Verdau

Für die Zellisolierung werden die Epidermisstücke aus dem PBS in 3 mL 0,5 %ige Trypsin-Lösung (~ 30 Units/ml, 6-Well-Platte) überführt und für 5 bis 10 min bei 37°C in 5 %iger CO₂ / 95 % Luftatmosphäre bei 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Sobald sich die ersten Basalzellen als Schleier von der Epidermis lösen (nur diese Schicht der Keratinozyten ist zur Zellteilung befähigt), werden die Zellen vereinzelt. Hierzu wird die Trypsin-Lösung mit einer gestopften Pasteurpipette eingesogen und vorsichtig an den Epidermisstücken vorbei gespült. Dabei ist es vorteilhaft, die Epidermisstücke gleichzeitig mit der schräg gehaltenen Pasteurpipette am Boden des Wells zu fixieren und die Trypsin-Lösung unmittelbar an den Zellen vorbeizuspülen. Desweiteren werden die Epidermisstücke in die Pasteurpipette hineingesaugt und wieder hinausgespült.

Nach der Vereinzellung der Zellen wird der Trypsin-Verdau durch Zugabe von 5 mL Stop-Lösung (PBS mit FCS und Penicillin-Streptomycin) beendet. Die ungelöste Epidermis, bestehend aus Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum corneum, wird mit der Pasteurpipette aus der Suspension herausgefischt und in PBS (6-Well-Platte) entsorgt.

Die Zelllösung wird in ein 12 mL Zentrifugenröhrchen gegeben, das Well nochmals mit 3 mL Stop-Lösung gespült und die restlichen Zellen in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wird für 10 min bei 4°C und einer RZB von 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet mit 10 mL Stop-Lösung gewaschen und erneut bei 4°C und einer RZB von 400 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Keratinozyten in 1 mL KGM-Nährmedium aufgenommen.

7.2.4.2.1.3. Aussähen der isolierten Keratinozyten

Zunächst erfolgt die Bestimmung der Zellzahl (7.2.4.1.1. Kultivierung von HaCaT-Zellen). Die Zellsuspension wird mit KGM-Nährmedium auf ein geeignetes Volumen verdünnt und in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellzahl sollte bei ca. 3×10^5 Zellen pro Well liegen, das Endvolumen bei 2 mL pro Well.

7.2.4.2.2. Kultivierung

Die Anzucht der Keratinozyten erfolgt in 6-well Platten mit 2 mL KGM-Medium pro Well in einem Brutschrank bei 37°C in 5 %iger CO₂ / 95 % Luftatmosphäre bei 90 % Luftfeuchtigkeit.

Das Medium wird 2 bis 3 mal pro Woche durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt, wobei der erste Mediumwechsel frühestens 3 Tage nach dem Aus-säen erfolgen sollte. Sobald die Zellen zu 70–80 % konfluent sind, werden sie pass-agierte.

7.2.4.2.3. Passagieren

Nach Erreichen einer 70 bis 80 %igen Konfluenz werden die Zellen subkultiviert. Zu-nächst wird das Medium abgesaugt. Die Zellen werden zweimal je 2 min mit 3 mL PBS/Well und einmal wenige Sekunden (max. ½ min!) mit 500 µL Trypsin-EDTA-Lösung/Well gewaschen, um tote bzw. nicht adhärente Zellen zu entfernen.

Nach erneuter Zugabe von 500 µL Trypsin/EDTA-Lösung/Well wird für 5 min (max. 10 min!) bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die adhärent wachsenden Zellen vom Kulturgefäßboden zu lösen.

Nach mikroskopischer Überprüfung (die Zellen haben sich abgerundet) wird die Trypsinierung durch Zugabe von 1mL Stop-Lösung (PBS mit FCS und Penicillin-Streptomycin) beendet. Die Zellen werden vorsichtig mit der Pipette suspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Wells werden mit 500 µL Stop-Lösung aus-gespült und diese mit der Zellsuspension vereint.

Die Zentrifugation der Zellen erfolgt für 10 min bei einer RZB von 400 x g und 4°C. Die Zellen werden mit 9 mL Stop-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. An-schließend werden die Zellen in 1 mL KGM-Nährmedium aufgenommen und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt (7.2.4.2.1.3). Die Zellsuspension wird mit KGM-Medium auf ein geeignetes Volumen verdünnt und in eine 6-Well-Platte mit einer Zellzahl von ca. 2 x 10⁵ Zellen/Well ausgesät.

7.2.4.2.4. Einfrieren

Keratinocyten können in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Für das Einfrieren sollten nur schnell wachsende Keratinocyten verwendet werden. Die zum Einfrieren ausgewählten Kulturgefäße sollten nur zu etwa 50 % bewachsen sein.

Vor dem Aussäen der Zellsuspension in eine 6-Well-Platte, wird ein Aliquot abgenommen und wie unter 7.2.4.1.3. (Einfrieren von HaCaT-Zellen) beschrieben weiter behandelt.

7.2.4.2.5. Auftauen

Das Auftauen erfolgt wie unter 7.2.4.1.4. (Auftauen von HaCaT-Zellen) beschrieben. Nach dem Auftauvorgang wird jedoch nicht mit DMEM-Nährmedium, sondern mit KGM-Nährmedium die Zellzahl eingestellt und ausgesät.

7.2.5. Isolierung von Hautlipiden

7.2.5.1. Isolierung von Lipiden aus Corneozyten und Keratinocyten

Die Corneozyten werden wie in unter 7.2.3 beschrieben von einem Probanden gewonnen. Die Abspüllösung wird in einem Zentrifugenröhrchen aus Glas vereinigt. Die Corneozyten, die sich nach der Abschabung in der Extraktionslösung befinden, werden bei einer RZB von 6200 x g und 4°C 5 min abzentrifugiert.

Für die Gewinnung von Lipiden aus Keratinocyten werden die Zellen aus einer 75 cm² Zellkulturschale bzw. einer 6-Well-Platte verwendet. Das Ablösen der Zellen von der Schale erfolgt wie unter 7.2.4.1.2 (HaCaT-Keratinocyten) bzw. 7.2.4.2.3 (primäre Keratinocyten) beschrieben. Die Zellen werden nach Zugabe der Stop-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen aus Glas überführt. Nach dem Abzentrifugieren der Stop-Lösung werden die Zellen nicht in Nährmedium aufgenommen, sondern wie im nächsten Absatz beschrieben weiterbehandelt.

Die Corneozyten bzw. Keratinocyten werden in 2 mL Aceton / Ethanol (1:1) (v:v) suspendiert, um die Lipide zu extrahieren. Hierbei dürfen nur Zentrifugenröhrchen

aus Glas verwendet werden. Das Extraktionsmittel kann aus Kunststoffröhrchen Inhaltsstoffe herauslösen, die unter Umständen später auf der HPTLC-Platte mit detektiert werden!

Die Suspension wird bei Raumtemperatur in einem Thermomixer bei 800 RPM für 15 min geschüttelt und anschließend bei einer RZB von 850 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Lösungsmittel mit den Lipiden wird mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und das Zellpellet noch zwei mal mit 2 mL Aceton/Ethanol wie oben beschrieben extrahiert. Die Lösungsmittel-extrakte der Corneozyten und Keratinozyten werden in je einem 10 mL Spitzkolben vereinigt, die zuvor bei 104 °C getrocknet und gewogen werden.

Die Lösungsmittel werden mittels Stickstoffstrom eingengt und der Rückstand zur Trockene gebracht. Der Lipidgehalt wird anschließend durch Differenzwägung ermittelt. Auf ein Trocknen des Kolbens bei 104°C im Trockenschrank vor dem zweiten Wägen wird verzichtet, um die empfindlichen Lipide nicht zu zersetzen. Der Rückstand wird in Chloroform / Methanol (2:1) (v:v) aufgenommen, die Lipid-Endkonzentration der Lösung wird auf 10 bis 25 µg/µL eingestellt.

7.2.5.2. Gewinnung von Lipiden direkt von der Hautoberfläche

Auf die Innenseite des Oberarmes eines Probanden wird ein länglicher Teflontrichter (37,5 cm² Innendurchmesser) aufgesetzt und befestigt. In diesen Trichter werden 6 mL Aceton / Ethanol (1:1, v/v) gegeben und 1 min lang zum Abspülen der Lipide mit einer Eppendorfpipette ein- und ausgesogen. Es werden insgesamt 4 Areale abgespült, auf jedem Oberarm 2. Die Lipidlösung wird zentrifugiert, um abgespülte Corneozyten zu entfernen. Die Lipidlösung aller Areale wird in einem zuvor getrockneten und gewogenen 10 mL Spitzkolben vereinigt. Das Lösungsmittel wird mittels Stickstoffstrom eingengt und der Rückstand zur Trockene gebracht. Der Lipidgehalt wird anschließend durch Differenzwägung ermittelt. Der Rückstand wird in Chloroform / Methanol (2:1, v/v) aufgenommen, die Lipidkonzentration der Lösung wird auf 10 bis 25 µg/µL eingestellt.

7.2.6. Mikroskopische Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an das Stratum corneum

Die Epidermis wird aus humanen Hautbiopsien isoliert (siehe 7.2.4.2.1 Isolierung epidermaler Keratinozyten bis einschließlich 7.2.4.2.1.1. Dispase-Verdau). Um die Bindungsaffinität von Corynebakterien an Haut zu untersuchen, ist es nicht möglich, die komplette Epidermis zu mikroskopieren, da sie nicht transparent genug ist. Aus diesem Grund wird das Stratum corneum zunächst durch einen Trypsin-Verdau (7.2.4.2.1.2.) von den lebenden Keratinozyten abgetrennt.

Das Entfernen der Keratinozyten erfolgt mit einer Pasteurpipette, in die Trypsin-Lösung eingesogen und am Stratum corneum vorbei gespült wird. Dabei gilt es zu verhindern, dass sich das Stratum corneum zusammenrollt bzw. zusammenklebt, da es beim Entrollen leicht einreißt. Aus diesem Grund wird es mit einer Pinzette während des Abspülens der Keratinozyten fest am Boden der Petrischale fixiert.

Zur Überprüfung, welche Seite des Stratum corneums die Oberseite bzw. die ehemals der Umwelt zugewandte Seite ist, wird es in PBS-Puffer überführt. Zeigt das Stratum corneum mit dieser sehr hydrophoben Seite nach unten, klappte es bei Berührung der PBS Oberfläche zusammen. Bei richtiger Lage breitete sich das Stratum corneum auf der PBS Oberfläche aus.

Für das Mikroskopieren wird das Stratum corneum auf einem Objektträger ausgebreitet. Damit es bei der folgenden Überschichtung nicht wegschwimmt, wird es zunächst luftgetrocknet. Durch vorsichtiges Entfernen des PBS-Puffers mit Zellstoff kann der Trocknungsvorgang beschleunigt werden. Eine Hitzefixierung darf zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattfinden, da hierdurch die nachfolgende Adhäsion von Corynebakterien möglicherweise beeinflusst wird. Anschließend wird das Stratum corneum mit einem Fettstift umrandet, um das Zerlaufen der Lösungen beim Überschichten zu verhindern.

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wird das Stratum corneum zunächst für 2 h mit einer 2 %igen BSA-Lösung in PBS überschichtet. Nach dem Entfernen des BSA mittels einer Pipette und Zellstoff wird das Stratum corneum erneut luftgetrocknet. Wird hier auf das Trocknen verzichtet, kann es beim folgenden Überschichtungsvorgang zum Ablösen des Stratum corneums vom Objektträger kommen. Anschließend wird mit einer Bakteriensuspension von ca. 1×10^6 Bakterien/mL in PBS für 2 h überschichtet.

Nach der Adhäsion der Bakterien wird der Objektträger zum Waschen 3 x vorsichtig in PBS geschwenkt und nach Trocknung zur Hitzefixierung 2 x durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen. Dadurch wird die Zellwand der Bakterien für Farbstoffe zugänglich. Das Stratum corneum wird 2 min in Kristallviolett gefärbt und mehrfach in dest. H₂O gespült. Anschließend wird ein Tropfen dest. H₂O auf das Stratum corneum gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und mikroskopiert.

7.2.7. Nachweismethode für die Adhäsion von Bakterien an immobilisierte Ganglioside und Lipide durch HPTLC

7.2.7.1. Auftragen von Gangliosiden und Lipiden auf HPTLC-Platten

Als stationäre Phase werden Kieselgel-Fertigplatten aus Glas verwendet. Für die Untersuchung der Ganglioside werden Kieselgel 60-Platten von der Firma Merck bezogen, die Untersuchung der Lipide wird mit Kieselgel Nano-Durasil-20-Platten der Firma Macherey und Nagel durchgeführt.

Gearbeitet wird je nach Untersuchung mit 5 x 5 cm², 10 x 10 cm² und 10 x 20 cm² HPTLC-Platten, dafür werden 10 x 20 cm² Platten je nach Bedarf mit einem Schneidegerät zerteilt.

Zur Entfettung und Reinigung werden die Kieselgelplatten zunächst in eine DC-Kammer gestellt, die 0,5 cm hoch mit Diethylether gefüllt ist. Das Fließmittel zieht hydrophobe Verunreinigungen mit der Fließmittelfront zur oberen Kante der Platten. Anschließend werden die Platten an der Luft getrocknet.

Die Proben werden mit dem DC-Probenautomat III von CAMAG in schmalen Banden von 5 mm innerhalb einer Reihe, 1 cm vom unteren Rand der Kieselgelplatten entfernt, aufgetragen.

Für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten können mehrere Proben- bzw. Standardreihen nebeneinander aufgetragen werden, da die HPTLC-Platten für diese Untersuchung nicht entwickelt werden (7.2.7.2). Es werden insgesamt 9 Reihen mit jeweils 9 Banden á 5 mm in einem Abstand von 9 mm aufgetragen (Abb. 65).

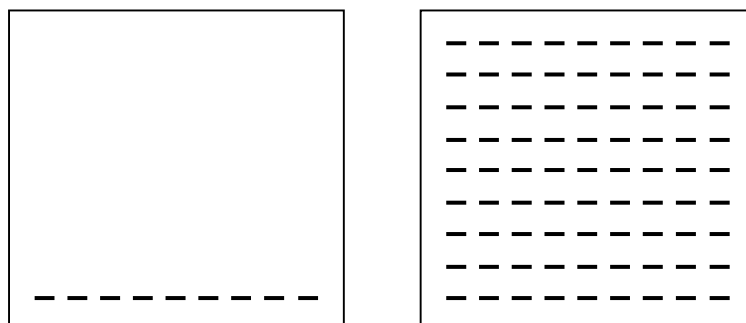


Abb. 65: Auftrageschema für Untersuchungen mit Entwicklung (links) und ohne Entwicklung (rechts) der HPTLC-Platte.

7.2.7.2. Dünnschichtchromatographie

Die HPTLC-Platten werden zur Auftrennung der Analyte nacheinander mit dem unteren Rand (ca. 0,5 cm) in verschiedene Fließmittel gestellt (entwickelt). Zuvor wird die Entwicklungskammer zur besseren Absättigung der Dampfphase mit Papierstreifen versehen mit dem Fließmittel gefüllt mindestens 10 min stehen gelassen. Während der Entwicklung wird die Kammer mit Parafilm verschlossen.

Nr.	Fließmittel	Zusammensetzung	Laufstrecke
1	Chloroform / Methanol / 2 % CaCl ₂ -Lsg. in H ₂ O	80 : 40 : 7, v/v/v	4 cm
2	Chloroform / Ethanol / 2 % CaCl ₂ -Lsg. in H ₂ O	90 : 20 : 1, v/v/v	5 cm

Tab. 30: Mobile Phase für Ganglioside.

Nr.	Fließmittel	Zusammensetzung	Laufstrecke
1	Chloroform / Methanol / Eisessig	95 : 15 : 5, v/v/v	1 cm
2	Isooctan / Diethylether / Eisessig	80 : 20 : 7, v/v/v	3,5 cm
3	Petroleumbenzin	100 %ig	6 cm

Tab. 31: Mobile Phase für Lipide.

Die HPTLC-Platten bleiben so lange in den Fließmitteln stehen, bis die Fließmittelfront das Ende der markierten Laufstrecke erreicht hat. Nach der Entwicklung werden die Platten luftgetrocknet.

7.2.7.3. Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen

Untersuchung der Ganglioside:

Die entwickelte HPTLC-Platte (bzw. ohne Entwicklung bei der Untersuchung der Bindungsaffinität) wird 1 min in 0,5 %ige Plexigum-Lösung getaucht und anschließend luftgetrocknet. Anschließend wird die HPTLC-Platte für zwei Stunden in 2 %iger BSA-Lösung geschwenkt, um unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Die BSA-Lösung wird erst unmittelbar vor dem Überschichten mit Bakterien abgegossen, weil die Platte zwischendurch nicht trocknen darf.

Untersuchung der Lipide:

Die entwickelte HPTLC-Platte (bzw. ohne Entwicklung bei der Untersuchung der Bindungsaffinität) wird für zwei Stunden in 2 %iger BSA-Lösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die BSA-Lösung wird erst unmittelbar vor dem Überschichten mit Bakterien abgegossen, weil die Platte zwischendurch nicht trocknen darf.

7.2.7.4. HPTLC-Overlay Assay mit DAPI markierten Bakterien

Zunächst werden die Bakterien, wie unter 7.2.3. beschrieben, mit DAPI markiert. Die HPTLC-Platte wird auf den Siebeinsatz einer feuchten Kammer gelegt. Anschließend wird die Bakteriensuspension mit einer Pipette auf die HPTLC-Platte aufgebracht. Für eine 10 x 10 cm² große Platte werden 10 mL Bakteriensuspension mit 5×10^9 Bakterien verwendet (7.2.2.3. Markierung von Bakterien, Tab. 25).

Die feuchte Kammer wird verschlossen und die überschichtete HPTLC-Platte für zwei Stunden zum Adhären der Bakterien stehen gelassen. Anschließend wird die Platte dreimal für 1 min in PBS geschwenkt, um die nicht gebundenen Bakterien zu entfernen.

Die Lipidbanden, an die sich DAPI-gefärbte Bakterien angelagert haben, werden durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 nm (UV-Handlampe) zum Fluoreszieren angeregt und können mit der gefärbten Kontrollplatte verglichen werden. Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe eines Videosystems.

7.2.7.5. Chromatographische Färbeverfahren

7.2.7.5.1. Kupfersulfat-Färbung

Die HPTLC-Platte wird 10 sec in die Kupfersulfat-Färbelösung getaucht und anschließend 15 min bei 180°C im Trockenschrank inkubiert.

Die aufgetragenen Ganglioside / Lipide werden zu braunen Flecken verascht.

7.2.7.5.2. Anisaldehyd-Färbung

Die HPTLC-Platte wird 1 sec in die Anisaldehyd-Lösung getaucht und anschließend 1 bis 15 min auf 90 bis 125°C erhitzt.

Es resultieren auf fast farblosem Untergrund unterschiedlich gefärbte Chromatogramm-Zonen, die häufig im langwelligen UV-Licht (365 nm) fluoreszieren. Glykolipide färben sich grün oder blaugrün.

Bei zu langem Erhitzen färbt sich der Untergrund rötlich; durch Einwirkung von Wasserdampf kann er wieder entfärbt werden.

7.2.8. Untersuchung der bakteriellen Adhäsion mit dem optischen Biosensor IAsys plus

7.2.8.1. Bakterienaufarbeitung

10 µL einer Arbeitskultur werden wie unter 7.2.2.2 beschrieben auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Auf die Agarplatte werden 2 mL PBS gegeben, die Bakterien mit einem Drigalskispatel von der Agarplatte gelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wird 5 min bei einer RZB von 2900 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1 mL PBS/T resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Thomakammer werden 2×10^{10} Bakterien abgenommen und auf 1 mL mit PBS/T verdünnt. Von dieser Lösung wird eine 1:10 Verdünnung (2×10^9 Bakterien) hergestellt.

7.2.8.2. Immobilisierung des NeutrAvidins™

Für die folgenden Untersuchungen wird das IAsys plus auf eine Temperatur von 22 °C, auf eine Rührerfrequenz von 85 und eine Datenaufzeichnungsrate von 1 sec pro Datenpunkt eingestellt.

- Zunächst wird eine neue Biotinküvette in das IAsys plus eingespannt. Es wird 5 x mit 40 µL PBS/T gewaschen und 10 min equilibriert.
- Die Datenerfassung wird gestartet und 3 min die Basislinie aufgezeichnet.
- Es werden 20 µL NeutrAvidin™ [2 mg/mL] zu dem PBS/T in die Küvette gegeben und zum Binden 10 min in der Küvette gelassen.
- Es wird 9 x mit 60 µL PBS/T gewaschen und 2 min die Basislinie aufgezeichnet.
- Zum Ablösen von nicht richtig gebundenem NeutrAvidin™ wird insgesamt dreimal mit 5 x 40 µL Glycin/HCl (pH = 3) gewaschen, danach jeweils 5 x mit 40 µL PBS/T.
- Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Bindung des NeutrAvidins™ werden 2 x 40 µL BSA [0,2 mg/mL in PBS] in die Küvette gegeben. Anschließend wird mit 5 x 40 µL PBS/T gewaschen.

Für die Berechnung der Zunahme des Resonanzwinkels durch die Immobilisierung des NeutrAvidins™ wird der Resonanzwinkel der Basislinie mit PBS/T von dem Resonanzwinkel nach dem letzten Waschschrift mit PBS/T subtrahiert.

Die Empfindlichkeit der Biotinküvette ist 600 arcsec pro ng/mm². Dieser Wert wird für die Berechnung des immobilisierten Proteins benötigt. Zweikanal IAsys Küvetten haben eine Sensorfläche von 4 mm². Damit wird das insgesamt immobilisierte Protein berechnet.

7.2.8.3. Bindung von biotinylierten Liganden

Nach der Beschichtung mit NeutrAvidin™ wird eine biotinylierte Substanz auf die NeutrAvidin™-Oberfläche gebunden.

Zu den untersuchten Substanzen gehören der biotinylierte Glykocluster N12, biotinylierte Mannose und biotinylierte Mannose-6-Phosphat. Diese Substanzen sind in PBS-Puffer löslich.

Ebenfalls untersucht wurden die Substanzen KS-IV-145 (biotinyliertes Methyl- α -Mannosid) und KS-IV-153 (biotinyliertes Methyl- α -Mannosid mit einer C₁₅ Lipid-Seitenkette), die in PBS/T-Puffer unlöslich sind und in Methanol gelöst für den Assay eingesetzt werden müssen. Dies hat keinen Einfluss auf die NeutrAvidin™-Oberfläche, solange eine Bindungszeit von ca. 5 min nicht überschritten wird.

biotinylierte Substanz	Konzentration	Einsatzmenge
Glykocluster N12	2 mg/mL in PBS	1 x 40 μ L
Mannose	2 mg/mL in PBS	+ 10 μ L auf 40 μ L PBS/T
Mannose-6-Phosphat	2 mg/mL in PBS	+ 10 μ L auf 40 μ L PBS/T
KS-IV-145	10 mg/mL in MeOH	+ 10 μ L auf 40 μ L PBS/T + 20 μ L auf 40 μ L PBS/T
KS-IV-153	10 mg/mL in MeOH	+ 10 μ L auf 40 μ L PBS/T + 20 μ L auf 40 μ L PBS/T

Tab. 32: Untersuchung biotinylierter Substanzen

Die biotinylierten Substanzen werden in PBS bzw. MeOH gelöst (Konzentrationen siehe Tab. 32) und in vorbehandelte Küvetten (7.2.8.3.) gegeben. Die eingesetzten Mengen der Lösungen befinden sich in Tab. 32. Nach ca. 10 min wird 3 x mit 60 μ L PBS/T und 2 x mit 40 μ L PBS/T gespült. Die Differenz zwischen der Pufferlinie vor und nach der Zugabe der biotinylierten Substanzen entspricht deren Bindung.

7.2.8.4. Adhäsion von Corynebakterien

In die Küvette werden zu den vorgelegten 40 μ L PBS/T 10 μ L Bakteriensuspension zugegeben, d.h. die Konzentration an Bakterien in der Küvette ist um zwei Zehnerpotenzen niedriger als die der eingesetzten Bakteriensuspension. Nach ca. 30 min bis 1 h wird mit 3 x 60 μ L PBS/T, 5 x 40 μ L Glycin/HCl und 5 x 40 μ L PBS/T gewaschen.

Für den Overlay Assay werden 5×10^9 Bakterien suspendiert in 10 mL PBS auf eine HPTLC-Platte von 100 cm² gegeben. Auf die Küvetten-Oberfläche von 4 mm² umgerechnet entspricht das einer Bakterienkonzentration von 2×10^6 . In die Küvette des IAsys plus müssten demnach 10 μ L einer Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 2×10^8 Bakterien/mL eingesetzt werden.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigten 2×10^6 Bakterien nur eine geringe Änderung der Response. Aus diesem Grund wurde die Konzentration erhöht, um sicher zu gehen, dass ein Überschuss an Bakterien eingesetzt wurde.

Für die Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien an NeutrAvidin™ wurden 2×10^8 Bakterien in der Küvette eingesetzt, d. h. es wurden 10 µL der Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 2×10^{10} Bakterien/mL in die Küvette zugegeben.

7.2.8.5. Regeneration der Biotinküvette

Es ist möglich, eine Biotinküvette mehrfach zu verwenden. Hierfür muss der gebundene NeutrAvidin™-Ligand von der Oberfläche wieder entfernt werden. Für diese Totalregeneration muss die Biotinküvette zunächst aus dem Gerät entfernt werden. Die Küvetten-Oberfläche wird 2 min mit 50 µL gesättigter Kaliumhydroxidlösung behandelt und anschließend schnell 8 mal mit 100 µL dest. Wasser gründlich gewaschen, bis alle Spuren der Kaliumhydroxidlösung entfernt sind (Überprüfung mit pH-Papier).

7.3. Tabellen

7.3.1. Untersuchung der Bindungsaffinität von C. group G (86) an verschiedene Ganglioside

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte aus n = 3					
Standards	250 ng	500 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Asialo GM1	0,4296	0,522	0,8407	nicht getestet	nicht getestet
Asialo GM2	0,2412	0,3625	0,8847	nicht getestet	nicht getestet
Disialo GD1a	0,1086	0,4808	1,6904	nicht getestet	nicht getestet
Disialo GD1b	0,4383	0,8654	2,6390	nicht getestet	nicht getestet
Disialo GD2	0,3996	0,4835	1,1617	nicht getestet	nicht getestet
Disialo GD3	0,1702	0,2105	0,6662	nicht getestet	nicht getestet
Monosialo GM1	0,3333	0,8282	2,9385	nicht getestet	nicht getestet
Monosialo GM2	0,3787	1,4514	3,1669	nicht getestet	nicht getestet
Monosialo GM3	0,0932	0,2595	0,8106	nicht getestet	nicht getestet
Globosid	-	-	0,2337	0,2168	0,4981
Glucocerebrosid	-	-	0,1699	0,3996	0,7646
Lactocerebrosid	-	-	0,3876	0,6140	0,9961

7.3.2. Untersuchung des Einflusses der Wachstumsphase von Bakterien auf den Overlay-Assay

Standard, 2 µg	Platte, 48 h, [IntOD]	Platte, 24 h, [IntOD]	Flüssigkultur, 24 h, [IntOD]	Flüssigkultur, 3,5 h, [IntOD]
Pentacosan	1,9296	1,8391	1,9296	1,5487
Sqalen	0,6237	0,7287	0,6237	0,8056
Triolein	0,6200	0,6309	0,6200	0,6661
Palmitinsäure	0,1082	0,1191	0,1082	0,1562
Cholesterol	0,3582	0,3050	0,3582	0,6261
Cholesteryl-oleat	1,6974	1,5868	1,6974	1,4117
Cholesterol-3-sulfat	2,9758	2,6687	2,9758	2,4526
Ceramid III	0,5128	0,4083	0,5128	0,5134
Ceramid IV	0,8129	0,7802	0,8129	0,5682

Standard, 4 µg	Platte, 48 h, [IntOD]	Platte, 24 h, [IntOD]	Flüssigkultur, 24 h, [IntOD]	Flüssigkultur, 3,5 h, [IntOD]
Pentacosan	2,5469	2,1339	2,5469	1,6658
Squalen	1,4982	1,3847	1,4982	1,1946
Triolein	1,3610	1,2285	1,3610	1,1777
Palmitinsäure	0,5245	0,5037	0,5245	0,5717
Cholesterol	1,0307	1,1176	1,0307	2,0315
Cholesteryl-oleat	2,9616	1,9662	2,9616	1,9086
Cholesterol-3-sulfat	4,7472	3,3445	4,7472	2,1688
Ceramid III	1,2638	0,8904	1,2638	0,8299
Ceramid IV	1,6702	1,4563	1,6702	0,7739

7.3.3. Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien zu Hautlipiden

7.3.3.1. Bindungsaffinität von C. group G (45) zu Hautlipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (45)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	0,0475	0,0464	0,1377	0,2296
Ceramid III	-	0,0496	0,0516	0,0999	0,1966
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0745	0,1599	0,3916	0,7738
Cholesteryl-oleat	-	0,0960	0,1436	0,3366	0,5775
Cholesterol	-	0,0637	0,0554	0,0932	0,1144
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	-	0,0270	0,0471	0,0943
Squalen	-	-	-	0,0486	0,0941
Pentacosane	0,0421	0,1151	0,2249	0,4640	0,7344

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (45)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,4101	0,5396	0,9354	1,3215
Ceramid III	0,2925	0,3596	0,7217	1,1658
Cholesterol-3-sulfat	1,2285	1,5755	2,4028	3,1047
Cholesteryl-oleat	0,8261	0,9915	1,5636	2,0484
Cholesterol	0,1571	0,2027	0,4018	0,7869
Palmitinsäure	0,0602	0,0694	0,1634	0,4752
Triolein	0,1325	0,2056	0,5163	0,9315
Squalen	0,1272	0,1804	0,4364	0,8302
Pentacosane	0,9301	1,0778	1,4794	1,8209

Standardabweichung, C. group G (45)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	0,0083	0,0114	0,0518	0,0557
Ceramid III	-	0,0064	0,0051	0,0242	0,0705
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0211	0,0435	0,0847	0,1570
Cholesteryl-oleat	-	0,0208	0,0204	0,0540	0,0851
Cholesterol	-	0,0157	0,0053	0,0216	0,0232
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	-	0,0023	0,0062	0,0139
Squalen	-	-	-	0,0082	0,0179
Pentacosane	0,00535	0,0437	0,0681	0,0640	0,0701

Standardabweichung, C. group G (45)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,1003	0,1290	0,1473	0,2181
Ceramid III	0,0699	0,0792	0,1420	0,1738
Cholesterol-3-sulfat	0,1849	0,1892	0,3302	0,4525
Cholesteryl-oleat	0,1201	0,1085	0,1545	0,1665
Cholesterol	0,0194	0,0342	0,0527	0,0945
Palmitinsäure	0,0000	0,0012	0,0415	0,0689
Triolein	0,0211	0,0240	0,0729	0,0682
Squalen	0,0204	0,0291	0,0266	0,0635
Pentacosane	0,0665	0,1176	0,2012	0,3033

7.3.3.2. Bindungsaffinität von C. group G (48) zu Hautlipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (48)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	0,0343	0,0516	0,0773	0,1464
Ceramid III	-	0,0472	0,0531	0,0707	0,1285
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0562	0,0740	0,2303	0,5097
Cholesteryl-oleat	-	0,0519	0,0649	0,1713	0,3392
Cholesterol	-	-	0,0539	0,0650	0,0734
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	-	-	0,0269	0,0582
Squalen	-	-	-	0,0402	0,0640
Pentacosane	0,0762	0,1040	0,1948	0,3721	0,5380

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (48)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,2472	0,3902	0,6440	0,9995
Ceramid III	0,1950	0,2761	0,5379	0,9346
Cholesterol-3-sulfat	0,8122	1,0859	1,7419	2,3331
Cholesteryl-oleat	0,5433	0,7111	1,1541	1,6648
Cholesterol	0,1063	0,1456	0,2821	0,5799
Palmitinsäure	0,0342	0,0476	0,1464	0,4508
Triolein	0,0923	0,1428	0,3737	0,7565
Squalen	0,0874	0,1238	0,2896	0,5991
Pentacosane	0,6872	0,8262	1,1083	1,4005

Standardabweichung, C. group G (48)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	0,0143	0,0269	0,0196	0,0225
Ceramid III	-	0,0169	0,0104	0,0090	0,0134
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0206	0,0117	0,0507	0,1023
Cholesteryl-oleat	-	0,0184	0,0166	0,0190	0,0406
Cholesterol	-	-	0,0079	0,0254	0,0126
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	-	-	0,0074	0,0101
Squalen	-	-	-	0,0210	0,0126
Pentacosane	-	0,0331	0,0693	0,0892	0,1335

Standardabweichung, C. group G (48)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,0611	0,1167	0,1350	0,2139
Ceramid III	0,0229	0,0389	0,0689	0,1616
Cholesterol-3-sulfat	0,1848	0,2033	0,2931	0,3466
Cholesteryl-oleat	0,0796	0,1164	0,1420	0,2525
Cholesterol	0,0112	0,0184	0,0205	0,0484
Palmitinsäure	0,0036	0,0080	0,0115	0,0333
Triolein	0,0168	0,0106	0,0378	0,0557
Squalen	0,0155	0,0161	0,0371	0,0951
Pentacosane	0,1621	0,1601	0,2215	0,2425

7.3.3.3. Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) zu Hautlipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	-	-	0,0569	0,0965
Ceramid III	-	-	-	0,0611	0,0917
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0722	0,0661	0,1745	0,3469
Cholesteryl-oleat	-	0,0540	0,0706	0,1545	0,2585
Cholesterol	-	-	-	0,0518	0,0813
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	-	-	0,0361	0,0609
Squalen	-	-	-	0,0371	0,0599
Pentacosane	-	0,0680	0,1223	0,2515	0,3972

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,1339	0,1715	0,3089	0,4131
Ceramid III	0,1277	0,1616	0,3242	0,4508
Cholesterol-3-sulfat	0,5067	0,5696	0,8158	1,0644
Cholesteryl-oleat	0,3912	0,4695	0,6851	0,8811
Cholesterol	0,0933	0,1044	0,2073	0,4947
Palmitinsäure	-	0,0592	0,1090	0,3685
Triolein	0,0887	0,1149	0,2880	0,4343
Squalen	0,0824	0,1193	0,2285	0,4354
Pentacosane	0,4392	0,5284	0,6428	0,8429

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	-	-	0,0256	0,0354
Ceramid III	-	-	-	0,0168	0,0231
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0021	0,0209	0,0517	0,0634
Cholesteryl-oleat	-	0,0068	0,0128	0,0331	0,0474
Cholesterol	-	-	-	0,0102	0,0262
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	-	-	0,0061	0,0210
Squalen	-	-	-	0,0106	0,0126
Pentacosane	-	0,0174	0,0277	0,0440	0,0647

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,0266	0,0465	0,0793	0,1443
Ceramid III	0,0103	0,0223	0,1062	0,1134
Cholesterol-3-sulfat	0,1031	0,1043	0,2315	0,3377
Cholesteryl-oleat	0,0694	0,1023	0,2036	0,2513
Cholesterol	0,0372	0,0294	0,0636	0,2113
Palmitinsäure	-	0,0190	0,0335	0,1607
Triolein	0,0345	0,0422	0,0994	0,1421
Squalen	0,0235	0,0433	0,0979	0,1403
Pentacosane	0,0669	0,0787	0,1314	0,2970

7.3.3.4. Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (96) zu Hautlipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (96)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	0,0536	0,0605	0,0781	0,1445
Ceramid III	-	-	0,0640	0,0748	0,1421
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0767	0,1014	0,2740	0,5095
Cholesteryl-oleat	-	0,0850	0,1051	0,2217	0,3907
Cholesterol	-	0,0492	0,0581	0,0710	0,0974
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	-	-	0,0427	0,0732
Squalen	-	-	-	0,0384	0,0658
Pentacosane	-	0,1052	0,1911	0,3608	0,4995

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (96)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,2499	0,3567	0,5804	0,7840
Ceramid III	0,1960	0,2434	0,4716	0,7454
Cholesterol-3-sulfat	0,8330	1,0097	1,4020	1,8802
Cholesteryl-oleat	0,5958	0,7194	1,0272	1,3705
Cholesterol	0,1165	0,1712	0,3102	0,6499
Palmitinsäure	0,0551	0,0576	0,1575	0,4422
Triolein	0,1084	0,1514	0,3523	0,6647
Squalen	0,1080	0,1449	0,3372	0,5893
Pentacosane	0,6397	0,7681	0,9737	1,1731

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (96)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	0,0062	0,0128	0,0163	0,0285
Ceramid III	-	-	0,0278	0,0171	0,0318
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0252	0,0349	0,0722	0,1254
Cholesteryl-oleat	-	0,0202	0,0306	0,0628	0,1115
Cholesterol	-	0,0000	0,0146	0,0283	0,0160
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	-	-	0,0134	0,0257
Squalen	-	-	-	0,0110	0,0302
Pentacosane	-	0,0432	0,0636	0,1098	0,1294

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (96)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,0300	0,0400	0,0640	0,1006
Ceramid III	0,0298	0,0334	0,0907	0,0893
Cholesterol-3-sulfat	0,2009	0,2583	0,3634	0,4555
Cholesteryl-oleat	0,1444	0,2124	0,2684	0,4026
Cholesterol	0,0397	0,0512	0,0823	0,1267
Palmitinsäure	0,0133	0,0241	0,0851	0,1700
Triolein	0,0478	0,0632	0,1443	0,2045
Squalen	0,0542	0,0660	0,1359	0,2071
Pentacosane	0,2147	0,2839	0,3630	0,3588

7.3.3.5. Bindungsaffinität von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) zu Hautlipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	0,0433	0,0296	0,0929	0,1562
Ceramid III	-	-	0,0471	0,0765	0,1460
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0512	0,0950	0,2729	0,5142
Cholesteryl-oleat	-	0,0671	0,1134	0,2521	0,4054
Cholesterol	-	-	0,0443	0,0566	0,1043
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	0,0427	0,0373	0,0417	0,0795
Squalen	-	-	-	0,0419	0,0757
Pentacosane	-	0,0794	0,1558	0,3294	0,4735

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,2438	0,3170	0,5122	0,6660
Ceramid III	0,1942	0,2464	0,4258	0,6450
Cholesterol-3-sulfat	0,7670	0,9115	1,2586	1,4903
Cholesteryl-oleat	0,5320	0,6214	0,8362	1,0678
Cholesterol	0,1373	0,1709	0,3346	0,7071
Palmitinsäure	0,0465	0,0504	0,1268	0,3842
Triolein	0,1220	0,1714	0,3553	0,5895
Squalen	0,0992	0,1505	0,3000	0,4995
Pentacosane	0,5784	0,6435	0,8480	0,9881

Standardabweichung, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Ceramid IV	-	0,0092	0,0070	0,0250	0,0303
Ceramid III	-	-	0,0139	0,0213	0,0303
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0092	0,0137	0,0450	0,1026
Cholesteryl-oleat	-	0,0128	0,0160	0,0296	0,0623
Cholesterol	-	-	0,0000	0,0139	0,0346
Palmitinsäure	-	-	-	-	-
Triolein	-	0,0098	0,0111	0,0083	0,0238
Squalen	-	-	-	0,0100	0,0174
Pentacosane	-	0,0097	0,0264	0,0730	0,1117

Standardabweichung, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Ceramid IV	0,0565	0,0954	0,1903	0,2501
Ceramid III	0,0260	0,0530	0,1054	0,1807
Cholesterol-3-sulfat	0,1301	0,2304	0,4335	0,6607
Cholesteryl-oleat	0,1138	0,1508	0,2551	0,3687
Cholesterol	0,0324	0,0520	0,0892	0,2063
Palmitinsäure	0,0126	0,0123	0,0344	0,0915
Triolein	0,0321	0,0540	0,1171	0,1924
Squalen	0,0229	0,0324	0,0856	0,1720
Pentacosane	0,1636	0,1717	0,2929	0,4155

7.3.4. Untersuchung der Bindungsaffinität von Corynebakterien zu verschiedenen Lipidstandards

7.3.4.1. Erste Standardgruppe, Abb. 37

7.3.4.1.1. Bindungsaffinität von *C. group G* (45) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. group G</i> (45)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	0,05305	0,2770	0,3362	0,6637	0,9603
Cholesteryl-stearate	0,0485	0,1262	0,2824	0,5437	0,8434
Cholesteryl-n-Decylate	0,03815	0,0944	0,1673	0,2952	0,4692
Cholesteryl-acetat	-	0,0454	0,0646	0,1426	0,1965
Cholesteryl-formate	-	0,0546	0,0517	0,1021	0,1769
Behensäure	0,0357	0,0851	0,1358	0,3570	0,5941
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	-	-	0,0766	0,2424
Cholesterol	-	-	0,0477	0,0610	0,0897

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (45)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	1,2542	1,4632	2,1131	2,8144
Cholesteryl-stearate	1,1731	1,4000	1,9747	2,6917
Cholesteryl-n-Decylate	0,7219	0,8986	1,4076	1,9873
Cholesteryl-acetat	0,2701	0,3505	0,6110	1,0466
Cholesteryl-formate	0,2605	0,3304	0,6049	1,0278
Behensäure	0,9389	1,1349	1,6821	2,1676
Ölsäure	0,0187	0,0284	0,1222	0,3263
Stearinsäure	0,5035	0,6612	1,0584	1,5170
Cholesterol	0,1348	0,1767	0,3260	0,6256

Standardabweichung, C. group G (45)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	0,01045	0,2055	0,1044	0,1462	0,2365
Cholesteryl-stearate	0,01966	0,0418	0,0721	0,1252	0,1761
Cholesteryl-n-Decylate	0,00565	0,0185	0,0358	0,0682	0,1209
Cholesteryl-acetat	-	0,0051	0,0190	0,1016	0,0634
Cholesteryl-formate	-	0,0120	0,0141	0,0232	0,0687
Behensäure	-	0,0224	0,0303	0,0933	0,1284
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	-	-	0,0134	0,0829
Cholesterol	-	-	0,0022	0,0272	0,0452

Standardabweichung, C. group G (45)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	0,2614	0,3402	0,5311	0,6239
Cholesteryl-stearate	0,2287	0,3281	0,4774	0,7372
Cholesteryl-n-Decylate	0,1561	0,2197	0,3383	0,4721
Cholesteryl-acetat	0,0709	0,0946	0,1587	0,2450
Cholesteryl-formate	0,0926	0,1462	0,2418	0,3479
Behensäure	0,1293	0,1861	0,4150	0,4193
Ölsäure	0,0000	0,0104	0,0567	0,1544
Stearinsäure	0,1713	0,2343	0,3749	0,5897
Cholesterol	0,0685	0,0876	0,1553	0,2669

7.3.4.1.2. Bindungsaffinität von C. group G (48) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (48)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	0,0260	0,1580	0,3102	0,6367	0,9348
Cholesteryl-stearate	0,1267	0,1115	0,2617	0,5353	0,8165
Cholesteryl-n-Decylate	-	0,1005	0,1635	0,3111	0,4636
Cholesteryl-acetat	-	0,0714	0,0506	0,1066	0,1776
Cholesteryl-formate	-	0,0513	0,0537	0,0955	0,1547
Behensäure	-	0,0894	0,1276	0,3200	0,5574
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	0,0443	0,0307	0,0572	0,1591
Cholesterol	-	0,0306	0,0310	0,0627	0,0860

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (48)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	1,2940	1,5319	2,1688	2,6820
Cholesteryl-stearate	1,1926	1,4219	1,9731	2,5989
Cholesteryl-n-Decylate	0,7097	0,8658	1,3705	2,0478
Cholesteryl-acetat	0,2435	0,3191	0,6011	1,0448
Cholesteryl-formate	0,2102	0,2699	0,5180	0,8963
Behensäure	0,8685	1,0225	1,4440	1,8789
Ölsäure	-	0,0379	0,0805	0,2107
Stearinsäure	0,3818	0,4935	0,7966	1,1532
Cholesterol	0,1132	0,1450	0,2596	0,5114

Standardabweichung, C. group G (48)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	-	0,0352	0,0465	0,1076	0,1950
Cholesteryl-stearate	-	0,0224	0,0574	0,0929	0,1474
Cholesteryl-n-Decylate	-	0,0229	0,0362	0,0596	0,0565
Cholesteryl-acetat	-	0,0189	0,0147	0,0044	0,0152
Cholesteryl-formate	-	0,0097	0,0090	0,0259	0,0263
Behensäure	-	0,0399	0,0439	0,0899	0,1379
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	0,0055	0,0108	0,0146	0,0341
Cholesterol	-	0,0000	0,0061	0,0107	0,0204

Standardabweichung, C. group G (48)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	0,3011	0,3872	0,5728	0,4636
Cholesteryl-stearate	0,1740	0,1974	0,2563	0,2451
Cholesteryl-n-Decylate	0,0830	0,0749	0,1707	0,2785
Cholesteryl-acetat	0,0249	0,0356	0,0663	0,1239
Cholesteryl-formate	0,0349	0,0370	0,0832	0,1246
Behensäure	0,1898	0,1792	0,3011	0,3294
Ölsäure	-	0,0115	0,0203	0,0478
Stearinsäure	0,0793	0,1072	0,1998	0,3059
Cholesterol	0,0273	0,0386	0,0711	0,1657

7.3.4.1.3. Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	-	0,0825	0,1860	0,3685	0,5550
Cholesteryl-stearate	0,0284	0,0825	0,1780	0,3292	0,4815
Cholesteryl-n-Decylate	-	0,0861	0,1088	0,2048	0,3181
Cholesteryl-acetat	-	0,0461	0,0381	0,0863	0,1562
Cholesteryl-formate	-	0,0385	0,0488	0,0839	0,1140
Behensäure	-	0,0544	0,0787	0,2126	0,3686
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	-	-	0,0447	0,1113
Cholesterol	-	-	0,0359	0,0518	0,0606

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	0,6884	0,8070	1,1741	1,4668
Cholesteryl-stearate	0,6597	0,8040	1,1690	1,5040
Cholesteryl-n-Decylate	0,4830	0,5579	0,8540	1,2390
Cholesteryl-acetat	0,1864	0,2404	0,4149	0,7075
Cholesteryl-formate	0,1553	0,2181	0,3604	0,6121
Behensäure	0,5433	0,6268	0,9330	1,2601
Ölsäure	-	0,0287	0,0742	0,1595
Stearinsäure	0,2545	0,3475	0,5618	0,7545
Cholesterol	0,0846	0,1116	0,1936	0,3707

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	-	0,0441	0,0760	0,1346	0,2200
Cholesteryl-stearate	-	0,0333	0,0670	0,0888	0,1110
Cholesteryl-n-Decylate	-	0,0159	0,0407	0,0479	0,0733
Cholesteryl-acetat	-	0,0201	0,0121	0,0226	0,0383
Cholesteryl-formate	-	0,0110	0,0173	0,0321	0,0252
Behensäure	-	0,0157	0,0194	0,0460	0,0888
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	-	-	0,0091	0,0260
Cholesterol	-	-	0,0146	0,0117	0,0193

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	0,2828	0,3838	0,6774	0,9072
Cholesteryl-stearate	0,2051	0,3118	0,5332	0,8418
Cholesteryl-n-Decylate	0,1410	0,1953	0,3674	0,5637
Cholesteryl-acetat	0,0405	0,0628	0,1449	0,2975
Cholesteryl-formate	0,0308	0,0544	0,1228	0,2485
Behensäure	0,1684	0,1847	0,3437	0,5599
Ölsäure		0,0040	0,0287	0,0444
Stearinsäure	0,0764	0,0780	0,1740	0,3083
Cholesterol	0,0367	0,0463	0,0639	0,1163

7.3.4.1.4. Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (96) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (96)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	0,0472	0,1624	0,2267	0,4360	0,5828
Cholesteryl-stearate	-	0,0930	0,1964	0,3719	0,5144
Cholesteryl-n-Decylate	-	0,0874	0,1201	0,2008	0,3089
Cholesteryl-acetat	-	0,0616	0,0537	0,0846	0,1453
Cholesteryl-formate	-	-	0,0387	0,0798	0,1519
Behensäure	-	0,0801	0,1124	0,2761	0,4005
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	-	-	0,0437	0,1354
Cholesterol	-	-	0,0367	0,0400	0,0430

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (96)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	0,6845	0,7855	1,0320	1,2993
Cholesteryl-stearate	0,6461	0,8323	1,0836	1,2441
Cholesteryl-n-Decylate	0,4426	0,5113	0,7330	0,9434
Cholesteryl-acetat	0,1878	0,2151	0,3624	0,5238
Cholesteryl-formate	0,1700	0,2223	0,3233	0,4743
Behensäure	0,5560	0,5904	0,8161	0,9355
Ölsäure	-	0,0321	0,0599	0,1531
Stearinsäure	0,2432	0,2941	0,4790	0,6463
Cholesterol	0,0676	0,0818	0,1371	0,2602

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (96)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	0,0146	0,0379	0,0646	0,1449	0,1652
Cholesteryl-stearate	-	0,0287	0,0646	0,0845	0,1131
Cholesteryl-n-Decylate	-	0,0214	0,0238	0,0439	0,0459
Cholesteryl-acetat	-	0,0085	0,0181	0,0224	0,0348
Cholesteryl-formate	-	-	0,0089	0,0124	0,0269
Behensäure	-	0,0130	0,0282	0,0673	0,0396
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	-	-	0,0133	0,0346
Cholesterol	-	-	0,0109	0,0034	0,0067

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (96)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	0,1420	0,1782	0,4664	0,6843
Cholesteryl-stearate	0,1174	0,2273	0,3941	0,5175
Cholesteryl-n-Decylate	0,0352	0,0693	0,1835	0,3735
Cholesteryl-acetat	0,0194	0,0249	0,0672	0,1392
Cholesteryl-formate	0,0346	0,0152	0,0430	0,1101
Behensäure	0,0647	0,0807	0,1490	0,2199
Ölsäure	-	0,0110	0,0106	0,0243
Stearinsäure	0,0292	0,0174	0,0643	0,1481
Cholesterol	0,0110	0,0095	0,0144	0,0626

7.3.4.1.5. Bindungsaffinität von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	0,0477	0,1608	0,2972	0,6135	0,9043
Cholesteryl-stearate	0,0403	0,1154	0,2568	0,5451	0,8439
Cholesteryl-n-Decylate	0,0322	0,0953	0,1642	0,3201	0,4847
Cholesteryl-acetat	-	0,0591	0,0502	0,1126	0,1987
Cholesteryl-formate	-	0,0558	0,0713	0,1091	0,1997
Behensäure	-	0,0994	0,1479	0,3484	0,6003
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	0,0324	0,0580	0,0802	0,2366
Cholesterol	-	0,0701	0,0536	0,0773	0,1061

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	1,2307	1,4574	2,0210	2,5157
Cholesteryl-stearate	1,1809	1,4150	1,9384	2,5126
Cholesteryl-n-Decylate	0,7293	0,9010	1,3467	1,9290
Cholesteryl-acetat	0,2781	0,3503	0,6072	1,0397
Cholesteryl-formate	0,2768	0,3585	0,6189	1,0625
Behensäure	0,9280	1,0937	1,5868	2,1950
Ölsäure	-	0,0409	0,1207	0,3240
Stearinsäure	0,5029	0,7008	1,0546	1,4190
Cholesterol	0,1560	0,1878	0,3653	0,6930

Standardabweichung, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-behenate	0,0062	0,0862	0,1140	0,1846	0,2617
Cholesteryl-stearate	0,0050	0,0335	0,0638	0,1295	0,2158
Cholesteryl-n-Decylate	-	0,0249	0,0437	0,0579	0,1213
Cholesteryl-acetat	-	0,0127	0,0201	0,0289	0,0492
Cholesteryl-formate	-	0,0084	0,0136	0,0339	0,0653
Behensäure	-	0,0273	0,0356	0,0862	0,1688
Ölsäure	-	-	-	-	-
Stearinsäure	-	0,0000	0,0000	0,0294	0,0985
Cholesterol	-	0,0099	0,0156	0,0322	0,0384

Standardabweichung, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-behenate	0,3334	0,4290	0,5028	0,6769
Cholesteryl-stearate	0,2953	0,3397	0,4668	0,6392
Cholesteryl-n-Decylate	0,1918	0,2425	0,3436	0,4831
Cholesteryl-acetat	0,0617	0,0803	0,1248	0,2407
Cholesteryl-formate	0,1042	0,1430	0,2274	0,3374
Behensäure	0,2265	0,2575	0,3564	0,4363
Ölsäure	-	0,0077	0,0349	0,1375
Stearinsäure	0,1996	0,2846	0,4247	0,5630
Cholesterol	0,0630	0,0833	0,1806	0,2977

7.3.4.2. Zweite Standardgruppe, Abb. 41

7.3.4.2.1. Bindungsaffinität von *C. group G (45)* zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. group G (45)</i>					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	0,0505	0,0844	0,1016	0,2330	0,3476
Cholesteryl-linolelaidate	0,0390	0,0668	0,1157	0,2153	0,3651
Cholesteryl-linoleate	0,0249	0,0991	0,1298	0,2181	0,3683
Cholesteryl-elaidate	0,0510	0,1049	0,1366	0,2696	0,4299
Cholesteryl-oleate	0,0411	0,1315	0,1318	0,2713	0,4278
Cholesteryl-stearate	0,0561	0,1341	0,2627	0,5113	0,7329
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0763	0,1327	0,3424	0,6240
Cholesteryl-chlorformiat	0,0290	0,0472	0,0449	0,0843	0,1474
Cholesteryl-chlorid	0,0638	0,1627	0,1144	0,2137	0,3028

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. group G (45)</i>				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,5768	0,6999	1,0160	1,3350
Cholesteryl-linolelaidate	0,5703	0,6902	0,9619	1,2973
Cholesteryl-linoleate	0,5839	0,7161	1,0013	1,3401
Cholesteryl-elaidate	0,6873	0,8103	1,1143	1,4412
Cholesteryl-oleate	0,6373	0,7743	1,0503	1,3827
Cholesteryl-stearate	0,9079	1,0307	1,2783	1,5958
Cholesterol-3-sulfat	0,8931	1,0068	1,3030	1,6644
Cholesteryl-chlorformiat	0,1824	0,2216	0,3833	0,5692
Cholesteryl-chlorid	0,4494	0,5062	0,6858	0,8778

Standardabweichung, C. group G (45)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	0,0000	0,0341	0,0248	0,0734	0,1174
Cholesteryl-linolelaidate	0,0076	0,0176	0,0173	0,0426	0,0892
Cholesteryl-linoleate	0,0013	0,0277	0,0329	0,0531	0,0927
Cholesteryl-elaidate	0,0005	0,0114	0,0302	0,0610	0,0863
Cholesteryl-oleate	0,0122	0,0326	0,0339	0,0635	0,1131
Cholesteryl-stearate	0,0188	0,0219	0,0567	0,1268	0,1932
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0132	0,0204	0,0660	0,1648
Cholesteryl-chlorformiat	0,0000	0,0081	0,0186	0,0246	0,0464
Cholesteryl-chlorid	0,0247	0,0879	0,0242	0,0427	0,0700

Standardabweichung, C. group G (45)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,2112	0,2222	0,3354	0,5084
Cholesteryl-linolelaidate	0,1618	0,2022	0,3373	0,4880
Cholesteryl-linoleate	0,1559	0,2125	0,3523	0,5347
Cholesteryl-elaidate	0,1683	0,2394	0,3541	0,5413
Cholesteryl-oleate	0,1592	0,2220	0,3397	0,5174
Cholesteryl-stearate	0,2573	0,3008	0,4251	0,6161
Cholesterol-3-sulfat	0,2995	0,3560	0,5830	0,8429
Cholesteryl-chlorformiat	0,0687	0,0872	0,1555	0,2288
Cholesteryl-chlorid	0,1114	0,1526	0,2294	0,3295

7.3.4.2.2. Bindungsaffinität von C. group G (48) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (48)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	-	0,1142	0,1287	0,2550	0,3547
Cholesteryl-linolelaidate	0,0343	0,1002	0,1411	0,2767	0,4385
Cholesteryl-linoleate	0,0592	0,1193	0,1416	0,2875	0,4751
Cholesteryl-elaidate	0,0266	0,1281	0,1741	0,3343	0,5230
Cholesteryl-oleate	0,0323	0,1277	0,1644	0,3319	0,5288
Cholesteryl-stearate	0,051	0,1768	0,3085	0,5799	0,8037
Cholesterol-3-sulfat	0,0259	0,0813	0,1391	0,3443	0,6128
Cholesteryl-chlorformiat	0,0375	0,0570	0,0487	0,1179	0,2044
Cholesteryl-chlorid	0,0514	0,1377	0,1409	0,2573	0,3732

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (48)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,5407	0,6543	0,9739	1,2893
Cholesteryl-linolelaidate	0,6191	0,7303	1,0384	1,3217
Cholesteryl-linoleate	0,6403	0,7336	1,0635	1,3972
Cholesteryl-elaidate	0,7149	0,8385	1,1141	1,4300
Cholesteryl-oleate	0,7021	0,8164	1,0856	1,3527
Cholesteryl-stearate	0,9837	1,1118	1,3271	1,5854
Cholesterol-3-sulfat	0,9763	1,1000	1,3591	1,5730
Cholesteryl-chlorformiat	0,2132	0,2579	0,4077	0,6076
Cholesteryl-chlorid	0,5121	0,5716	0,7212	0,8990

Standardabweichung, C. group G (48)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	-	0,0495	0,0477	0,1290	0,1570
Cholesteryl-linolelaidate	0,0047	0,0371	0,0474	0,1026	0,1922
Cholesteryl-linoleate	0,0000	0,0553	0,0421	0,1194	0,2134
Cholesteryl-elaidate	0,0000	0,0487	0,0523	0,1329	0,2389
Cholesteryl-oleate	0,0000	0,0197	0,0624	0,1311	0,2416
Cholesteryl-stearate	0,0006	0,0623	0,0911	0,2212	0,3435
Cholesterol-3-sulfat	0,0001	0,0209	0,0150	0,0469	0,1666
Cholesteryl-chlorformiat	0,0000	0,0186	0,0142	0,0418	0,0955
Cholesteryl-chlorid	0,0161	0,0599	0,0398	0,0921	0,1641

Standardabweichung, C. group G (48)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,2139	0,3225	0,5477	0,7637
Cholesteryl-linolelaidate	0,2932	0,3475	0,5382	0,7177
Cholesteryl-linoleate	0,2882	0,3749	0,5715	0,7840
Cholesteryl-elaidate	0,3230	0,3994	0,5826	0,7688
Cholesteryl-oleate	0,3038	0,3891	0,5432	0,7091
Cholesteryl-stearate	0,4141	0,4832	0,5982	0,7556
Cholesterol-3-sulfat	0,3996	0,4944	0,6936	0,8137
Cholesteryl-chlorformiat	0,1181	0,1293	0,2134	0,3258
Cholesteryl-chlorid	0,2350	0,2509	0,3334	0,4377

7.3.4.2.3. Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	0,0372	0,0460	0,0887	0,1513	0,2432
Cholesteryl-linolelaidate	-	0,0809	0,0868	0,1552	0,2466
Cholesteryl-linoleate	0,0361	0,0738	0,0851	0,1770	0,2782
Cholesteryl-elaidate	-	0,0704	0,0885	0,1801	0,3102
Cholesteryl-oleate	0,0310	0,0851	0,0883	0,2084	0,3153
Cholesteryl-stearate	-	0,1036	0,1600	0,3182	0,4300
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0632	0,0807	0,2051	0,3895
Cholesteryl-chlorformiat	-	0,0646	0,0470	0,0719	0,1100
Cholesteryl-chlorid	0,0478	0,0795	0,0711	0,1386	0,2190

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,3194	0,4034	0,5802	0,7713
Cholesteryl-linolelaidate	0,3783	0,4318	0,5906	0,7811
Cholesteryl-linoleate	0,3442	0,4301	0,5672	0,7286
Cholesteryl-elaidate	0,4238	0,4708	0,6430	0,7961
Cholesteryl-oleate	0,4012	0,5169	0,6494	0,8074
Cholesteryl-stearate	0,5098	0,6088	0,8061	0,9323
Cholesterol-3-sulfat	0,5546	0,5426	0,6765	0,8042
Cholesteryl-chlorformiat	0,1216	0,1517	0,2368	0,3666
Cholesteryl-chlorid	0,2707	0,3129	0,4260	0,5018

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	0,0000	0,0143	0,0263	0,0672	0,1073
Cholesteryl-linolelaidate	-	0,0202	0,0355	0,0618	0,1226
Cholesteryl-linoleate	0,0000	0,0383	0,0372	0,0888	0,1370
Cholesteryl-elaidate	-	0,0289	0,0425	0,0970	0,1666
Cholesteryl-oleate	0,0000	0,0236	0,0408	0,0961	0,1618
Cholesteryl-stearate	-	0,0451	0,0665	0,1409	0,1828
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0383	0,0278	0,0725	0,1417
Cholesteryl-chlorformiat	-	0,0100	0,0092	0,0372	0,0674
Cholesteryl-chlorid	0,00675	0,0291	0,0293	0,0797	0,1216

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,1106	0,1401	0,2675	0,3941
Cholesteryl-linolelaidate	0,1382	0,1638	0,2490	0,3715
Cholesteryl-linoleate	0,1442	0,1824	0,2661	0,3792
Cholesteryl-elaidate	0,1935	0,2228	0,3071	0,3387
Cholesteryl-oleate	0,1740	0,2689	0,3643	0,3840
Cholesteryl-stearate	0,2132	0,3254	0,4440	0,4939
Cholesterol-3-sulfat	0,2681	0,3231	0,4664	0,4654
Cholesteryl-chlorformiat	0,0705	0,0975	0,1538	0,2435
Cholesteryl-chlorid	0,1333	0,1606	0,2351	0,2813

7.3.4.2.4. Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (96) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (96)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	-	0,0508	0,0693	0,0932	0,1450
Cholesteryl-linolelaidate	-	0,0432	0,0703	0,1176	0,1712
Cholesteryl-linoleate	-	0,0496	0,0843	0,1427	0,2394
Cholesteryl-elaidate	-	0,0736	0,1029	0,1709	0,2648
Cholesteryl-oleate	0,0537	0,0701	0,0913	0,1633	0,2440
Cholesteryl-stearate	-	0,0792	0,1489	0,2736	0,3830
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0448	0,0610	0,1537	0,2810
Cholesteryl-chlorformiat	-	0,0434	0,0394	0,0564	0,0891
Cholesteryl-chlorid	0,0435	0,0866	0,0579	0,1015	0,1444

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (96)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,2381	0,2859	0,4329	0,5647
Cholesteryl-linolelaidate	0,2604	0,3127	0,4769	0,6588
Cholesteryl-linoleate	0,3044	0,3542	0,4855	0,6818
Cholesteryl-elaidate	0,3514	0,4196	0,5489	0,6897
Cholesteryl-oleate	0,3745	0,4546	0,5222	0,7236
Cholesteryl-stearate	0,5136	0,5403	0,6403	0,7678
Cholesterol-3-sulfat	0,4085	0,4451	0,6148	0,7629
Cholesteryl-chlorformiat	0,1090	0,1277	0,2120	0,3314
Cholesteryl-chlorid	0,1949	0,2221	0,3226	0,4145

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (96)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	-	0,0282	0,0639	0,0130	0,0235
Cholesteryl-linolelaidate	-	0,0115	0,0165	0,0208	0,0348
Cholesteryl-linoleate	-	0,0071	0,0267	0,0158	0,0360
Cholesteryl-elaidate	-	0,0187	0,0168	0,0066	0,0312
Cholesteryl-oleate	0,0000	0,0282	0,0192	0,0189	0,0379
Cholesteryl-stearate	-	0,0180	0,0209	0,0627	0,0768
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0078	0,0172	0,0501	0,0521
Cholesteryl-chlorformiat	-	0,0143	0,0158	0,0066	0,0248
Cholesteryl-chlorid	0,0000	0,0149	0,0072	0,0238	0,0365

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (96)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,0525	0,0513	0,0757	0,1110
Cholesteryl-linolelaidate	0,0234	0,0332	0,0903	0,1778
Cholesteryl-linoleate	0,0476	0,0377	0,0582	0,0905
Cholesteryl-elaidate	0,0469	0,0601	0,0699	0,1807
Cholesteryl-oleate	0,0485	0,0669	0,0819	0,1787
Cholesteryl-stearate	0,0443	0,0742	0,1034	0,1911
Cholesterol-3-sulfat	0,0394	0,0500	0,1050	0,1174
Cholesteryl-chlorformiat	0,0241	0,0359	0,0565	0,0927
Cholesteryl-chlorid	0,0497	0,0539	0,0871	0,1246

7.3.4.2.5. Bindungsaffinität von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	0,0413	0,0990	0,1961	0,6019	0,7944
Cholesteryl-linolelaidate	0,0440	0,1687	0,2728	0,5349	0,9077
Cholesteryl-linoleate	0,0537	0,1735	0,2662	0,5666	1,0215
Cholesteryl-elaidate	0,0816	0,1999	0,3170	0,7202	1,2269
Cholesteryl-oleate	0,0844	0,2297	0,3379	0,7386	1,2397
Cholesteryl-stearate	0,0996	0,4138	0,6908	1,4521	2,2656
Cholesterol-3-sulfat	0,0247	0,1600	0,3092	0,8554	1,6287
Cholesteryl-chlorformiat	0,0695	0,0977	0,1031	0,2467	0,4574
Cholesteryl-chlorid	0,1187	0,3701	0,2782	0,5755	0,9315

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	1,1637	1,6634	2,4855	3,1949
Cholesteryl-linolelaidate	1,4480	1,8211	2,8230	3,5345
Cholesteryl-linoleate	1,5392	1,9061	2,9113	3,7253
Cholesteryl-elaidate	1,8696	2,3047	3,1937	3,9551
Cholesteryl-oleate	1,8514	2,2857	3,2229	3,9883
Cholesteryl-stearate	2,8434	3,1765	3,7617	4,6635
Cholesterol-3-sulfat	2,5071	2,9528	3,7569	4,3945
Cholesteryl-chlorformiat	0,6010	0,7960	1,4604	2,2727
Cholesteryl-chlorid	1,3949	1,6401	2,3115	2,9822

Standardabweichung, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Cholesteryl-linolenate	0,0263	0,0323	0,0598	0,2940	0,2526
Cholesteryl-linolelaidate	0,0214	0,0410	0,0780	0,1635	0,2476
Cholesteryl-linoleate	0,0067	0,0495	0,0823	0,1659	0,2867
Cholesteryl-elaidate	0,0362	0,0606	0,0879	0,2147	0,3629
Cholesteryl-oleate	0,0259	0,0421	0,0698	0,1819	0,3037
Cholesteryl-stearate	0,0311	0,1561	0,2087	0,3791	0,5706
Cholesterol-3-sulfat	0,0108	0,0251	0,0500	0,1207	0,2899
Cholesteryl-chlorformiat	0,0354	0,0406	0,0248	0,0604	0,1266
Cholesteryl-chlorid	0,0500	0,0040	0,0704	0,1354	0,2401

Standardabweichung, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Cholesteryl-linolenate	0,3111	0,4025	0,5543	0,6911
Cholesteryl-linolelaidate	0,3367	0,4160	0,7237	0,7579
Cholesteryl-linoleate	0,3652	0,4982	0,7628	0,7964
Cholesteryl-elaidate	0,4762	0,5935	0,8231	0,7713
Cholesteryl-oleate	0,4571	0,6211	0,7810	0,7723
Cholesteryl-stearate	0,7059	0,8991	1,1417	1,0744
Cholesterol-3-sulfat	0,4580	0,4829	0,5222	0,6955
Cholesteryl-chlorformiat	0,1214	0,1979	0,4094	0,7685
Cholesteryl-chlorid	0,3181	0,4724	0,7623	1,0279

7.3.4.3. Dritte Standardgruppe, Abb. 44

7.3.4.3.1. Bindungsaffinität von C. group G (45) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (45)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat (C18)	-	0,0406	0,0404	0,1877	0,5483
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	-	0,0475	0,0630	0,1083	0,1990
Galactocerebroside II	-	-	0,0373	0,0587	0,0916
Galactocerebroside I	-	0,0427	0,0388	0,0721	0,1407
Cholesterol	-	0,0392	0,0348	0,0557	0,0674
Cholesterol-3-sulfat	0,0420	0,1381	0,1218	0,3063	0,4561

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (45)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	-
Octadecylsulfat (C18)	0,6545	0,9463	1,5034	1,9467
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	0,2428	0,3204	0,5271	0,8545
Galactocerebroside II	0,1407	0,1741	0,2732	0,4441
Galactocerebroside I	0,2231	0,2764	0,4089	0,5826
Cholesterol	0,0943	0,1137	0,2112	0,3628
Cholesterol-3-sulfat	0,5935	0,7064	0,9017	1,2333

Standardabweichung, C. group G (45)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat	-	0,0027	0,0048	0,0867	0,2388
Tetradecylsulfat	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	-	0,0089	0,0207	0,0484	0,0726
Galactocerebroside II	-	-	0,0065	0,0138	0,0206
Galactocerebroside I	-	0,0107	0,0124	0,0186	0,0320
Cholesterol	-	0,0141	0,0072	0,0229	0,0159
Cholesterol-3-sulfat	0,0195	0,0122	0,0438	0,1015	0,1689

Standardabweichung, C. group G (45)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat	-	-	-	-
Octadecylsulfat	0,3040	0,3794	0,5017	0,6514
Tetradecylsulfat	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	0,0698	0,1009	0,1645	0,2094
Galactocerebroside II	0,0350	0,0567	0,0930	0,1326
Galactocerebroside I	0,0565	0,0838	0,1306	0,2039
Cholesterol	0,0329	0,0414	0,0723	0,1512
Cholesterol-3-sulfat	0,2239	0,3082	0,4313	0,4881

7.3.4.3.2. Bindungsaffinität von C. group G (48) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (48)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat (C18)	-	0,0955	0,1642	0,3830	0,5445
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	-	0,0628	0,0932	0,1638	0,3133
Galactocerebroside II	-	-	0,0463	0,0720	0,1134
Galactocerebroside I	-	0,0661	0,0412	0,0830	0,1585
Cholesterol	-	-	0,0335	0,0443	0,0755
Cholesterol-3-sulfat	0,0370	0,0772	0,1375	0,3061	0,5463

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, C. group G (48)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	0,0959
Octadecylsulfat (C18)	0,8208	1,1834	1,9172	2,3214
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	0,3293	0,4151	0,7161	1,1727
Galactocerebroside II	0,1828	0,2138	0,3741	0,6373
Galactocerebroside I	0,2721	0,3656	0,5428	0,8442
Cholesterol	0,1169	0,1558	0,2644	0,4583
Cholesterol-3-sulfat	0,7207	0,8705	1,0972	1,4455

Standardabweichung, <i>C. group G</i> (48)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat	-	0,0435	0,0698	0,2604	0,1720
Tetradecylsulfat	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosidsulfat	-	0,0000	0,0426	0,1596	0,3113
Galactocerebrosid II	-	-	0,0040	0,0381	0,0816
Galactocerebrosid I	-	0,0021	0,0167	0,0468	0,0809
Cholesterol	-	-	0,0155	0,0277	0,0436
Cholesterol-3-sulfat	0,0182	0,0121	0,0713	0,1643	0,2602

Standardabweichung, <i>C. group G</i> (48)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	0,0140
Octadecylsulfat (C18)	0,5236	0,8165	1,3125	1,3599
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebrosidsulfat	0,2648	0,3175	0,5348	0,9304
Galactocerebrosid II	0,1141	0,1453	0,2771	0,4731
Galactocerebrosid I	0,1545	0,2098	0,3227	0,5771
Cholesterol	0,0568	0,0863	0,1390	0,2386
Cholesterol-3-sulfat	0,4165	0,5208	0,7280	1,0320

7.3.4.3.3. Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (DSMZ 7171) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat (C18)	-	0,0918	0,1313	0,3547	0,6415
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosidsulfat	-	-	0,0462	0,1252	0,1787
Galactocerebrosid II	-	-	0,0417	0,0574	0,0945
Galactocerebrosid I	-	0,0325	0,0570	0,0758	0,1261
Cholesterol	-	-	0,0247	0,0459	0,0669
Cholesterol-3-sulfat	0,0518	0,1186	0,1208	0,2441	0,3864

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	0,1089
Octadecylsulfat (C18)	0,6621	0,9586	1,3242	1,7883
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebroside-sulfat	0,2072	0,2422	0,4339	0,7640
Galactocerebroside II	0,1312	0,1644	0,2782	0,4812
Galactocerebroside I	0,2194	0,2620	0,3619	0,5458
Cholesterol	0,0937	0,1065	0,2168	0,3795
Cholesterol-3-sulfat	0,6129	0,6289	0,8403	0,9440

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat	-	0,0461	0,0944	0,1677	0,2269
Tetradecylsulfat	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebroside-sulfat	-	-	0,0166	0,0455	0,0346
Galactocerebroside II	-	-	0,0000	0,0127	0,0368
Galactocerebroside I	-	0,0000	0,0418	0,0195	0,0490
Cholesterol	-	-	0,0000	0,0159	0,0344
Cholesterol-3-sulfat	0,0170	0,0588	0,0637	0,1172	0,2250

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (DSMZ 7171)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	0,0381
Octadecylsulfat (C18)	0,1804	0,4789	0,5603	0,7073
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebroside-sulfat	0,0590	0,0703	0,1653	0,3207
Galactocerebroside II	0,0705	0,0706	0,0974	0,1940
Galactocerebroside I	0,0813	0,0906	0,1069	0,2376
Cholesterol	0,0342	0,0327	0,0522	0,1034
Cholesterol-3-sulfat	0,3217	0,2983	0,4122	0,4657

7.3.4.3.4. Bindungsaffinität von *C. jeikeium* (96) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (96)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat (C18)	-	0,0309	0,0420	0,1320	0,4223
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	-	0,0526	0,0326	0,0738	0,1467
Galactocerebroside II	-	-	0,0270	0,0432	0,0673
Galactocerebroside I	-	-	0,0365	0,0488	0,0966
Cholesterol	-	-	0,0212	0,0406	0,0687
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0726	0,0797	0,1797	0,3065

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. jeikeium</i> (96)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	0,0743
Octadecylsulfat (C18)	0,6327	0,9224	1,6582	2,5630
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	0,1829	0,2471	0,4843	0,7957
Galactocerebroside II	0,0984	0,1370	0,2414	0,3844
Galactocerebroside I	0,1621	0,2158	0,3851	0,5568
Cholesterol	0,0906	0,0929	0,1852	0,4107
Cholesterol-3-sulfat	0,5042	0,5592	0,8110	1,1067

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (96)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat	-	0,0133	0,0125	0,0327	0,0958
Tetradecylsulfat	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	-	0,0051	0,0075	0,0092	0,0137
Galactocerebroside II	-	-	0,0051	0,0105	0,0067
Galactocerebroside I	-	-	0,0035	0,0103	0,0223
Cholesterol	-	-	0,0002	0,0162	0,0194
Cholesterol-3-sulfat	-	0,0118	0,0138	0,0568	0,1132

Standardabweichung, <i>C. jeikeium</i> (96)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	0,0182
Octadecylsulfat (C18)	0,1288	0,1317	0,3652	0,6661
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	0,0243	0,0256	0,0694	0,1118
Galactocerebroside II	0,0147	0,0230	0,0386	0,0631
Galactocerebroside I	0,0253	0,0276	0,0623	0,1179
Cholesterol	0,0123	0,0182	0,0281	0,0762
Cholesterol-3-sulfat	0,0879	0,1121	0,1451	0,2775

7.3.4.3.5. Bindungsaffinität von *C. minutissimum* (DSMZ 20651) zu verschiedenen Lipiden

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat (C18)	-	0,0596	0,0554	0,2804	0,9715
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	-	0,0640	0,0990	0,2181	0,4416
Galactocerebroside II	-	0,0433	0,0462	0,0942	0,1501
Galactocerebroside I	-	0,0512	0,0482	0,1338	0,2453
Cholesterol	-	0,0363	0,0450	0,0716	0,1042
Cholesterol-3-sulfat	0,0359	0,1247	0,1866	0,4684	0,8654

Bindungsaffinität [IntOD], Mittelwerte n = 5, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	0,1347
Octadecylsulfat (C18)	1,0205	1,4960	2,5695	3,3563
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebrosideulfat	0,5107	0,6760	1,1519	1,8631
Galactocerebroside II	0,2416	0,3297	0,5577	0,9254
Galactocerebroside I	0,4306	0,5484	0,8873	1,2258
Cholesterol	0,1694	0,2146	0,3994	0,7255
Cholesterol-3-sulfat	1,1145	1,3001	1,7462	2,2081

Standardabweichung, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)					
Standards	10 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng
Dodecylsulfat	-	-	-	-	-
Octadecylsulfat	-	0,0025	0,0180	0,1507	0,5065
Tetradecylsulfat	-	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-	-
Galactocerebrosidsulfat	-	0,0320	0,0752	0,1555	0,3047
Galactocerebrosid II	-	0,0275	0,0156	0,0403	0,0807
Galactocerebrosid I	-	0,0220	0,0236	0,0654	0,1066
Cholesterol	-	0,0064	0,0080	0,0196	0,0226
Cholesterol-3-sulfat	0,0019	0,0681	0,0991	0,2433	0,3938

Standardabweichung, <i>C. minutissimum</i> (DSMZ 20651)				
Standards	750 ng	1000 ng	2000 ng	4000 ng
Dodecylsulfat (C12)	-	-	-	0,0386
Octadecylsulfat (C18)	0,2634	0,5063	0,9119	0,9218
Tetradecylsulfat (C14)	-	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-	-
Galactocerebrosidsulfat	0,2152	0,2926	0,5913	1,0330
Galactocerebrosid II	0,1083	0,1505	0,3007	0,4883
Galactocerebrosid I	0,1985	0,2481	0,4131	0,6165
Cholesterol	0,0465	0,0597	0,1189	0,2761
Cholesterol-3-sulfat	0,5331	0,7304	1,0178	1,3338

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Corinna Schröder
Geburtsdatum: 06.09.1970
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976 – 1980 Grundschole, Hamburg
1980 – 1989 Sankt-Ansgar-Schule, Hamburg, Abschluss: Abitur

Berufsausbildung / Studium

Aug. 1989 – Jul. 1991 Ausbildung zur Chemisch-Technischen-Assistentin in Hamburg
Okt. 1991 – Mai 1996 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg
07.10.1996 Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung
Diplom in Lebensmittelchemie
Nov. 1996 – Apr. 1997 Praktische Ausbildung bei Fintelmann und Meyer, Handels- und Umweltschutzlaboratorien, Hamburg
Mai 1997 – Okt. 1997 Praktische Ausbildung an der Chemischen- und Lebensmitteluntersuchungsanstalt der Stadt Hamburg
17.02.1998 Zweite lebensmittelchemische Staatsprüfung
ab Mai 1998 Promotion bei Prof. Dr. Dr. H. Steinhart an der Universität Hamburg, Institut für Lebensmittelchemie und Biochemie in Kooperation mit der Beiersdorf AG

Berufstätigkeit

ab Mai. 1998 Freie wissenschaftliche Mitarbeiterin der Beiersdorf AG im Bereich Forschung