

**Aus der Tropenmedizinischen Abteilung  
der Missionsärztlichen Klinik Würzburg  
Chefarzt Prof. Dr. med. A. Stich**

**Talglipide als Wirtsfaktoren für *Mycobacterium leprae*.  
Literaturrecherche und Entwicklung einer Methode zur Talganalyse**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Carolin Philipp  
aus Kulmbach

Würzburg, Juli 2013





**Referent: Prof. Dr. med. August Stich**

**Korreferent: Prof. Dr. Ernst Conzelmann**

**Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2013**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

*Diese Arbeit ist meinen lieben Eltern gewidmet.*

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	SINNGEBUNG DIESER ARBEIT.....	1
1.2	KLINIK UND KLASSIFIKATION DER LEPRA.....	3
2	TALGLIPIDE ALS WIRTSFAKTOREN FÜR <i>M.LEPRAE</i> : LITERATURRECHERCHE ZUM STAND DER FORSCHUNG IN RELEVANTEN GEBIETEN.....	5
2.1	BIOLOGIE UND ERREGEREIGENSCHAFTEN.....	5
2.1.1	Morphologie.....	5
2.1.2	Anzüchtbarkeit.....	5
2.1.3	Extrakorporale Überlebensfähigkeit.....	6
2.1.4	Infizierte Gewebe.....	6
2.2	GENOM UND METABOLISMUS.....	8
2.2.1	Überblick über die Stoffwechsellistung von <i>M.leprae</i> .....	8
2.2.2	Das defektive Genom von <i>M.leprae</i> .....	9
2.2.3	Kohlenhydrat-Stoffwechsel.....	10
2.2.3.1	Glukosemetabolismus und Energiegewinnung.....	10
2.2.3.2	Rolle einfacher Kohlenstoffquellen für die Lipidsynthese.....	15
2.2.4	Lipidstoffwechsel.....	16
2.2.4.1	Bedeutung von Lipiden für Mykobakterien und die de novo- Fettsäuresynthese.....	16
2.2.4.2	Die Lipolyse.....	20
2.2.4.3	Anabole und katabole Verwendung von Fettsäuren.....	22
2.2.4.3.1	Polyketidsynthese und Glyoxylat-Zyklus.....	23
2.2.4.3.2	Betaoxidation.....	25
2.2.4.4	Fettsäure-Elongation.....	25
2.2.4.5	Zellwand-Lipide von <i>M.leprae</i> .....	26
2.2.4.5.1	Mykolsäuren.....	28
2.2.4.5.2	PGL-1.....	29
2.2.4.5.2.1	Synthese von PGL-1.....	30
2.2.4.6	Virchow Zellen und Lipid Droplets.....	31
2.2.4.6.1	Lipid droplets.....	32
2.2.4.6.2	Lipid droplets in <i>M.leprae</i> infizierten Schwann-Zellen .....	33
2.2.5	Ausgewählte Bereiche des Proteinmetabolismus.....	33
2.2.5.1	Defekte des Aminosäuremetabolismus.....	33
2.2.5.2	Sigma-Faktoren und Stressantwort.....	34
2.2.5.3	Eisenstoffwechsel.....	35
2.2.5.4	Sezernierte Proteine und immunologische Antwort.....	35
2.3	WIRTSANTWORT UND IMMUNOLOGIE.....	37
2.3.1	Lepra-Empfänglichkeit.....	37
2.3.1.1	Ursachen für das Clustering von Lepraerkrankungen.....	38
2.3.1.2	Genetische Wirtsfaktoren des Immunsystems.....	40
2.3.1.2.1	Genetische Wirtsfaktoren des angeborenen Immunsystems.....	40
2.3.1.2.1.1	PARK2 und PACRG.....	40
2.3.1.2.1.2	NRAMP1.....	41
2.3.1.2.2	Genetische Wirtsfaktoren des erworbenen Immunsystems.....	41
2.3.1.2.2.1	HLA.....	41
2.3.1.2.2.2	Chromosom 10p13.....	42
2.3.1.2.2.3	TAP2.....	42
2.3.1.2.2.4	TNF $\alpha$ .....	42
2.3.1.2.2.5	TLR.....	43

2.3.2	Lepra und Immundefizienz.....	43
2.3.3	Prophylaxe und Impfung.....	44
2.3.3.1	BCG.....	45
2.4	EPIDEMIOLOGIE DER LEPPRA.....	47
2.4.1	Prävalenz und Inzidenz seit 1985.....	47
2.4.2	Aktuelle Prävalenz und Inzidenz .....	48
2.4.3	Epidemiologie der Lepra bis zum 20. Jahrhundert.....	52
2.4.3.1	Verbreitung der Lepra bis zum 20. Jahrhundert.....	53
2.4.3.2	Lepra und Tuberkulose im mittelalterlichen Europa.....	55
2.4.4	Epidemiologische Daten mit Relevanz für Transmission und Suszeptibilität. .	56
2.4.4.1	Asymptomatische Träger von <i>M.leprae</i> .....	56
2.4.4.2	Geschlechterverhältnis und Alter.....	56
2.4.4.3	Ethnie.....	57
2.4.4.4	Sozioökonomische Verhältnisse.....	57
2.5	LEPRATRANSMISSION.....	58
2.5.1	Aktuelle Diskussion über die Transmissionshypthesen.....	58
2.5.2	Tropfeninfektion.....	59
2.5.3	Hautübertragung.....	60
2.5.4	Armadillos als Infektionsquelle.....	61
2.5.5	Arthropoden als Vektoren.....	62
2.6	TALGLIPIDE.....	63
2.6.1	Talgsekretion.....	63
2.6.2	Talgkomponenten.....	64
2.6.2.1	Sapiensäure.....	65
2.6.2.2	Squalen.....	67
2.6.2.2.1	Entstehung und Funktion.....	67
2.6.2.2.2	Squalen als Antioxidanz.....	68
2.6.2.3	Freie Fettsäuren.....	70
2.7	ARBEITSHYPOTHESEN.....	71
3	ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR TALGANALYSE: MATERIALIEN UND METHODEN.....	72
3.1	CHEMIKALIEN.....	72
3.2	GERÄTE UND GEBRAUCHSMATERIALIEN.....	72
4	ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR TALGANALYSE: ERGEBNISSE.....	72
4.1	VORBEREITUNG FÜR DIE ANALYSE.....	72
4.1.1	Sebutapes.....	72
4.1.1.1	Aufbau und Verwendungsmöglichkeiten.....	72
4.1.1.2	Probenentnahme und Aufbewahrung .....	74
4.1.2	Extraktionsverfahren.....	75
4.1.3	Abtrennung der Tapesubstanzen .....	76
4.2	REDUKTION VON VERUNREINIGUNGEN.....	79
4.2.1	Testung der Lösemittel.....	80
4.2.2	Testung sonstiger Utensilien.....	82
4.3	INTERNE STANDARDS.....	83
4.3.1	Synthese interner Standards für Wachs- und Cholesterinester .....	83
4.3.2	Hexacosan als interner Standard für Squalen.....	86
4.3.3	Ergosterol als interner Standard für Cholesterin.....	88
4.4	ENTWICKLUNG DES ANALYSEVERFAHRENS.....	90
4.4.1	DC zur Trennung der Talglipide.....	90
4.4.1.1	Identifikation geeigneter Färbemethoden für die DC.....	90
4.4.1.2	Identifikation eines geeigneten DC-Laufmittels.....	91
4.4.1.3	Trennung von Wachs- und Cholesterinestern.....	94

4.4.2 Ionenaustausch-Chromatografie zur Abtrennung von FFA.....	97
4.5 QUANTITATIVE ANALYSE DER TALGLIPIDE.....	99
4.5.1 Aufbereitung der Talglipide für die GC.....	99
4.5.2 Vergleichssubstanzen für GC.....	100
4.5.3 Ergebnisse Einzelmessungen GC.....	102
4.5.3.1 Squalen-Messung.....	102
4.5.3.2 Sapiensäure-Messung.....	103
4.5.3.3 Messung freier Fettsäuren.....	105
4.6 ZUSAMMENFASSUNG DES ANALYSEVERFAHRENS.....	108
5 DISKUSSION.....	113
5.1 QUALITÄT AUSGEWÄHLTER VERFÜGBARER DATEN.....	113
5.1.1 Daten zur Epidemiologie.....	113
5.1.2 Daten zur Transmission.....	116
5.1.3 Daten zum Genom und Metabolismus.....	117
5.2 DISKUSSION DER HYPOTHESE "TALGLIPIDE ALS WIRTSFAKTOR BEI DER HAUTÜBERTRAGUNG".....	118
5.2.1 Diskussion der Rolle von Lipiden für <i>M.leprae</i> .....	118
5.2.1.1 Diskussion der Lipide im Metabolismus von <i>M.leprae</i> .....	118
5.2.1.2 Diskussion des Einflusses von Lipiden auf die Epidemiologie.....	119
5.2.1.3 Mögliche Rolle der Talglipide als Suszeptibilitätsfaktoren.....	119
5.2.1.3.1 Sapiensäuremenge als Suszeptibilitätsfaktor.....	120
5.2.1.3.2 Squalenmenge als Suszeptibilitätsfaktor.....	120
5.2.1.3.3 Menge an freien Fettsäuren als Suszeptibilitätsfaktor.....	121
5.2.2 Diskussion der kutanen Transmissions-Hypothese.....	122
5.2.2.1 Infizierte Gewebe als Hinweis auf den Transmissionsmodus.....	122
5.2.2.2 Extrakorporale Überlebensfähigkeit und Schmierinfektion.....	123
5.2.2.3 Der "Haushaltsfaktor" als Hinweis auf kutane Transmission.....	123
5.3 DISKUSSION DER ENTWICKELTEN METHODE.....	125
5.3.1 Grenzen der Methode.....	125
5.3.1.1 Gaschromatografische Fettsäure-Analyse.....	125
5.3.1.2 Gaschromatografische Squalen-Analyse.....	125
5.3.1.3 Sebumextraktion mit Sebutapes.....	126
5.3.2 Anwendung der Methode unter tropischen Bedingungen.....	126
5.4 SCHLUSSFOLGERUNG AUS DEN ERGEBNISSEN DER LITERATURRECHERCHE UND DER ENTWICKELTEN METHODE.....	128
5.4.1 Validierung der Methode.....	128
5.4.2 Durchführung einer Fall-Kontroll-Studie.....	128
5.4.2.1 Die Kollektive.....	128
5.4.2.2 Die Proben.....	129
5.4.2.3 Die beteiligten Strukturen.....	129
ZUSAMMENFASSUNG.....	130
LITERATURVERZEICHNIS.....	133
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	149
ANNEX I: CHEMIKALIEN.....	151
ANNEX II: GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	152
ANNEX III: PROBANDENBOGEN TALGPROBENENTNAHME.....	153

## Abkürzungsverzeichnis

ANCDR	<i>annual new case detection rate</i>
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BI	bazillärer Index
BL	borderline lepromatöse Form der Lepra
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
BT	borderline tuberkuloide Form der Lepra
C/M	Chloroform-Methanol-Mischung
C26	Hexacosan
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>case detection rate</i>
CE	Cholesterinester
Chol	Cholesterin
CMI	<i>cellular mediated immunity</i>
CMW	Chloroform-Methanol-Wasser-Mischung
CoA	Coenzym-A
COX	Cyclooxygenase
DAHW	Deutsche Lepra- und Tuberkulose-Hilfe
DC	Dünnschichtchromatografie
DG	Diglyzeride
DEAE	Diethylaminoethyl
ECF	<i>extracytoplasmic function</i>
Fad	<i>fatty acid acyl-CoA dehydrogenase-Gen</i>
FFA	<i>free fatty acids</i>
FFS	freie Fettsäure(n)
FSME	Fettsäuremethylester
GC-FID	Gaschromatografie-Flammenionisationsdetektor-Einheit
HAART	<i>high active anti-retroviral therapy</i>
HEA	Hexan-Essigester-Essigsäure-Mischung
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IRIS	<i>immune reconstitution inflammatory syndrome</i>
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LD	<i>lipid droplets</i>

LL	lepromatöse Form der Lepra
Lm	Laufmittel
µmol	Mikromol
MB	multibazilläre Form der Lepra
<i>M.tb</i>	<i>M.tuberculosis</i>
Mb	Megabasen
MDT	<i>multi drug therapy</i>
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
NGO	<i>non-governmental organization</i>
NLEP	<i>national leprosy eradication programme</i>
PB	pauzibazilläre Form der Lepra
PCR	polymerase chain reaction
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDIM	Phthioceroldimycocerosat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGE	Prostaglandin
PGL-1	Phenolisches Glykolipid 1
PKS	Polyketidsynthase
SC	Säulenchromatographie
SKG	Schraubkappenglas
Squ	Squalen
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TG	Triglyzeride
TH	T-Helferzelle
TLR	<i>toll like receptor</i>
TMS	Trimethylsilyl
TNFα	Tumornekrosefaktor Alpha
TT	tuberkuloide Form der Lepra
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
WE	Wachsester
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Hinweis zum Sprachgebrauch:

*Entsprechend der queer-Theorie verstehe ich Geschlecht als Kontinuum, nicht als Dichotomie. Unter der entsprechenden Schreibweise z.B. "Patient\_innen" statt "Patienten" würde jedoch die Leserlichkeit des ohnehin z. T. komplexen Texts zu sehr leiden. Daher bediene ich mich der konventionellen Schreibweise, schließe jedoch ausdrücklich alle Geschlechter mit ein.*

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 SINNGEBUNG DIESER ARBEIT

*M.leprae* wurde 1873 von Armauer Hansen als Erreger der Lepra identifiziert. Knapp 140 Jahre später ist der Erreger immer noch nicht in Kultur anzüchtbar, noch ist die Übertragung der Krankheit eindeutig geklärt. Ebensowenig existiert ein aussagekräftiger und für endemische Länder tauglicher Test zur Diagnose im Frühstadium der Lepra. Das Stigma der Erkrankung besteht weiterhin und führt u.a. häufig zu einem sehr späten Diagnosezeitpunkt, an dem irreversible Nervenschädigungen bereits eingetreten sind. Zur Bekämpfung der Lepra reichen eine flächendeckende MDT (engl. *multi drug therapy*) und eine Prävalenzsenkung nicht aus (s. 5.1.1). 250 000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit sind ein deutliches Signal kontinuierlicher Übertragungseignisse (s. 2.4.2). Für eine effektive Bekämpfung der Krankheit müssen Neuerkrankungen verhindert werden. Da nur ein Bruchteil der mit *M.leprae* exponierten Menschen eine manifeste Krankheit entwickelt, ist die Suche nach Wirtsfaktoren, die die Lepraempfindlichkeit beeinflussen, von essentieller Bedeutung (s. 2.3.1). Nur so können Prophylaxe-Maßnahmen gezielt der exponierten Risikogruppe zugute kommen und eine medizinisch und finanziell fragwürdige Behandlung gesunder und nicht empfänglicher Personen vermieden werden. Allerdings muss anerkannt werden, dass ohne weitere Forschungsbemühungen, um die genannten Wissenslücken über *M.leprae* zu schließen, ein wahrnehmbares Zurückdrängen der Krankheit nicht möglich sein wird. Umso kritischer ist das WHO-Eradikationsprogramm zur Beseitigung der Lepra als globales Gesundheitsproblem bis 2005 anzusehen. Die Festlegung einer national gemittelten Prävalenzzahl als Eradikationsziel trägt weder dem Clustering der Lepra Rechnung, noch stellt sie ein geeignetes epidemiologisches Maß für die Aktivität einer Krankheit dar. Gilt ein Land als "leprafrei", ist es somit durchaus möglich, dass in mehreren Bezirken immer noch erhebliche Case Detection Rates vorliegen. Die Lepra als eine eradizierte oder zumindest kurz vor der Eradikation stehende Krankheit zu proklamieren hatte weitreichende Folgen (s.

5.1.1). Eine dieser negativen Folgen beschrieb Paul Fine mit folgenden Worten: "*The first thing that the elimination programme eliminated was leprosy research*" (Burki 2009). Diese Arbeit soll einen kleinen Beitrag leisten, diese Aussage nicht Wirklichkeit werden zu lassen. Ich hoffe, dass sowohl der umfangreiche Literaturteil als auch die Methode zur Talganalyse als Grundlagen für weitere Forschungsarbeiten zur Transmission der Lepra dienen.

## **1.2 KLINIK UND KLASSIFIKATION DER LEPRO**

Lepra besitzt ein breites Spektrum klinischer und histopathologischer Manifestationen, die von der Fähigkeit des Wirts abhängt, eine zelluläre Immunantwort auf *M.leprae* zu entwickeln (Scollard et al. 2006a). Dieses Konzept wurde als erstes von Skinsnes 1964 formuliert (Skinsnes 1964) und von Ridley und Jopling zu einer praktischen Klassifizierung weiterentwickelt (Ridley & Jopling 1966). Die fünfstufige Klassifikation von Ridley und Jopling basiert auf der Immunantwort und der histologischen Einteilung und ermöglicht eine Vereinheitlichung in der klinischen Diagnose.

An einem Pol befinden sich die nicht infektiösen TT-Patienten mit einer hochgradigen zellulär vermittelten Immunität und einem negativen bis geringen BI im skin slit smear (pauszibazilläre Lepra = PB). Klinisch weisen die TT-Patienten singuläre, gut abgegrenzte Läsion mit zentraler Hypopigmentierung und Hypästhesie auf. Bereits im Frühstadium kommt es häufig zu einer Beteiligung peripherer Nerven und in deren Folge zu sensorischen, motorischen und autonomen Ausfällen (McDougall & Ulrich 1993). Biopsien dieser Läsionen zeigen eine gut entwickelte granulomatöse Entzündung.

Am anderen Pol der Ridley-Jopling-Klassifikation stehen die immunologisch anergen LL-Patienten. Die zellulär vermittelte Immunantwort ist im Bezug auf *M.leprae* nicht aktiv, es kommt lediglich zu einer Antikörperproduktion. Der Erreger kann sich ungehindert vermehren, was zu einem hohen BI führt und auch als multibazilläre Lepra (MB) bezeichnet wird. Klinisch treten hier zahlreiche, schwach abgegrenzte erhabene oder noduläre Läsionen an allen Körperstellen auf. Als Erstsymptom wird häufig ein chronisches, bilaterales Ödem der Beine oder auch eine nasale Obstruktion mit z.T. blutigem Sekret beobachtet. Die Biopsie der Läsionen zeigt Schichten schaumiger Makrophagen in der Dermis, die sehr viele säurefeste Stäbchen enthalten, die auch *Globi* genannt werden. Der Großteil der Patienten gehört jedoch der Borderline-Kategorie zwischen diesen beiden polaren Formen der Lepra an: Borderline-lepromatös (BL), borderline (BB) und borderline-tuberkuloid (BT). Eine weitere Form ist die indeterminierte Lepra, die bei sehr frühen Läsionen auftreten kann und bioptisch eine unspezifische perineurale Infiltration mit

wenigen säurefesten Stäbchen aufweist.

Ridley und Jopling	TT	BT	BB	BL	LL
CMI	+++	++	+	+/-	-
Bakterieller Index (BI) im <i>slit skin smear</i>	0	0-3	3-5	5 oder 6	5 oder 6
WHO	PB	PB/MB	MB	MB	MB

*Tabelle 1: Klassifikationen der Lepra nach Jopling und McDougall 1988 und der WHO 1994. (CMI = engl. cell mediated immunity)*

Immunologische Untersuchungen konnten zeigen, dass die unterschiedlichen Ausprägungen der Krankheit maßgeblich in Unterschieden bei der CD4-Antwort begründet liegen: In den Haut- und Nervenläsionen von TT-Patienten wurden für die TH1-Antwort typischen Zytokinen IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-12 und IL-15 nachgewiesen. Die Antigen-präsentierenden Zellen von TT-Patienten produzierten 10x mehr IL-12 als die von LL-Läsionen. Überdies liegen bei TT-Patienten deutlich mehr IL-12-Rezeptoren vor. IL-12 und IL-18 konnte auch bei BT-Patienten identifiziert werden. In LL- und BL-Läsionen kommt es hingegen zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-4 und IL-10, also typischen Zytokinen der TH2-Antwort. IL-4 hemmt wiederum die Produktion von IL-12 (Mandell 2010).

## **2 TALGLIPIDE ALS WIRTSFAKTOREN FÜR *M.LEPRAE*: LITERATURRECHERCHE ZUM STAND DER FORSCHUNG IN RELEVANTEN GEBIETEN**

In den folgenden Kapiteln wird der aktuelle Stand der Lepraforschung (Stand September 2011) zu den Themen Genom und Metabolismus, Wirtsantwort und Immunologie, Epidemiologie, Transmission und Talglipide dargestellt. Besonderer Fokus liegt auf Lipiden als Wirtsfaktor für eine Lepraerkrankung und möglichen Einflussfaktoren einer kutanen Transmission. Anhand entsprechender Schlagworte wurde eine Literaturrecherche in Pubmed durchgeführt. Berücksichtigt wurden Artikel von ca. 1960 - Mai 2011. Ergänzend wurden die maßgeblichen Lehrwerke der Tropenmedizin und Infektiologie bzw. Dermatologie herangezogen.

### **2.1 BIOLOGIE UND ERREGEREIGENSCHAFTEN**

#### **2.1.1 Morphologie**

*M.leprae* ist ein grampositives, säurefestes, mikroaerophiles Stäbchenbakterium. Es ist unbeweglich, bildet keine Sporen und lebt obligat intrazellulär in Makrophagen und Schwannzellen. Die Zellwand von *M.leprae* besteht aus einem Gerüst kovalent verknüpfter Peptidoglykane, Arabinogalaktane und Mykolsäuren. Ein für *M.leprae* spezifischer Bestandteil der Zellwand ist das Phenolische Glykolipid 1 (PGL-1), das mit dem für periphere Nerven spezifischen Laminin-2 interagieren kann und somit an der Invasion der Schwannzellen beteiligt ist (Eiglmeier et al. 2001a) (vgl. 2.2.4.5).

#### **2.1.2 Anzuchtbarkeit**

Bisher ist es nicht möglich, *M.leprae* auf künstlichen Medien anzuzüchten. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das Zusetzen von Palmitinsäure zum Anzuchtmedium zu einer verstärkten Synthese von PGL-1 führt und Zellsuspensionen mit wasserlöslichen Sphingolipiden eine vermehrte endogene Atmung aufweisen (Ng et al. 2000; Rambukkana et al. 1997) (vgl. 2.2.4.3). Die Ursache für das weitgehende Scheitern von Anzuchtversuchen wird auf den

defektiven Energiemetabolismus und das Unvermögen, zentrale Kohlenhydratquellen zu nutzen, zurückgeführt (s. 2.2.3.2).

### **2.1.3 Extrakorporale Überlebensfähigkeit**

*M.leprae* ist außerhalb des Körpers bis zu 36 Stunden überlebensfähig, unter tropischen Bedingungen sogar bis zu neun Tagen (Sticht-Groh et al. 1995; Ishaque & Sticht-Groh 1994).

Es wurde sogar eine Überlebensfähigkeit des Erregers im Boden von bis zu 45 Tagen beobachtet (Leprosy Group WHO 2009). Der Nachweis der Lebensfähigkeit der detektierten Erreger erfolgte durch das Einimpfen in Mauspfoten. 2008 konnte mittels molekularer Methoden erneut gezeigt werden, dass Bodenproben im Bereich von Patientenbehausungen signifikant mehr überlebensfähige *M.leprae*-Bakterien enthalten als Vergleichsbereiche (Desikan 1977). Auch in 47% der Wasserproben in indonesischen Hochendemieidörfern konnte DNA von *M.leprae* nachgewiesen werden, womit jedoch über die Lebensfähigkeit der Bakterien keine Aussage gemacht werden kann. Diese ist lediglich durch RNA Analyse der 16S rRNA und der Reversen-Transkriptions-PCR möglich (Lavania et al. 2008). Das Temperaturoptimum des Erregers von etwa 27-30 °C fügt sich in die Beobachtungen der hohen Persistenz von *M.leprae* außerhalb von Wirtsorganismen logisch ein (Kurabachew et al. 1998) (s. 2.2.5.2). Die Voraussetzung und der Nachweis für eine hohe Persistenz des Erregers in unbelebter Umwelt ist somit gegeben (vgl. 2.5.1).

### **2.1.4 Infizierte Gewebe**

Die Haut und die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes sind die am häufigsten befallenen Körperregionen, wobei es im Rahmen der lepromatösen Lepra zu einer hämatogenen Disseminierung des Erregers auch in die Augen, die Hoden, die Knochen von Händen und Füßen sowie Leber und Milz kommen kann (Lockwood 2010). Mittels histopathologischer Untersuchungen konnte bereits 1975 nachgewiesen werden, dass *M.leprae* nicht nur Makrophagen und Schwannzellen befällt, sondern u.a. auch in Monozyten im Blut, perivaskulären Histozyten sowie den Endothelwandzellen von lymphatischen und kleinen Blutgefäßen der Schleimhaut vorkommt (Lang 2010; Lockwood 2010). Bei

unbehandelten MB-Patienten lassen sich *M.leprae* kontinuierlich mit einer Konzentration von ca. 10<sup>5</sup> pro ml Blut nachweisen, ohne dass dies ein septisches Krankheitsbild hervorruft (McDougall et al. 1975). Diese Beobachtungen erklären auf der einen Seite, wie *M.leprae* von der Haut-/Schleimhautoberfläche in den Blutkreislauf gelangt, zum anderen werfen sie aber auch die Frage auf, ob Hautläsionen nicht sekundär nach einer hämatogenen Disseminierung des Erregers entstanden sein könnten (vgl. 5.2.2.1).

## **2.2 GENOM UND METABOLISMUS**

### **2.2.1 Überblick über die Stoffwechselleistung von *M.leprae***

Zusammenfassend lässt sich über die Ergebnisse biochemischer Aktivitätsanalysen von Enzymen und bioinformatischer Analysen des Genoms von *M.leprae* Folgendes feststellen: Die größten funktionellen Gengruppen von *M.leprae* sind beteiligt an der Genregulation, dem Metabolismus und der Modifikation von Fettsäuren und Polyketiden, der Zellwandsynthese und dem Transport von Stoffwechselzwischenprodukten (Drutz et al. 1972) (s.Abb 1).

Die katabolen Stoffwechselwege von *M.leprae* wurden im Laufe seiner Evolution einer starken Reduktion unterworfen, wohingegen die anabolen Fähigkeiten relativ unbeeinträchtigt zu sein scheinen. Beispielsweise sind komplette Stoffwechselwege für die Synthese von Purinen, Pyrimidinen, der meisten Aminosäuren, Nucleoside, Nucleotiden, Vitamine und Kofaktoren vorhanden. Die Aufrechterhaltung dieser anabolen Systeme legt die Vermutung nahe, dass die intrazelluläre Nische, die *M.leprae* für sich gefunden hat, diese Komponenten oder entsprechende Transportsysteme nicht enthält (Cole 2001; Eiglmeier et al. 2001a; Eiglmeier et al. 2001b).

Die folgenden Kapitel behandeln den Metabolismus von *M.leprae* mit einem Fokus auf den Lipidstoffwechsel. Um einen Eindruck der Gesamtstoffwechselleistung von *M.leprae* zu vermitteln und die besondere Stellung des Lipidmetabolismus ermessen zu können, werden auch der Kohlenhydratstoffwechsel und ausgewählte Bereiche der Proteinstoffwechsels beleuchtet.

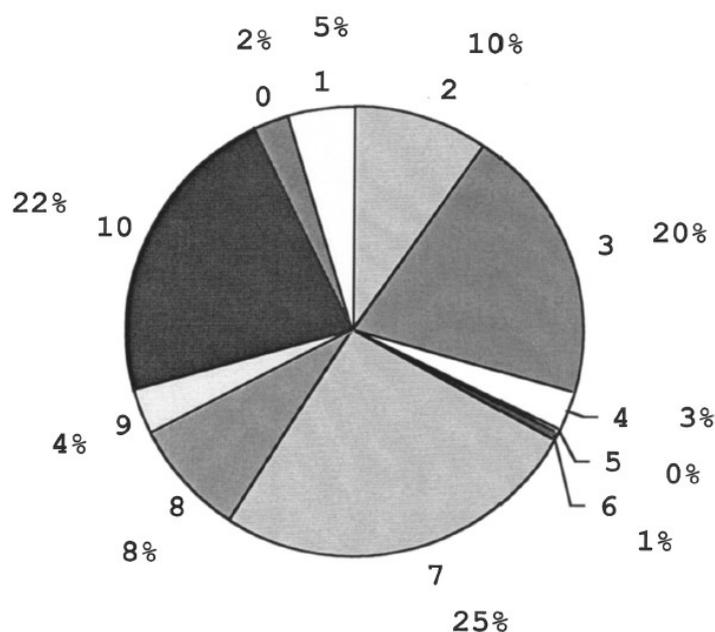


Abbildung 1: Funktionelle Einteilung der Gene von *M.leprae* mit dem prozentualen Anteil der Gruppe an allen Genen. 1, Lipidmetabolismus 2, Informations- Stoffwechselwege 3, Zellwand und Zellwandprozesse 4, stabile RNA 5, Insertions-Sequenzen und Phagen-assoziierte Funktionen 6, PE (Prolin-Glutamat)- und PPE (Prolin-Prolin-Glutamat)-Proteinfamilie 7, Intermediärstoffwechsel und Atmung 8, Unbekannte Funktion 9, Regulatorische Proteine 10, bewahrte hypothetische Proteine 0, Virulenz, Detoxifikation und Anpassung (Eiglmeier et al. 2001a).

### 2.2.2 Das defektive Genom von *M.leprae*

2001 wurde das Genom von *M.leprae* vollständig entschlüsselt. Ein Großteil der klinisch relevanten Erkenntnisse wurde aus dem Vergleich des Genoms von *M.leprae* mit dem seines nahen Verwandten *M.tuberculosis* (*M.tb*) gewonnen.

Prinzipiell ist festzuhalten, dass *M.leprae* ein äußerst defektives Genom aufweist, was Folge seiner mit vielen Genverlusten behafteten Evolution ist (Scollard et al. 2006a).

Zum einen ist das Gesamtgenom von *M.leprae* mit 3.3 Mb deutlich kleiner als das von *M.tb*, welches 4.4 Mb umfasst (Cole 2001). Zum anderen weist das Genom von *M.leprae* 1 133 sogenannte Pseudogene, also durch Mutation inaktivierte Gene, auf. *M.tb* besitzt lediglich sechs solcher Pseudogene. Folglich enthalten nur weniger als 50% des *M.leprae*-Genoms funktionale Gene. Bei *M.tb* stellen 90% des Genoms funktionale Gene dar (Scollard et al. 2006a). Der

Verlust zahlreicher Gene geht mit dem Verlust verschiedener Stoffwechselwege einher, was zu dem biologischen Nischendasein von *M.leprae* führt. Durch seine minimalistische Genausstattung und das noch begrenztere Proteom ist *M.leprae* ein wichtiges Modell geworden für den Entwurf eines Minimalgenoms, das obligat intrazelluläre Pathogene benötigen.

## **2.2.3 Kohlenhydrat-Stoffwechsel**

### **2.2.3.1 Glukosemetabolismus und Energiegewinnung**

Als Veranschaulichung der im Folgenden beschriebenen Stoffwechselwege dient Abb. 2. Durch den Verlust vieler Oxidoreduktasen, Oxygenase, Dehydrogenasen kurzkettiger Alkohole und deren regulatorischer Gene wurde der Kohlenstoff- und Stickstoff-Katabolismus stark eingeschränkt (Cole 1998). Das Genom für *M.leprae* kodiert für alle für die Glykolyse benötigten Enzyme, kann also Glukose zu Pyruvat oxidieren. Diese Gene werden nachgewiesenermaßen auch während des intrazellulären Wachstums von *M.leprae* transkribiert (Cole 2001). Dabei konnte nur eine sehr geringe Aktivität der Pyruvatkinase, die einen der ATP produzierenden Schritte der Glykolyse katalysiert, nachgewiesen werden (Williams et al. 2004). Diese Beobachtung stimmt mit aktuellen Erkenntnissen aus der Genomforschung überein, nach denen Transkripte von *pykA*, dem für die Pyruvatkinase kodierenden Gen, trotz sehr sensitiver Verfahren bei *M.leprae* kaum nachweisbar waren (Wheeler 1983). Die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA ist *M.leprae* durch das Vorliegen einer PDH prinzipiell möglich, wird aber vermutlich nur in geringem Ausmaß betrieben. Die Verwendung von Pyruvat zur Glykan-Synthese ist *M.leprae* nicht möglich, weil es das dafür nötige *pca*-Gen, das für das Enzym Pyruvat-Carboxylase kodiert, nicht besitzt (Williams et al. 2004). *M.leprae* ist also wie die meisten Mykobakterien zwar zur Glukoseverwertung für die Energiegewinnung fähig, jedoch stellt Glukose nicht die bevorzugte Energiequelle dar (Wheeler 2003). Hierfür kommen eher Fettsäuren in Frage (s. 2.2.4.3). Dies mag eine evolutionäre Anpassung an die kohlenhydratarme Wachstumsumgebung in den Phagosomen widerspiegeln (Wheeler 1983). Neben der Glykolyse ist *M.leprae* auch zum Pentose-Phosphat-Weg in der

Lage. Das Acetyl-Coenzym A aus dem Pyruvat der Glykolyse oder der Betaoxidation von Fettsäuren fließt in den Zitratzyklus ein, wo die Reduktionsäquivalente NADH entstehen.

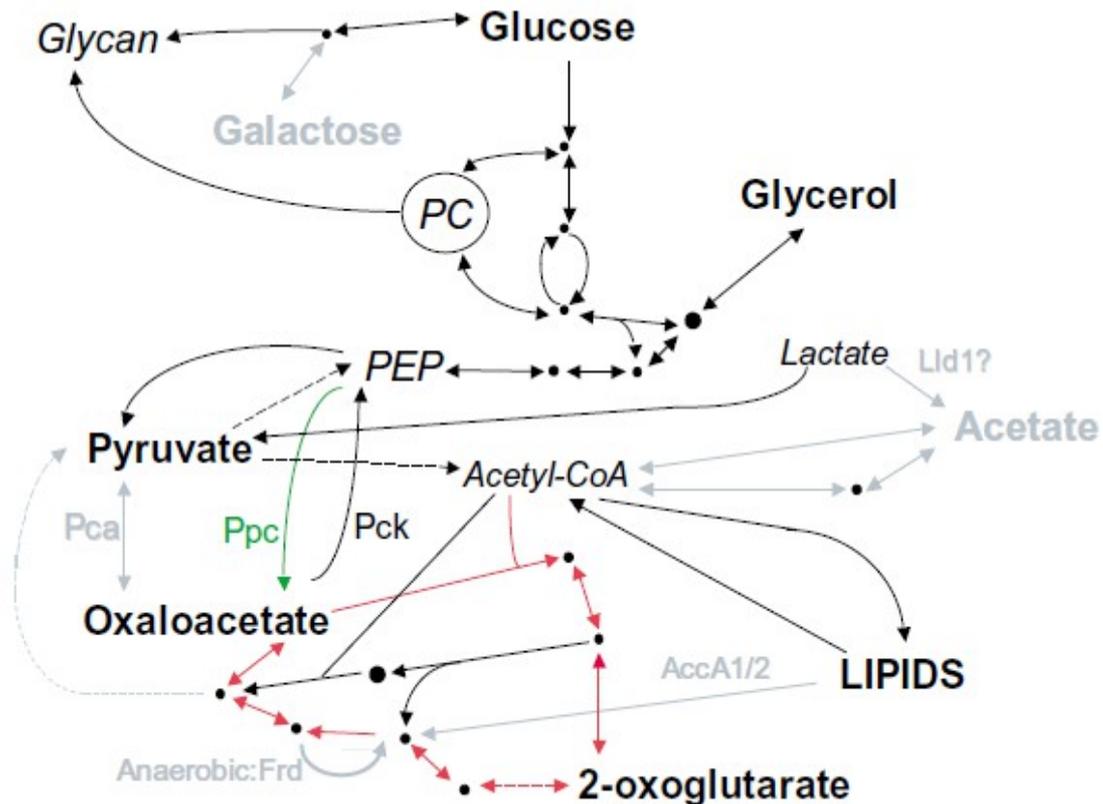


Abbildung 2: Kohlenhydratstoffwechsel von *M. leprae*. Stoffwechselwege in Pfeilen dargestellt. Schwarz oder rot: Stoffwechselweg bei *M. leprae* und *M. tb* vorhanden. Grau: Stoffwechselweg nur bei *M. tb* vorhanden. Grün: nur bei *M. leprae* vorhanden. Gestrichelte Linie: Reaktionen sind möglich, aber mit geringer Aktivität. Mögliche Kohlenstoffquellen für das Wachstum sind fettgedruckt. Graue Kohlenstoffquellen sind nur für *M. tb* verfügbar. Schlüsselmetaboliten sind kursiv gedruckt. Sonstige Metaboliten als Punkte dargestellt. PC = Pentosephosphatweg. Krebszyklus: rote Pfeile (Wheeler 2003).

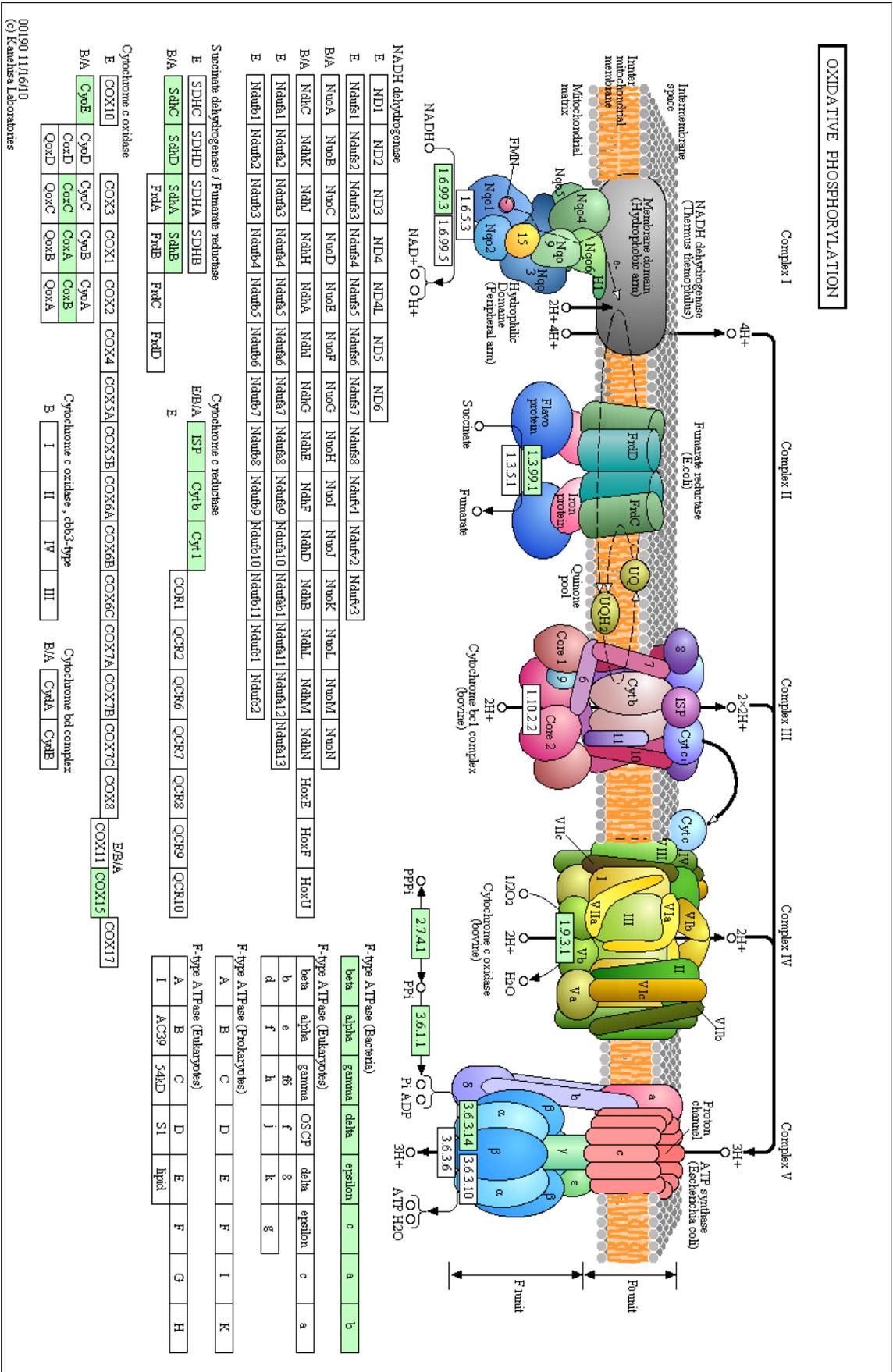
Zur Veranschaulichung der an der Atmungskette beteiligten Komplexe dient Abb. 3. *M. tb* oxidiert NADH wie üblich in der Atmungskette im Komplex I, der NADH-Dehydrogenase, um daraus über die folgenden Schritte der Atmungskette ATP zu gewinnen. Bei *M. leprae* liegt allerdings nur noch das äußerste 3'-Ende des NADH-Oxidase-Operons, nuoA-N, vor, wodurch der Komplex I der Atmungskette seine Funktion nicht mehr erfüllen kann. Das hat zwei weitreichende Konsequenzen. Zum einen kann *M. leprae* NADH nicht zur

ATP-Produktion verwenden, zum anderen ist auch die Regeneration von NAD<sup>+</sup> eingeschränkt, die normalerweise von der NADH-Dehydrogenase vollbracht wird. Das Enzym NDH II, das zwar nicht am Elektronentransport beteiligt ist, ist jedoch in der Lage NADH, das im Zitratzyklus gebildet wird, zu NAD<sup>+</sup> zu regenerieren (Schnappinger et al. 2003). Eine andere Möglichkeit NADH zu oxidieren, wäre für *M.leprae* die Überführung von Pyruvat zu Acetat und CO<sub>2</sub> unter der Verwendung der Lactat-Dehydrogenase und der Lactat-Oxidase. Da *M.leprae*, im Gegensatz zu *M.tb*, eine Phosphoenolpyruvat(PEP)-Carboxylase besitzt, wäre es auch möglich NAD<sup>+</sup> zu regenerieren, indem PEP über Oxalacetat zu Malat oder Fumarat verwandelt wird. Die durch diese beiden Stoffwechselwege entstehenden Säuren können nicht verwertet werden und müssen ausgeschieden werden (Wheeler 2003).

Als einziger Elektronendonator für die Atmungskette ist *M.leprae* FADH erhalten geblieben (Cole 2001).

Neben einer unvollständigen Enzymausstattung für die Atmungskette hat *M.leprae* auch die Enzyme und die von ihnen benötigten prosthetischen Gruppen für anaerobe und mikroaerophile Elektronen-Übertragungs-Systeme verloren. So besitzt es keine Formiat-Dehydrogenase, mit der es Ameisensäure zu CO<sub>2</sub> unter NADH<sup>+</sup>-Gewinn umwandeln könnte, noch die für die Nitrat-Atmung nötige Nitrat-Reduktase. Weiterhin ist *M.leprae* zum reduktiven Zitratzyklus wegen fehlender Fumarat-Reduktase nicht in der Lage (Wheeler 2003) .

Die aus diesen Erkenntnissen resultierende Einschränkung der Energiegewinnung stellt vermutlich eine der Ursachen für die außergewöhnlich lange Verdopplungszeit von *M.leprae* dar. Die Unfähigkeit sowohl zu einer effizienten aeroben Atmung als auch zu einer anaeroben Energiegewinnung spiegelt eindrücklich die Nischenposition von *M.leprae* wider (Cole 2001).



ML2061 dehydrogenase; K03885 NADH dehydrogenase [EC:1.6.99.3]  
 [KO:K03885] [EC:1.6.99.3]  
 ML0697 sdhA; succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC:1.3.5.1)  
 [KO:K00239] [EC:1.3.99.1]  
 ML0696 sdhB; succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit (EC:1.3.99.1)  
 [KO:K00240] [EC:1.3.99.1]  
 ML0699 sdhC; succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit  
 [KO:K00241]  
 ML0698 sdhD; succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor  
 protei [KO:K00242]  
 ML0881 qcrC; cytochrome c reductase cytochrome c component [KO:K03889]  
 ML0880 qcrA; Rieske iron-sulphur reductase component [KO:K03890]  
 ML0879 qcrB; cytochrome b [KO:K03891]  
 ML0584 ctaB; protoheme IX farnesyltransferase (EC:2.5.1.1) [KO:K02301]  
 [EC:2.5.1.-]  
 ML0882 ctaE; cytochrome c oxidase subunit III [KO:K02276] [EC:1.9.3.1]  
 ML1728 cytochrome c oxidase; K02274 cytochrome c oxidase subunit I  
 [EC:1.9.3.1] [KO:K02274] [EC:1.9.3.1]  
 ML0875 ctaC; cytochrome c oxidase chain II (EC:1.9.3.1) [KO:K02275]  
 [EC:1.9.3.1]  
 ML0587 hypothetical protein; K02259 cytochrome c oxidase assembly protein  
 subunit 15 [KO:K02259]  
 ML1146 atpC; F0F1 ATP synthase subunit epsilon (EC:3.6.3.14) [KO:K02114]  
 [EC:3.6.3.14]  
 ML1145 atpD; F0F1 ATP synthase subunit beta (EC:3.6.3.14) [KO:K02112]  
 [EC:3.6.3.14]  
 ML1144 atpG; F0F1 ATP synthase subunit gamma (EC:3.6.3.14) [KO:K02115]  
 [EC:3.6.3.14]  
 ML1143 atpA; F0F1 ATP synthase subunit alpha (EC:3.6.3.14) [KO:K02111]  
 [EC:3.6.3.14]  
 ML1142 atpH; F0F1 ATP synthase subunit delta [KO:K02109 K02113]  
 [EC:3.6.3.14 3.6.3.14]  
 ML1141 atpF; F0F1 ATP synthase subunit B (EC:3.6.3.14) [KO:K02109]  
 [EC:3.6.3.14]  
 ML1140 atpE; F0F1 ATP synthase subunit C (EC:3.6.3.14) [KO:K02110]  
 [EC:3.6.3.14]  
 ML1139 atpB; F0F1 ATP synthase subunit A (EC:3.6.3.14) [KO:K02108]  
 [EC:3.6.3.14]  
 ML0210 ppa; inorganic pyrophosphatase (EC:3.6.1.1) [KO:K01507]  
 [EC:3.6.1.1]  
 ML1681 polyphosphate kinase (EC:2.7.4.1); K00937 polyphosphate kinase  
 [EC:2.7.4.1] [KO:K00937] [EC:2.7.4.1]

*Tabelle 2: Zuordnung der Genomsequenzen zu den entsprechenden Enzymen  
 der Atmungskette (Kyoto University Bioinformatics Center 2011).*

Die Ursache für die Akkumulation von Pseudogenen gerade im Energiemetabolismus von *M.leprae* kann möglicherweise auf den Verlust des dnaQ-Gens zurückgeführt werden, das für eine Untereinheit des DNA-Polymerase-Komplexes kodiert, die für das Korrekturlesen zuständig ist. Der Verlust dieses Gens in Kombination mit dem Verlust zweier weiterer Gene (mutL und mutS), die an dem Mismatch-Reparaturmechanismus beteiligt sind, stellt eine ausreichende Voraussetzung für eine Akkumulation von Pseudogenen dar (Kyoto University Bioinformatics Center 2011). Da *M.leprae* überdies an eine isolierte, intrazelluläre Nische gebunden ist, besitzt es keine Gelegenheit genetisches Material auszutauschen. In der Folge spezialisiert sich sein Metabolismus durch die Akkumulation von mäßig nachteiligen Mutationen immer weiter. Dieser evolutionäre Prozess wird als Muller-Ratsche bezeichnet (Dawes & Mizrahi 2001).

#### **2.2.3.2 Rolle einfacher Kohlenstoffquellen für die Lipidsynthese**

Die grundlegenden Kohlenhydratstoffwechselwege sind bei *M.leprae* erhalten. Somit kann es Glukose und Glycerin metabolisieren, um Energie zu gewinnen oder Glykane zu produzieren (Moran 1996). *M.leprae* ist jedoch nicht in der Lage, alle Intermediärprodukte für die Synthese seiner z.T. hochkomplexen Lipide selbstständig zu synthetisieren. Beispielsweise werden einfache Kohlenstoffquellen wie z.B. Acetat nicht zur Fettsäuresynthese verwendet (Wheeler 2003), was nahelegt, dass Fettsäuren vom Wirt bezogen werden müssen. Letztgenannte Untersuchungen wurden jedoch mit in vivo-angezuchteten *M.leprae* durchgeführt. Es ist bekannt, dass der Lipidmetabolismus von Mykobakterien einer starken Regulation unterworfen ist und insbesondere durch das Vorliegen von Lipiden in der Wachstumsumgebung die Lipidsynthese aus einfachen Kohlenhydraten, wie z.B. Glukose, herunterreguliert werden kann. Somit könnte bei in vivo-gewonnenen *M.leprae* eine geringere Lipidsynthese-Aktivität auf einen negativen Feedbackmechanismus zurückgeführt werden, da im Wirt stets Lipide vorhanden sind. Im Falle der Verwertbarkeit von Acetat für die Fettsäuresynthese wurde dies aber durch entsprechende Experimente mit *M.microti* und *M.avium* in Frage gestellt, die trotz des Vorliegens von Lipiden im

Nährmedium eine gleichbleibend hohe Aktivität der Phosphat-Acetyltransferase zeigten, die für die Verwertung von Acetat notwendig ist. Diese 1988 von Wheeler et al. aufgestellte Vermutung konnte durch die Dechiffrierung des Genoms 2001 belegt werden, die gezeigt hat, dass im Genom von *M.leprae* keine Sequenz für die Phosphat-Acetyltransferase kodiert (Wheeler & Ratledge 1988).

Auch Glycerin, als ein weiterer Vertreter einfacher Kohlenstoffquellen, wird weder für die Synthese von in Acylglyceriden veresterten noch von freien Fettsäuren verwendet, sondern fließt wiederum in den Glycerinrest von Acylglyceriden ein (Scollard et al. 2006a). Weiterhin ging *M.leprae* im Laufe seiner Evolution die Essigsäure als Kohlenstoffquelle verloren, da die dazu nötigen Enzyme Acetat-Kinase, Phosphat-Acetyltransferase und Acetyl-Coenzym A-Synthase nur noch als Pseudogene vorliegen. Ebenso wenig ist *M.leprae* in der Lage, Galaktose zu verstoffwechseln, da die Gene *galK* und *galT* fehlen. Somit muss *M.leprae* die Galaktane seiner Zellwand aus Glukose produzieren. Weiterhin fehlt *M.leprae* die Malat-Decarboxylase, die mit schnellem Wachstum von Mykobakterien assoziiert ist (Wheeler & Ratledge 1988). Insbesondere der Kohlenhydratstoffwechsel einfacher Kohlenstoffe muss bei *M.leprae* somit als degenerativ angesehen werden. Da somit einfache Kohlenstoffe nur in sehr begrenztem Maße für die Lipidsynthese verwertet werden können, ist zu vermuten, dass Lipide bevorzugt vom Wirt aquirit werden (vgl. 2.2.4.6).

Im defektiven Energiemetabolismus und dem Unvermögen, zentrale Kohlenhydratquellen wie Acetat und Galaktose zu nutzen, liegt vermutlich eine der Hauptursachen begründet, weshalb *M.leprae* in axenischen Kulturen nicht anzüchtbar ist (Ratledge 1982b).

## **2.2.4 Lipidstoffwechsel**

### **2.2.4.1 Bedeutung von Lipiden für Mykobakterien und die de novo-Fettsäuresynthese**

Wie bei den meisten anderen Mykobakterien stellen Lipide etwa 40% des Trockengewichts von *M.leprae* dar (Wheeler 2003). Viele dieser Lipide sind

komplex und, wie die Mykolate der Zellwand, für Mykobakterien charakteristisch. Diese komplexen Lipide können großteils selbstständig synthetisiert werden, was die Genomanalysen von *M.leprae* zeigen (Ratledge 1982a). Wheeler et al. haben bereits 1990 festgestellt, dass *M.leprae* eine Verdopplungszeit von 23 Tagen bräuchte, wenn es ausschließlich auf die de-novo Fettsäuresynthese angewiesen wäre. Da die tatsächliche Verdopplungszeit von *M.leprae* allerdings bei 12 Tagen liegt (Brennan & Vissa 2001), können die benötigten Fettsäuren nicht komplett selbstständig synthetisiert werden, sondern müssen aus einer exogenen Quelle rekrutiert werden (Levy 1976).

Tatsächlich enthalten *M.leprae*-Extrakte nur eine kaum nachweisbare Aktivität der de novo-Fettsäuresynthetase. Verglichen mit anderen Mykobakterien war die gemessene de novo-Fettsäuresynthetase-Aktivität bei *M.leprae* aber derart gering, dass Wheeler et al. dies darauf zurückführten, dass *M.leprae* in Wirtszellen herangezüchtet wurde, in denen Lipide vorhanden waren. Fettsäuren, die aus Wirtslipiden freigesetzt werden und in das Mykobakterium aufgenommen werden, würden vermutlich die Fettsäure-Synthetase inhibieren oder zumindest herunterregulieren, wie es auch in anderen Mykobakterien, die in vivo herangezüchtet werden, der Fall ist. Diese Kontrolle geschieht vermutlich auf Ebene der Genexpression (Wheeler et al. 1990). Das Genom von *M.leprae* kodiert für die Fettsäuresynthetase (s. Abb. 4 und Tab. 3). Das heißt, *M.leprae* ist prinzipiell in der Lage, Fettsäuren zu synthetisieren, bevorzugt es aber, ähnlich anderen pathogenen Mykobakterien, Fettsäuren aus Wirtslipiden zu rekrutieren, anstatt sie selbstständig herzustellen (Wheeler et al. 1990).

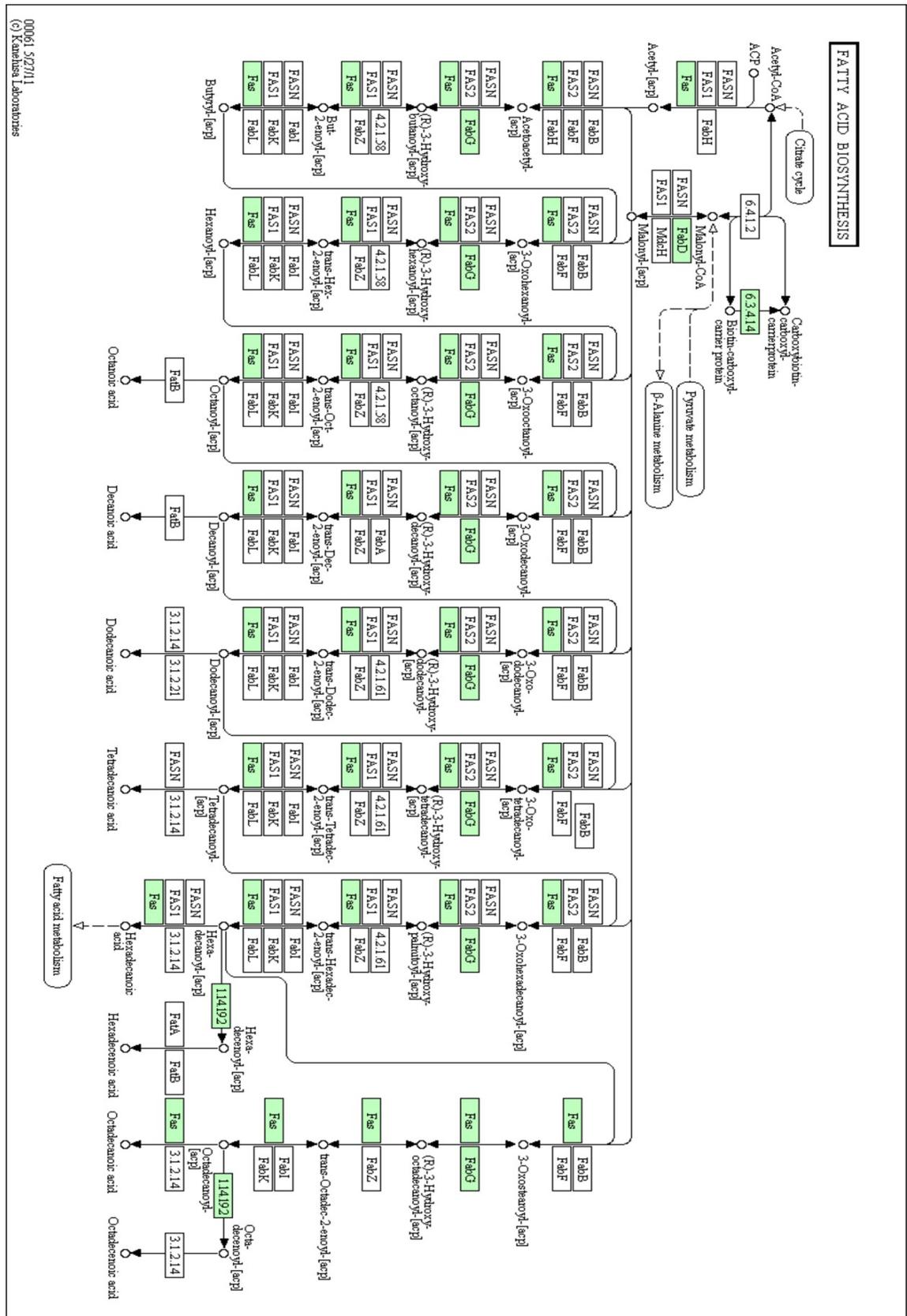


Abbildung 4: Fettsäure-Biosynthese. Die grün hinterlegten Gene konnten im Genom von *M.leprae* identifiziert werden. (Kyoto University Bioinformatics Center 2011).

ML0726	bccA; acetyl/propionyl CoA carboxylase [alpha] subunit (EC:6.3.4.14) [KO:K11263] [EC:6.3.4.14]
ML1653	fabD; acyl-carrier-protein S-malonyltransferase [KO:K00645] [EC:2.3.1.39]
ML1191	fas; fatty acid synthase [KO:K11533] [EC:2.3.1.-]
ML2565	fabG; 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase (EC:1.1.1.100) [KO:K00059] [EC:1.1.1.100]
ML2185	desA1; acyl-[ACP] desaturase [KO:K03921] [EC:1.14.19.2]
ML1952	desA2; acyl-[ACP] desaturase [KO:K03922] [EC:1.14.19.2]

*Tabelle 3: Zuordnung der Genomsequenzen zu den entsprechenden Enzymen der Fettsäure-Biosynthese (Kyoto University Bioinformatics Center 2011)*



ML1158	fadA4; acetyl-CoA acetyltransferase (EC:2.3.1.9) [KO:K00626] [EC:2.3.1.9]
ML2162	fadA; acetyl-CoA acetyltransferase (EC:2.3.1.9) [KO:K00626] [EC:2.3.1.9]
ML2564	fadA2; acetyl-CoA acetyltransferase (EC:2.3.1.9) [KO:K00626] [EC:2.3.1.9]
ML2161	fadB; fatty oxidation complex alpha subunit [KO:K01782] [EC:5.1.2.3 4.2.1.17 1.1.1.35]
ML0120	echA1; enoyl-CoA hydratase (EC:4.2.1.17) [KO:K01692] [EC:4.2.1.17]
ML1241	enoyl-CoA hydratase (EC:4.2.1.17); K01692 enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17] [KO:K01692] [EC:4.2.1.17]
ML1724	enoyl-CoA hydratase (EC:4.2.1.17); K01692 enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17] [KO:K01692] [EC:4.2.1.17]
ML2118	echA6; enoyl-CoA hydratase (EC:4.2.1.17) [KO:K01692] [EC:4.2.1.17]
ML2401	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase (EC:4.2.1.17); K01692 enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17] [KO:K01692] [EC:4.2.1.17]
ML2402	enoyl-CoA hydratase (EC:4.2.1.17); K01692 enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17] [KO:K01692] [EC:4.2.1.17]
ML0660	fadE23; acyl-CoA dehydrogenase [KO:K00249] [EC:1.3.99.3]
ML0887	long-chain-fatty-acid-CoA ligase; K01897 long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3] [KO:K01897] [EC:6.2.1.3]
ML2053	alcohol dehydrogenase; K13953 alcohol dehydrogenase, propanol- preferring [EC:1.1.1.1] [KO:K13953] [EC:1.1.1.1]
ML2639	aldehyde dehydrogenase; K00128 aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3] [KO:K00128] [EC:1.2.1.3]

*Tabelle 4: Zuordnung der Genomsequenzen zu den entsprechenden Enzymen des Fettsäure-Abbaus (Kyoto University Bioinformatics Center 2011).*

Für die Degradierung von Lipiden stehen *M.leprae* nur drei Enzyme zur Verfügung, wohingegen *M.tb* 22 Enzyme für die Lipolyse besitzt (Kyoto University Bioinformatics Center 2011). Eins der drei Lipase-Enzyme von *M.leprae*, lipG, weist Ähnlichkeit zu fadD bzw. mmaA Genen auf und scheint folglich in seiner Funktion auf das Umwandeln von Fettsäuren beschränkt zu sein (Lockwood 2010). Eine weitere Lipase ist eine Phospholipase. Somit bleibt *M.leprae* lediglich ein einziges Enzym für den Abbau von Neutralipiden übrig (Wheeler 2003). Dass die Notwendigkeit für *M.leprae*, Lipide zu degradieren, trotz dieser sparsamen Enzymausstattung von großer Bedeutung zu sein scheint, lassen die Untersuchungen von Cruz et al. von 2008 vermuten. Sie konnten nachweisen, dass Lipasen und Phospholipasen in Wirtszellen dermalen

LL-Läsionen überexprimiert werden. Es ist denkbar, dass die spärliche Lipase-Ausstattung von *M.leprae* durch eine Induktion dieser Enzyme in Wirtszellen kompensiert wird (Cole 2001; Cruz et al. 2008).

#### **2.2.4.3 Anabole und katabole Verwendung von Fettsäuren**

Wie unter 2.2.4.1 und 2.2.4.5 dargelegt, hat *M.leprae* einen großen Bedarf an Kohlenstoff, um seine Strukturlipide zu synthetisieren. Über den Kohlenhydratstoffwechsel von *M.leprae* wurde bereits ausgeführt, dass über die Glykolyse jedoch nur in sehr geringem Umfang Acetyl-CoA produziert wird, was für die Lipidsynthese verwendet werden könnte. Aus den Genomanalysen wird ersichtlich, dass *M.leprae* wohl, ähnlich wie *M.tb*, stattdessen vornehmlich Wirtslipide als Kohlenstoffquelle nutzt (Mattos et al. 2011). Hauptsächlich gestützt wird diese These durch die bemerkenswerte Vielzahl an Paralogen des FadD-Gens. Dieses Gen kodiert für Acyl-CoA-Synthetasen und katalysiert folgende Reaktion: Fettsäure + ATP + Coenzym A  $\leftrightarrow$  Fettsäure-Acyl-CoA + AMP + PP<sub>i</sub>. *M.tb* besitzt 36 dieser FadD-Gene. Aber auch für *M.leprae* ist das Vorliegen von 11 aktiven FadD-Genen bemerkenswert, wenn man die sonst reduktive Genausstattung berücksichtigt. *E.coli* beispielsweise hat nur ein einziges FadD-Gen (Wheeler & Ratledge 1994).

Da die Fähigkeit, Fettsäuren aus veresterten Verbindungen (zB Triglyzeriden) zu gewinnen, durch die geringe Anzahl an Lipasen eingeschränkt zu sein scheint, gleichzeitig aber auf die Metabolisierung von Fettsäuren fokussiert wird, drängt sich die Vermutung auf, dass nicht-veresterte freie Fettsäuren für *M.leprae* von großer Bedeutung sind. Freie Fettsäuren gelten u.a. für Mykobakterien als toxisch und membranschädigend, wenn sie akkumulieren. Somit erfüllt die Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetase zwei Aufgaben. Zum einen die Beseitigung einer schädlichen Substanz, zum anderen die Herstellung von Acyl-CoA, die sowohl in den Katabolismus zur Energiegewinnung, als auch in den Anabolismus zur Lipidsynthese einfließen (Wheeler 2003).

##### **2.2.4.3.1 Polyketidsynthese und Glyoxylat-Zyklus**

FadD ist nicht nur am Fettsäure-Scavenging beteiligt, sondern auch an der Polyketidsynthese (FadD28), d.h. der Synthese der Phthiocerol- und

Mycocerosat-Anteile von PGL-1 (vgl. 2.2.4.5.2.1) (Wheeler 2003).

Daneben können Fettsäuren über den Glyoxylat-Shunt (s. Abb. 6) auch zur Glukosesynthese verwendet werden und von dieser ausgehend beispielsweise der Glykan-Synthese für die Zellwand zugeführt werden. Fettsäuren werden in der Betaoxidation zu Acetat abgebaut und dann zu Acetyl-CoA aktiviert. Hier schließt sich der Glyoxylatzyklus an, der dem Zitratzyklus ähnlich ist. Beide Zyklen beginnen mit der Kondensation eines Moleküls Acetyl-CoA mit Oxalacetat, wodurch Zitrat entsteht, was daraufhin in Isozitat überführt wird. Beim Glyoxylatzyklus spaltet die Isozitatlyase nun Isozitat zu Succinat und Glyoxylat. Glyoxylat wird über die Malatsynthase mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu Malat kondensiert. Das so entstandene Malat kann nun in die Glukoneogenese einfließen und über Phosphoenolpyruvat zu Glukose umgewandelt werden (Wheeler 2003). *M.leprae* besitzt überdies alle für die Glukoneogenese notwendigen Enzyme.

Für das entscheidende Enzym des Glyoxylat-Zyklus, die Isozitat-Lyase, kodiert im Genom von *M.leprae* das Gen *aceA*. Diesem Gen entspricht bei *M.tb* das *icl*-Gen, dessen Transkription heraufreguliert wird, sobald *M.tb* von aktivierten Makrophagen phagozytiert wird. Dies legt eine Verbindung zwischen der Entwicklung der adaptiven Immunität im Wirt und der Expression des Isozitat-Lyase-Gens bei Tuberkulose nahe (Wheeler & Ratledge 1994). Beim quantitativen Vergleich der Transkriptionshäufigkeit des *aceA*-Gens von *M.leprae* aus infizierten Nacktmäusen mit denen aus menschlichen Lepraläsionen konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden. Das könnte bedeuten, dass selbst wenn keine zellulär vermittelte Immunität im Wirt vorliegt, *aceA* konstitutiv exprimiert wird und für das Wachstum von *M.leprae* nötig ist (McKinney et al. 2000). Üblicherweise kodieren konstitutiv exprimierte Gene für Enzyme, die die Grundstoffwechselaktivitäten der Zelle katalysieren, was auch an dem synonymen Ausdruck "Haushaltsgen" (engl. *housekeeping gene*) für die konstitutiv exprimierten Gene deutlich wird. Somit scheint es naheliegend, dass der Glyoxylat-Shunt für *M.leprae* zum Grundstoffwechsel gehört, vergleichbar etwa dem Glukose-Stoffwechsel bei vielen anderen Bakterien.

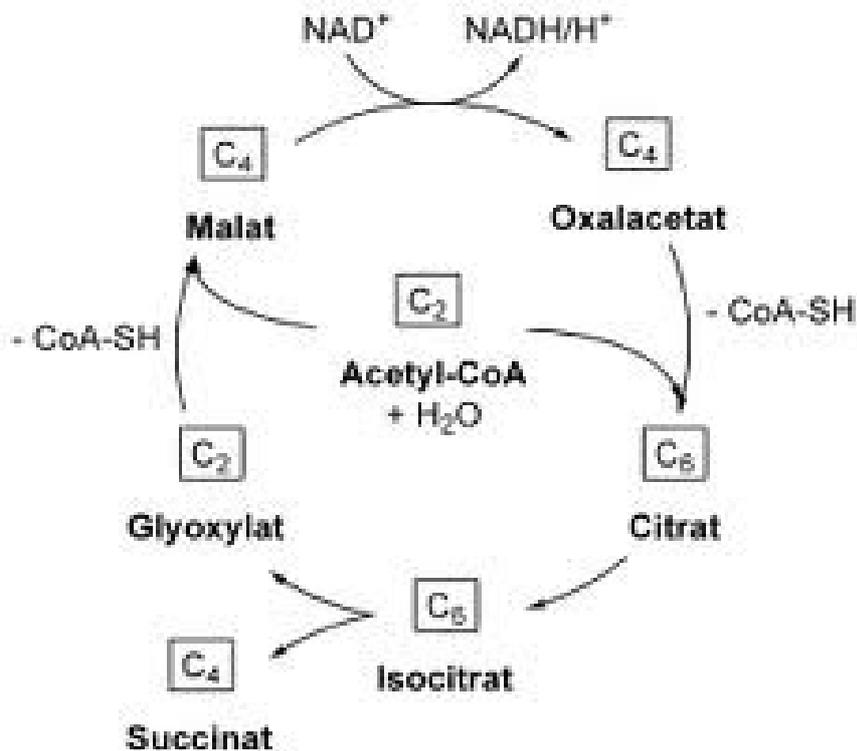


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Glyoxylatzyklus (Wikipedia 2011b)

#### 2.2.4.3.2 Betaoxidation

*M. leprae* nutzt Fettsäuren nicht nur zur Herstellung von Strukturlipiden, sondern auch zur Energiegewinnung mittels Betaoxidation und anschließender oxidativer Phosphorylierung. Durch das Vorliegen und die aktive Transkription der Gene *echA1*, *fadB2*, *fadE5* und *fadA2* erfüllt *M. leprae* alle Voraussetzungen, um Fettsäuren mittels Betaoxidation abzubauen (Williams et al. 2004) (s. Abb. 5 und Tab. 4). Die Genomanalysen von *M. leprae* konnten zeigen, dass *M. leprae* für seine Energiegewinnung Fettsäuren der Glukose vorzieht (Williams et al. 2004). Auf dieser Fähigkeit des Erregers, Fettsäuren zu oxidieren, basierte sogar eine belastbare Methode zum Nachweis der Lebensfähigkeit von *M. leprae* vor der Entwicklung molekularbiologischer Techniken (Franzblau 1988). Im Gegensatz zu den 11 *FadD*-Genen, die an Fettsäure-Scavenging, Polyketidsynthese und Betaoxidation beteiligt sein können, stehen 4 ausschließlich katabol aktive *FadE*-Gene. Diese kodieren für die maßgeblich an der Betaoxidation beteiligten Acyl-CoA Dehydrogenasen

(Wheeler 2003). Die relative Häufigkeit vielseitig aktiver Enzyme passt sich logisch in das Bild eines intrazellulären Bakteriums mit Minimal-Genom ein (Scollard et al. 2006a).

#### **2.2.4.4 Fettsäure-Elongation**

Für die Synthese seiner zahlreichen langkettigen Fettsäuren, wie z.B. der Meromykolsäuren, ist die Aktivität von Fettsäure-Elongasen für *M.leprae* von besonderer Bedeutung.

Zwar können theoretisch diese Fettsäuren aus einzelnen Acetyl-CoA-Molekülen zusammengesetzt werden, naheliegender ist in Anbetracht des wichtigen Stellenwerts der Fettsäure-Aquirierung aus Wirtslipiden aber die Verlängerung von präformierten Acyl-CoA, dem Produkt der FadD Acyl-CoA-Synthetasen (vgl. 2.2.4.3). Zur Verlängerung dieser aktivierten Fettsäureketten ist jedoch ebenfalls Acetyl-CoA nötig. Dies stammt entweder aus der Glykolyse oder der Betaoxidation. Die einzig noch vorhandene PDH von *M.leprae* wird von aceE kodiert, einem Gen, was sich in der upstream-Region der Fettsäure- und Meromykolat-Synthese befindet und eine Kopplung dieser beiden Stoffwechselwege nahelegt. Entsprechend verhält es sich mit der Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase, die für die Herstellung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA notwendig ist und von den Genen accA und accD kodiert wird. AccD6 befindet sich in der downstream-Region von an der Meromykolat-Synthese beteiligten Gene (kasA, B) (Wheeler 2003).

Die Acetyl-CoA-abhängige Fettsäure-Elongase stellt das Hauptenzym der Fettsäureelongation dar. Die Malonyl-CoA-abhängige Elongase hat lediglich eine 100fach geringere Aktivität als die Acetyl-CoA-abhängige Elongase (Wheeler et al. 1990). Nicht nur die Grundaktivität, sondern auch die Regulation dieser beiden Elongasen durch im Wachstumsmedium enthaltene Lipide ist unterschiedlich. Die Acetyl-CoA abhängige Elongase wird durch das Vorliegen exogener Lipide in ihrer Aktivität heraufreguliert, wohingegen die Malonyl-CoA-abhängige Elongase nicht beeinflusst wird. Dies trifft auf das Vorliegen von Acylketten mit bis zu 16 C-Atomen sowohl in künstlich angereicherten Wachstumsmedien als auch in Wirtszellen zu. Die Aktivitätssteigerung der Acetyl-CoA abhängigen Elongase konnte sowohl bei künstlich angezüchteten

Mykobakterien als auch bei in vivo angezüchteten Mykobakterien nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass der Lipidmetabolismus von Mykobakterien wie *M.leprae* je nach Lipidangebot des Wirtes reguliert wird (Wheeler et al. 1990). Der zentrale anaplerotische Stoffwechselweg für die Fettsäure-Verlängerung ist der Glyoxylat-Zyklus, dessen Aktivität bei *M.leprae* nachgewiesen ist (Marques et al. 2008) .

#### **2.2.4.5 Zellwand-Lipide von *M.leprae***

40% des Trockengewichts von *M.leprae* sind Lipide, wovon sich ein großer Teil in der Zellwand befindet. Die Synthese dieser z.T. hochkomplexen Lipide wird von *M.leprae* selbstständig durchgeführt, benötigt aber große Mengen an Lipiden, die wenn möglich vom Wirt aquiriert werden (vgl. 2.2.4.3).

Der Aufbau der Zellwand von *M.leprae* ist komplex (s. Abb. 7). Die Plasmamembran ist mit einer Schicht Peptidoglykan bedeckt, die als der Kern der Zellwand bezeichnet wird, und über eine Verbindungseinheit aus Arabinogalaktan kovalent mit dem Galaktan verbunden. Eine weitere Verbindung in diesem Bereich stellen die dreifachverzweigten Ketten des Arabinans dar, die wiederum mit dem Galaktan verbunden sind. Mykolsäuren sind mit dem Ende der Arabinanketten verbunden und bilden die innere Schicht der Pseudolipid-Doppelschicht. Die äußere Schicht wird durch die Mykolsäuren Trehalose-Monomycolat, die Mycocerosate Phthioceroldimycocerosat (PDIMs) und PGL gebildet. Umgeben wird das Bakterium von einer Kapsel, die hauptsächlich aus PGL, PDIM Phosphatidylinositol-Mannosiden und Phospholipiden besteht. Lipoglykane wie z.B. Phosphatidylinositol-Mannoside, Lipomannan und Lipoarabinomannan sind sowohl in der Plasmamembran verankert als auch in der Kapsel vorhanden (Scollard et al. 2006a).

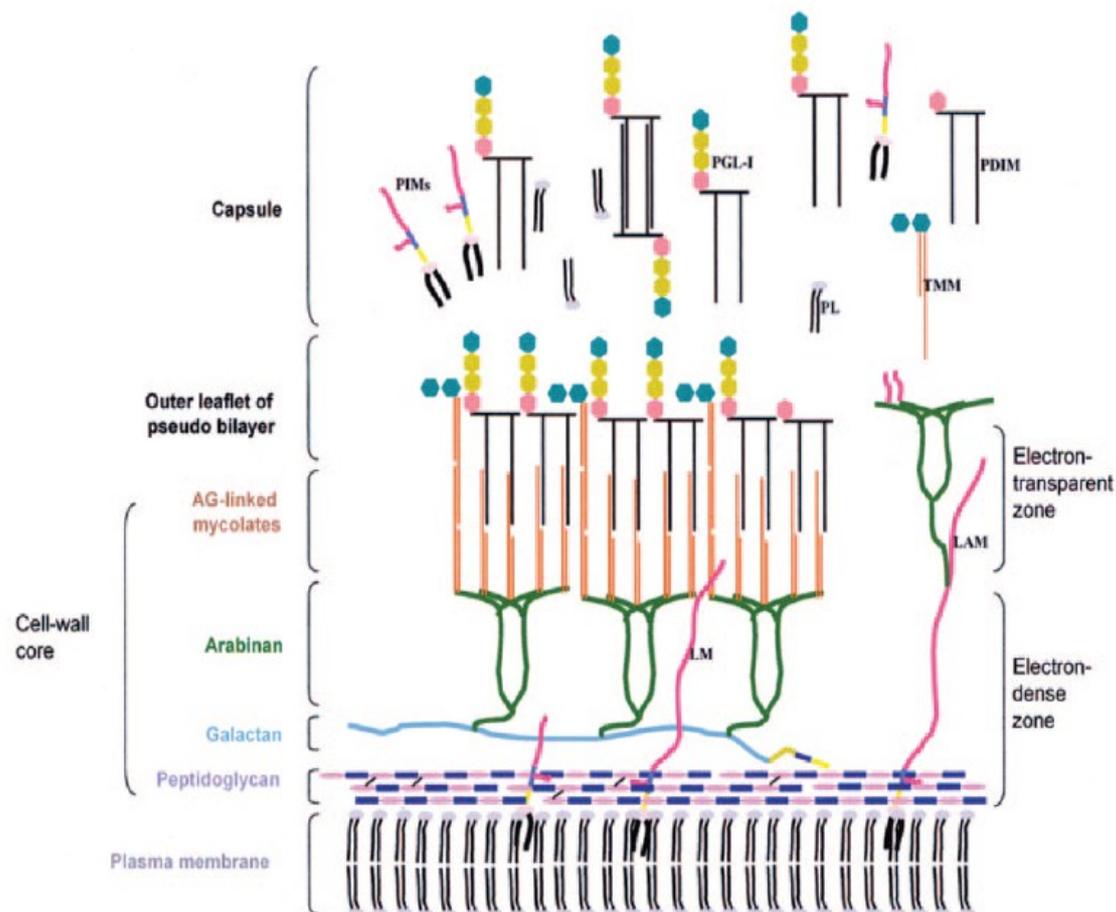


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Zellwand und Kapsel von *M.leprae*. TMM: Trehalose Monomycolat; PDIM: Phthiocerol-Dimycolate; PGL: Phenolisches Glykolipid; LM: Lipomannan; LAM: Lipoarabinomannan; (Vissa & Brennan 2001).

Der Großteil für die Synthese dieses Peptidoglykan-Arabinogalaktan-Mykolsäure-Polymers scheinen im Genom von *M.leprae* enthalten zu sein (Brennan & Vissa 2001). Eine Ausnahme stellen zwei Gene dar, die für die Polyprenyl-Phosphat-Synthese (*dxs-II* und *idi*) von Relevanz sind: Ein Gen (*fabH*) das an der Meromykolat-Synthese und ein Glykosyltransferase-Gen (*pimB*), das an der Biosynthese von Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol-Mannosiden, Lipomannan und Lipoarabinomannan beteiligt ist. Da diese Erkenntnisse v.a. auf vergleichenden Genomanalysen beruhen, muss die Korrektheit dieser Zuordnung von Gen zu Stoffwechselweg noch weiter untersucht werden.

### 2.2.4.5.1 Mykolsäuren

Mykolsäuren sind die längsten natürlich vorkommenden Fettsäuren, überdies sind sie verzweigt. Die Mykolsäuren stellen Strukturelemente aller Mykobakterien dar und umfassen Alpha-Mykolsäuren, die keine Sauerstoffsubstituenten besitzen, und die oxygenierten Keto- und Methoxyformen. Zur Modifikation von Mykolsäuren sind Methyltransferasen nötig. Im Genom von *M. leprae* kodieren die Gene *cmaA*, *mmaA* und *umaA* für diese Methyltransferasen. *M. leprae* besitzt keine Methoxy-Mykolate (Daffé & Draper 1998), da es die *MmaA2* und *MmaA3* Enzyme verloren hat, die bei *M. tb* die Methoxy-Gruppe an die Mykolsäuren anheften. Die Zykluspropanierung der Mykolsäuren geschieht bei *M. leprae* vermutlich durch Enzyme, die durch die *umaA* Gene kodiert werden (Draper et al. 1982; Glickman et al. 2000).

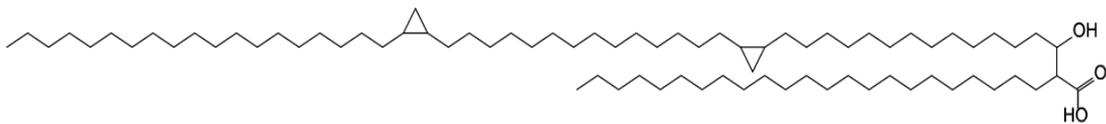


Abbildung 8: Beispiel für eine Alpha-Mykolsäure (Wikipedia 2011c).

### 2.2.4.5.2 PGL-1

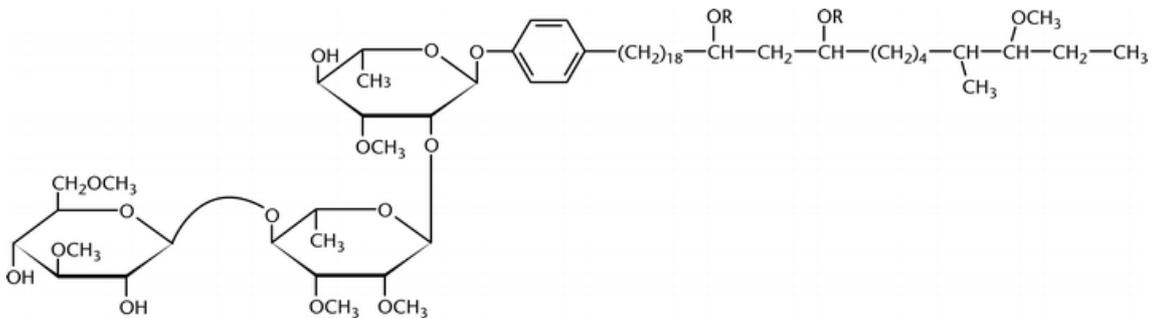


Abbildung 9: Phenolisches Glykolipid 1 (PGL-1)

Das für *M. leprae* spezifische PGL-1 (S. Abb. 9) trägt maßgeblich zur Virulenz des Erregers bei und besitzt immunsuppressive Eigenschaften. Wird das auf dendritischen Zellen exponierte PGL-1 mittels spezifischer Antikörper maskiert, kommt es sowohl zu einer verstärkten Proliferation als auch zu einer vermehrten IFN- $\gamma$  Produktion durch *M. leprae*-aktivierte T-Zellen (Hashimoto et al. 2002).

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass DIM Mykobakterien vor oxidativem Stress schützen (Onwueme et al. 2005). PGL-1-behandelte Monozyten produzierten weniger Superoxidanionen, wenn sie mit *M.leprae* in Kontakt kamen (Chan et al. 1989). Die Verringerung der Superoxidanion-Produktion war dosisabhängig und konnte nicht mit Monozyten reproduziert werden, die mit z.B. PDIM behandelt worden waren (Vachula et al. 1990). Sowohl die Oligosaccharid- als auch, in geringerem Maße, die Phenoxyl-Fraktion des PGL-1 tragen zur Detoxifizierung von Sauerstoffradikalen bei. Ein weiterer Mechanismus, um dem *oxidative burst*, der einer Phagozytose von Mykobakterien folgen kann, zu entkommen, geschieht über die Wechselwirkung mit dem Komplementsystem. PGL-1 bindet dosisabhängig die C3-Komponente des Komplementsystems und befördert die Phagozytose durch Monozyten (Schlesinger & Horwitz 1991). Die Bindung ist von dem PGL-1-spezifischen Oligosaccharid abhängig, wobei monodeglykosyliertes PGL-1 und PDIM zu einer geringeren C3-Fixierung führten. Ebenso ist der MYCS-Rest für die Bindung von C3 notwendig, da deacyliertes PGL-1 diese signifikant reduziert. Die Phagozytose mittels Komplement-Rezeptoren löst keinen *respiratory burst* aus (Scollard et al. 2006a) und stellt für *M.leprae* somit einen effektiven Schutz vor toxischen Sauerstoffradikalen dar.

Einen weiteren Beitrag zur Virulenz von *M.leprae* leistet PGL-1, indem es an dem Tropismus des Erregers für Schwannzellen maßgeblich beteiligt ist. PGL-1 bindet spezifisch an das Laminin-2 der Basallamina von Schwannzell-Axonen. Entscheidend ist bei dieser Interaktion vermutlich das Oligosaccharid von PGL-1, wobei der Lipidrest des Moleküls für die korrekte Präsentation der Oligosaccharid-Einheit zum Laminin-2 von Bedeutung ist (Ng et al. 2000). Überdies induziert PGL-1 die Demyelinisierung von Axonen, was diese in Folge anfälliger für den Eintritt von *M.leprae* macht (Rambukkana et al. 2002).

#### **2.2.4.5.2.1 Synthese von PGL-1**

PGL-1 entsteht durch die Addition von drei O-methylierten Desoxyzuckern an PDIM, einem veresterten zusammengesetzten Lipid, das durch die Mycocerosat-Synthase und die Polyketidsynthase (PKS) Typ I hergestellt wird (Daffé & Draper 1998). Eine evolutive Neuordnung von Genen führt dazu,

dass die Gene, die zur Biosynthese des Phthiocerol-Rests (ppsA-E) nötig sind, sich bei *M.leprae* nun in direkter Nähe zu denen für die Glykosyltransferase (v.a. ML2348) befinden (Brennan & Vissa 2001). Dies hat zur Folge, dass *M.leprae* PGL-1 synthetisieren kann, *M.tb* hingegen, bei dem diese Neuordnung der Gene nicht stattgefunden hat, nur zur Synthese eines verwandten, jedoch nicht glykosylierten oder phenolischen Lipids imstande ist (Wheeler 2003). Die Gene für die Glycosyltransferase, die PDIM zu PGL-1 modifizieren, konnten trotz ausgedehnter Genomvergleiche nicht identifiziert werden (Cole 2001). PDIMs bestehen aus einem Gerüst eines langkettigen 3-Methoxy-, 4-Methyl-, 9,11-Dihydroxy-Glykols (=Phthiocerol) oder einem p-glykosylierten Phenylglykol (=Glykosyl-Phenolphthiocerol). Die Kettenlänge beträgt zwischen 34 und 36 C-Atomen (Onwueme et al. 2005).

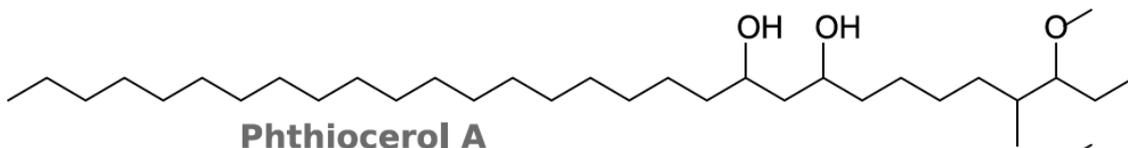


Abbildung 10: Beispiel für ein Phthiocerol (Wikipedia 2010).

Dieses Gerüst ist zweifach verestert mit Di-, Tri- und Tetra-Methyl-verzweigten Acylketten (=Mycocerosate) (Minnikin et al. 1985). Mycocerosate sind 2,4,6-Trimethyl Fettsäuren mit einer einer C-Kettenlänge von etwa 28 (Onwueme et al. 2005).

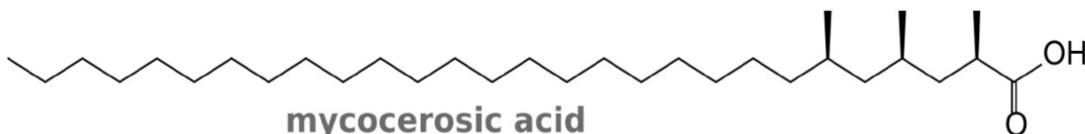


Abbildung 11: Beispiel für ein Mycocerosat (Wikipedia 2010).

Die O-Methylgruppe von Phthiocerol stammt von Methionin. Die C4-Methyl-Verzweigung kommt aus Propionsäure. Das Kohlenstoffgerüst entsteht aus Essigsäure, Propionsäure und 6-Methyl-7-methoxy-Nonanat (Onwueme et al. 2005). Somit scheint *M.leprae* nicht auf den Bezug verzweigtkettiger Fettsäuren vom Wirt angewiesen zu sein. Die Methylverzweigungen der Mycocerosate kommen durch eine sukzessive Kondensation von Propionsäure an einen

Fettsäure-Vorläufer zustande (Onwueme et al. 2005).

Sowohl bei der Mycocerosat- als auch bei der Phthiocerol-Synthese werden also lange Acylketten benötigt (Trivedi et al. 2004), zu deren Synthese Fettsäuren notwendig sind. Für die Polyketide ist die metabolische Verknüpfung von Fettsäure-Aquirierung und der Synthese von Zellwandlipiden bereits aufgedeckt: Für die Synthese und die Translokation von Polyketiden sind bei *M.leprae* hauptsächlich drei Gencluster zuständig, von denen eines für das PGL-1 kodiert. In jedem dieser Cluster befindet sich ein oder mehrere *fadD*-Gene, die für Fettsäure-AcylCoA-Synthetasen kodieren. Die in dem Cluster ebenfalls enthaltenen Acyl-CoA-Ligasen besitzen somit wahrscheinlich auch eine Rolle im Fettsäureumbau und in der Fettsäure-Aquirierung. Dies zeigt eine Verbindung von Fettsäure-Scavenging mit der Synthese der Zellwandlipide von *M.leprae* auf. Wie bereits ausgeführt, werden Fettsäuren bevorzugt vom Wirt bezogen (vgl. 2.2.4.3).

#### **2.2.4.6 Virchow Zellen und Lipid Droplets**

Die hochgradig infizierten Makrophagen dermalen Läsionen von LL-Patienten haben ein schaumiges Aussehen und werden auch als Virchow- oder Leprazellen bezeichnet (Virchow 1863; Scollard et al. 2006a). Die Untersuchung dieser Zellen ergab, dass *M.leprae* innerhalb vergrößerter lipidgefüllter Phagosomen lebt und sich vermehrt (Chatterjee et al. 1959), was eine beträchtliche Veränderung des Lipidmetabolismus bei der Infektion vermuten lässt. Zunächst wurde angenommen, dass diese Lipide von *M.leprae* selbst produziert werden (ähnlich wie PDIMs für PGL-1) (Sakurai & Skinsnes 1970; Kaplan et al. 1983; Brennan 1984), Cruz et al. konnten jedoch 2008 aufzeigen, dass in diesen Zellen oxidierte Phospholipide des Wirtes akkumulieren (Cruz et al. 2008). *M.leprae* befällt neben Makrophagen auch Schwannzellen, die bei LL-Patienten ebenfalls ein schaumiges Aussehen besitzen. Neueste Untersuchungen konnten zeigen, dass sogenannte *lipid droplets* (LD) dieser schaumigen Degeneration von Schwannzellen zugrundeliegen und dazu dienen, *M.leprae* vom Wirt bezogene Lipide im Phagosom zur Verfügung zu stellen (Mattos et al. 2011).

#### **2.2.4.6.1 Lipid droplets**

LDs sind Organellen und werden auch als Lipidkörperchen oder Adiposomen bezeichnet. Sie finden sich in jedem Zelltyp mit der Funktion, Lipide zu speichern. Eine Hauptaufgabe stellt die Verteilung von Neutral- und Phospholipiden auf verschiedene membrangebundene Organellen der Zelle dar (Zehmer et al. 2009). Weiterhin sind LDs an der Wirt-Pathogen-Interaktion zahlreicher Erreger wie Viren, Bakterien, Protozoen und Würmer beteiligt (Wenk 2006; D'Avila et al. 2008; van der Meer-Janssen et al. 2010). LDs spielen auch eine Rolle bei der Synthese und Sekretion von Entzündungsmediatoren (Bozza & Viola 2010; Bozza et al. 2009). Cruz et al konnten auf diesem Gebiet zeigen, dass wirtsbezogene, oxidierte Phospholipide, die in Virchow-Zellen akkumulieren, die angeborene Immunabwehr inhibieren (Cruz et al. 2008). In den LDs, die in Folge einer *M.leprae*-Infektion gebildet werden, werden Eikosanoide synthetisiert, die schließlich zu einer vermehrten PGE2-Produktion von infizierten COX-2-positiven Makrophagen führt (Mattos et al. 2011). In Folge davon wird die Produktion von TH1-Zytokinen inhibiert, was vermutlich zur T-Zell-Anergie der LL-Lepra beiträgt (Betz & Fox 1991).

#### **2.2.4.6.2 Lipid droplets in *M.leprae* infizierten Schwann-Zellen**

Im Februar 2011 veröffentlichten Mattos et al. eine Studie, die durch in vivo und in vitro Versuche den Nachweis liefert, dass die Infektion durch *M.leprae* mittels der Bildung von LDs einen entscheidenden Einfluss auf die Lipidhomöostase von Schwannzellen und das intrazelluläre Überleben von *M.leprae* hat. Der Beweis dieser Hypothese beruht maßgeblich auf den Erkenntnissen, dass die Bildung von LDs in infizierten Schwannzellen von LL-Patienten induziert wird und die LDs dort akkumulieren. Weiterhin besteht in vivo und in vitro eine enge Verbindung zwischen den LDs und *M.leprae* mit dem Ziel, über die Lipide der Adiposomen im Phagosom verfügen zu können. Die Wichtigkeit dieser LD-assoziierten Lipiddegradation wird durch das verminderte Überleben von *M.leprae* deutlich, das in Folge einer unterdrückten LD-Biogenese und eines unterdrückten LD-Transports zu beobachten ist (Mattos et al. 2011).

Es wird angenommen, dass für die Entstehung der Virchow-Zellen in dermalen LL-Läsionen ein vergleichbarer Prozess verantwortlich ist, da *M.leprae* nicht nur

in Schwannzellen, sondern auch in Makrophagen die Bildung von LDs induziert und zu diesen eine enge Verbindung aufrecht erhält (Mattos et al. 2010; Akama et al. 2010).

## **2.2.5 Ausgewählte Bereiche des Proteinmetabolismus**

### **2.2.5.1 Defekte des Aminosäuremetabolismus**

*M.leprae* fehlen die nötigen Enzyme zur Herstellung von Vit. B12 (Cobalamin) und Methionin. Durch den Verlust von Genen für den Schwefeltransport, insbesondere von *metC*, kann Cystein nicht in Methionin umgewandelt werden. Die Gene zur Prolin- und Tryptophan-Biosynthese sind *M.leprae* demgegenüber erhalten geblieben. Vermutlich hätte der Verlust dieser Gene einen nicht tolerierbaren Nachteil auf das Wachstum von *M.leprae* gehabt. Methionin hingegen ist in der Wachstums Umgebung meist vorhanden. Bei Anzüchtversuchen wird dem Nährmedium folglich Vit. B12 und Methionin zugesetzt. Die Defekte im Proteinstoffwechsel von *M.leprae* sind somit nicht verantwortlich für den ausbleibenden Erfolg bei *M.leprae*-Kultivierungsversuchen (Wheeler 2003).

### **2.2.5.2 Sigma-Faktoren und Stressantwort**

*M.leprae* passt sich, wie für intrazelluläre Erreger üblich, an unterschiedliche Umweltfaktoren im infizierten Wirt an, indem es die Expression spezifischer proteinkodierender Gene reguliert, die auf veränderte Umweltbedingungen ansprechen (Williams et al. 2004). Die Regulation von Proteinen, beispielsweise sogenannter "Stressproteine", erfüllen demnach eine wichtige Rolle in der Pathogenität eines Erregers. Für das intrazelluläre Überleben von *M.tb* haben sich Hitzeschockproteine, eine Form der Stressproteine, als entscheidend erwiesen. Die Regulation dieser Hitzeschockproteine geschieht über spezifische Sigmafaktoren der RNA-Polymerase (Manganelli et al. 2002; Manganelli et al. 1999). Allerdings bestehen zwischen *M.leprae* und *M.tb* große Unterschiede, was das Erkennen der Promotorregion und die Transkriptionseinleitung durch Sigmafaktoren betrifft. So kodiert *M.tb* für 13 Sigmafaktoren, wovon 10 zu der ECF (*extracytoplasmic function*)-Familie

gehören (Kaushal et al. 2002). Demgegenüber besitzt *M.leprae* die Sigmafaktorgene sigA und sigB, die der sigma-70-Familie angehören, und sigC und sigE als lediglich zwei Vertreter der ECF-Familie (Cole 2001). Die übrigen Sigmafaktor-Gene (sigD, sigF bis sigK und sigM) liegen im Genom von *M.leprae* als Pseudogene vor. Transkriptionsanalysen zeigten, dass die Gene, die für SigA, SigB, SigC und SigE kodieren, neben zahlreichen Hitzeschock- und anderen Stressproteinen, während der Infektion in Nacktmäusen transkribiert werden. Die *M.leprae* aus Lepraläsionen des Menschen und denen von Mäusen zeigten hinsichtlich der sigA- und sigE-Transkriptionsraten vergleichbare Ergebnisse. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Transkriptionsfaktoren von *M.leprae* für die sigA- und sigE-Transkription in der Leprainfektion des Menschen und der Maus vergleichbar sind.

Die begrenzte Anzahl an Sigmafaktoren stellt für *M.leprae* einen entscheidenden Nachteil im Bezug auf die Anpassungsfähigkeit an verschiedene Umweltbedingungen dar. Beispielsweise wurden die ECF-Sigmafaktoren E und H, die mittels des Sigma-70-Faktors SigB agieren, mit der Fähigkeit von *M.tb* assoziiert bei Temperaturen von 37 °C und mehr zu überleben (Raman et al. 2001). Im Genom von *M.leprae* liegt kein intaktes sigH vor, was erklären könnte, dass *M.leprae* oberhalb einer Temperatur von 33 °C seine metabolische Aktivität in vitro verliert; und folglich kühlere Körperstellen bevorzugt (Truman & Krahenbuhl 2001).

### **2.2.5.3 Eisenstoffwechsel**

Um als Pathogen zu überleben, ist die Beschaffung von Eisen von zentraler Bedeutung. Das mykobakterielle Phagosom scheint die Eisenzufuhr für die darin lebenden Pathogene zu beschränken (De Voss et al. 1999).

*M.leprae* besitzt verschiedene aktive Gene, die für Proteine im Transport und der Speicherung von Eisen als auch für die Regulation des Eisenmetabolismus kodieren. In der Beschaffung von Eisen scheint *M.leprae* allerdings, im Gegensatz zu *M.tb*, beschnitten zu sein. Eine Hauptursache dafür ist das Fehlen des kompletten mbt-Operons, was zur Folge hat, dass *M.leprae* weder Membran-assoziierte noch sezernierungsfähige Salicylat-basierte Mycobactin-Siderophoren herstellen kann (Quadri et al. 1998). Auch konnte keines der

sonst bekannten Gene für Eisenbeschaffung im Genom von *M.leprae* detektiert werden. Somit ist anzunehmen, dass *M.leprae* mittels anderer Mycobactin-ähnlicher oder sonstiger Eisen-Scavenger-Moleküle das benötigte Eisen in der intrazellulären Umgebung bezieht, deren Biochemie noch nicht aufgeklärt wurde (Wittmann et al. 2004). In Frage käme z.B. ein Nramp1-ähnliches Protein, das an der Aufnahme zweiwertiger Metallionen beteiligt ist (Makui et al. 2000).

#### **2.2.5.4 Sezernierte Proteine und immunologische Antwort**

Sezernierte Proteine spielen bei der Suche nach geeigneten Diagnoseverfahren und Vakzinen eine wichtige Rolle. Der Hauptmechanismus für Proteinsekretion über die zytoplasmatische Membran ist bei Bakterien der Sec-abhängige Mechanismus. Die dafür benötigte Markierung und Translokation von Präkursor-Proteinen über die zytoplasmatische Membran hinweg erfordert das Produkt von mindestens sechs Genen bei *E.coli*: secA, secB, secD, secE, secF und secY. *M.tb* und *M.leprae* kodieren für homologe Gene mit Ausnahme von secB. Williams et al. konnten durch bioinformatische Analysen der sec-Gene nachweisen, dass alle sec-abhängigen Gene beim intrazellulären Wachstum von *M.leprae* transkribiert werden und somit die Fähigkeit zur sec-abhängigen Proteinsekretion vorliegt. Untersuchungen von *M.tb* zeigten, dass SecA2 zur Pathogenese nötig ist, unter anderem, weil die Sekretion der Superoxiddismutase ein SecA2-abhängiges Protein darstellt (Braunstein et al. 2003). Die Superoxiddismutase ist für die Virulenz von *M.tb* sehr wichtig, da sie den oxidativen Angriff der Makrophagen auf den intrazellulären Erreger abwehrt. Da während der Infektion von Nacktmäusen mit *M.leprae* ebenfalls die aktive Transkription der secA1- und secA2-Gene nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass sie auch für die Virulenz und das optimale intrazelluläre Wachstum von *M.leprae* von Bedeutung sind. Einige der sezernierten Proteine sind immunogen während der Infektion im Menschen und können sowohl starke B- als auch T-Zell-Antwort hervorrufen (Wiker & Harboe 1992).

Bei der Erforschung der ESAT6-Familie, einer Gruppe kleiner und bei der Tuberkulose hochimmunogener sezernierter Proteine, kam es zu

immunologisch bedeutsamen Beobachtungen. Das ESAT6-Transkript (ML0049) wurde in menschlichen Lepraläsionen in 24fach höherer Konzentration nachgewiesen als in entsprechenden Läsionen von Nacktmäusen. Eine mögliche Erklärung für diese vermehrte ESAT6-Genexpression bei der menschlichen Leprainfektion könnte darin bestehen, dass beim Menschen immunologische Konditionen in den BL- und LL-Läsionen vorliegen, die bei T-Zell-defizitären Nacktmäusen nicht vorkommen. Für *M.tb* konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Genexpression von *icl* (=Isozitatlyase) in aktivierten Makrophagen durch die immunologische Antwort auf den Erreger beeinflusst wird (McKinney et al. 2000). Sollte eine solche Immunantwortbedingte Genexpression auch für *M.leprae* zutreffen, könnte man daraus die für das Wachstum notwendigen Gene für die verschiedenen Lepraausprägungen ableiten. Das wiederum könnte die Unterschiede in der Persistenz von *M.leprae* in menschlichen Organismen erklären und überdies einen Angriffspunkt für die Behandlung einer inapparenten (engl. *dormant*) Leprainfektion darstellen.

## 2.3 WIRTSANTWORT UND IMMUNOLOGIE

### 2.3.1 Lepra-Empfänglichkeit

Nur ein Bruchteil der Personen, die zu *M. leprae* exponiert worden sind und deren Immunsystem sich nachweislich mit dem Erreger auseinandergesetzt hat, erkrankt manifest an Lepra. Es sind also bestimmte Wirtsfaktoren nötig, die eine Person für Lepra empfänglich machen. Bis zur Entwicklung einer symptomatischen Infektion sind verschiedene Schritte nötig, auf deren Ebene jeweils Suszeptibilitätsfaktoren Einfluss nehmen können (s. Abb. 12).

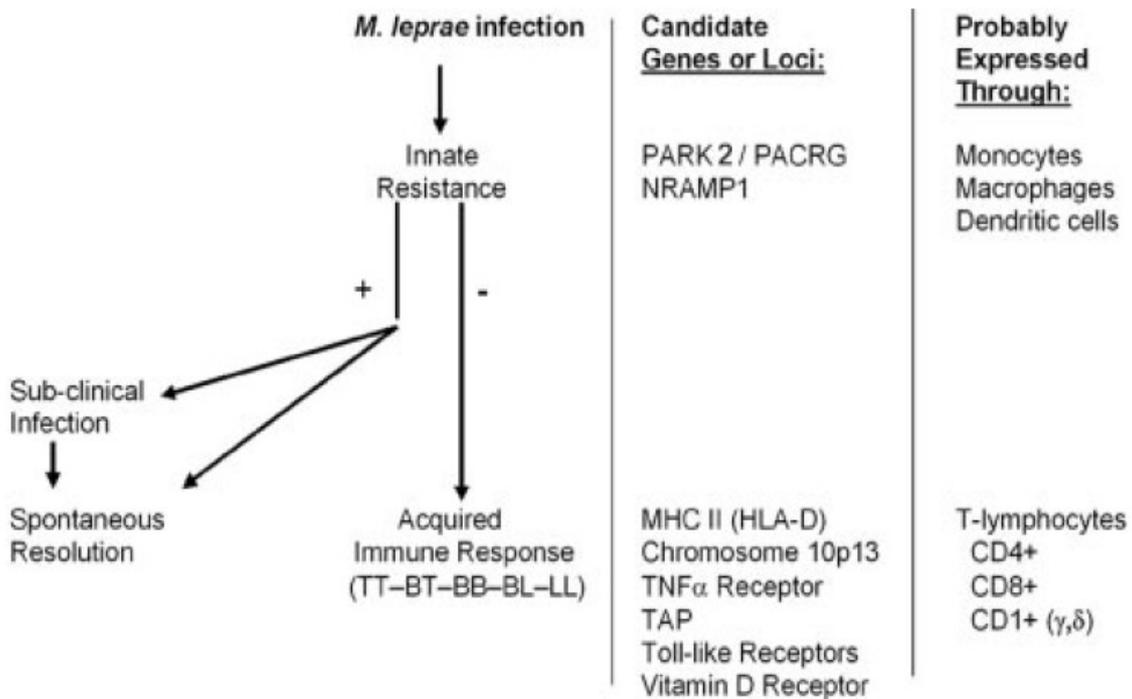


Abbildung 12: Zweistufiges Modell genetischer Einflussfaktoren auf die menschliche Immunität gegen *M. leprae*. Die erste Stufe wird von der angeborenen Abwehr gebildet, die beeinflusst, ob es zu einer Lepra-Infektion per se kommt. Die zweite Stufe besteht aus der erworbenen Abwehr, die zur Ausprägung einer der verschiedenen Erscheinungsbilder der Lepra führt (Scollard et al. 2006a).

Die erste Voraussetzung für ein infektiöses Krankheitsgeschehen ist die Persistenz des Erregers auf dem Wirt und die Vermehrung unter den für ihn geeigneten Umweltbedingungen. Gemäß unserer Hypothese wäre ein

denkbarer Wirtsfaktor auf dieser Ebene das Vorliegen ausreichender Mengen bestimmter Lipide auf der Haut oder im Nasenostium. Den nächsten Schritt stellt die angeborene und erworbene Immunantwort des Wirtsorganismus dar. Auf dieser Ebene sind die anschließend erörterten, v.a. genetisch fixierten Wirtsfaktoren einzuordnen. Im Falle der Lepra kommen noch Faktoren hinzu, die die Entwicklung der Erkrankung in Richtung immunologisch aneurer LL- oder immunologisch kompetenter TT-Form beeinflussen.

5% der Bevölkerung in Endemiegebieten trägt *M.leprae*-DNA in der Nase, doch nur weniger als 5% dieser nachweislich exponierten Personen erkrankt tatsächlich an Lepra (Lockwood 2010; Lang 2010). Eine subklinische Infektion mit Anti-PGL-1-Antikörper tritt mit ca. 2-35% der Bevölkerung endemischer Gebiete viel häufiger auf (Worobec 2009). Weiterhin ist, neben genetischen Determinanten, einer der wichtigsten und mehrfach nachgewiesenen Risikofaktoren für eine Lepraerkrankung der langdauernde, enge Kontakt mit LL-Patienten (vgl. 5.2.2). D.h. *M.leprae* muss als Erreger geringer Infektiosität eingestuft werden, der die für ihn geeigneten Wirte jedoch genau selektiert. Daraus folgt, dass Wirtsfaktoren für die Lepraempfänglichkeit nicht nur auf einer Ebene der Infektion und Manifestation der Lepra eine Rolle spielen, sondern dass vermutlich eine Kombination von Wirtsfaktoren vorliegen muss, dass ein Individuum als leprasuszeptibel einzustufen ist.

### **2.3.1.1 Ursachen für das Clustering von Lepraerkrankungen**

Das Clustering von Leprafällen innerhalb von Haushalten, Familien und der Nachbarschaft wurde mehrfach beschrieben (Bakker et al. 2005; Moet et al. 2006). Diese ist zum Teil auf eine größere Kontaktintensität, die eine erhöhte Ansteckungswahrscheinlichkeit zur Folge hat, zurückzuführen. Allerdings erkranken nur wenige der exponierten Personen innerhalb und außerhalb des Haushalts (Britton & Lockwood 2004; Fischer et al. 2010). Die Existenz genetischer Suszeptibilitätsfaktoren erschien in epidemiologischen Studien wahrscheinlich und konnte durch genetische Untersuchungen in Vietnam und Brasilien bewiesen werden (Mira et al. 2003; Mira et al. 2004). Die epidemiologischen Studien waren jedoch nicht beweiskräftig, da sie die Korrelation von Verwandtschaft und Mitgliedschaft im Haushalt nicht

berücksichtigten. Es konnte gezeigt werden, dass die Risikoerhöhung für nahe Verwandte, an Lepra zu erkranken, nur knapp signifikant ist, wenn die Daten hinsichtlich der Kontaktdistanz (z.B. Haushaltsmitglied vs Nachbar vs sozialer Kontakt) angepasst werden (Moet et al. 2006). Es scheint somit möglich, dass das erhöhte Risiko, das Familienmitglieder tragen, auf den gemeinsamen Risikofaktor des Haushalts zurückzuführen ist. In Frage käme beispielsweise Armut, was in Brasilien als Risikofaktor für Lepra identifiziert werden konnte (Kerr-Pontes et al. 2004).

Um die zugrundeliegenden Faktoren für die heterogene Lepraempfänglichkeit aufzudecken, die für das Clustering innerhalb von Haushalten verantwortlich ist, führten Fischer et al. 2010 eine aufwändige Untersuchung epidemiologischer und soziologischer Daten von über 20 000 Kontakten von 1000 Leprapatienten in Bangladesch aus (Moet et al. 2008; Fischer et al. 2008). Mithilfe eines komplexen Mikrosimulationsmodells wurden insgesamt 18 mögliche Ursachen-Szenarien für die ihnen vorliegenden Daten entwickelt. Die Szenarien entstanden aus der Kombination verschiedener Hypothesen für die Ursache der heterogenen Leprasuszeptibilität: 1. Zufällige Verteilung der empfänglichen Personen 2. Ein dem Haushalt immanenter Faktor (engl. *household factor*) 3. Ein genetischer Faktor (dominant oder rezessiv). 4. Eine Kombination aus Haushaltsfaktor und genetischem Faktor. Diese möglichen Einflussfaktoren wurden mit unterschiedlichen Anteilen empfänglicher Personen an der Gesamtbevölkerung (5%, 10% und 20%) auf die Vereinbarkeit mit den ihnen vorliegenden Daten getestet. Als Orientierung diente dabei die Vermutung, dass etwa 10% des indischen Subkontinents für Lepra empfänglich ist (Meima et al. 2004b). Trotz der beträchtlichen Datenmenge konnte der zugrundeliegende Mechanismus der unterschiedlichen Lepraempfänglichkeit, der für das Clustering in Haushalten verantwortlich ist, nicht identifiziert werden. Weder stellte sich einer der Mechanismen als wahrscheinlicher heraus, noch konnte einer ausgeschlossen werden. Als Ursache für das Scheitern der Identifikation des Suszeptibilitätsmechanismus wurde zum einen die geringe Anzahl neu detektierter Fälle genannt. Zum anderen war nichts über die Eigenschaften des "Haushaltsfaktors" bekannt. Dieser könnte ein komplizierter und zeitabhängiger

Faktor wie beispielsweise Hungerepisoden oder Unterernährung sein (Fischer et al. 2010).

### **2.3.1.2 Genetische Wirtsfaktoren des Immunsystems**

Vor der Identifikation von *M.leprae* als verursachender Erreger der Lepra durch Hansen 1874 wurde Lepra als Erbkrankheit angesehen. Lepra ist zwar nicht vererbbar, aber Zwillingsstudien und die Häufung von Leprafällen innerhalb von Familien weisen auf einen genetischen Anteil der Erkrankung hin. Mittlerweile gibt es ausreichend Evidenz für Gene, die die menschliche Immunantwort auf zwei Ebenen beeinflussen.

Die erste Ebene ist die prinzipielle Empfänglichkeit oder Resistenz gegen Lepra. Das bedeutet, ob nach der Exposition mit *M.leprae* eine Vermehrung und Verbreitung des Erregers im Körper stattfindet und dadurch eine Immunantwort in Form der verschiedenen Erscheinungsbilder der Lepra (von TT bis LL) hervorgerufen wird oder nicht. Dafür verantwortlich ist das angeborene Immunsystem in Form monozytärer Zellen. Die zweite Ebene der genetischen Beeinflussung der Immunantwort auf Lepra kommt zum Tragen, wenn das angeborene Immunsystem unzureichend ist, sich direkt des Erregers zu entledigen. Sie besteht in der Beeinflussung des erworbenen zellulär-vermittelten Immunsystems und dem Phänomen der verspäteten Hypersensitivität des infizierten Organismus auf das Pathogen.

#### **2.3.1.2.1 Genetische Wirtsfaktoren des angeborenen Immunsystems**

Das angeborene Immunsystem besteht hauptsächlich aus T-Lymphozyten und die mit ihnen interagierenden Antigen-präsentierenden Zellen (Scollard et al. 2006a). Für die beiden Gene PARK2/PACRG und NRAMP1 konnte eine Korrelation mit der angeborenen Abwehr und somit der Empfänglichkeit oder Resistenz für Lepra per se nachgewiesen werden.

##### **2.3.1.2.1.1 PARK2 und PACRG**

PARK2/PACRG stellt das erste menschliche Gen dar, das überhaupt mit der Empfänglichkeit für eine Infektionskrankheit assoziiert werden konnte (Buschman & Skamene 2004). Die Korrelation konnte in unabhängigen

Untersuchungen an vietnamesischen und brasilianischen Populationen belegt werden. Der entscheidende Locus ist die Promotorregion von PARK2 und einem koregulierten Gen, PACRG, die sich auf auf Chromosom 6q25-q27 befinden. Das Genprodukt ist PARKIN, was seinen Namen durch die Assoziation mit Parkinson-Frühformen erhielt. Dass dieses Protein auch für die Lepraempfindlichkeit entscheidend ist, war völlig unerwartet. Funktionell stellt dieses Protein eine Ligase im Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg des intrazellulären Proteinabbaus dar (Zhang et al. 2000). Dieser Stoffwechselweg reguliert die Prozessierung von Proteinantigenen innerhalb von Makrophagen und beeinflusst somit die Antigenpräsentation zu Lymphozyten und die darauffolgende Immunantwort (Mueller 2004).

#### **2.3.1.2.1.2 NRAMP1**

NRAMP1 steht für *natural resistance-associated macrophage protein 1* und beeinflusst bei Mäusen die Empfänglichkeit für intrazelluläre Erreger (Skamene et al. 1982). Das Gen wird auch als SLC11A1 bezeichnet und befindet sich beim Mensch auf Chromosom 2q35. Die reifen NRAMP Proteine beeinflussen die Überlebensfähigkeit und Replikation von in Makrophagen lebenden Pathogenen, indem sie Eisen und andere zweiwertige Kationen über die Phagosomen-Membran transportieren (Gruenheid & Gros 2000). NRAMP1 konnte in Studien mit der Empfänglichkeit für Lepra per se und dem Auftreten verschiedener Lepraformen in gewissen Bevölkerungsgruppen assoziiert werden (Abel et al. 1998). Diese geschieht vermutlich durch die Beeinflussung der Expression von MHC II-Molekülen, die Regulierung der TNF $\alpha$ -Expression und die Induktion der NO-Synthase (Blackwell et al. 2000).

#### **2.3.1.2.2 Genetische Wirtsfaktoren des erworbenen Immunsystems**

##### **2.3.1.2.2.1 HLA**

Die genetische Beeinflussung der erworbenen Immunabwehr bei Lepra ist vielfältig. Das humane Leukozyten Antigen (HLA)-DR2 und -DR3 des MHC II-Moleküls konnte mit der tuberkuloiden (pauszillären) Ausprägung der Lepra assoziiert werden (Serjeantson 1983; Ottenhoff & de Vries 1987).

#### **2.3.1.2.2.2 Chromosom 10p13**

Weiterhin konnte eine signifikante Verbindung zwischen einer Reihe von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 10p13 und der Empfänglichkeit für Lepra gezeigt werden. Da die meisten der in dieser Studie untersuchten Patienten an der pauzibazillären Form der Lepra erkrankt waren, kann jedoch keine Aussage getroffen werden, ob diese Genloci mit Lepra per se oder lediglich mit der tuberkuloiden Ausprägung der Krankheit assoziiert sind (Siddiqui et al. 2001)

#### **2.3.1.2.2.3 TAP2**

Das Gen TAP2 auf dem Chromosom 6p21 kodiert für einen Transporter, der an der Prozessierung von Antigenen beteiligt ist (engl. *transporter associated with antigen processing*, Abk. TAP). Die TAP-Proteine transportieren Peptide zum endoplasmatischen Retikulum Antigen-präsentierender Zellen, wo sie für die Antigen-Präsentation an MHC I-Moleküle gebunden werden. TAP2 konnte ebenfalls mit der Entwicklung der pauzibazillären Lepraform in Verbindung gebracht werden, wobei durch die Nähe zu anderen HLA-Genen auf dem Chromosom die Signifikanz dieses Ergebnisses noch ungewiss ist (Rajalingam et al. 1997).

#### **2.3.1.2.2.4 TNF $\alpha$**

TNF $\alpha$  ist auf komplexe Weise in eine Vielzahl von Regulationsmechanismen der menschlichen Immunabwehr von *M.leprae* eingebunden. TNF $\alpha$  wird hauptsächlich von Makrophagen produziert, was eine Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen nach sich zieht. Somit spielt TNF $\alpha$  eine große Rolle bei der unspezifischen Entzündungsreaktion, angeborener Abwehr und ist zu einer sehr effektiven Stimulation der Zell-vermittelten Abwehr in der Lage. Prinzipiell ist TNF $\alpha$  mit einer ausgeprägten Abwehr gegen *M.leprae* assoziiert. So liegt sowohl bei Patienten mit tuberkuloïder Lepra als auch bei Typ1-Reaktionen ein erhöhter TNF $\alpha$ -Serumspiegel vor. Insbesondere für die Promotorregion des für TNF $\alpha$  kodierenden Gens konnten verschiedene Polymorphismen identifiziert werden. Diese Polymorphismen stellen mögliche Einflussfaktoren auf die Intensität der Wirtsantwort und folglich auf die

Entwicklung der verschiedenen Lepraformen dar. So konnte ein Allel mit der lepromatösen Ausprägung der Lepra in Verbindung gebracht werden (Roy et al. 1997), ein anderes mit der tuberkuloiden Form und der Resistenz gegen Lepra per se (Santos et al. 2002). Schließlich werden einige TNF $\alpha$ -Allele auch mit der Reaktionsstärke beim Lepra-Hauttest (Mitsuda-Test) assoziiert (Ferreira et al. 2004).

#### **2.3.1.2.2.5 TLR**

Die so genannten Toll-like Rezeptoren (TLRs) spielen ebenfalls eine Rolle bei der Immunabwehr von *M.leprae*. TLRs sind Zelloberflächenmoleküle und tragen wesentlich zu der Erkennung von Pathogenen bei. Die Aktivierung der TLRs führt zur Freisetzung verschiedener Immunmediatoren, wodurch sie vor allem in der frühen Phase der spezifischen Immunantwort von Bedeutung sind (Heine & Lien 2003). TLR2 kontrolliert verschiedene Bereiche der Immunabwehr von *M.leprae* u.a. die Produktion von Zytokinen und bestimmte Signalwege der Zelle (Bochud et al. 2003; Kang et al. 2002; Krutzik et al. 2003). Nachdem Studien die Empfänglichkeit für Tuberkulose mit Polymorphismen des Vitamin-D Rezeptors in Verbindung brachten (Rook 1988), wurden entsprechende Studien auch für Lepra durchgeführt. Diese konnten eine Assoziation mit der tuberkuloiden und lepromatösen Form der Lepra nachweisen (Roy et al. 1999). Das VDR-Gen kodiert für ein intrazelluläres Rezeptorprotein, das den aktiven Metaboliten von Vitamin D bindet und in der Folge zu einer Aktivierung von Monozyten führt und die Funktion von CD4- und CD8-T-Lymphozyten beeinflusst (Hayes et al. 2003).

#### **2.3.2 Lepra und Immundefizienz**

Um die Pathogenese, einschließlich der Übertragung und immunologischer Wirtsfaktoren, eines Infektionserregers zu eruieren, kann das Betrachten des Krankheitsverlaufs unter immundefizienten Bedingungen wertvolle Hinweise liefern. So tritt im Gegensatz zu Tuberkulose die Lepra bei HIV-Patienten nicht häufiger auf (Hussain et al. 2005; Lucas 1993; Pönnighaus et al. 1991). Die HIV-Infektion scheint keinen Einfluss auf die Empfänglichkeit, die klinische Ausprägung oder die Histologie einer Lepra-Infektion zu haben. Die

Erklärungen hierfür sind noch hypothetisch und bedürfen weitergehender Forschung. Zum einen wird die, im Gegensatz zu *M.tb*, geringe Virulenz von *M.leprae* als mögliche Ursache angesehen. So könnte das sehr langsame Wachstum von *M.leprae* dem Immunsystem des Wirts ein besseres Mithalten gewährleisten, auch wenn es durch die HIV-Infektion schon geschwächt ist (Scollard et al. 2006a). In Zeiten vor Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) wurde auch erwogen, dass HIV-Patienten sterben, bevor ihre Lepra-Infektion aufgrund der langen Inkubationszeit manifest wird (Lucas 1993).

Wenn eine HIV-Infektion auch das prinzipielle Auftreten von Lepra nicht zu begünstigen scheint, so hat die Therapie der HIV-Infektion durchaus einen Einfluss auf den Verlauf der Lepra. Nach dem Beginn der HAART konnte bei einigen Patienten, ähnlich einem Immun-Rekonstitutions-Inflamations-Syndrom (IRIS), die Manifestation einer vorher unbekanntem Lepra-Infektion beobachtet werden (Couppié et al. 2004; Lawn et al. 2003). Überdies trat bei diesen Patienten oft eine Typ-1-Reaktion auf. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine subklinische Lepra in endemischen Gebieten unter HIV-Patienten häufiger der Fall ist, als bisher angenommen.

Im Gegensatz zur Immunsuppression durch HIV gibt es Beobachtungen bei Patienten unter medikamenteninduzierter Immunsuppression bei schwerer Arthritis und Organtransplantationen, bei denen eine vorher inapparente Lepra-Infektion manifest geworden ist bzw eine vorbestehende Lepra in Richtung lepromatöser Lepra exazerbierte. Auf die Lepra-Therapie sprachen diese Patienten gut an, es kam jedoch, vergleichbar den Beobachtungen unter HIV-positiven Patienten unter HAART, zu einer Typ1-Reaktion (Scollard et al. 2006b; Modi et al. 2003).

### **2.3.3 Prophylaxe und Impfung**

Die Identifikation von Wirtsfaktoren hat als maßgebliches Ziel die Anwendung einer gezielten Prophylaxe oder Impfung, um die Erkrankung einer exponierten und suszeptiblen Person zu verhindern. Bei den aktuellen Bemühungen der WHO um die Kontrolle der Lepra steht die Therapie der Krankheit im Vordergrund. Zwar konnte die Prävalenz so gesenkt werden, die Inzidenz von

Lepra hat sich aber kaum verändert. Überdies erleiden 16 bis 39% der multibazillären Patienten mit hohen BIs innerhalb der 4 bis 10 Jahre nach der 2jährigen MDT einen Rückfall (Gelber et al. 2004; Girdhar et al. 2000; Jamet & Ji 1994). Für die Kontrolle und letztendlich auch die Ausrottung der Lepra sind also weitere Strategien nötig, nicht nur eine Therapie der Erkrankung. Um die Inzidenz einer Krankheit zu senken, muss ihre Übertragung verhindert werden. Dies kann entweder über gezielte prophylaktische Maßnahmen für exponierte und empfängliche Individuen geschehen oder über eine Impfung in Endemiegebieten. Eine geeignete Vakzine sollte auch gegen resistente *M.leprae*-Stämme schützen, womit eine Verbreitung dieser Stämme eingedämmt würde.

### **2.3.3.1 BCG**

Die besterforschte Impfung für Lepra ist der *M.bovis* BCG-Impfstoff. Die Effektivität dieser Impfung für Lepra variiert in dem breiten Spektrum von 20 bis 80% (Scollard et al. 2006a). Auch was den Schutz gegen Tuberkulose betrifft, gibt es eine große Spannbreite bei der BCG-Impfung, deren Ursachen in biologischen Unterschieden der verwendeten BCG-Stämme, der Exposition zu in der Umwelt vorkommenden Mykobakterien, dem ineffektiven Boostern gegen eine Reinfektion mit oder der Reaktivierung von Tuberkulose angenommen werden (Fine 2001). Ähnliche Ursachen kommen vermutlich auch für die unterschiedliche Effizienz der BCG-Impfung für die Lepra in Frage. Mehrere Studien haben die Kombination des BCG-Impfstoffes mit abgetöteten *M.leprae* auf ihre Wirksamkeit untersucht, konnten jedoch im Großteil der Fälle keine verbesserte Schutzwirkung zeigen. Weitere Studien wurden mit Vakzinen abgetöteter atypischer Mykobakterien, Mykobakterium w (Katoch 1981) und ICRC (Desikan & Sreevatsa 1995; Ranadive et al. 1962) durchgeführt. In einer indischen Studie erwies sich die Kombination dieser Impfstoffe mit BCG dem alleinigen BCG-Impfstoff überlegen.

Der Einsatz von Lepraimpfstoffen zu therapeutischen Zwecken ist noch kaum erforscht. Es gibt einige Berichte, dass die Verabreichung eines Mycobakterium w-basierten Impfstoffes zusätzlich zur MDT zu einer klinischen und histopathologischen Verbesserung und einem verminderten BI führt (De

Sarkar et al. 2001). Diesen positiven Effekten steht allerdings eine in verschiedenen Studien beobachtete signifikante Erhöhung von Typ1-Reaktionen gegenüber (Zaheer et al. 1993). Hier wird deutlich, wie schwer es bei der Anwendung einer postexpositionellen Vakzine ist, ein Gleichgewicht zwischen der erwünschten Stimulation der Zell-vermittelten Abwehr und dem Vermeiden schädlicher Überreaktionen zu finden.

Die Entschlüsselung des *M.leprae*-Genoms hat den Weg für neue Impfstoffentwicklungen geebnet, indem Gene identifiziert werden können, die für Vakzine-geeignete Protein-Antigene kodieren. Im Fokus steht die Entwicklung von Vakzinen, die auf der BCG-Impfung beruhen, wie beispielsweise eine rekombinante BCG-Impfung, die gewisse Antigene überexprimiert oder die Herstellung von Adjuvanzen (Priming), die von einer BCG-Impfung geboostert werden. Letzteres wurde im Tiermodell für Tuberkulose bereits mit Erfolg durchgeführt (Brandt et al. 2004; McShane et al. 2001; Mollenkopf et al. 2004).

Bei der Weiterentwicklung des BCG-Impfstoffes zum Zwecke des besseren Schutzes gegen Tuberkulose wie durch die Prime-Boost-Strategie oder das genetic engineering sollte stets geprüft werden, ob der so neu entwickelte Impfstoff auch noch gegen Lepra wirkungsvoll ist.

## 2.4 EPIDEMIOLOGIE DER LEPROSA

### 2.4.1 Prävalenz und Inzidenz seit 1985

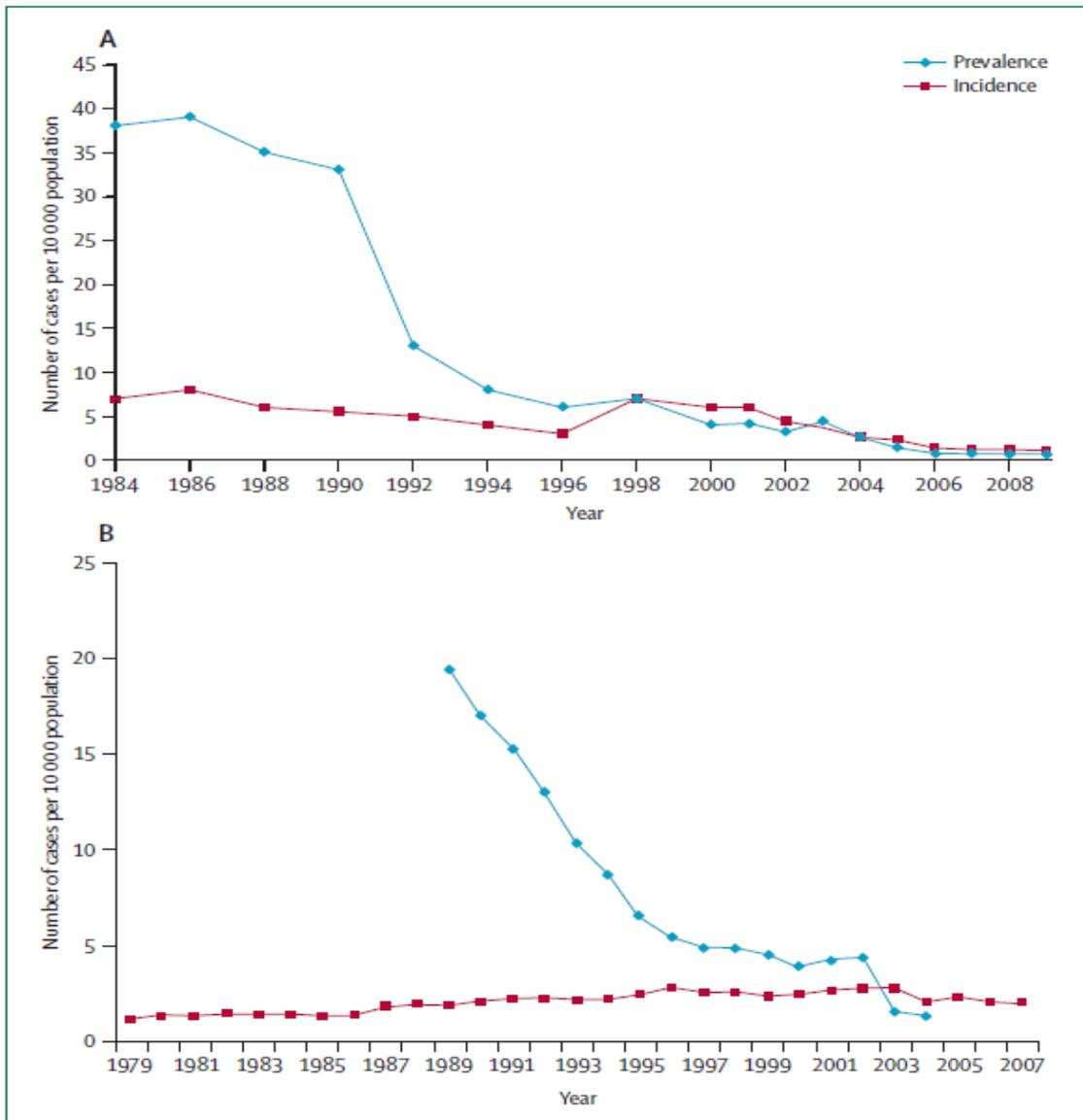


Abbildung 13: Inzidenz (CDR) und Prävalenz von Lepra in Indien (A) und Brasilien (B) (Rodrigues & Lockwood 2011).

Gemäß den WHO-Daten ist die Prävalenz der Lepra von 5 Mio im Jahr 1985 auf 750 000 im Jahr 2000 gesunken (vgl. 5.1.1). Seit 1985 wurden mehr als 14 Millionen Leprapatienten durch MDT geheilt, die CDR ist während des gleichen Zeitraums jedoch nur unwesentlich abgefallen (Fine 2007). *M. leprae* wird also weiterhin übertragen. Die Implementierung einer flächendeckenden und kostenfreien MDT konnte zwar die Prävalenz senken, hatte jedoch nur

ungenügenden Einfluss auf die Inzidenz (Meima et al. 2004a). Die Ursache hierfür bleibt ungeklärt (Job et al. 2008; WHO 2006). Exemplarisch lässt sich diese Entwicklung an Brasilien und Indien aufzeigen (s. Abb. 13). Der geringe Abfall der Lepra-Inzidenz weltweit lässt sich Abb. 14 entnehmen.

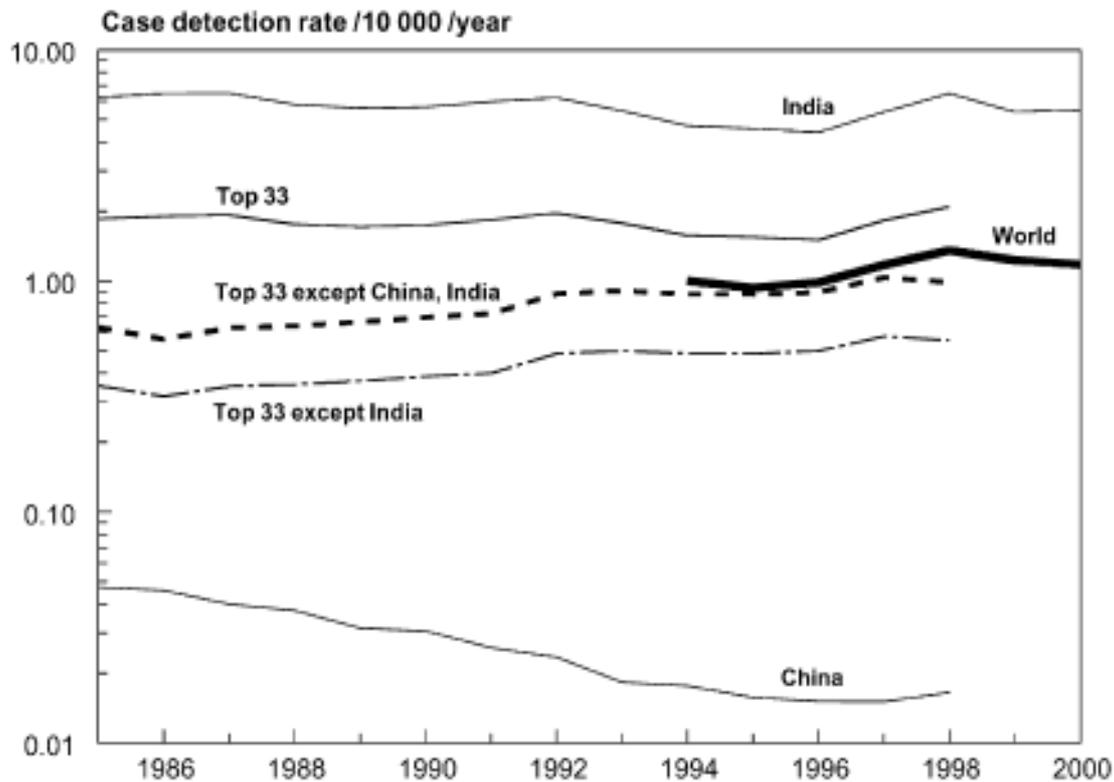


Abbildung 14: Case Detection Rate weltweit, für Indien, China und die Top 33 endemischen Länder mit und ohne Indien und China von 1985 bis 2000 (Meima et al. 2004a).

## 2.4.2 Aktuelle Prävalenz und Inzidenz

Die Lepraprävalenz ist von 620 538 Fällen im Jahr 2002 auf 213 036 im Jahr 2009 abgefallen (Anon 2008; Anon 2009). 80% der Prävalenzfälle treten in nur 6 Ländern auf, wovon 60% auf Indien fallen und der Rest auf Brasilien, Burma, Indonesien, Madagaskar und Nepal (Britton & Lockwood 2004). Die ungleichmäßige Verteilung von Lepra (engl. *clustering*) lässt sich von weltweiten epidemiologischen Betrachtungen bis auf Gemeinde- und individuelle Ebene weiterverfolgen. So verfallen beispielsweise 70% der Neuerkrankungen auf nur 5 der 25 indischen Regierungsbezirke (WHO 2000). Auch aus den aktuellen

Zahlen der NLEP von 2010 lässt sich die Clusterbildung erkennen: 3 Regierungsbezirke (Bihar, Chhattisgarh und Dadra and Nagar Haveli) weisen eine Prävalenz zwischen 1 und 2,5 /10 000 auf und, obwohl sie nur ca. 10% der Bevölkerung stellen, tragen sie zu fast 20% der Fallzahlen und Neuerkrankungen bei (NLEP 2011).

Die Leprainzidenz beträgt seit etwa 5 Jahren 250 000 Fälle pro Jahr, wobei 94% der Patienten in den 17 Ländern registriert wurden, die mehr als 1000 neue Fälle pro Jahr aufweisen (s. Abb. 15 und 16). 2009 wurden in der WHO-Region Südostasien 160 000, in den Amerikas 40 000 und in Afrika 30 000 neue Fälle registriert. Der Anteil an Frauen ist mit 30-45% der Fälle in allen Regionen konstant, ebenso der Anteil der Kinder mit 7,5 - 10% (WHO 2010). Es werden aus allen Lepra-endemischen Ländern z.T. erhebliche Zahlen von Neuerkrankungen gemeldet (s. Abb. 17 und 18).

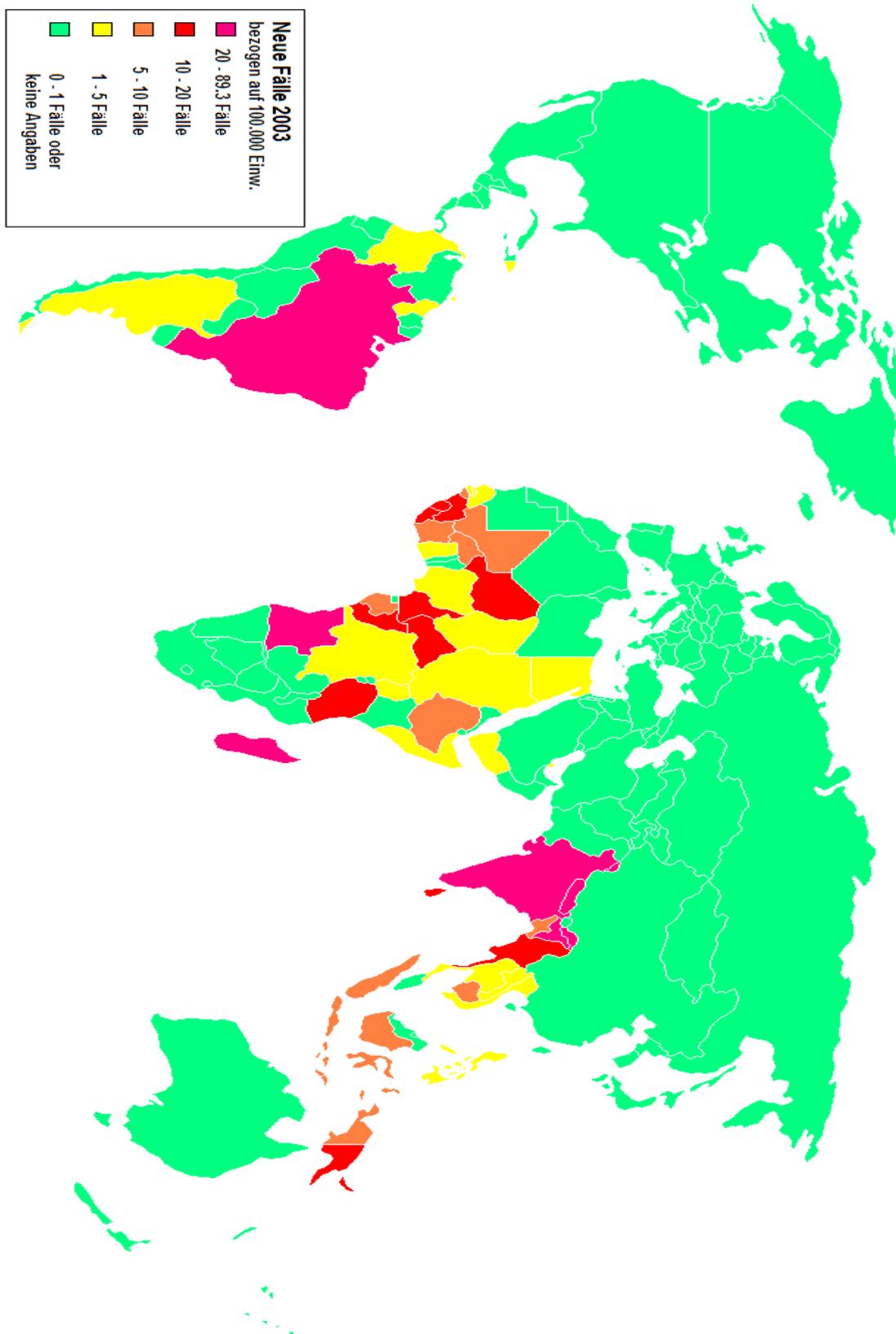


Abbildung 15: CDR für Lepraerkrankungen weltweit im Jahr 2003 (Wikimedia 2010 gemäß WHO-Daten)

Country – Pays	No. of new cases detected – Nombre de nouveaux cas dépistés								
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009		
Bangladesh	8 712	8 242	7 882	6 280	5 357	5 249	5 239		
Brazil – Brésil	49 206	49 384	38 410	44 436	39 125	38 914	37 610		
China – Chine	1 404	1 499	1 658	1 506	1 526	1 614	1 597		
Democratic Republic of the Congo – République démocratique du Congo	7 165	11 781	10 369	8 257	8 820	6 114	5 062		
India – Inde	367 143	260 063	169 709	139 252	137 685	134 184	133 717		
Ethiopia – Éthiopie	5 193	4 787	4 698	4 092	4 187	4 170	4 417		
Indonesia – Indonésie	14 641	16 549	19 695	17 682	17 723	17 441	17 260		
Madagascar	5 104	3 710	2 709	1 536	1 644	1 763	1 572		
Mozambique	5 907	4 266	5 371	3 637	2 510	1 313	1 191		
Myanmar	3 808	3 748	3 571	3 721	3 637	3 365	3 147		
Nepal – Népal	8 046	6 958	6 150	4 235	4 436 <sup>a</sup>	4 708 <sup>a</sup>	4 394 <sup>a</sup>		
Nigeria – Nigéria	4 799	5 276	5 024	3 544	4 665	4 899	4 219		
Philippines	2 397	2 254	3 130	2 517	2 514	2 373	1 795		
Sri Lanka	1 925	1 995	1 924	1 993	2 024	1 979	1 875		
Sudan – Soudan	906	722	720	884	1 706 <sup>b</sup>	1 901 <sup>b</sup>	2 100 <sup>b</sup>		
United Republic of Tanzania – République-Unie de Tanzanie	5 279	5 190	4 237	3 450	3 105	3 276	2 654		
<b>Total (%)</b>	<b>491 635 (96)</b>	<b>386 424 (95)</b>	<b>285 257 (95)</b>	<b>247 022 (93)</b>	<b>240 664 (93)</b>	<b>233 263 (94)</b>	<b>227 849 (93)</b>		
<b>Global total – Total général</b>	<b>514 718</b>	<b>407 791</b>	<b>299 036</b>	<b>265 661</b>	<b>258 133</b>	<b>249 007</b>	<b>244 796</b>		

<sup>a</sup> New cases detected from mid-November 2008 to mid-November 2009. – Nouveaux cas dépistés entre la mi-novembre 2008 et la mi-novembre 2009.

<sup>b</sup> Includes data from southern Sudan. – Comprend les données du Sud-Soudan.

Abbildung 16: Entwicklung der Annual New Case Detection Rate seit 2003 der 16 Länder mit einer ANCDR  $\geq 1000$  im Jahr 2009 (WHO 2010).

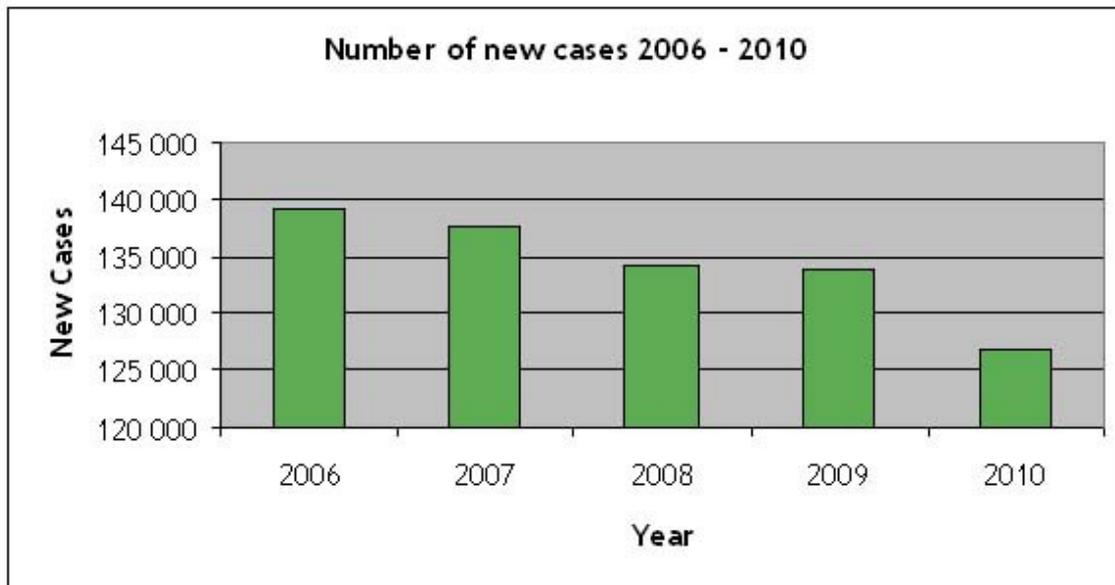


Abbildung 17: Entwicklung der ANCDR in Indien 2006-2010 (ILEP 2010b; WHO 2010).

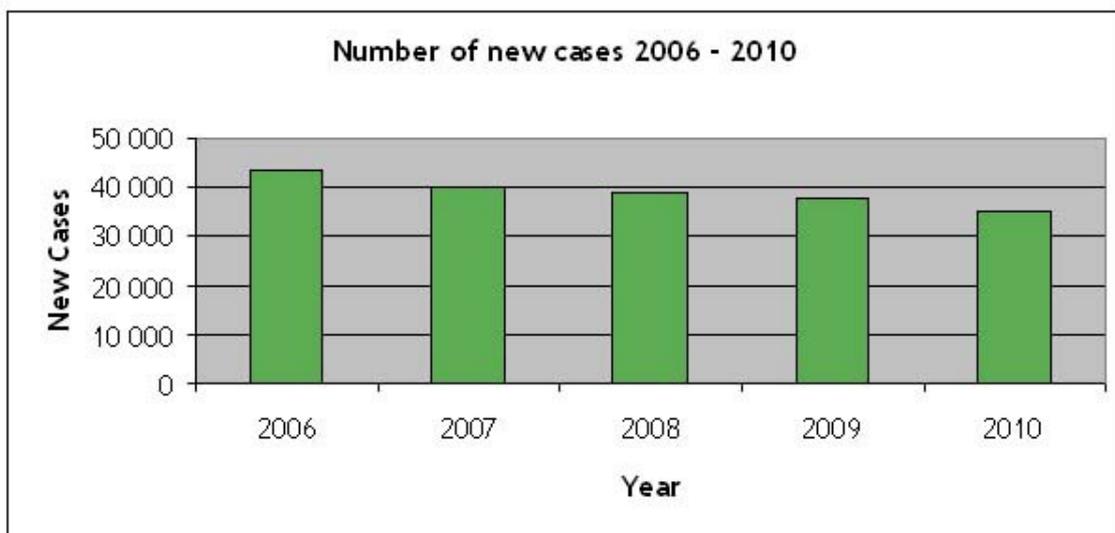


Abbildung 18: Entwicklung der ANCDR in Brasilien 2006-2010 (WHO 2010; ILEP 2010a).

### 2.4.3 Epidemiologie der Lepra bis zum 20. Jahrhundert

Die Betrachtung der Epidemiologie kann u.a. Hinweise auf Risikofaktoren für die Verbreitung einer Krankheit und zugrundeliegende Transmissionsmechanismen geben. Im Folgenden wird die Verbreitung der Lepra von ihren Anfängen bis zum 20. Jahrhundert mit einem Fokus auf dem mittelalterlichen Europa aufgezeigt.

### 2.4.3.1 Verbreitung der Lepra bis zum 20. Jahrhundert

Der Ursprung der Lepra scheint in Süd- oder Ostasien zu liegen (Stone et al. 2009). 2009 wurde ein 4000 Jahre altes Skelett entdeckt, das Spuren einer Lepraerkrankung aufweist (Robbins et al. 2009). Von dort hat Alexander der Große (356-323 v. Chr.) die Lepra in die Mittelmeerregion gebracht, von wo aus sie sich durch die Kreuzzüge (11.-13. Jhd) nach Nordeuropa weiterverbreitete. Die weiteste Verbreitung und die meisten Fallzahlen werden in Europa für das 13. Jhd angesetzt. Im gleichen Zeitraum kam es in Europa zu einer zunehmenden Verstädterung, die bis ins Spätmittelalter weiterging, dann jedoch durch die Pest unterbrochen wurde (Abulafia, D. 1998). Ab diesem Zeitpunkt nahm die Verbreitung der Lepra wieder ab, bis sie mit dem Ende des 16. Jhds aus Europa weitgehend verschwunden war. Anhand der Zahl von Lepra-Krankenhäusern in England lässt sich diese Entwicklung veranschaulichen (s. Abb. 19).

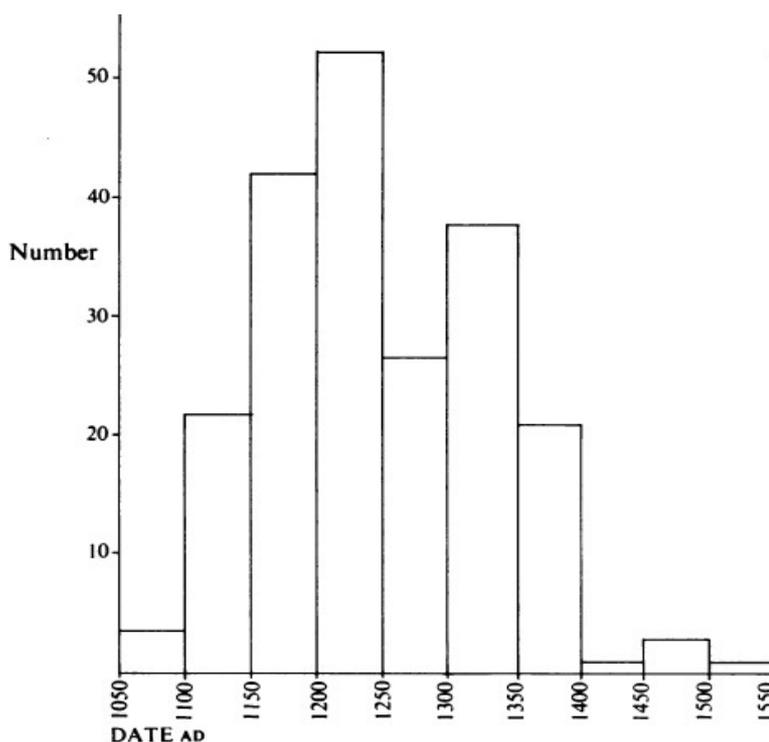


Abbildung 19: Anzahl der englischen Leprakrankenhäuser von 1050 bis 1550 (Manchester 1984).

Am Ende des 17. Jhds gab es nur noch in Norwegen und Island eine relevante Anzahl an Lepraerkrankungen. Während der 1830er Jahre kam es zu einem

schnellen Anstieg der Lepraerkrankten in Norwegen. Mitte des 19. Jhds kamen in Norwegen mehr als 2000 Erkrankte auf eine Gesamteinwohnerzahl von nur 2 Millionen. In Deutschland kam es in dieser Zeit nur zu vereinzelt Fällen an Lepra (Meyer 1888). Gegen Ende des 19. Jhds ging die Lepra aber auch in Norwegen rasant zurück (s. Abb. 20).

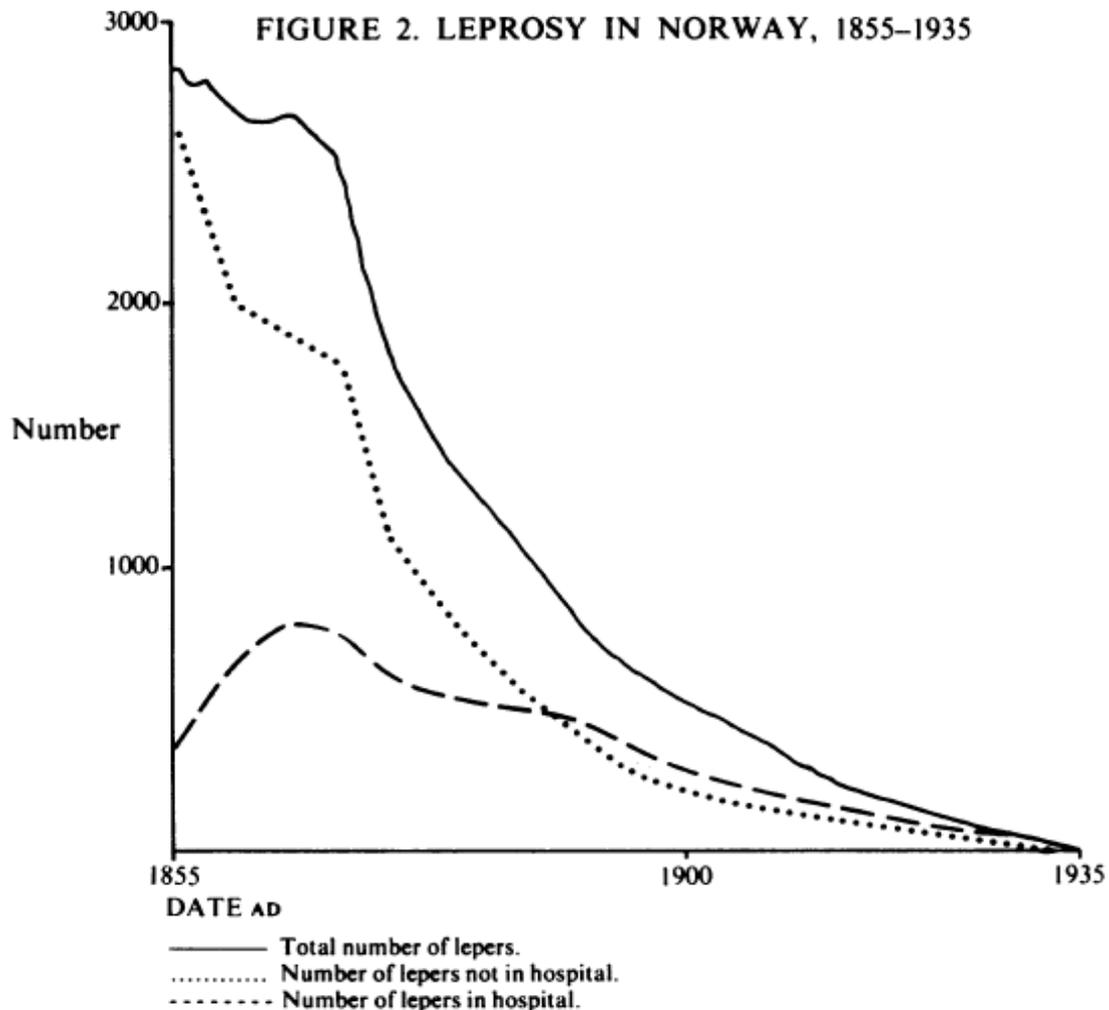


Abbildung 20: Anzahl der Lepraerkrankten in Norwegen von 1855 bis 1935 (durchgezogen: Gesamtanzahl, gepunktet: außerhalb von Kliniken, gestrichelt: innerhalb von Kliniken) (Manchester 1984).

Die Ursache für den Rückgang der Lepra wird weitgehend der Segregation der Leprapatienten in Leprosarien zugeschrieben, in denen v.a. infektiöse LL-Patienten gezwungen waren zu leben. Aus Abb. 20 geht jedoch hervor, dass in Norwegen im späten 19. Jhd nur ein kleiner Teil der Leprapatienten in Anstalten untergebracht war und der Abfall der Leprafälle nicht mit der Anzahl der

segregierten Patienten korreliert werden kann. Diese Beobachtung spricht für eine geringe Infektiosität der Lepra, die mit heutigen Erkenntnissen übereinstimmt und den epidemiologischen Nutzen von Leprosarien in Frage stellt.

Mit der Kolonialisierung (1880 bis 1914) wurde *M.leprae* nach Westafrika und Amerika und durch den Sklavenhandel in die Karibik und nach Brasilien gebracht (Meyer 1888).

#### **2.4.3.2 Lepra und Tuberkulose im mittelalterlichen Europa**

Ein Zusammenhang zwischen dem Abfall der Lepraerkrankungen gegen das Ende des 13. Jhds und dem gleichzeitigen Anstieg der Tuberkulosefälle wird als sehr wahrscheinlich angenommen. Die Tuberkuloseerkrankungen stiegen mit zunehmender Urbanisierung und einem starken Bevölkerungswachstum am Ende des 13. Jhds an. Überdies wird vermutet, das mit Tb infiziertes Milchvieh aus Italien in diesem Zeitraum nach Nordeuropa verbracht wurde und sich in den dortigen Viehbeständen ausbreitete. Im 15. Jhd kam es überdies durch ein starkes Marktwesen zu einer Intensivierung der Viehzucht. Unter den mittelalterlichen Wohnbedingungen mit engem Mensch-Tier-Kontakt ist somit eine Übertragung der Tuberkulose auf diesem Wege ebenfalls von großer Bedeutung (Manchester 1984).

Eine Kreuzimmunität zwischen *M.leprae* und *M.tb* ist seit langem bekannt und wird u.a. in der BCG-Vakzine zum gleichzeitigen Schutz gegen Tuberkulose und Lepra ausgenutzt. Entsprechend wird vermutet, dass eine durchgemachte Tuberkulose-Infektion zu einer gewissen Immunität gegen Lepra führt. Jopling konnte bei keinem von 500 Leprapatienten, die er bzgl ihrer Krankheitsgeschichte befragte, eine Tuberkulose feststellen (Jopling 1982). Eine Lepra-Infektion hingegen scheint keinen Einfluss auf die Immunität gegen Tuberkulose zu haben. Im Gegenteil, in mittelalterlichen Leprakrankenhäusern stellte die Tuberkulose eine der Haupttodesursachen dar (Manchester 1984). Inwiefern ein ähnlicher Einfluss der Tuberkulose auf die heutige Epidemiologie der Lepra besteht, ist noch nicht abschließend zu beurteilen.

## **2.4.4 Epidemiologische Daten mit Relevanz für Transmission und Suszeptibilität**

### **2.4.4.1 Asymptomatische Träger von *M.leprae***

In endemischen Gebieten trägt etwa 5% der Bevölkerung DNA von *M.leprae* in der Nase. Inwiefern sich es hierbei um lebensfähige Bakterien handelt, kann nicht gesagt werden (Lockwood, 2010). Da nur 5 % der zu *M.leprae* exponierten Individuen erkranken, ist die asymptomatische Infektion folglich sehr häufig (Lang 2010). Über den Beitrag dieser asymptomatischen Infektion an der Übertragung von Lepra kann noch keine Aussage getroffen werden. Die hochgradige Durchseuchung, aber nur seltene Manifestation der Krankheit lässt auf das Vorliegen von Wirtsfaktoren schließen, die ein Individuum besitzen muss, um empfänglich für die Vermehrung von *M.leprae* in seinem Organismus zu sein. Genetische Wirtsfaktoren spielen bei der Empfänglichkeit für Lepra eine große Rolle (vgl. 2.3.1) und sind möglicherweise die Erklärung für das "Clustering" von Lepra in bestimmten geografischen Regionen und ethnischen Gruppen innerhalb eines Landes (Durrheim et al. 2002; Bakker et al. 2002; Baumgart et al. 1993).

### **2.4.4.2 Geschlechterverhältnis und Alter**

Was das Geschlechterverhältnis unter Leprapatienten betrifft, so ist auffällig, dass es unter Kindern ausgeglichen ist, ab der Pubertät aber in einem Verhältnis von 1,5-2 : 1 Männer zu Frauen vorliegt. Dieser Unterschied wird durch die Unterdiagnose der Lepra bei Frauen zwar nicht verursacht, aber begünstigt (Britton & Lockwood 2004; Peters & Eshiet 2002). Eine hormonelle Komponente von Wirtsfaktoren liegt somit nahe. Auf eine wichtige Rolle von Hormonen bei der Lepra weisen außerdem die Inzidenzpeaks hin. Die meisten Erkrankungen treten zwischen dem 10.-15. und seltener zwischen dem 30.-60.Lebensjahr auf (Lockwood 2010). Berücksichtigt man die Inkubationszeiten, die für die tuberkuloide Form 3 - 5 Jahre und für die lepromatöse Form 7 - 10 Jahre betragen, so bedeutet das, dass die Infektion mit *M.leprae* bereits in der Kindheit stattfindet. Das Infektionsrisiko für Kinder in Haushalten mit unbehandelten MB-Patienten ist nachgewiesenermaßen höher als für

Erwachsene (Worobec 2009).

#### **2.4.4.3 Ethnie**

Durch epidemiologische Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Korrelation zwischen Ethnie und Empfänglichkeit bzw. Ausprägungsform der Lepra vorliegt. Afrikaner scheinen eine höhere Empfänglichkeit für Lepra per se zu besitzen (Wolff & Johnson 2009), jedoch seltener als Inder und viel seltener als Chinesen oder Kaukasier an der multibazillären Form der Lepra zu erkranken (Cohen 2010). Die Gründe dieser Unterschiede sind noch unbekannt.

#### **2.4.4.4 Sozioökonomische Verhältnisse**

Lepra kommt heute v.a. in tropischen Regionen der Welt vor, ist aber nicht als Tropenkrankheit zu werten, sondern als Armutskrankheit, die bis zum vergangenen Jahrhundert auch noch in Europa heimisch war und erst durch die Verbesserung der sozioökonomischen Verhältnisse vollends verdrängt werden konnte. Epidemiologische Studien zeigten, dass Haushaltskontakte von Personen mit unbehandelter MB-Lepra in endemischen Gebieten ein relatives Risiko der Ansteckung von bis zu 10% besitzen. Kinder sind einem noch größeren Risiko ausgesetzt. Eine Fall-Kontroll-Studie im Amazonas-Gebiet Brasiliens untersuchte wirtschaftlich-soziale Verhältnisse von neuen Leprafällen mit Gesunden der gleichen Gemeinde (Kerr-Pontes et al. 2006). Eine Exposition im Haushalt und in der Nachbarschaft wurde für die Leprapatienten ausgeschlossen. Ein niedriges Bildungsniveau (korreliert mit Armut), Hungerepisoden, wöchentliches Baden in offenem Wasser (Fluss, See), Jagen oder Fischen in den vergangenen 10 Jahren, seltener Wechsel (< 1x/14 Tage) von Bettwäsche oder Hängematte (korreliert mit Zugang zu Frischwasser) und das Wohnen in einem Haus mit Sand- oder Lehmboden waren bei den Leprapatienten signifikant häufiger.

## **2.5 LEPRATRANSMISSION**

### **2.5.1 Aktuelle Diskussion über die Transmissionshypothesen**

Bis zu den 1970er Jahren wurde die Hautübertragung als Transmissionsmodus favorisiert, da man wusste, dass große Mengen an *M.leprae* über ulzerierende kutane Lepraläsionen in die Umwelt abgegeben werden (Girdhar 2005). Durch die Entdeckung, dass Leprapatienten sowie erhebliche Anteile der Bevölkerung in endemischen Gebieten *M.leprae* in der Nase tragen, geriet die Tröpfcheninfektion in den Fokus (Lockwood 2010). Neueste Erkenntnisse von Übertragungseignissen zwischen Mensch und Armadillo stellen die Lepra als Zoonose wieder zur Debatte (Truman et al. 2011). Job et al. sprachen sich 2008 infolge der Ergebnisse ihrer Studie, die sowohl Haut- als auch Nasensekrete von Kontaktpersonen mit Leprapatienten untersucht hat, deutlich dafür aus, dass es Evidenz für beide Transmissionswege gibt (Job et al. 2008). Ebenso liefern Studien zur Infektion von Nacktmäusen den Nachweis für verschiedene Möglichkeiten der Inokulation von *M.leprae* in einen Organismus. Sowohl über unverletzte Nasenschleimhaut, durch *M.leprae*-beladene Aerosole, auf subkutanem und auf intravenösem Weg konnten Nacktmäuse mit *M.leprae* erfolgreich infiziert werden. Weiterhin kam es bei Nacktmäusen auch durch das Aufbringen des Erregers auf verletzte Haut und kontaminierte Dornenstachel zur Infektion. Prinzipiell erscheinen folgende Transmissionswege als möglich: 1. Tröpfcheninfektion 2. Haut-zu-Haut-Übertragung 3. Kongenitale Übertragung (Duncan et al. 1983) 4. Dermale Inokulation über Tattoo-Nadeln (Porritt & Olsen 1947) 5. über kontaminierten Boden 6. über Arthropoden (Worobec 2009). Die kongenitale Übertragung und die Transmission via Tätowierung beruhen auf Einzelfallberichten und werden aus diesem Grund hier nicht weiter beleuchtet. Die Wichtigkeit der anderen Transmissionsmodi für die Übertragungseignisse der Lepra in globaler Sicht ist nicht bekannt (Rees & McDougall 1977; Job et al. 1994; Job et al. 1990; Girdhar 2005).

Im Folgenden wird der aktuelle Stand der Forschung im Hinblick auf die Transmissionshypothesen der Lepra unter dem Aspekt möglicher Aus- und Eintrittspforten des Erregers dargestellt. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den

beiden aktuell favorisierten Übertragungshypothesen der Tröpfchen- und Hautinfektion.

### **2.5.2 Tröpfcheninfektion**

In mehreren Studien konnte aufgezeigt werden, dass MB-Patienten sowohl *M.leprae*-DNA, als auch lebensfähige *M.leprae* im Nasensekret ausscheiden (Leprosy Group WHO 2009). Über respiratorische Sekrete können mehr als  $10^7$  lebensfähige *M.leprae* pro Tag von multibazillären Patienten an die Umwelt abgegeben werden (Mandell et al. 2010), wobei neben der Nasen- auch die Mundschleimhaut eine wichtige Rolle spielt (Martinez et al. 2010).

Eine der Beobachtungen, die maßgeblich dazu beitrugen, dass die Übertragung von *M.leprae* mittels Tröpfcheninfektion in Betracht gezogen wurde, ist, dass bis zu 5% der gesunden Bevölkerung in endemischen Gebieten, wie z.B. Indien, *M.leprae*-DNA in der Nase tragen (Lockwood 2010). Ob die so detektierte DNA von *M.leprae*-Fragmenten oder lebensfähigen *M.leprae* stammt, wurde bisher allerdings nicht untersucht. Außerdem handelt es sich bei dem Vorhandensein von *M.leprae* in der Nase um einen transienten Zustand, was auch erklären könnte, dass die Zahlen der für *M.leprae*-DNA in der Nase positiv getesteten Bevölkerung in verschiedenen Studien oft deutlich unterhalb der häufig zitierten 5% liegen (Hatta et al. 1995).

Die einzelnen Schritte der Tröpfcheninfektion von *M.leprae* werden wie folgt angenommen: 1. Inhalation von *M.leprae*, die sich in der unteren Nasenmuschel befinden. 2. Lokale Vermehrung in Monozyten der Haut. 3. Transiente Bakteriämie. 4. Bindung der *M.leprae* an Schwannzellen und Makrophagen (Cree & Smith 1998; Lockwood 2004).

Selbstverständlich ist auch in der Nase ein direktes Eindringen in den Blutkreislauf möglich (vgl. 2.5.3).

Die Tröpfcheninfektion konnte auch durch entsprechende Nacktmausversuche mit *M.leprae*-beladenen Aerosolen belegt werden (Rees & McDougall 1977).

Wie der Erreger in die Nase gelangt, ist noch nicht geklärt. Wenn man davon ausginge, dass die Aus- und Eintrittsstelle für *M.leprae* identisch ist, könnte der Erreger über Aerosole beim Husten, Niesen oder Sprechen von einer infizierten Person in die Nasenregion einer gesunden Person gelangen. Weiterhin ist Fakt,

dass die Nase und das Nasenostium eine der am häufigsten mit den Fingern berührten Körperstellen ist. Es wäre also denkbar, dass *M.leprae* im Sinne einer Schmierinfektion von kontaminierten Personen oder Gegenständen über die Hände zur Nase der Indexperson gelangt.

### **2.5.3 Hautübertragung**

Zwar wird in einigen tropenmedizinischen Lehrwerken das Passieren von *M.leprae* durch intakte Haut nicht angenommen (Lang 2010), was jedoch im Gegensatz zu zahlreichen Untersuchungen steht, die *M.leprae* sowohl in der Epidermis, der Keratinschicht, in Haarfollikeln als auch in Talg- und Schweißdrüsen nachgewiesen haben (Girdhar 2005; Leprosy Group WHO, 2009). Ebenso wird die in einigen Untersuchungen angewandte Entnahmetechnik mittels nicht haftender *composite skin contact smears* auf ihre Tauglichkeit zum Nachweis von *M.leprae* auf der Hautoberfläche in Frage gestellt und falschnegative Ergebnisse für möglich gehalten (Girdhar 2005). *M.leprae* wurde sowohl innerhalb epidermaler als auch dendritischer Zellen gefunden. Letztere sind Phagozyten und wandern bekanntermaßen von der Dermis zur Epidermis. Inwiefern die phagozytierten *M.leprae* auf diesem Weg jedoch als lebensfähige Bakterien freigesetzt werden, ist unklar. Die Freisetzung via abgestoßener Keratinozyten und über Schweiß und Talg wird eher als Möglichkeit der Verbreitung lebensfähiger *M.leprae* angesehen (Kotteeswaran et al. 1980; Girdhar 2005). Generell wird davon ausgegangen, dass die intakte Haut von MB-Patienten eine geringe Anzahl lebensfähiger *M.leprae* abgibt, wohingegen über kutane Lepraläsionen große Mengen an Erregern freigesetzt werden (Meyers 2000).

Nicht nur die Freisetzung, sondern auch das perkutane Eindringen des Erregers geschieht maßgeblich über beschädigte Haut, wobei festzuhalten ist, dass kleine Hautverletzungen den Normalfall darstellen (Girdhar 2005). Entsprechende Nacktmausversuche konnten die Infektion mit *M.leprae* über Hautabschürfungen ebenso belegen (Job et al. 1990; Job et al. 1994).

Nach dem Eindringen in die Haut vermehrt sich *M.leprae* in den Perizyten und Endothelzellen der Hautkapillaren, -arteriolen und -venolen. Über die Endothelzellen und den interstitiellen Raum der Perizyten gelangt der Erreger in

den Blutkreislauf, wo er von im Blut zirkulierenden Monozyten phagozytiert werden kann (Drutz et al. 1972; Coruh & McDougall 1979). Über den Blutkreislauf gelangt *M.leprae* u.a. zu Schwannzellen, und es ist denkbar, dass auch Hautläsionen sekundär über eine hämatogene Disseminierung entstehen können.

Aufgrund der Vermutung, dass nicht alle Hautläsionen durch die direkte Erregerinokulation entstehen, sondern das v.a. für die Primärläsion gilt, wurden viele Studien durchgeführt, die die Topografie der Primärläsionen dokumentieren, um einen Hinweis auf den Übertragungsweg zu erhalten. Bei Kindern ist die Primärläsion nur in 10% der Fälle am Stamm und in der überwiegenden Mehrheit an den Bereichen der nicht bedeckten Extremitäten zu finden. Von diesen wiederum trägt ein großer Teil die Erstmanifestation an den Knien und Ellbogen, also Hautstellen, die häufig unter Verletzungen leiden. Der in Erwachsenenstudien vorgebrachte Bias, dass die exponierteren Körperteile häufiger untersucht würden als die bekleideten, scheint für Studien an Kindern nicht haltbar (Girdhar 2005).

#### **2.5.4 Armadillos als Infektionsquelle**

Neben der Mensch-zu-Mensch-Übertragung der Lepra gewinnt die Übertragungsmöglichkeit der Lepra vom Armadillo (neunbändiges Gürteltier = (lat.) *Dasyus novemcintus*) auf den Menschen an Bedeutung. Seit den 1970ern ist bekannt, dass Armadillos für *M.leprae* sehr empfänglich sind, was u.a. durch ihre niedrige Körpertemperatur von 30-35 °C erklärt werden kann. Etwa 65% der experimentell mit *M.leprae* inokulierten Armadillos entwickeln eine disseminierte Infektion. Die granulomatöse Immunantwort von Armadillos auf *M.leprae* ist histopathologisch der des Menschen identisch. Die Reaktionen individueller Tiere reichen - wie beim Menschen - von der TT- bis zur LL-Form, wobei es insbesondere für die lepromatöse Nervenschädigung beim Menschen ein sehr gutes Modell darstellt. Überdies ist das Armadillo das einzige Tiermodell, das infolge BCG-Impfung einen effektiven Schutz gegen *M.leprae* entwickelt, der den von BCG-Impfstudien an Menschen gleichkommt. Aktuell ist die Lepra unter Armadillos v.a. im Süden der USA, in den Staaten Arkansas, Louisiana, Mississippi und Texas verbreitet (Scollard et al. 2006a).

Durch die Ähnlichkeit der Lepraerkrankung im Armadillo und im Menschen liegt die Vermutung nahe, dass es zwischen Armadillo und Mensch auch zu Übertragungsereignissen kommen kann. Untersuchungen der Leprastämme wilder Armadillos und autochthoner Lepraerkrankungen bei Menschen in den südlichen USA zeigten den selben, nirgends sonst in der Welt auftretenden Leprastamm. Somit wird davon ausgegangen, dass Lepra in dieser Region als Zoonose vorliegt und Armadillos ein großes natürliches Reservoir von *M.leprae* darstellen, das auf empfängliche Individuen übertragen werden kann (Truman et al. 2011).

### **2.5.5 Arthropoden als Vektoren**

Eine immer wieder erwähnte, aber nicht abschließend untersuchte Übertragungsmöglichkeit der Lepra stellt die durch Arthropoden dar. Prinzipiell befindet sich *M.leprae* in den Hautgefäßen in erreichbarer Entfernung für die Mundwerkzeuge von Arthropoden. Überdies konnten *M.leprae* an den Mundwerkzeugen von Fliegen, Moskitos und Wanzen nachgewiesen werden (Lang 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass *M.leprae* von *Aedes aegypti* von lepromatösen Hautläsionen auf Nacktmäuse übertragen werden kann (Banerjee et al. 1991). Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht weiterverfolgt. Die Übertragung der Lepra durch Insekten ist als möglich einzustufen, benötigt für eine abschließende Evaluierung jedoch weitere Forschung auf dem Gebiet.

## **2.6 TALGLIPIDE**

Die Hautoberflächenlipide (engl. *skin surface lipids*) setzen sich aus Talglipiden und Stratum Corneum-Lipiden zusammen. Das Verhältnis von Talg- zu Stratum Corneum-Lipiden ist abhängig von den Hautanhangsgebilden und damit je nach Körperregion unterschiedlich. Die größten Mengen an Hautoberflächenlipiden lassen sich in Körperregionen entnehmen, die eine hohe Dichte an Talgdrüsen haben, wie beispielsweise der Stirn oder der Thoraxregion (Clarys & Barel 1995). Prinzipiell wird der Großteil der extrahierbaren Hautoberflächenlipide durch Talglipide gestellt und nur ein unbedeutender Anteil durch Stratum Corneum-Lipide (Pappas 2009).

### **2.6.1 Talgsekretion**

Die Talgdrüse ist eine multilobuläre Drüse, die sich in der Dermis befindet. Der äußere Anteil der Drüse besteht aus Epithelzellen, die von einer Basalmembran umgeben sind. Normalerweise ist der Ausführungsgang der Talgdrüse mit einem Haarfollikel verbunden, die gemeinsam die sogenannte Haartalgdrüseneinheit (engl. *pilosebaceous unit*) bilden. Talg wird durch eine holokrine Sekretion gebildet. Die Sebozyten entstehen aus undifferenzierten Basalzellen, die sich in der Peripherie der Drüse befinden und im Laufe des Reifungsprozesses ins Drüseninnere wandern. Während der Reifung akkumulieren Lipidtröpfchen in den Sebozyten füllen diese vollständig aus. Diese Lipide werden durch das Platzen der Sebozyten in die Drüse freigesetzt. Der frisch freigesetzte Talg ist eine klare, ölige Substanz, die hauptsächlich Triglyzeride, Wachsester, Squalen und kleine Mengen an Cholesterin-Estern enthält. Im Infundibulum der Haartalgdrüseneinheit liegen im Talg Lipaseproduzierende Bakterien wie z.B. *Propionibacterium acnes* oder *Staphylococcus epidermidis* vor. Unter Einfluss dieser residenten Keimflora werden aus den Triglyzeride des Talgs mittels Hydrolyse freie Fettsäuren freigesetzt. Die Talgproduktion wird über die mitotische Aktivität der Basalzellen reguliert (Clarys & Barel 1995). Diese stehen unter der hormonellen Kontrolle von Androgenen (gonadal und adrenokortikal) und werden durch

Östrogen gehemmt (Downing et al. 1987). Unter Bedingungen einer erhöhten Talgproduktion konnten Veränderungen in der relativen Zusammensetzung der Talgkomponenten festgestellt werden (Cooper et al. 1976; Cotterill et al. 1972) Die Talglipide kommen ausschließlich im Talg vor, wohingegen alle sonstigen Lipide im menschlichen Körper ähnlich sind. So beispielsweise die Synthese von Sapiensäure und Wachsestern, die Akkumulation von Squalen oder das Vorhandensein sehr langer verzweigter oder hydroxylierter Fettsäuren (Pappas 2009). Der menschliche Talg dient u.a. der Fotoprotektion und der Bereitstellung von fettlöslichen Antioxidantien auf der Hautoberfläche. Überdies besitzt er antimikrobielle sowie pro- und antiinflammatorische Aktivität (Zouboulis et al. 2008).

### 2.6.2 Talgkomponenten

Das Sebum besteht aus Triglyzeriden, Wachsestern, Squalen, freien Fettsäuren, Cholesterinestern und Diglyzeriden. Die relativen Anteile dieser Talgkomponenten ist Abb. 21 zu entnehmen, die Strukturformeln Abb. 22. Je nach Entnahmetechnik wurden die Triglyzeride bereits durch residente Hautbakterien hydrolysiert und freie Fettsäuren freigesetzt. Somit erklärt sich die große Spannweite beim relativen Anteil dieser beiden Komponenten im Sebum (Downing et al. 1969).

<b>Lipid class</b>	<b>Range weight, %</b>	<b>Mean weight, %</b>
Triglycerides	20–60	45
Wax esters	23–29	25
Squalene	10–14	12
Free Fatty Acids	5–40	10
Cholesterol and Sterol esters	1–5	4
Diglycerides	1–2	2

Abbildung 21: Relative Talgzusammensetzung (Pappas 2009)

Die Hautoberflächenlipide sind generell relativ arm an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Typisch für das Sebum ist das reichhaltige Vorliegen von langkettigen Fettsäuren mit bis zu 26 Kohlenstoffatomen, unverzweigt oder

verzweigt, im Großteil gesättigt oder einfach ungesättigt (Haahti & Horning 1963). Teilweise liegen die Fettsäuren in freier Form vor und sind verantwortlich für die antimykotischen und antibakteriellen Eigenschaften der Haut (Lee et al. 2006). Der Großteil der Fettsäuren ist jedoch mit langkettigen Alkoholen oder Cholesterin verestert und liegen als Wachs- und in viel geringerem Maße als Cholesterinester vor (Nicolaidis 1967; De Luca & Valacchi 2010).

## A Sebaceous Lipids

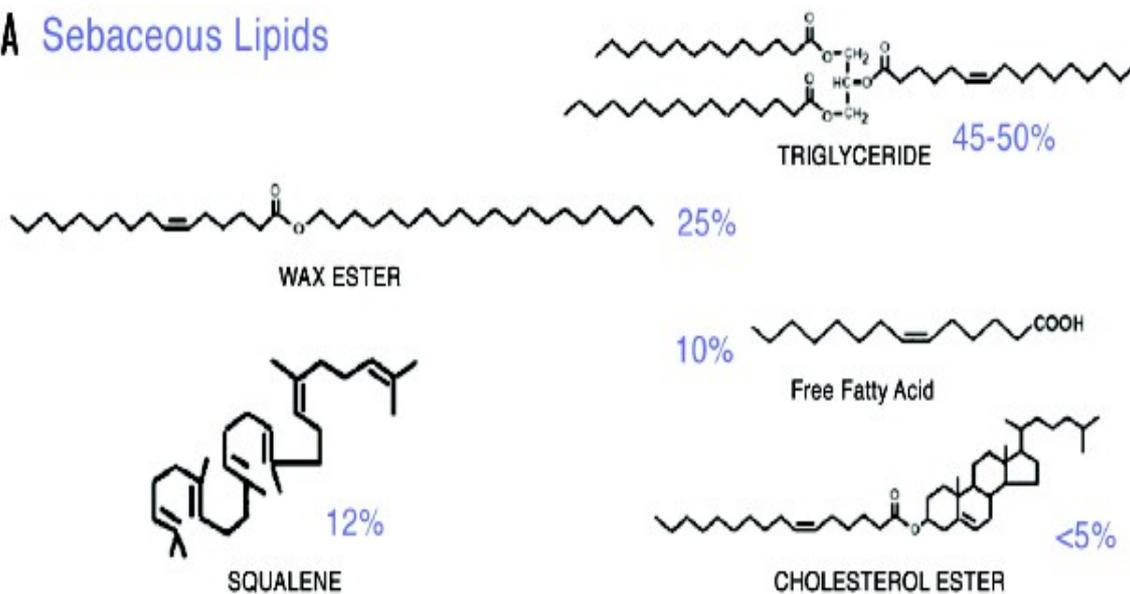


Abbildung 22: Repräsentative Strukturformeln von Talglipide (Pappas 2009)

### 2.6.2.1 Sapiensäure

Sapiensäure (16:1,  $\Delta$ 6) stellt mit 25% die Hauptfettsäure der Talglipide dar und liegt ausschließlich im Sebum vor. Es wird nicht über die Nahrung bezogen, da nur sehr wenige Pflanzenspezies zur Herstellung von Sapienat fähig sind (Nicolaidis 1974). Die Menge der im Sebum vorliegenden Sapiensäure korreliert mit der Gesamtsebumproduktion (Smith et al. 2008).

Sapienat wird durch die  $\Delta$ 6-Desaturase (= Fettsäure-Desaturase 2) aus Palmitinsäure (16:0) hergestellt. Diese Desaturase ist die Hauptdesaturase in der Talgdrüse und liegt vor allem in differenzierten Sebozyten vor, die die suprabasalen Schichten der Talgdrüse ausmachen und bereits eine vollständige

Lipidsyntheseaktivität erreicht haben (Ge et al. 2003). Die Verlängerung von Sapienat um zwei Kohlenstoff-Atome und das Einfügen einer weiteren Doppelbindung ergibt 5,8-Octadecadienoin-Säure (engl. *Sebaleic acid*), eine Reaktion und ein Metabolit die ebenfalls auf das menschliche Sebum begrenzt sind. Die Menge an Sapiensäure ist um ein vielfaches höher als die seiner Derivate, Isomere oder auch anderer einfach ungesättigter Fettsäuren im Talg (Pappas 2009).

Sapiensäure ist auch diejenige Fettsäure die hauptsächlich aus den Triglyzeriden des Talgs als freie Fettsäure freigesetzt wird (Drake et al. 2008). In vielfältigen Studien hat das Sapienat eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen vornehmlich grampositive Bakterien wie z.B. *Staph.aureus*, *Strept.pyogenes*, *Staph.epidermidis* aber auch *Micrococcus spp.* bewiesen. Es stellt, gemeinsam mit Laurinsäure, die allerdings nur in bedeutend geringerem Maße im Talg vorkommt, die Fettsäure mit der höchsten antimikrobiellen Wirkung dar. In Kombination mit Ethanol war Sapiensäure sogar wesentlich effektiver gegen Methicillin-resistente *Staph.aureus* (MRSA) als Mupirocin in gleicher Konzentration, wobei letzteres den Goldstandard gegen diesen Erreger darstellt. Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen mit verschiedenen anderen Antibiotika-resistenten klinischen Isolaten von *Staph.aureus* Stämmen, Propionibakterien und Pseudomonas (Drake et al. 2008).

Die Empfindlichkeit von *M.leprae* oder anderen Mykobakterien gegen Sapiensäure wurde noch nicht untersucht. Durch die breite und effektive antimikrobielle Aktivität gegen andere grampositive Bakterien erscheint eine Wirksamkeit auch gegen Mykobakterien möglich.

*M.leprae* tritt bei einer kutanen Übertragung höchstwahrscheinlich über verletzte Haut in den Körper ein. Die Haut besitzt verschiedene Mechanismen der angeborenen Abwehr um das Eindringen von Bakterien bei einer Disruption der Hautbarriere zu verhindern. Es wird vermutet, dass auch die Hydrolyse von Triglyzeriden auf der Hautoberfläche zur Immunantwort bei einer Hautschädigung beiträgt (Drake et al. 2008). Neben den bakteriellen Lipasen in der Talgdrüse, werden freie Fettsäuren auch durch eine epidermale Lipase aus den Triglyzeriden freigesetzt. Diese epidermale Lipase ist in lamellaren

Granulae (engl. *lamellar granules*) verpackt und wird in den Interzellularraum zwischen dem *Str.granulosum* und dem *Str.corneum* ausgeschüttet (Madison et al. 1998), wo es an der Hydrolyse von Mono- und Diglyzeriden aus Phospholipiden beteiligt ist. Die Lipase ist aber prinzipiell auch fähig Triglyzeride des Talgs zu hydrolysieren, insofern es mit diesen in Berührung kommt. Dies ist der Fall, wenn das *Str.corneum* beschädigt wird und es in dessen Folge zu einer schnellen Ausschüttung der lamellaren Granulae und der darin enthaltenen Lipase kommt (Menon et al. 1992; Elias & Feingold 2001). Aufgrund der starken antimikrobiellen Aktivität von Sapiensäure ist denkbar, dass diese Lipase preferenziell Sapienat aus den Triglyzeriden des Sebums freisetzt (Drake et al. 2008) um bei einer Verletzung der Haut schnell gegen eindringende Bakterien wirksam zu sein.

### **2.6.2.2 Squalen**

#### **2.6.2.2.1 Entstehung und Funktion**

Eines der bemerkenswertesten Charakteristika der Talglipide ist die Anreicherung von Squalen, einem Cholesterinvorläufer (Downing et al. 1969). Beim Menschen wird etwa 60% des mit der Nahrung zugeführten Squalens absorbiert und im Serum mittels *very low-density lipoproteins* (VLDL) zu zahlreichen Geweben transportiert. Die größte Anreicherung findet auf der Haut durch die Konzentration in den Sebozyten statt (Kelly 1999), wo es zwischen 12-20% der gesamten Hautoberflächenlipide darstellt. In der Leber und anderen Geweben wird Squalen vollständig zu Squalen-2,3-Epoxid metabolisiert und anschließend über Lanosterol in Cholesterin umgewandelt. Die Akkumulation von Squalen in den Sebozyten lässt sich vermutlich auf eine wegen des anaeroben Milieus der Talgdrüse abweichende Expression und Aktivität von zwei Sauerstoff-regulierten Schlüsselenzymen des Squalen-Metabolismus zurückführen, der Squalen-Synthase und der Squalen-Oxidocyclase (Smith & Thiboutot 2008). Der natürliche Mangel an Squalen-Oxidocyclase-Aktivität in der Talgdrüse hat vermutlich einen Evolutionsvorteil dargestellt, da Squalen in der Lage ist reaktive Sauerstoffverbindungen auf der Haut zu neutralisieren, also als Antioxidanz wirksam ist (De Luca & Valacchi 2010). Als weitere möglich

Erklärung für die Anreicherung von Squalen in den Talgdrüsen wird die Überexpression bzw. eine verstärkte Aktivität der Squalen-Synthase in den Zellen angesehen (Smith & Thiboutot 2008). Squalen tritt ausschließlich im menschlichen Talg auf, was als Folge des Fellverlusts und der damit auftretenden Notwendigkeit für einen Schutz gegen UV-induzierte reaktive Sauerstoffverbindungen gewertet werden kann. Die biochemischen Eigenschaften von Squalen als peroxidierbares Molekül hat wichtige biologische Auswirkungen und machen es zu einem Schlüsselmediator von Hautreaktionen auf Umweltstressoren (Yamamoto 2001).

#### **2.6.2.2.2 Squalen als Antioxidanz**

Die Hautoberflächenlipide werden unter dem oxidativen Stress infolge mikrobiellen Sauerstoffmetabolismus, atmosphärischen Sauerstoffs und Lichteinstrahlung oxidiert. Als Folge treten relevante Mengen peroxidierter Stoffwechselzwischenprodukte auf der Haut auf, von denen einige eindeutig als zytotoxisch, irritierend und immunogen eingestuft werden (Saint-Léger 2003).

Squalen stellt die größte peroxidierbare Fraktion der Hautoberflächenlipide dar und stellt überdies im Vergleich zu anderen Hautoberflächenlipiden den effizientesten Fänger freier Sauerstoffradikale dar (Kohno et al. 1995). Diese entstehen u.a. durch den Phagozyten-verursachten *oxidative burst* bei entzündlichen Hautveränderungen oder unter UV-Einstrahlung. Es konnte auch gezeigt werden, dass Squalen unter oxidativem Stress eher als Sauerstofffänger dient als Cholesterin, Triglyzeride oder ungesättigte freie Fettsäuren (Ohsawa et al. 1984). Indem Squalen oxidiert wird, schützt es die Hautoberflächenlipide und die zellulären peroxidierbaren Moleküle der vitalen Hautschichten vor diesem oxidativen Stress.

Oxidativer Stress z.B. in Form von mikrobiellem peroxidierendem Stoffwechsel führt zur oxidativen Degradation von Squalen, was zu verschiedenen Beiprodukten unterschiedlicher Polarität und Reaktivität führt. Diese Beiprodukte sind u.a. Squalen-Monohydroperoxid, verschiedene Isomere von Squalen-Epoxid und kürzerkettige reaktive Aldehyde (De Luca et al. 1996), insbesondere Formaldehyd und Malonyl-Dialdehyd (De Luca & Valacchi

2010) (vgl Abb. 23).

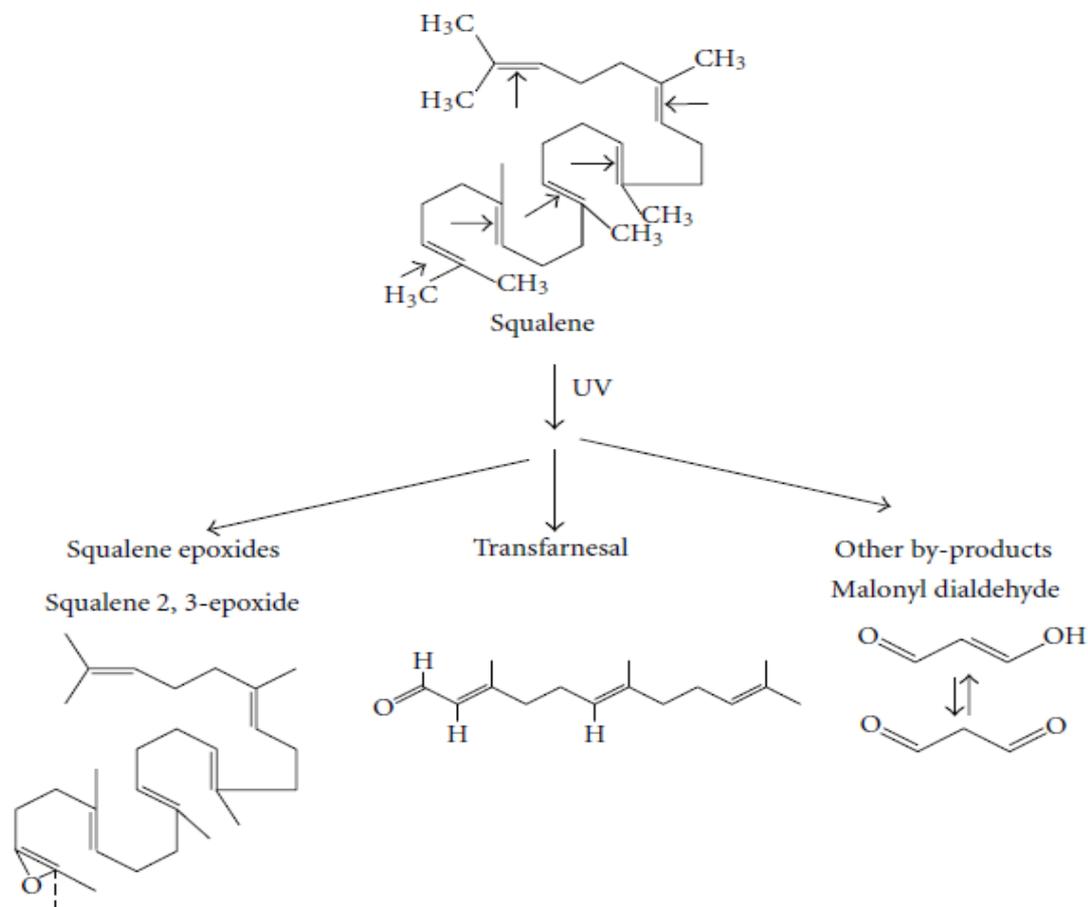


Abbildung 23: Chemische Strukturformeln von Squalen und seinen Beiprodukten (Chiara De Luca & Valacchi, 2010).

Diese Beiprodukte können von der äußeren Hornschicht der Haut in vitale Hautschichten vordringen und greifen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Keratinozyten-Plasmamembran an. Dadurch kommt es zu einem Abfall an Arachidonsäure und in dessen Folge u.a. zur Produktion einer Reihe von reaktiven Nucleophilen durch die Lipidoxidation. Squalen-Peroxide zeigen somit die typischen ambivalenten biologischen Eigenschaften anderer reaktiver Spezies: Bei geringen Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten stimulieren sie die DNA- und Protein-Synthese, wohingegen sie bei längerer Exposition und höheren Dosen zu Zellschäden und Hemmung der mitotischen Aktivität führen (Picardo et al. 1991b). Squalen-Peroxide stimulieren Keratinozyten auch zur Freisetzung gesteigerter Mengen proinflammatorischer

Zytokine (Ottaviani et al. 2006). Dies bedeutet, dass die reaktiven Beiprodukte von Squalen in höheren Konzentrationen zytotoxisch auf Keratinozyten und immunsuppressiv wirken (Picardo et al. 1991a; Picardo et al. 1991b).

Da der Schutz der Haut vor oxidativem Stress durch die Squalenoxidation also nicht ohne Nachteil ist, wird durch die Bereitstellung von Vitamin E (Tocopherol) auf der Hautoberfläche versucht, die Squalenoxidation so gering wie möglich zu halten. Vitamin E liegt im Sebum vor und in Hautregionen mit erhöhter Talgdrüsendichte wird eine kontinuierliche Vitamin E-Sekretion beobachtet. Diese wiederum steht in enger Verbindung mit der Menge des gleichzeitig sezernierten Squalens (Thiele et al. 1999).

### **2.6.2.3 Freie Fettsäuren**

Im Abschnitt über Sapiensäure (2.6.2.1) wurde aufgezeigt, dass freie Sapiensäure antimikrobielle Wirkung besitzt, wie auch andere Fettsäuren, z.B. Laurinsäure oder *Sebaleic acid*. Freie Fettsäuren sind aber nicht nur an der Barrierefunktion der Haut gegen Bakterien beteiligt, sie dienen *M.leprae* auch als Nahrung. Im Kapitel über den Metabolismus von *M.leprae* wurde die entscheidende Rolle von Lipiden für den Erreger bereits ausführlich dargelegt. Zur Fettsäuresynthese benötigt *M.leprae* Acetyl-CoA, das es präferenziell aus Wirtslipiden bezieht. Für die Hydrolyse der Lipide steht *M.leprae* jedoch nur eine einzige Lipase zur Verfügung. Demgegenüber besitzt *M.leprae* 11 aktive FadD Gene, was angesichts des minimalistischen Genoms des Bakteriums bemerkenswert ist und die Vermutung nahelegt, dass *M.leprae* vorliegende freie Fettsäuren den beispielsweise in Triglyzeriden veresterten Fettsäuren als Substrat vorzieht. Das FadD-Gen kodiert für ein Enzym, das freie Fettsäuren zu Acyl-CoA umwandelt. Dieser Schritt entgiftet zum einen die freien Fettsäuren, die bei Akkumulation toxisch und membranschädigend auf den Erreger wirken können, zum anderen kann das so gewonnen Acyl-CoA als Metabolit für anabole und katabole Stoffwechselwege dienen (Wheeler 2003).

## **2.7 ARBEITSHYPOTHESEN**

Aus der Literaturrecherche zum aktuellen Stand der Forschung im Bereich der Erregereigenschaften von *M.leprae* sowie der menschlichen Talglipide ergeben sich folgende Arbeitshypothesen, die als Grundlage für den Versuchsteil der Arbeit (Kapitel 3 und 4) dienen.

Gemäß der in 2.6.2.1 erörterten Erkenntnisse über die Talg-spezifische und antimikrobiell wirksame Fettsäure Sapiensäure, ist eine unserer Arbeitshypothesen, dass die Menge der auf der Haut vorliegenden Sapiensäure einen Wirtsfaktor für eine kutane Lepra-Infektion darstellt. Im Laborteil der Arbeit wird die Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Sapiensäure im Talg aufgezeigt (s. 4.5.).

Da Squalen ein zentrales Molekül beim Umgang mit u.a. mikrobiell verursachtem oxidativem Stress auf der Haut darstellt (s. 2.6.2.2), ist eine weitere Arbeitshypothese, dass die Menge des auf der Haut vorliegenden Squalens einen Einfluss auf die Empfänglichkeit für eine kutane Lepra-Infektion hat. Die entwickelte Methode zur quantitativen Bestimmung des im Talg vorhandenen Squalens wird im Kapitel 4.5. dargestellt.

Sowohl die Genomausstattung als auch der doppelte Nutzen - Entgiftung und Energiegewinnung - durch die Metabolisierung im Talg enthaltender freier Fettsäuren stellen die Argumente für unsere letzte Arbeitshypothese dar; nämlich dass die Menge der im Talg vorliegenden freien Fettsäuren einen Suszeptibilitätsfaktor für eine kutane Transmission der Lepra darstellt. Die dementsprechend entwickelte Technik zur quantitativen Analyse freier Fettsäuren im Talg ist Kapitel 4.5 zu entnehmen.

## **3 ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR TALGANALYSE: MATERIALIEN UND METHODEN**

### **3.1 CHEMIKALIEN**

s. Annex I

### **3.2 GERÄTE UND GEBRAUCHSMATERIALIEN**

s. Annex II

## **4 ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR TALGANALYSE: ERGEBNISSE**

Wie im Kapitel 2.6. ausgeführt, ist eine der Arbeitshypothesen, dass ein Zusammenhang zwischen der individuellen Menge an Squalen, freien Fettsäuren und Sapiensäure in den Talglipiden und der Empfänglichkeit für eine Leprainfektion besteht. Im Folgenden wird die Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Analyse von Squalen, freien Fettsäuren und der Sapiensäure im menschlichen Talg geschildert. Die Untersuchung der Talglipide mit Hinblick auf die Leprasuszeptibilität stellt ein Pilotprojekt dar und weitere Forschung in diesem Bereich ist wahrscheinlich. Aus diesem Grund haben wir über die gezielte Analyse von Squalen, freien Fettsäuren und Sapiensäure im Talg auch eine Methode entwickelt, die die Analyse der übrigen Talglipide (Cholesterin, Triglyzeride, Wachs- und Cholesterinester) ermöglicht.

### **4.1 VORBEREITUNG FÜR DIE ANALYSE**

#### **4.1.1 Sebutapes**

##### **4.1.1.1 Aufbau und Verwendungsmöglichkeiten**



Abbildung 24:  
Sebutape

Seit Ende der 1980er Jahre werden Sebutapes der Cuderm Corporation (Dallas, Texas, USA) zur Beforschung der Talglipide v.a. in der Akneforschung eingesetzt. Sebutape ist ein 3cm x 2cm großer, selbstklebender,

lipidabsorbierender Streifen mit polymerischem Aufbau (s. Abb. 24). Der Streifen wird auf die zu untersuchende Hautstelle geklebt, deren sezernierte Talglipide in die Hohlräume des Polymerfilms adsorbiert werden. Diese einfache Art der Talgprobengewinnung zeichnet Sebutape vor anderen Entnahmemethoden wie z.B. mittels Zigarettenpapier oder Lehmzubereitungen aus. Die zu untersuchende Hautstelle ist während der Probenentnahmezeit durch das Sebutape bedeckt, was akzidentelle Verunreinigungen der Probe verhindert und eine standardisierte Probengewinnung ermöglicht. Im Hinblick auf die von uns gewünschte Quantifizierung freier Fettsäuren ist das Sebutape sehr geeignet, da die Entnahmeschicht der Haut bei allen Probanden identisch ist und so die Unterschiede im Hydrolysegrad der Triglyzeride auf andere Mechanismen zurückgeführt werden können (vgl. 2.6.2.3). Auch die Entnahmezeit ist im Vergleich zur Zigarettenpapiertechnik kürzer. Auf einer vorhergehend entfetteten Hautstelle können nach einer Stunde der Talgaufnahme aus dem Sebutape alle gewünschten Parameter bestimmt werden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sind kontrollierte Bedingungen hinsichtlich Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit sowie der Schweißproduktion des Probanden nötig (Clarys & Barel 1995).

Mithilfe der Sebutape-Technik können verschiedene Parameter der Talgproduktion und -zusammensetzung erhoben werden. In der Akneforschung steht die generelle Quantifizierung der Talgproduktion im Vordergrund. Durch die Lipidaufnahme in die Hohlräume des Sebutapepolymers werden diese transparent. Das so entstehende Muster kann je nach Menge und Größe der Punkte, die die Talgdrüsen abbilden, einer Skala von 1 bis 5 zugeordnet werden. Ein großer Rangwert entspricht einer hohen Talgproduktion.

Auf dem Prinzip der zunehmenden Transparenz der Tapes mit steigender Sebumexkretion beruht auch die densitometrische Auswertung. Dabei wird das Tape durchleuchtet und mithilfe eines digitalen Lichtmessinstruments die Lichtdurchlässigkeit als Parameter für die produzierte Talgmenge quantifiziert (Serup 1991).

Die vom Sebutape adsorbierten Talglipide können auch für weitergehende Untersuchungen extrahiert werden. Bereits die ersten Versuche von Nordstrom

et al 1986 zeigten eine Reproduzierbarkeit der so gewonnen Ergebnisse. Sowohl die Extraktion der Tapes mit einem Lösungsmittel als auch die anschließende Auftrennung mittels DC oder HPLC und die Quantifizierung der Talgkomponenten mittels GC-FID oder MS wurde durch verschiedene Studien belegt (Kligman et al. 1986; Nordstrom et al. 1986; Pappas et al. 2009; Camera et al. 2010).

#### **4.1.1.2 Probenentnahme und Aufbewahrung**

Für die Entwicklung unseres Probenentnahmeprotokolls orientierten wir uns an der Studie von Pappas 2009, die die Analyse von Talglipiden zur Akneforschung zum Gegenstand hatte (Pappas et al. 2009).

Zur Etablierung der Talganalysemethode wählten wir ein dermatologisch gesundes Kollektiv etwa gleicher Altersstufe (s. Annex III). Die Kontrolle der Umgebungsbedingungen umfasste den Verzicht auf lipidhaltige Hautpflegeprodukte am Morgen des Entnahmetages und die Vermeidung von Schweißbildung vor und während der Probenentnahme. Die Stirn wurde zwischen Haaransatz und Augenbrauen nacheinander mit zwei in 70%igem Isopropanol getränkten Zellulose-Tüchern gleichmäßig entfettet. Das Sebutape wurde mittels Pinzette vom Trägerpapier abgezogen und auf die Stirn geklebt. Um einen gleichmäßigen Hautkontakt zu gewährleisten wurde das Tape mit der Pinzette glattgestrichen. Der Umgang mit den Sebutapes erfolgte mit unsterilen, nicht gepuderten medizinischen Latexuntersuchungshandschuhen. Das Tape wurde nach 45 Min. mittels Pinzette von der Stirn abgezogen und in ein Schraubkappenglas verbracht. Anschließend wurden die SKG mehrere Sekunden mit Argon begast, um eine Oxidation von Fettsäuren während der Lagerung zu verhindern. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C in einem verschlossenen Schraubkappenglas.

#### Probenentnahme mittels Sebutape:

1. Entfettung der zentralen Stirnpartie mittels zweier mit Isopropanol getränkter Zellulosetücher.
2. Aufkleben der Sebutapes und Andrücken an die Haut mittels Pinzette.
3. Entfernung der Sebutapes mittels Pinzette nach 45 Min. und Verbringung in

SKG.

4. Begasung der Tapes mit Argon für mehrere Sekunden. Aufbewahrung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.2 Extraktionsverfahren

Die von den Sebutapes adsorbierten Talglipide müssen durch ein geeignetes Lösungsmittel extrahiert werden. Wir verglichen Methanol mit Chloroform und einer 2/1-Mischung Chloroform/Methanol. Mit diesen Lösungsmitteln werden jedoch nicht nur die Talglipide aus den Tapes extrahiert, sondern auch Bestandteile des Sebutapes, die in der Laufmittelfront der DC als unpolare und an der Startlinie als polare Substanzen sichtbar sind. Bei der Extraktion mit

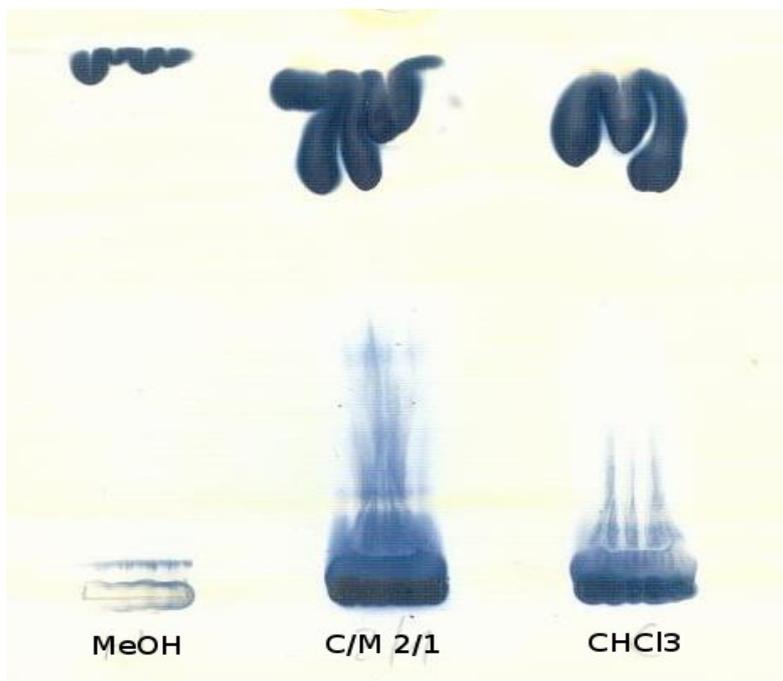


Abbildung 25: DC (Lm: CMW, Färbung: Molybdat-Phosphat-Reagens) des Sebutape-Extrakts. Vergleich von Lösungsmitteln zur Extraktion der Sebutapes. Bei Methanol werden am wenigsten Sebutapesubstanzen herausgelöst (C/M:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , CMW: Mischung  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ ).

Methanol wurden am wenigsten dieser Tapebestandteile mitextrahiert, weshalb wir die anfänglichen Versuche mit diesem Lösungsmittel durchführten (s. Abb. 25). Nach verschiedenen Aufreinigungsmethoden des Sebutapeextraktes konnten die für unsere Talganalyse störenden Tapesubstanzen aber

weitgehend aus den Proben entfernt werden (s. 4.2). Daher konnten wir auf das bewährte Lösemittelgemisch Chloroform/Methanol 2/1 zurückgreifen, mit dem eine Extraktion von Lipiden aller Polaritäten gewährleistet ist.

#### Extraktion Sebutape:

1. Extraktion Sebutapes mit 2ml C/M 2/1 V/V (einige Sekunden mischen) und anschließende Entfernung des Sebutapes.
2. Eindampfen und Aufnehmen des Sebutape-Extrakts in 100µl C/M 2/1 V/V
3. Auftragen von 20µl der Lösung auf DC-Platte (10cm x 8cm), Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  70/30/5 V/V/V, bis ca. 1 cm vor Plattenende laufen lassen
4. Färbung mit Molybdänmischung.

#### **4.1.3 Abtrennung der Tapesubstanzen**

Um Verunreinigungen der Talgproben durch die mitextrahierten Sebutapesubstanzen zu vermeiden, suchten wir nach geeigneten Methoden, diese von den Talglipiden abzutrennen. Mittels der Folch-Verteilung (Folch et al. 1957) konnte ein erheblicher Anteil der Tapesubstanzen in die Oberphase verbracht und mit dieser verworfen werden (s. Abb. 26).

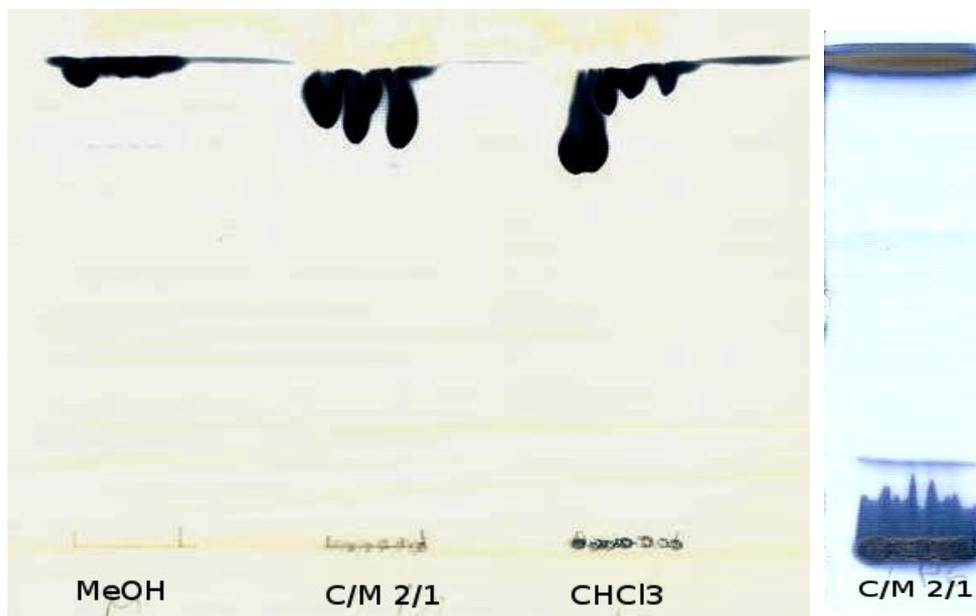


Abbildung 26: DC (Lm: CMW, Färbung: Molybdato-Phosphat-Reagens) des Sebutapeextrakts nach Folch-Verteilung (links) und nach Entfernung der

*schwarzen Streifen (rechts). Eine deutliche Reduktion der Sebutapesubstanzen konnte erreicht werden. (C/M: Mischung  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , CMW: Mischung  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ )*

Extraktion des Sebutapes und Reduktion der Tapesubstanzen:

1. Entfernung der schwarzen Seitenstreifen der Tapes.
2. Extraktion Sebutapes mit 2ml C/M 2/1 (einige Sekunden mischen) und anschließende Entfernung des Sebutapes.
3. Eindampfen und Aufnehmen des Sebutape-Extrakts in 100 $\mu\text{l}$  C/M 2/1
4. Folch-Verteilung: Zugabe 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Mischen. Zentrifugieren. Abhebern und Verwerfen der Oberphase. Eindampfen der Unterphase.
5. Auftragen von 20 $\mu\text{l}$  der Lösung auf DC-Platte (10cm x 8cm), Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  70/30/5, bis ca. 1 cm vor Plattenende laufen lassen
6. Färbung mit Molybdänmischung.

Das Sebutape besteht aus dem adhäsiven lipidabsorbierenden Film und zwei seitlichen nicht-adhäsiven schwarzen Streifen, die zur Applikation der Tapes dienen. Da die seitlichen Areale des Tapes nicht zur Talgadsorption beitragen, haben wir sie vor der Extraktion entfernt, was zu einer Reduktion der aus den Tapes gelösten Substanzen beitrug (s. Abb. 26).

Die nach Folch-Verteilung und Entfernung der schwarzen Streifen persistierenden Tapesubstanzen konnten großteils mittels Säulenchromatografie von den Talglipiden abgetrennt und mit der entsprechenden Fraktion verworfen werden (s. Abb. 27).

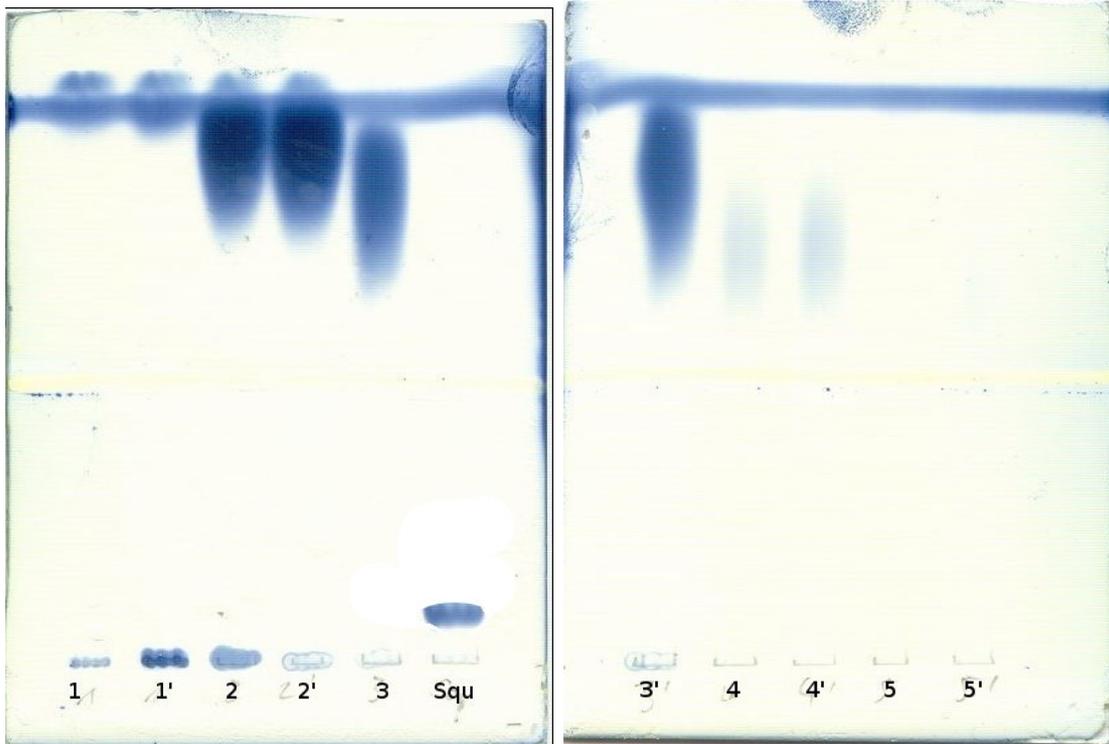


Abbildung 27: Abtrennung der Tapesubstanzen von der Talgprobe mittels SC. DC (Lm: Hexan, Färbung: Molybdato-Phosphat-Reagens) der Fraktionen 1-5 (je 1ml Hexan). Auftragung der Talgprobe z.B. 1 gegen leeres Sebutape z.B. 1'. (Squ: Squalen-Standard).

Abtrennung der Sebutape-Substanzen mittels Säulenchromatografie:

1. Packen einer Pasteurpipette mit 1ml Kieselgel in Hexan
2. Aufnehmen des Sebutape-Extrakt in 500µl Hexan und Auftragen auf die Säule.
3. Elution der Säule mit 5ml Hexan zum Herauswaschen aller Sebutapesubstanzen --> Verwerfen dieser Fraktion
4. Elution der Säule mit 8ml CM 2/1 zum Herauswaschen aller Talgbestandteile  
Auftrennung dieser Fraktion mittels DC (s. 4.4.1.1)

## **4.2 REDUKTION VON VERUNREINIGUNGEN**

Die durch die Sebutapes gewonnenen Talgproben stellen eine sehr geringe Probenmenge dar. Aus diesem Grund können bereits geringe Verunreinigungen die Ergebnisse erheblich verzerren. Entsprechende Störquellen müssen daher identifiziert und eliminiert werden.

Generell sollten folgende Maßnahmen bei der Aufarbeitung der Proben beachtet werden:

- Tragen von Latex- oder Vinyl-Handschuhen um eine Verunreinigung der Sebutapes durch Hautoberflächenlipide der Hände vorzubeugen;
- Aufbewahrung der leeren SKG unter Befüllung mit 2ml CM 3/2.
- Vorspülen der Pasteurpipette mit 2ml Ether 99% vor dem Packen mit der Kieselgel-Hexan-Aufschlammung.

Die gaschromatografischen Analysen von Kontrolldurchläufen des unter 4.6. beschriebenen Verfahrens ohne Sebutapes zeigten zahlreiche, deutliche Peaks in Bereichen, die für die Fettsäurebestimmung relevant sind. Besonders störend waren hierbei die Peaks auf Höhe der C16:0- und C18:0-Fettsäuremethylester. Durch eine systematische Untersuchung der einzelnen Analyseschritte kamen wir zu folgenden Ergebnissen.

Ausreichende Reinheit für die GC-Analyse besitzen:

- Das Dichlorethan, das zum Lösen der Probe zur GC-Analyse verwendet wird.
- Die Primulin-Aceton-H<sub>2</sub>O-Mischung für das Anfärben der DC-Platte nach der Umesterung.
- Das deionisierte Wasser, das verwendet wird für bzw. sich befindet in:
  - Folch-Verteilung zur Aufreinigung nach der Extraktion des Sebutapes
  - Folch-Verteilung für die Aufreinigung der sauren Fraktion nach dem Ionenaustausch
  - Primulin-Aceton-H<sub>2</sub>O-Mischung zur Anfärbung der DC-Platte
  - Wässrige Essigsäure als saure Fraktion beim Ionenaustausch
- Die Heptadekansäure als interner Standard.

Diese Substanzen wurden somit weiterhin verwendet.

### **4.2.1 Testung der Lösemittel**

Da bei unserem Analyseverfahren die Lösemittel eingedampft werden, konzentrieren sich die in ihnen von den Produktionswegen her enthaltenen Unreinheiten. Dies führt bei der hochsensitiven Analyse mittels GC-FID zu einem Auftreten von Peaks, die je nach Lage und Höhe für unsere Talanalyse stören. Bei Diethylether, Hexan, Chloroform und Methanol entschieden wir uns für die 99%ig reinen Varianten, die überdies Stabilisatoren enthalten, die in der GC nachweislich keine Peaks verursachen. Exemplarisch ist der Unterschied zwischen Lösungsmitteln unterschiedlichen Reinheitsgrades anhand der GC-Analysen von 95%igem vs 99%igem Ether in Abb. 28 dargestellt.

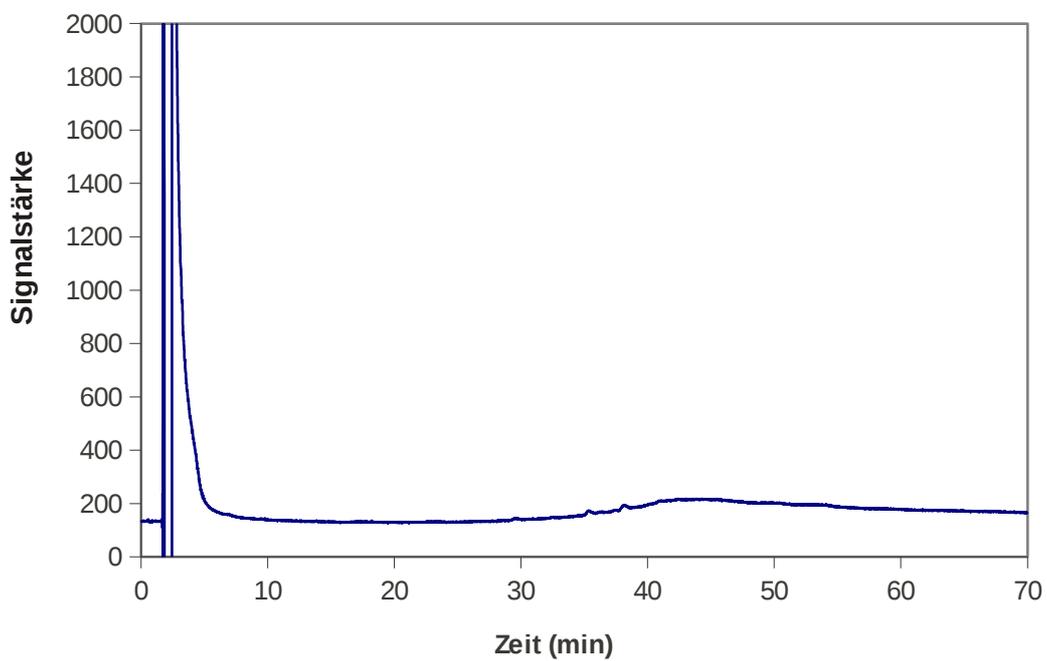
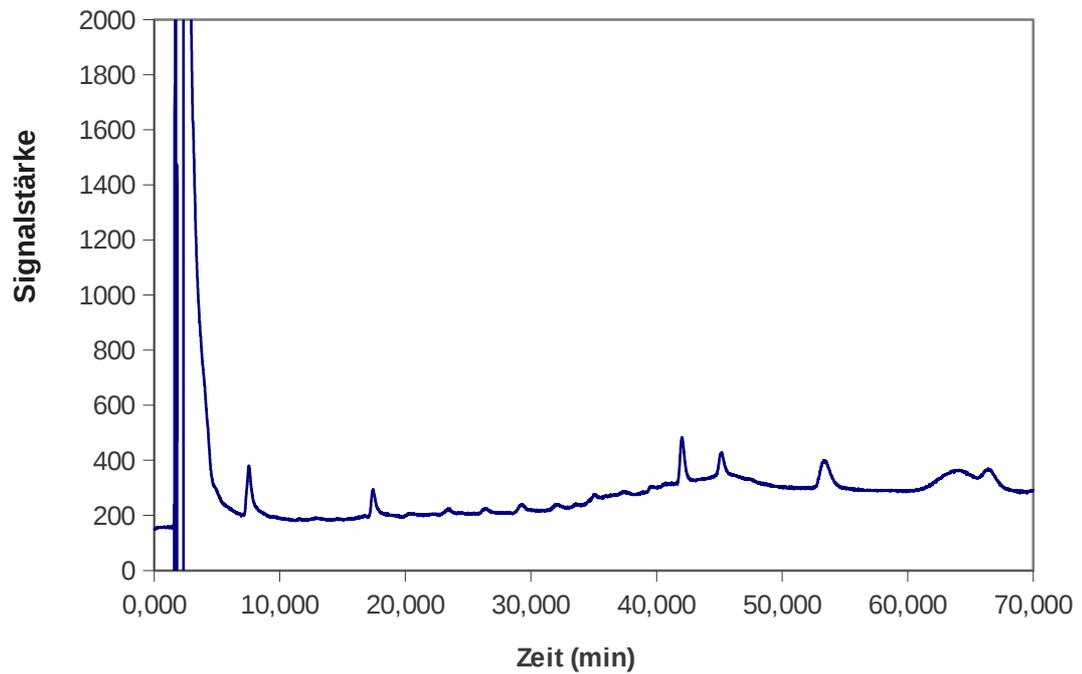


Abbildung 28: GC-Analyse von 95%igem (oben) und 99%igem (unten) Diethylether. Die Analyse von Leerproben sollte keine Peaks enthalten, wie es beim 99%igem Ether der Fall ist.

### Testung der Lösungsmittel auf mögliche Verunreinigungen

- 1a. Es wird eine Menge des zu untersuchenden Lösemittels eingedampft, die der im Analyseverfahren eingedampften Menge entspricht (z.B. Hexan 4ml, Ether 1,5ml).
- 1b. Wird das Lösemittel im Analyseverfahren vor der Umesterung zugegeben (z.B. Heptadekansäure), wird es zunächst umgeestert.
2. Lösen des Extrakts mit 20 µl DCE
3. Injektion von 0,5µl in GC-FID (FFAP-Säule)

### **4.2.2 Testung sonstiger Utensilien**

Ebenso haben wir das Kieselgel der DC-Platten und der Gravitationssäulen auf Verunreinigungen getestet. Die DC-Platten stellten sich als sauber heraus. Um möglichen Verunreinigungen z.B. in Verpackungsmaterialien vorzubeugen, entschieden wir uns dennoch dafür, die DC-Platten in 99%igem Ether vorlaufen zu lassen. Bis zur Verwendung werden sie unter Abschluss von der Umgebungsluft im Exsikkator aufbewahrt.

Die Dichtungen der SKG kamen ebenfalls als mögliche Fehlerquelle in Betracht, da sie unter der dreistündigen Inkubation bei 75 °C während der Umesterung erheblichem Stress ausgesetzt sind. Um die Substanzen, die bei der Umesterung aus den Dichtungen herausgelöst werden können, wurde eine Dichtung zerschnitten und direkt in die methanolische HCl zur Umesterung gegeben. Die anschließende GC-Analyse zeigte ein massives Auftreten von Peaks in dem für uns relevanten Bereich, wahrscheinlich durch in den Dichtungen enthaltene Weichmacher verursacht. Das Ersetzen der üblichen Gummidichtungen mit dünner Teflonbeschichtung gegen reine Teflondichtungen zeigte allerdings keinen Vorteil. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Weichmacher der Gummidichtungen die Teflonschicht bei der Umesterung nicht durchdringen. Aus diesem Grund haben wir uns für die Weiterverwendung der üblichen SKG-Dichtungen entschieden.

Unter Anwendung aller beschriebenen Maßnahmen sind die persistierenden Störsubstanzen vernachlässigbar (s. 4.5.3).

### **4.3 INTERNE STANDARDS**

Bei der Auftrennung, Derivatisierung und Analyse der Proben treten zwangsläufig gewisse Verluste auf. Um deren Einfluss abschätzen bzw. kompensieren zu können, werden zum jeweils frühestmöglichen Zeitpunkt definierte Mengen interner Standards zugegeben. Zur Quantifizierung der Gesamtlipide unternahmen wir den Versuch, die Sebutapes vor und nach Probenentnahme zu trocknen und auszuwiegen, wie in der Literatur beschrieben (Clarys & Barel 1995). Dies stellten wir aber wieder ein, da sich die sehr geringe Probenmenge als äußerst anfällig für zahlreiche, nur mangelhaft kontrollierbare Einflussfaktoren herausstellte.

Geeignete interne Standards müssen vor allem zwei Voraussetzungen erfüllen. Zum einen sollen sie sich bei der Probenauftrennung möglichst genau wie die zu untersuchenden Komponenten verhalten, d.h. im Falle der DC ein ähnliches Laufverhalten aufweisen. Zum anderen dürfen sie in den Proben nicht oder nur in sehr geringer Menge vorkommen. Als interne Standards für die im Talg vorkommenden Ester, Triglyzeride, Wachs- und Cholesterinester boten sich Verbindungen mit Heptadekansäure an. Diese ungeradzahlige Fettsäure kommt im Talg nur in unbedeutenden Mengen vor. Überdies verhält sie sich aufgrund vergleichbarer Kettenlänge (C17) ähnlich wie die Hauptfettsäuren des Talgs Palmitinsäure (C16) und Sapiensäure (C16:1  $\Delta$ 6) und führt somit in der GC-Analyse zu einem Peak kurz hinter diesen.

#### **4.3.1 Synthese interner Standards für Wachs- und Cholesterinester**

Je nach der zu analysierenden Talgkomponente muss die entsprechende Heptadekansäure-Verbindung als interner Standard mitlaufen. Zur Analyse freier Fettsäuren muss freies C17 als interner Standard verwendet werden, für die Analyse von Triglyzeriden Triheptadekanoin etc. Kommerziell erhältlich ist lediglich die freie Fettsäure Heptadekansäure und das Triglyzerid Triheptadekanoin. Für die Bestimmung von Cholesterinestern und Wachsestern mussten wir die entsprechenden internen Standards, Cholesteryl-Heptadekanoat und Hexadecyl-Heptadekanoat, selbst synthetisieren. Um die

Entstehung der korrekten Produkte nachzuweisen, verwendeten wir bei beiden Synthesen Cholesteryl-Oleat als Vergleichssubstanz, da in dem Laufmittel HEA Wachs- und Cholesterinester eine gemeinsame Bande ergeben.

#### Synthese von Hexadecyl-Heptadekanoat als internem Wachsester-Standard:

1. Lösen von 119,6mg Heptadekansäure (370  $\mu\text{mol}$ ) in 10 ml Dichlormethan.
2. Zugabe von 140  $\mu\text{l}$  Triethylamin, 96  $\mu\text{l}$  Chlorameisensäureethylester und 400mg Hexadecanol
3. Inkubation bei 30 °C für ca. 24 Stunden
4. DC zur Kontrolle der Produktentstehung. Laufmittel: 95/5 Hexan/Diethylether.  
Vergleichssubstanz: Cholesteryl-Oleat.

#### Isolierung des Hexadecyl-Heptadekanoats mittels Säulenchromatografie

1. Lösen des eingedampften Syntheseansatzes in 2 ml Hexan
2. Auftragen auf Kieselgel-Säule (Pasteurpipette gepackt mit Kieselgel in Hexan)
3. Stufenweise Elution mit  
Frkt 1-7: jeweils 1ml Hexan  
Frkt 8-12: jeweils 1ml Hexan/Ether 9/1  
Frkt 13: 5ml Ether
4. Eindampfen der Fraktionen auf jeweils 1 ml. Identifikation der Produkt enthaltenden Fraktionen mittels DC: Auftragen von jeweils 40 $\mu\text{l}$  der einzelnen Fraktionen gegen Hexadecanol, Heptadekansäure und Cholesteryl-Oleat.  
Entwicklung in HEA.
5. Vereinen, Eindampfen und Auswiegen der entsprechenden Fraktionen.

Zunächst versuchten wir, die Synthese des internen Cholesterinester-Standards, Cholesteryl-Heptadekanoat, entsprechend der Wachsestersynthese durchzuführen. Aufgrund der Reaktionsträgheit des Cholesterins gelang jedoch nur eine unbefriedigende Produktausbeute. Um die Reaktion durch Erhitzen beschleunigen zu können, testeten wir verschiedene andere Lösungsmittel, die einen höheren Siedepunkt als Dichlormethan besitzen. Von den getesteten

Lösungsmitteln Dioxan, Dimethylsulfoxid, Tetrahydrofuran und Dichlorethan, stellte sich letzteres als tauglich für die Synthese heraus. Mit Dichlorethan als Lösungsmittel konnten wir die Cholesterinester-Synthese somit bei 65 °C 18 Std lang inkubieren. Die Produktentstehung war auf diese Weise besser, jedoch wäre für eine komplette Umsetzung eine Inkubation über mehrere Tage notwendig gewesen. Daher testeten wir ein Verfahren mit Oxalylchlorid als Aktivator, was bereits nach 30 Min zu einer befriedigenden Produktausbeute führte.

#### Synthese von Cholesteryl-Heptadekanoat als internen Cholesterinester-Standard:

1. Lösen von 10,2 mg Heptadekanoat in 100 µl Oxalylchlorid und Inkubation bei 60 °C für 15 Min
2. Zugabe von 15 mg Cholesterin in 150 µl Toluol und Inkubation bei 60 °C für 30 Min
3. DC zur Kontrolle der Produktentstehung. Laufmittel: 95/5 Hexan/Diethylether. Vergleichssubstanz: Cholesteryl-Oleat (s. Abb 29).

Zur präparativen Herstellung des Cholesteryl-Heptadekanoats verwendeten wir die zehnfache Menge der im Protokoll angegebenen Substanzen. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend der des Hexadecyl-Heptadekanoats.



Abbildung 29: DC (Lm: Hexan/Ether 95/5, Färbung: Molybdato-Phosphat-Reagens) des Produkts der Cholesteryl-Heptadekanoat-Synthese (re) gegen CE-Standard (li). Beide Substanzen laufen auf gleiche Höhe, was den Beweis der erfolgreichen Synthese liefert.

### 4.3.2 Hexacosan als interner Standard für Squalen

Für Squalen ist kein als interner Standard taugliches Derivat kommerziell erhältlich und die Synthese einer geeigneten Verbindung wäre mit unverhältnismäßigem Aufwand verbunden. Daher haben wir uns mit Hexacosan für einen gesättigten Kohlenwasserstoff ähnlicher Kettenlänge (C<sub>26</sub> vs C<sub>30:6</sub>) entschieden, der bei der GC-Analyse an benachbarter Stelle von Squalen einen Peak liefert (s. Abb. 30). Da sich Hexacosan jedoch aufgrund seiner Polarität ähnlich wie die aus den Sebutapes gelösten Störsubstanzen verhält, würde es mit diesen bei der DC in die Front laufen. Daher wird Hexacosan erst nach der Extraktion des Squalens von der DC-Platte zugegeben (s. 4.6).

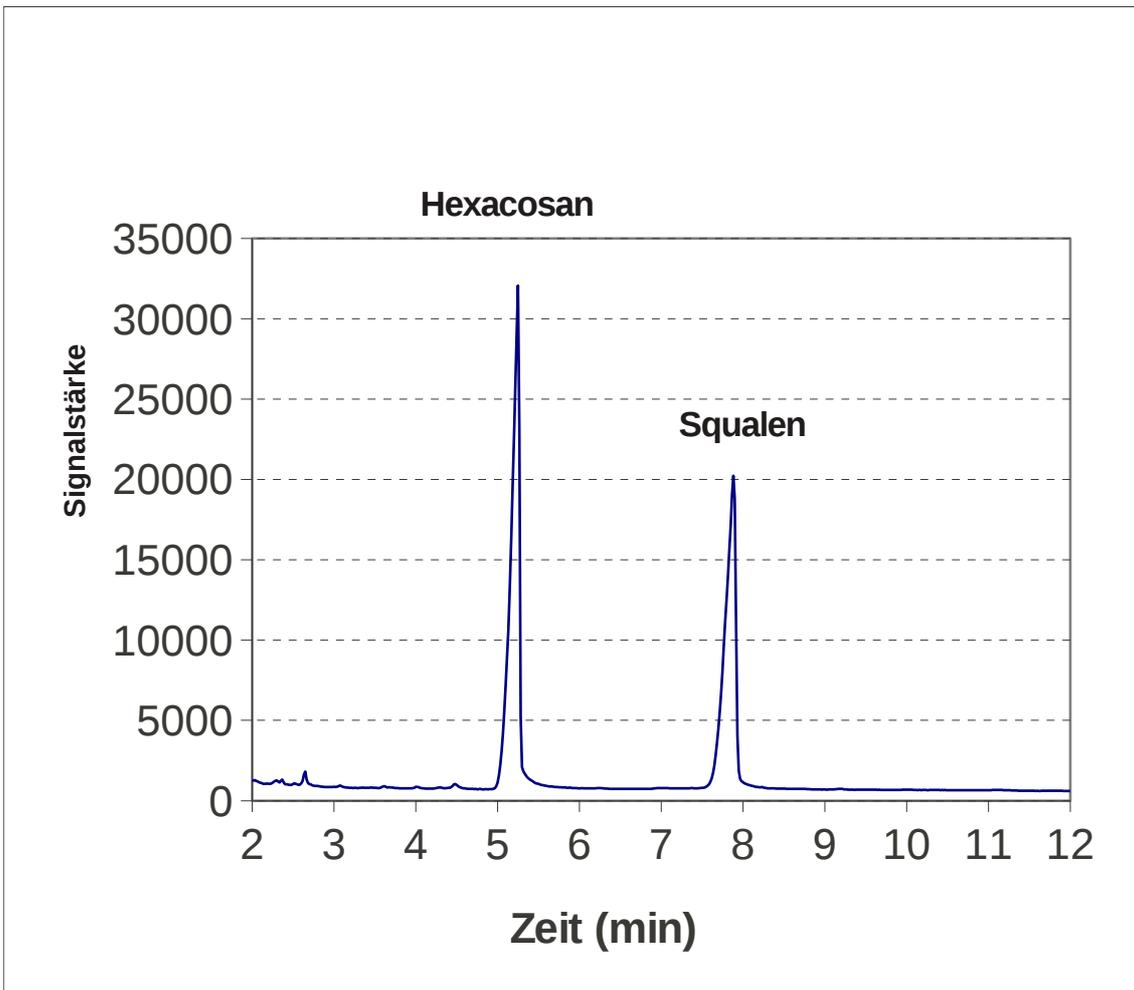


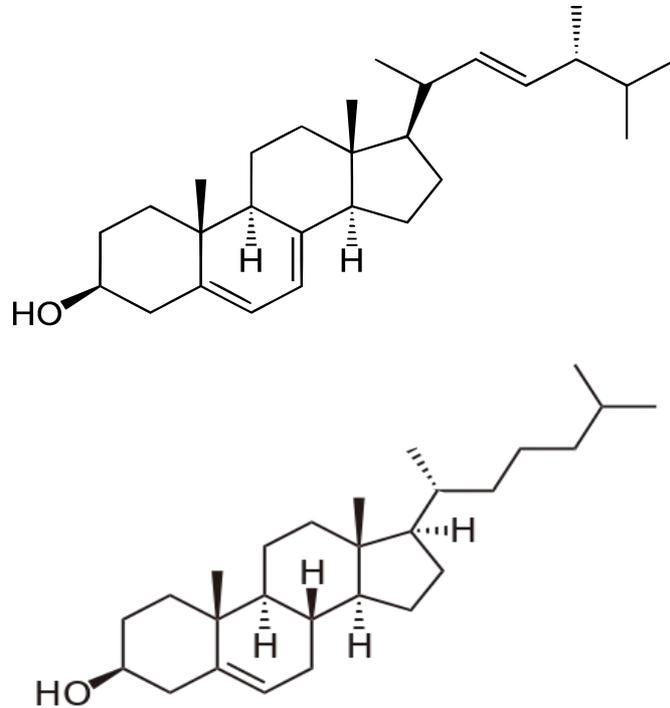
Abbildung 30: GC-Analyse (kurzes Temperaturprogramm) von Squalen (re) und Hexacosan (li). Die zeitnahen, deutlich getrennten Peaks zeichnen Hexacosan als geeigneten internen Standard für Squalen aus.

#### GC-FID-Analyse von Squalen und Hexacosan

1. Lösen der eingedampften Squalen-Probe (mit 10 $\mu$ g Hexacosan als internem Standard) in 20  $\mu$ l DCE
2. Direkte Injektion von 0,5 $\mu$ l der Lösung auf Säule (SE-30, 30m; Trägergas: N<sub>2</sub>; Säulenkopf-Druck von 80kPa)
3. mögliche Temperaturprogramme:
  - 150 °C-280 °C, 4 °C/Min, dann 10 Min isotherm bei 280 °C
  - 250 °C-280 °C, 1 °C/Min

### 4.3.3 Ergosterol als interner Standard für Cholesterin

Als internen Standard für Cholesterin wählten wir Ergosterol, einen Strukturverwandten des Cholesterins (s. Abb. 31).



*Abbildung 31: Strukturformeln von Cholesterin (oben) und Ergosterol (unten). Aufgrund seines fast identischen Aufbaus eignet sich Ergosterol als interner Standard für Cholesterin.*

Die Substanzen werden vor der GC-Analyse zu Trimethylsilyl-Ethern derivatisiert (s. 4.5.1). Die TMS-Ether liefern saubere, deutlich getrennte Peaks im Abstand von ca. 1 Minute (s. Abb. 32). Somit eignet sich Ergosterol gut zur Quantifizierung des in Talgproben vorkommenden Cholesterins.

#### GC-FID-Analyse von Cholesterin- bzw. Ergosterol-Trimethylsilylether

1. Direkte Injektion von 0,5µl Chol- bzw Ergosterol-TMS-Ether auf SE 30-Säule
2. Temperaturprogramm: 150 °C-280 °C mit 4 °C/min, dann 10 Min isotherm bei 280 °C.

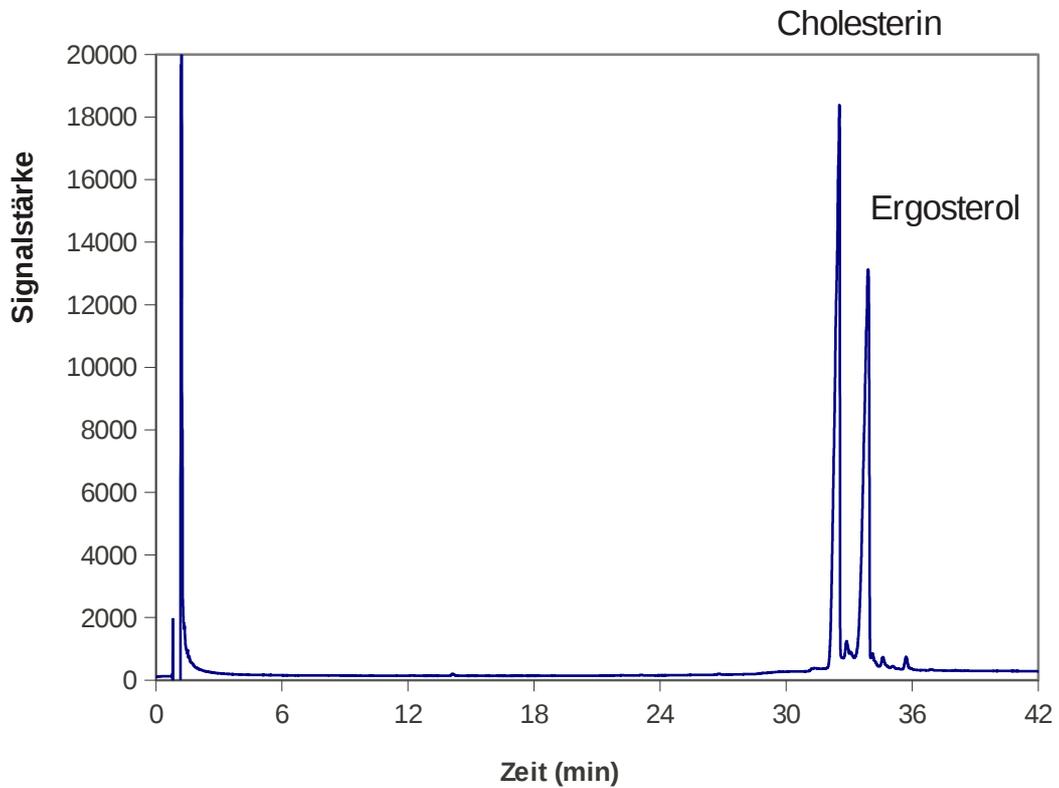


Abbildung 32: GC-Analyse von Cholesterin- und Ergosterol-TMS-Ether. Die saubere Trennung und die Erzeugung von Peaks in kurzem zeitlichen Abstand qualifiziert Ergosterol als geeigneten internen Standard von Cholesterin.

## **4.4 ENTWICKLUNG DES ANALYSEVERFAHRENS**

### **4.4.1 DC zur Trennung der Talglipide**

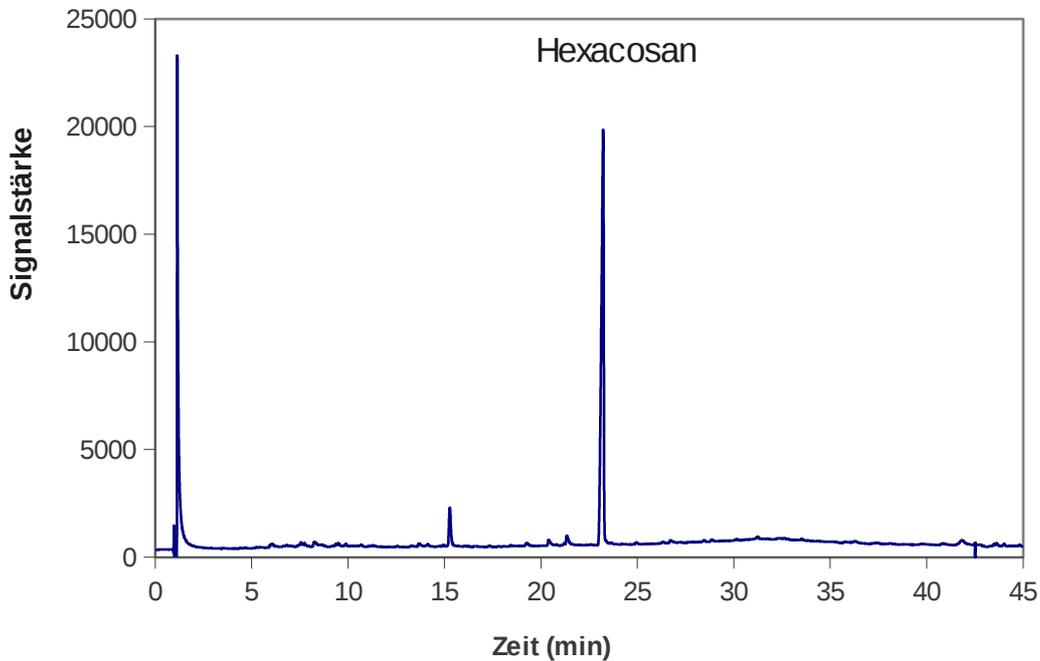
Für die relativ kleinen Mengen an zu analysierenden Lipiden erschien die Auftrennung durch semipräparative Dünnschichtchromatografie am geeignetsten.

#### **4.4.1.1 Identifikation geeigneter Färbemethoden für die DC**

Zur Sichtbarmachung der Lipidbanden der DC gibt es verschiedene Techniken mit unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten. Unkompliziert, schnell und sehr sensitiv ist die Anfärbung mit einem Molybdato-Phosphat-Reagens (s. 3.1). Die DC-Platte wird in die Färbekammer getaucht, abgetropft und anschließend auf einer Ceran-Platte bei ca. 150-200 °C erhitzt. Dabei erscheinen Lipide als blaue Banden. Diese Verfahren eignet sich jedoch nicht zur Weiterverarbeitung und Analyse von Proben, da die Lipide dabei zerstört werden.

Eine weitere Färbemethode stellt das Bedampfen mit Iod dar. Dazu wird die DC-Platte über eine mit Iodkristallen gefüllte Iodkammer gelegt. Der Ioddampf lagert sich in die Lipide ein und färbt diese an. Die Färbung ist nur vorübergehend, weil das Jod von den Lipiden wieder abdampft. Im Allgemeinen bleiben die Lipide vom Iod unbeeinträchtigt und können danach weiterverarbeitet und analysiert werden. Bei den Squalen-Analysen mussten wir jedoch feststellen, dass ein großer Nachteil dieser Färbemethode die irreversible Addition des Iods an die Doppelbindungen ungesättigter Lipide darstellt. Das mehrfach ungesättigte Lipid Squalen konnte nach der Zerstörung seiner Doppelbindungen durch die Iodaddition in der GC nicht mehr nachgewiesen werden (s. Abb. 33).

Für unser Analyseverfahren hat sich die Anfärbung der Lipide mittels Primulin und deren Sichtbarmachung unter UV-Licht (365nm) bewährt. Die Lipide werden bei dieser etablierten Methode nicht verändert, sie wurde bei vergleichbaren Talguntersuchungen erfolgreich eingesetzt (Pappas et al. 2009).



*Abbildung 33: GC-Analyse zur Squalen-Bestimmung einer Talgprobe. Hexacosan wurde als interner Standard zugefügt. Durch die vollständige Iod-Addition an die Doppelbindungen des Squalens konnte dies nicht mehr nachgewiesen werden. Üblicherweise führt Squalen zu einem Peak einige Minuten nach Hexacosan (s. Abb. 26)*

#### **4.4.1.2 Identifikation eines geeigneten DC-Laufmittels**

Die mittels Chloroform-Methanol 2/1 von der Säule gewaschenen Talglipide lassen sich am besten mit einer sukzessiven Entwicklung auf einer DC-Platte trennen. Zunächst wird mit dem Laufmittel Hexan/Ether 99/1 das unpolare Squalen von den sonstigen Talgkomponenten getrennt und für die Analyse ausgekratzt. Anschließend werden die restlichen Talglipide mit dem Laufmittel Hexan/Essigester/Essigsäure 59/10/1 (HEA) (vgl. Abb. 35) entwickelt. Der Vorteil von HEA ist eine bessere Auftrennung der polaren Lipide, die hier weniger weit laufen als unter CMW (s. Abb. 34). HEA 59/10/1 weist ähnliche Eigenschaften wie das in einer Aknestudie erfolgreich zur Talgauftrennung verwendete Laufmittel Iso-Hexan/Diethylether/Ameisensäure 80/20/2 (Pappas

2009).

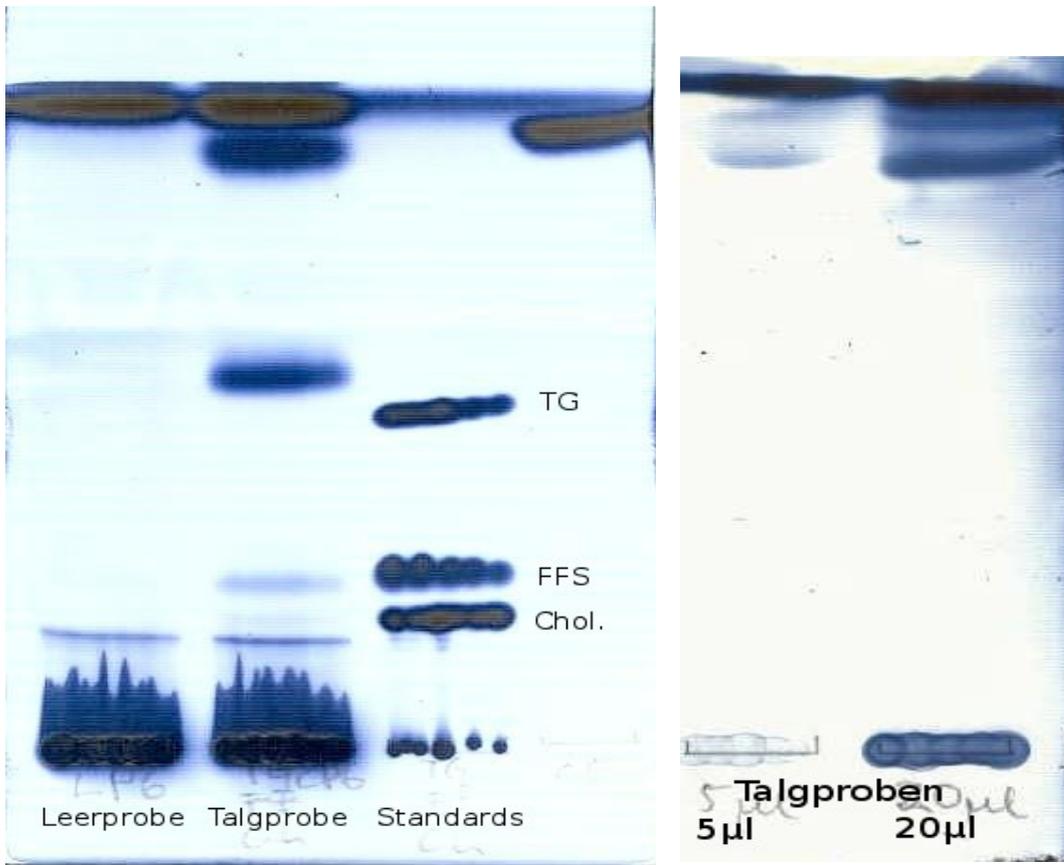


Abbildung 34: DC von Talgproben mit Laufmittel HEA (links) und CMW (rechts). Bei der Entwicklung mit HEA können die polaren Talglipide besser aufgetrennt werden. (TG=Triglyzeride, FFS=Freie Fettsäuren, Chol = Cholesterin).

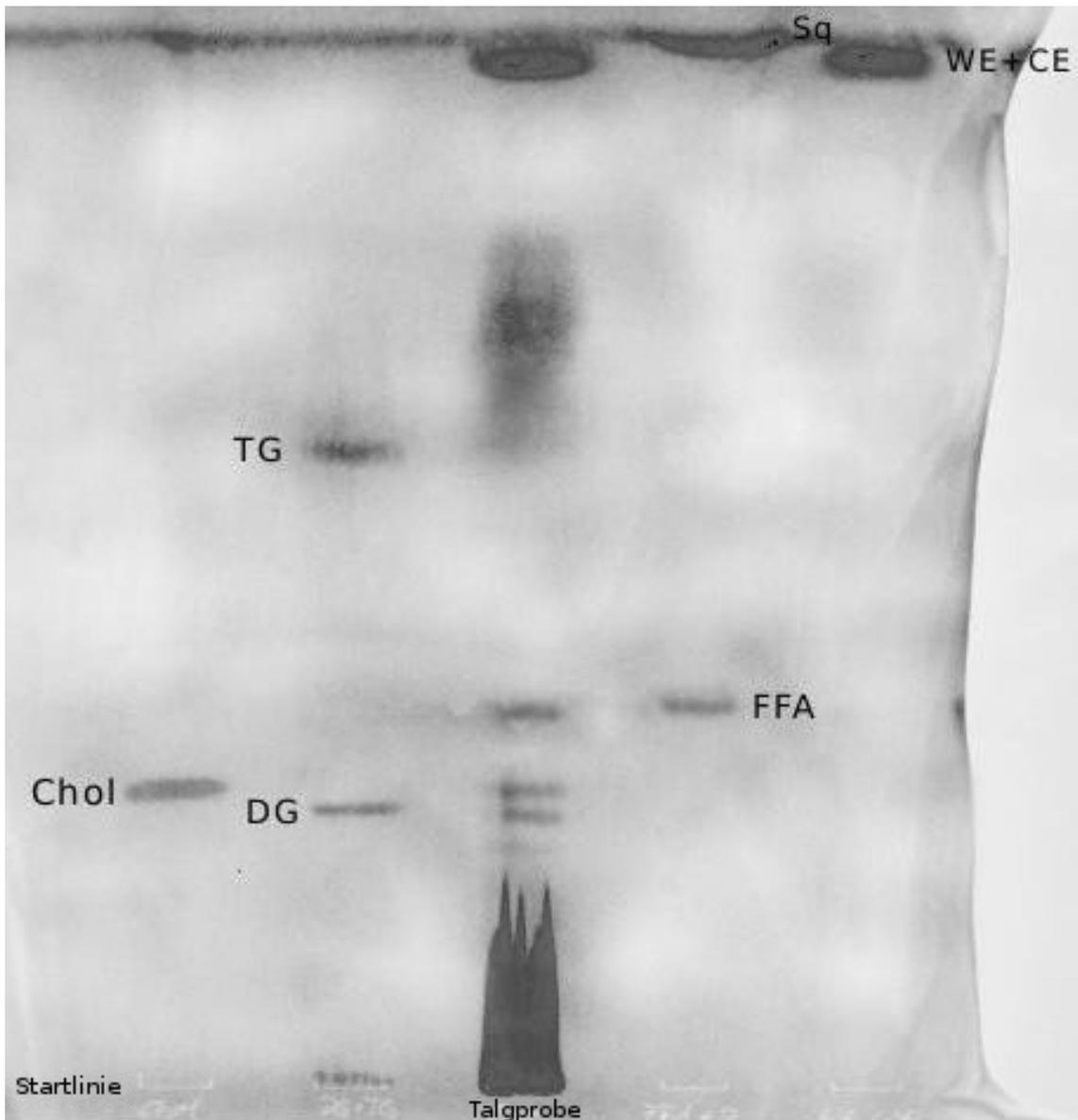


Abbildung 35: DC von Talgprobe und Standards mit Laufmittel HEA . Die breite Band auf Höhe der Triglyzeride kommt durch die unterschiedlichen veresterten Fettsäuren zustande. (Chol=Cholesterin, DG=Diglyzeride, TG=Triglyzeride, FFA=Freie Fettsäuren, WE=Wachsester, CE=Cholesterinester)

#### Auftrennung der Talgbestandteile mittels DC zur Analyse von Squalen- und FFS

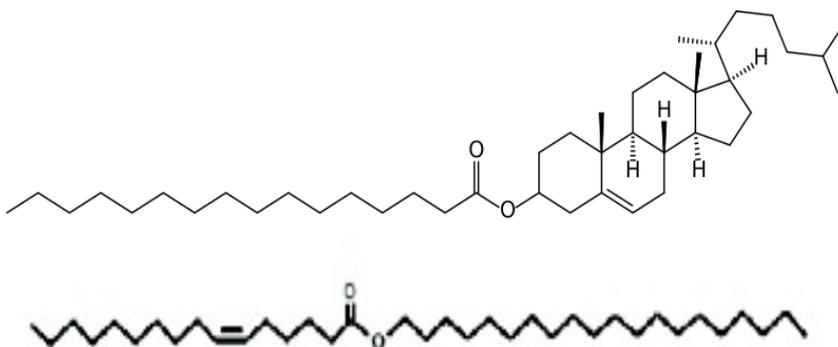
1. Eindampfen der Hälfte der 2. Fraktion der SC (Elution mit 8ml CM 2/1) und Aufnehmen in 100µl Hexan.
2. Auftragen der Probe auf eine DC-Platte (20x20cm) und Entwicklung in Hexan/Ether 99/1 V/V bis ca. 4cm vor Plattenende. Vergleichssubstanzen: Squalen, FFS.
3. Anfärben der Platte mit Primulin und Auskratzen der Squalen-Bande

4. Erneute Entwicklung der gleichen Platte in HEA 59/10/1 bis auf Höhe der ausgekratzten Squalen-Bande.
5. Auskratzen der FFS-Bande.

#### **4.4.1.3 Trennung von Wachs- und Cholesterinestern**

Für den Fall, dass die gesonderte Analyse von Wachs- und Cholesterinestern in nachfolgenden Schritten des Forschungsprojektes relevant werden sollte, suchten wir ein Verfahren zur Trennung dieser beiden Talglipide.

Die Trennung von Wachs- und Cholesterinestern ist komplex, da sich die beiden Lipidester in ihrem Aufbau lediglich durch das Cholesterin-Molekül unterscheiden (s. Abb. 36). Daher besitzen sie chemisch sehr ähnliche Eigenschaften, insbesondere eine identische Polarität, was die Trennung mittels DC sehr schwierig gestaltet.



*Abbildung 36: Beispiel für Cholesterinester (oben) und Wachsester (unten). Durch ihre chemische Struktur bedingt weisen sie eine fast identische Polarität auf, was die Trennung mittels DC sehr erschwert (Pappas 2009; Wikipedia 2011a).*

Überdies gibt es kaum wissenschaftliche Literatur oder Publikationen, die Techniken zur Trennung von Wachs- und Cholesterinestern beschreibt. Lediglich vereinzelte Talgforscher haben sich mit diesem komplexen Thema beschäftigt (Billheimer et al. 1983; Stewart & Downing 1981). Mit dem von uns zur Auftrennung der anderen Talgbestandteile verwendeten Laufmittel (HEA 59/10/1) ließen sich die beiden Substanzen nicht trennen (s. Abb. 35). Magnesium-Hydroxid soll Cholesterinester aufgrund seines Cholesterinrests gegenüber Wachsestern verlangsamen. Dies wurde von Nicolaidis 1970 mit

Mg(OH)<sub>2</sub>-Säulen beschrieben, konnte von uns jedoch nicht reproduziert werden. Wir verwendeten zunächst eine Säule von 2cm Durchmesser, mit der keinerlei Trennung der Substanzen erreicht werden konnte. Mit dem Einsatz einer Kieselgel-Säule (8mm Durchmesser, ca. 30cm Länge), gelang eine minimale Trennung, die jedoch für eine Trennung von mit unterschiedlichen Fettsäuren veresterten Wachs- und Cholesterinestern, wie sie im Talg auftreten, keinesfalls ausreicht. Als Laufmittel wählten wir Hexan/Essigester 98/2, was dem von Stewart et al eingesetzten Laufmittel gleichkommt (Stewart & Downing, 1981).

#### Säulenchromatografie mit Mg(OH)<sub>2</sub> zur Trennung von WE und CE:

1. Säule (Durchmesser 2cm, Länge 40cm) wird bis zu einem Packvolumen von 10ml mit einer Mg(OH)<sub>2</sub>-Hexan-Aufschlämmung gepackt.
2. Nachwaschen der Säule mit 10ml Hexan/Ether 95/5
3. 1ml 1/1-WE-CE-Gemisch (2mg/ml) wird auf die Säule gegeben
4. Frkt 1-10: je 2ml Hexan/Essigester 98/2
5. Auftragen von 20µl der Fraktionen gegen WE- und CE-Vergleichssubstanz auf DC und Entwicklung mit Hexan/Ether 95/5

Die von Stewart und Downing 1981 beschriebene Trennung von WE und CE durch den Einsatz einer Mg(OH)<sub>2</sub>-Säule in der *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) konnte ebensowenig reproduziert werden. Zunächst verwendeten wir eine standardmäßige Säule von 23cm Länge, mit der jedoch keine Trennung von WE und CE erreicht werden konnte. Stewart et al verwendeten eine überlange Säule von 60cm für ihre Trennung. Wir entschieden uns für das Hintereinanderschalten zweier Säulen mittels einer eigens dafür angefertigten Muffe, was zu einer Säulenlänge von 46cm führte. Auch mit einer solchen Säulenlänge konnte nur eine ansatzweise Trennung erreicht werden (s. Abb. 37). Als Laufmittel wurde wie bei der Säulenchromatografie Hexan/Essigester 98/2 eingesetzt.

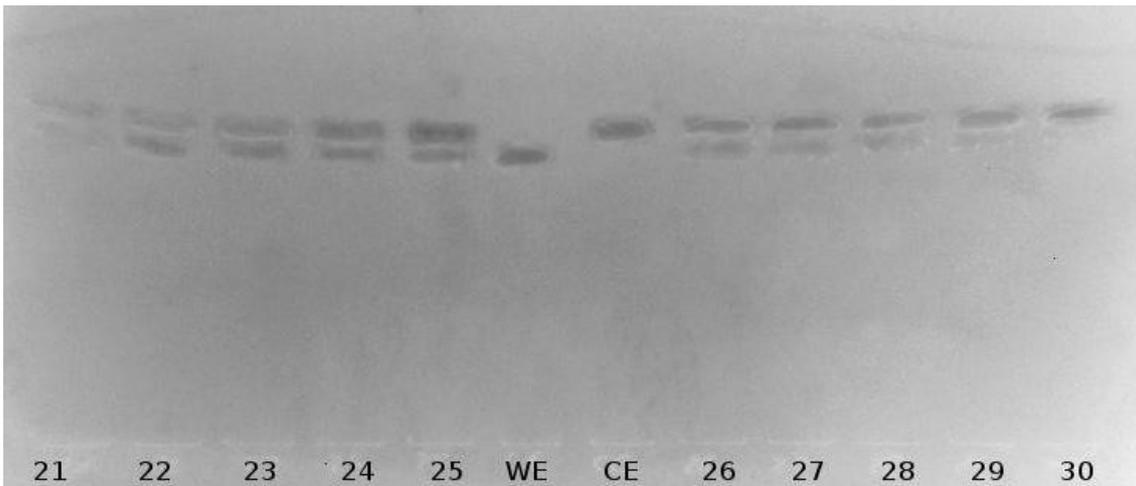


Abbildung 37: DC (Lm: Hexan/Ether 95/5, Färbung: Primulin) der HPLC-Fractionen 21 bis 30 gegen WE- und CE-Standard. Eine ansatzweise Trennung ist ab Fraktion 26 sichtbar.

#### HPLC mit Mg(OH)<sub>2</sub>-Säule zur Trennung von WE und CE:

1. Injektion von 0,5ml einer 1/1-WE/CE-Mischung (2mg/ml) in die Mg(OH)<sub>2</sub>-Säule (23cm bzw 46 cm Länge, 1cm Innendurchmesser, isokratisch: Hexan/Essigester 98/2) der HPLC.
2. Bei einer Flussrate von 1ml/Min werden 40 Fraktionen à 0,5ml gesammelt.
3. Eindampfen der Fraktionen, Lösen in 100µl Hexan, Auftragen von jeweils 10µl jeder Fraktion gegen CE- und WE-Standard auf DC (Laufmittel Hexan/Ether 95/5)

Nachdem wir die in der Literatur beschriebene Trennung von Wachs- und Cholesterinestern mittels Mg(OH)<sub>2</sub> nicht reproduzieren konnten, testeten wir weitere Lösungsmittel, die aufgrund ihrer chemischen Struktur eine Wechselwirkung mit dem Steran-Gerüst des Cholesterins möglich erscheinen ließen. Mit Tetrahydronaphthalin (Tetralin) als Laufmittel konnten WE und CE dünnschichtchromatografisch sauber getrennt werden, mit reinem Dekahydronaphthalin (Dekalin), einem gesättigten bicyclischen Kohlenwasserstoff, blieben beide Substanzen nahe der Startlinie liegen. Eine optimale Trennung von 1cm auf ca. 10cm Laufstrecke wurde mit der Mischung Dekalin/Ether 95/5 erreicht (s. Abb. 39).

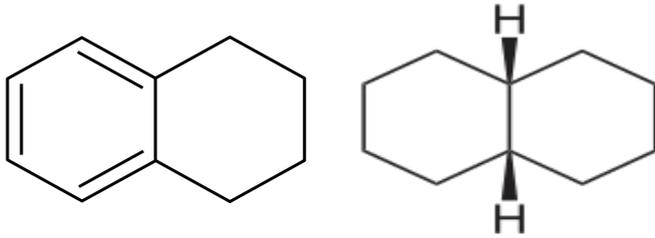


Abbildung 38: Laufmittel zur Trennung von Wachs- und Cholesterinestern: Tetralin (li) und Dekalin (re). Durch den bicyclischen Aufbau kommt es zu einer Wechselwirkung mit dem Sterangerüst des Cholesterin-Rests im Cholesterinester.

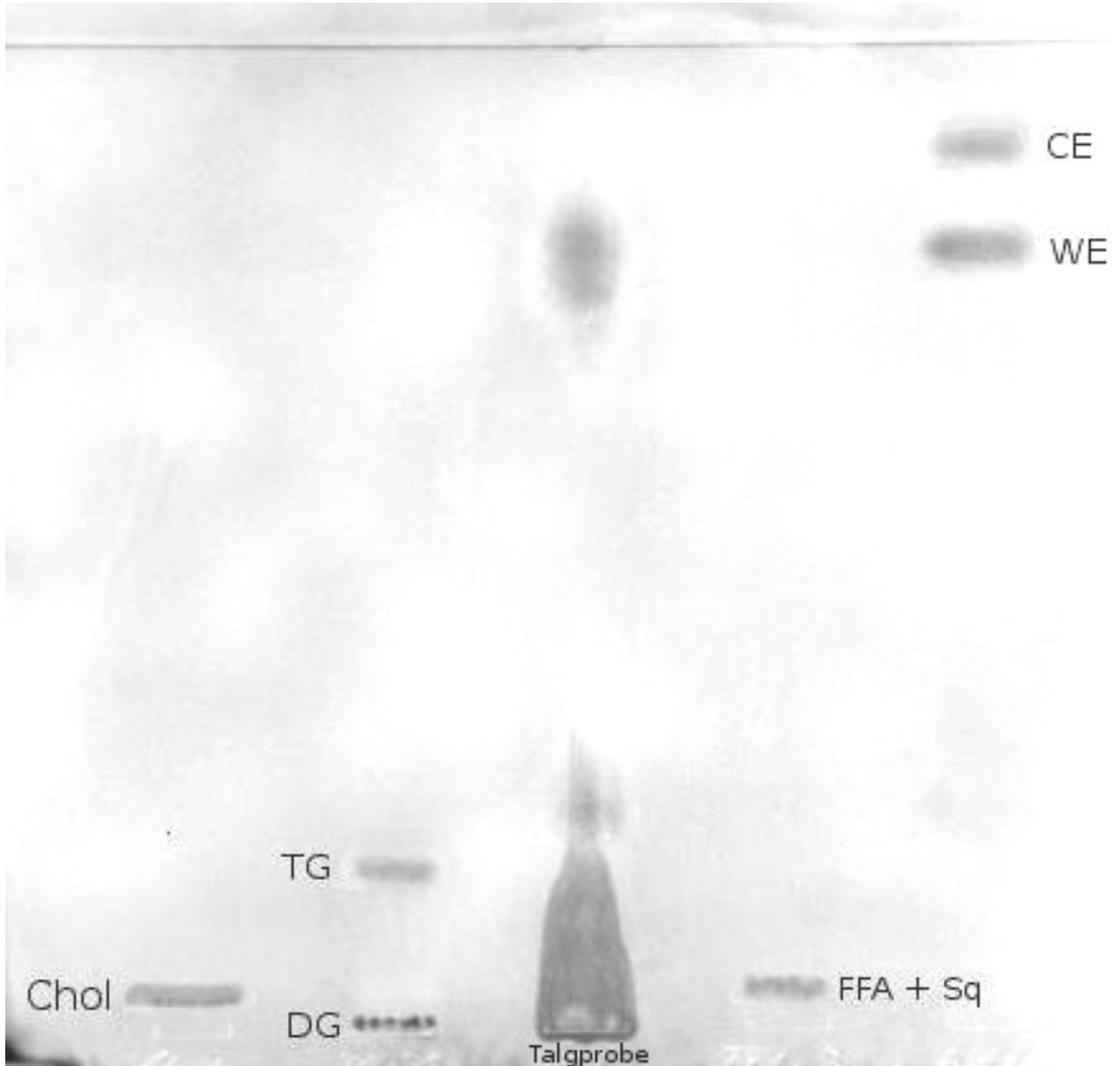


Abbildung 39: DC (Lm: Dek/Ether 95/5, Färbung: Primulin) von Talgprobe und Standards.

#### 4.4.2 Ionenaustausch-Chromatografie zur Abtrennung von FFA

Mit dem Ziel, zur Isolierung der freien Fettsäuren die aufwändige Lipidauftrennung mittels DC zu umgehen, versuchten wir die sauren Lipide durch Ionenaustausch-Chromatografie an Diethylaminoethyl (DEAE)-Cellulose

von den Neutral-Lipiden abzutrennen.

#### Ionenaustausch-Chromatografie

1. Befüllung einer Pasteurpipette mit einer DEAE-Cellulose-CM 2/1-Aufschlämmung bis zu einem Packvolumen von 1ml.
2. Vorwaschen der Säule mit 5ml MeOH.
3. Lösen des Sebutape-Extrakts mit 500µl CM 2/1 und Auftragen auf die Säule.
4. Fraktionen:
  1. Neutrale Fraktion: 4ml MeOH
  2. Saure Fraktion: 5ml 100mM NH<sub>4</sub>Acetat in MeOH
5. Eindampfen der sauren Fraktion auf 2ml, Zugabe von 4ml Chloroform und 1,5ml wässriger Essigsäure, Mischen, Zentrifugieren (2000 U/Min, 5 Min)
6. Abhebern und Verwerfen der Oberphase (incl. NH<sub>4</sub>), Eindampfen und Veresterung der Unterphase

Zum Nachweis, dass sich in der sauren Fraktion die freien Fettsäuren befinden, wurde die saure Fraktion gegen einen FFS-Standard auf eine DC aufgetragen. Diese zeigte, dass die Isolierung der freien Fettsäuren in der sauren Fraktion nur sehr bedingt gelang und überdies trotz Aufreinigung durch Folch-Verteilung erhebliche Verunreinigungen enthalten waren. Die Ionenaustauschchromatografie zur Isolierung der freien Fettsäuren wurde von uns daher als untauglich gewertet und eingestellt.

## **4.5 QUANTITATIVE ANALYSE DER TALGLIPIDE**

### **4.5.1 Aufbereitung der Talglipide für die GC**

Abgesehen von Squalen, was vom GC-FID direkt analysiert werden kann, müssen die Talglipide nach der Auftrennung aufbereitet werden. Die freien Fettsäuren werden verestert, die Ester (Triglyzeride, Wachs- und Cholesterinester) so umgeestert, dass für die gaschromatografische Analyse verwertbare Fettsäure-Methylester (FSME) vorliegen.

Um- bzw. Veresterung von Talglipiden zu FSME:

1. Zugabe von 2ml 1M HCl in MeOH zu Lipidextrakt (z.B. Freie Fettsäuren, Gesamt-Lipide)
2. Inkubation in geschlossenem SKG bei für 3 Std. bei 75 °C
3. Abkühlen lassen und Extraktion der FSME mit 2x2ml Hexan. Nach Zugabe des Hexans jeweils Zentrifugation (5Min bei 2000U/Min) und Abhebern der (Hexan-)Oberphase
4. Oberphasen werden vereint, eingedampft und in 100 µl Hexan aufgenommen.
5. Aufreinigung der Proben mittels DC: Auftragen der Proben gegen FSME-Standards und Entwicklung in Hexan/Ether 7/3
6. Primulin-Färbung der DC-Platte
7. Auskratzen der FSME-Banden und Extraktion des Kieselgels mit 1,5ml Ether. Zentrifugation (5Min bei 2000U/Min) und Abhebern des Überstandes. Eindampfen der Proben in Spitzgläschen.
8. Aufnahme der Probe in 20 µl DCE und Einspritzen in GC.

Das im Talg in geringen Mengen vorkommende Cholesterin lässt sich zwar direkt in der GC auftrennen, wesentlich schärfere Peaks erhält man jedoch nach einer Derivatisierung zu TMS-Ethern (s. Abb. 32).

#### Silylierung von Cholesterin:

1. Eindampfen der Cholesterin-Probe in ein Spitzgläschen. Zugabe von 50µg N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) und 100 µl Acetonitril.
2. Inkubation bei 70 °C für 15 Min.
3. Eindampfen und Einspritzen in GC: SE-30-Säule, N<sub>2</sub> als Trägergas, 80 kPa Säulenkopf-Druck, 150 °C-280 °C mit 4°/Min, dann 10 Min isotherm bei 280 °C  
Detektion mit FID

#### **4.5.2 Vergleichssubstanzen für GC**

Zum Nachweis, dass die zu analysierenden Talglipide in den Proben tatsächlich vorliegen, werden Vergleichssubstanzen bekannter Zusammensetzung verwendet. Diese Vergleichssubstanzen werden unter den gleichen Bedingungen (Säule, Temperaturprogramm etc) wie die Proben analysiert und anschließend mit den Probenergebnissen verglichen. Für die Zuordnung der Fettsäuren wurde eine FSME-Standard-Mischung gesättigter (s. Abb. 41) und ungesättigter Fettsäuren verwendet. Zur Identifikation der Sapiensäure, des Squalens und des Cholesterins verwendeten wir überdies die entsprechenden Einzelsubstanzen als Vergleichssubstanz: Sapiensäure-Methylester, Cholesterin-TMS-Ether und Squalen. Die Zuordnung der Vergleichssubstanz zu dem in der Talgprobe vorkommenden Lipid verläuft für alle Talgkomponenten gleich und ist hier exemplarisch anhand der Sapiensäure dargestellt (s. Abb. 40 - 42).

#### GC-FID-Analyse von FSME:

1. Lösen des FSME-Extrakts in 50µl DCE. Injektion von 0,5µl in OV1701-Säule
2. Temperaturprogramm: 150 °C-280 °C mit 4 °C/min, dann 10 Min isotherm bei 280 °C, Trägergas N<sub>2</sub>, Säulenkopfdruck 80kPa.

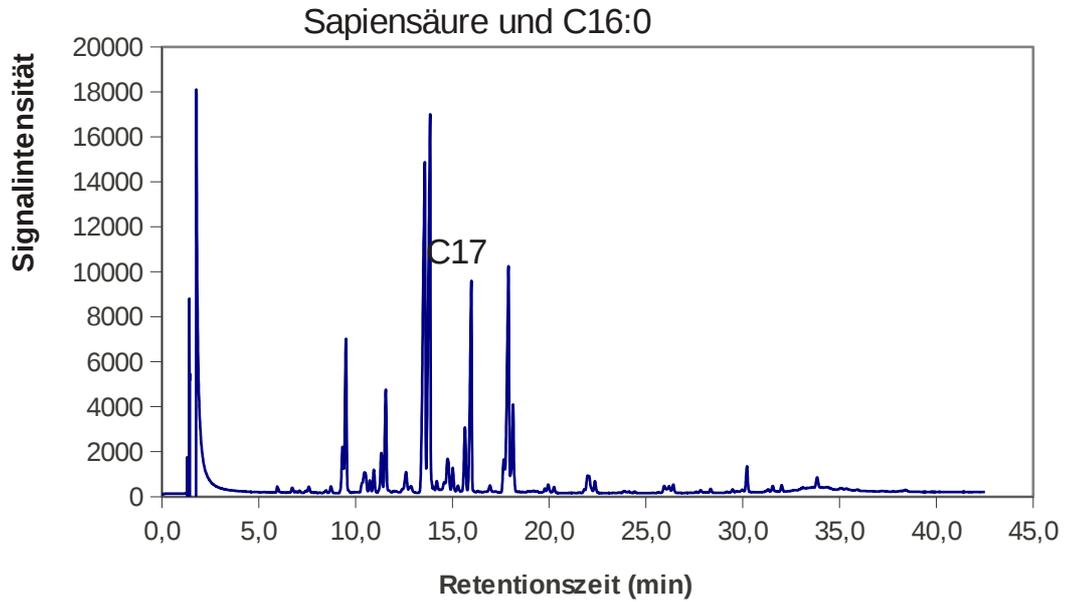


Abbildung 40: GC-Analyse einer Talgprobe zur Quantifizierung der Sapiensäure in den Gesamtfettsäuren. C17 als interner Standard.

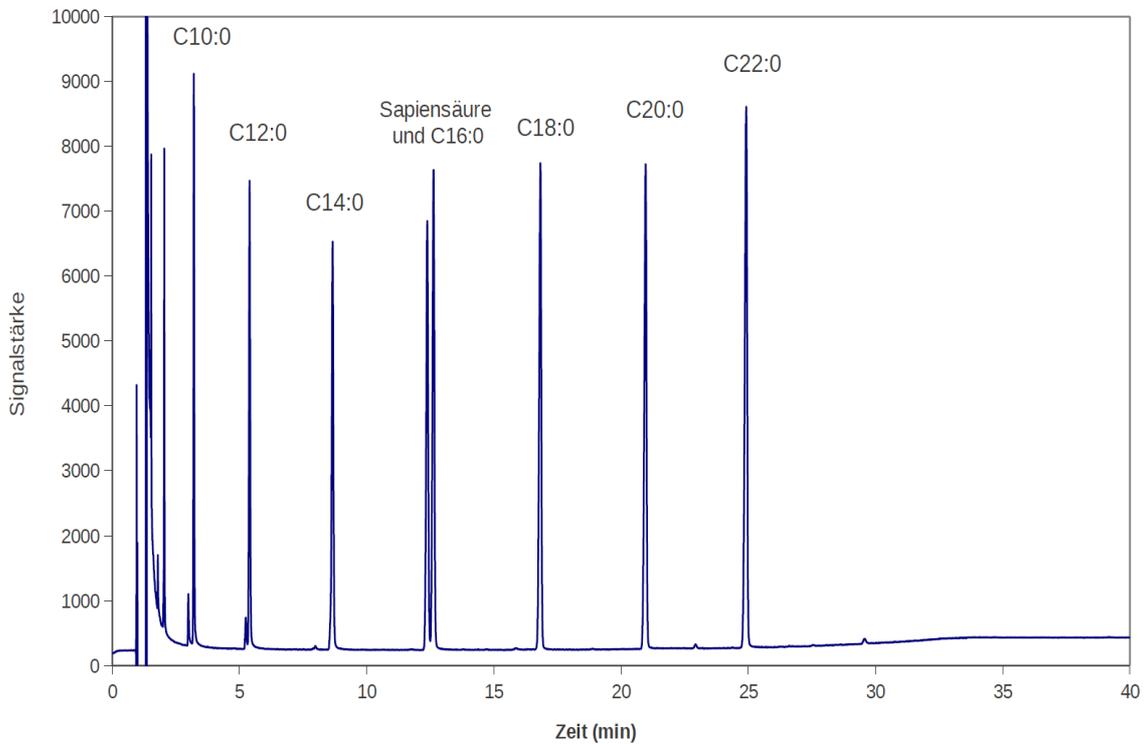


Abbildung 41: Identifikation von Fettsäuren in der Talgprobe am Beispiel der Sapiensäure. GC-Analysen (OV1701-Säule) von Standardmischung gesättigter FSME mit Sapiensäure-ME

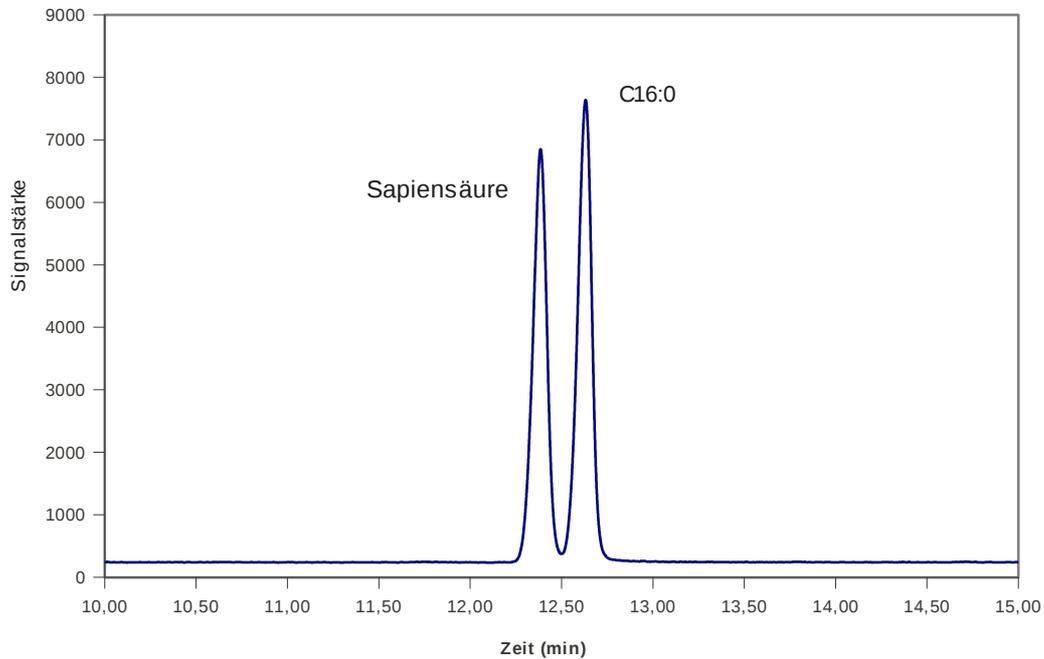


Abbildung 42: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 41 zur Verdeutlichung der sauberen Trennung von Sapiensäure und C16:0.

### 4.5.3 Ergebnisse Einzelmessungen GC

Anhand der Integration der Peakfläche der internen Standards, die in definierter Menge der Talgprobe zugesetzt worden sind, ist eine Quantifizierung der entsprechenden Talgkomponenten möglich (s. Abb. 43).

#### 4.5.3.1 Squalen-Messung

Die von Studierenden gewonnenen Talgproben wurden mittels Hexacosan als internem Standard auf ihren Squalengehalt untersucht. Unsere Ergebnisse sind mit denen ähnlicher Talganalysen vergleichbar (Pappas 2009).

Proband	nach Peak-Korrektur			ohne Peak-Korrektur		
	Hexacosan Flächen	Squalen Flächen	Squalen µg/Probe	Hexacosan Flächen	Squalen Flächen	Squalen µg/Probe
1	27078	53868	19,9	27078	71779	26,5
2	52435	149520	28,5	52435	214117	40,8
3	36305	82300	22,7	36305	116800	32,2
4				32927	75785	23,0
5				101826	278334	27,3
6				44327	161807	36,5
7				137248	391676	28,5
8				46255	102923	22,3
				Mittelwert		29,6
				StdAbw		6,5

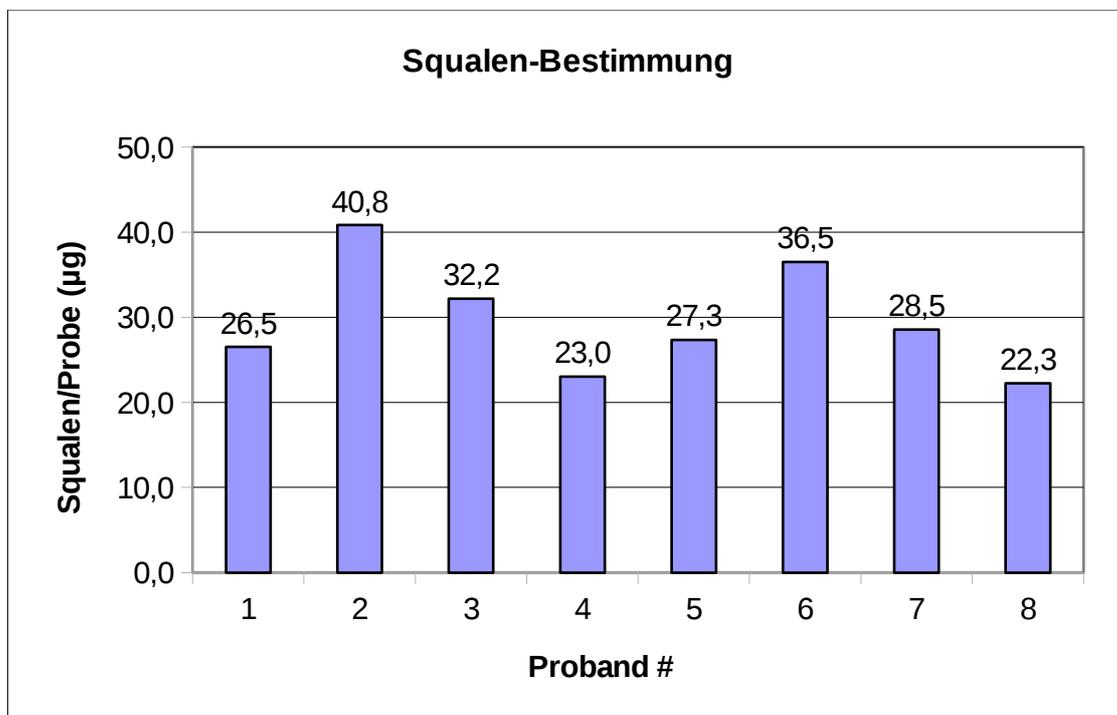


Abbildung 43: Berechnung (oben) und Ergebnisse (unten) einer Squalen-Bestimmung von acht Talgproben verschiedener Probanden.

#### 4.5.3.2 Sapiensäure-Messung

Sapiensäure (C16:1  $\Delta$ 6) unterscheidet sich lediglich durch eine Doppelbindung von der Palmitinsäure (C16:0). Beide Fettsäuren stellen Hauptanteile der im Talg enthaltenen freien oder veresterten Fettsäuren dar. Durch eine gaschromatografische Analyse sind diese beiden Fettsäuren zu trennen (s. Abb. 41 und

42).

Anhand der Integration der Peakfläche des internen Standards Heptadekansäure lässt sich die im Talg vorliegende Sapiensäure quantifizieren (s. Abb. 44 und 45).

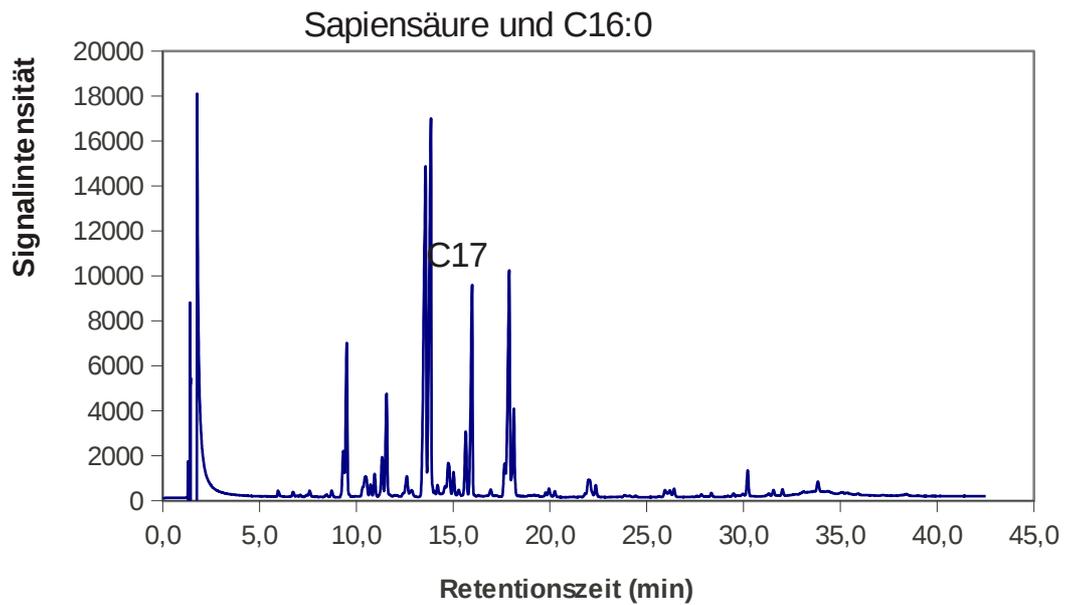
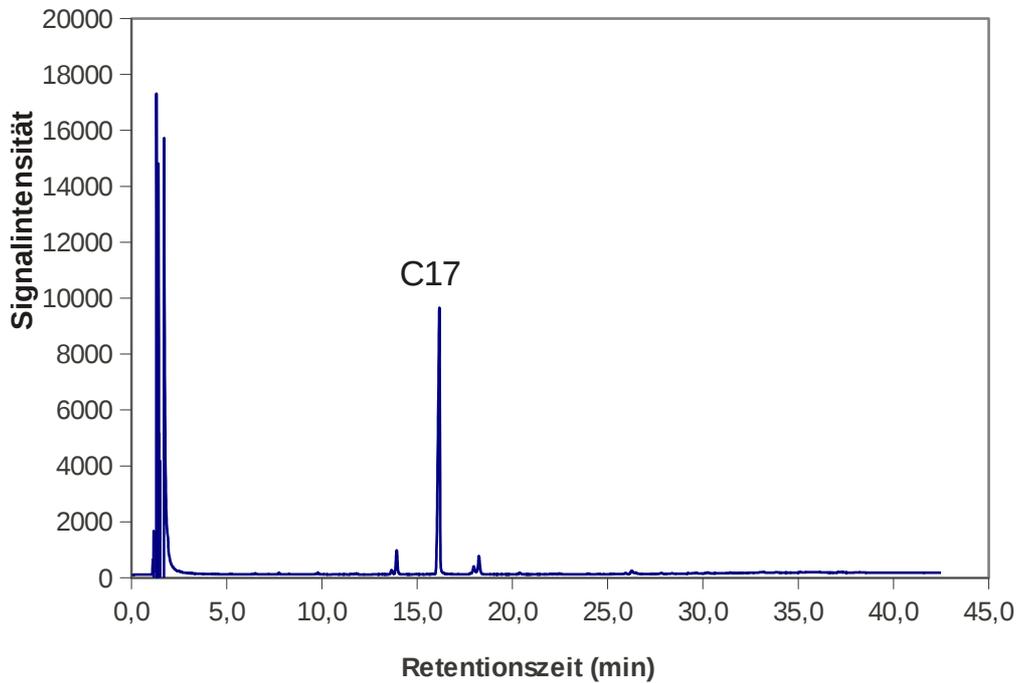


Abbildung 44: GC-Analyse einer Talgprobe zur Quantifizierung der Sapiensäure in den Gesamtfettsäuren. C17 als interner Standard.



*Abbildung 45: GC-Analyse der Kontrolle (leeres Sebutape) zur Quantifizierung der Sapiensäure in den Gesamtfettsäuren. C17 als interner Standard. Die persistierenden Peaks auf Höhe C16 und C18 sind vernachlässigbar.*

#### **4.5.3.3 Messung freier Fettsäuren**

Zur Quantifizierung der freien Fettsäuren im Talg werden alle FSME-Peaks der aus der DC ausgekratzten FFS-Bande integriert und anhand der Heptadecansäure als internem Standard quantifiziert.

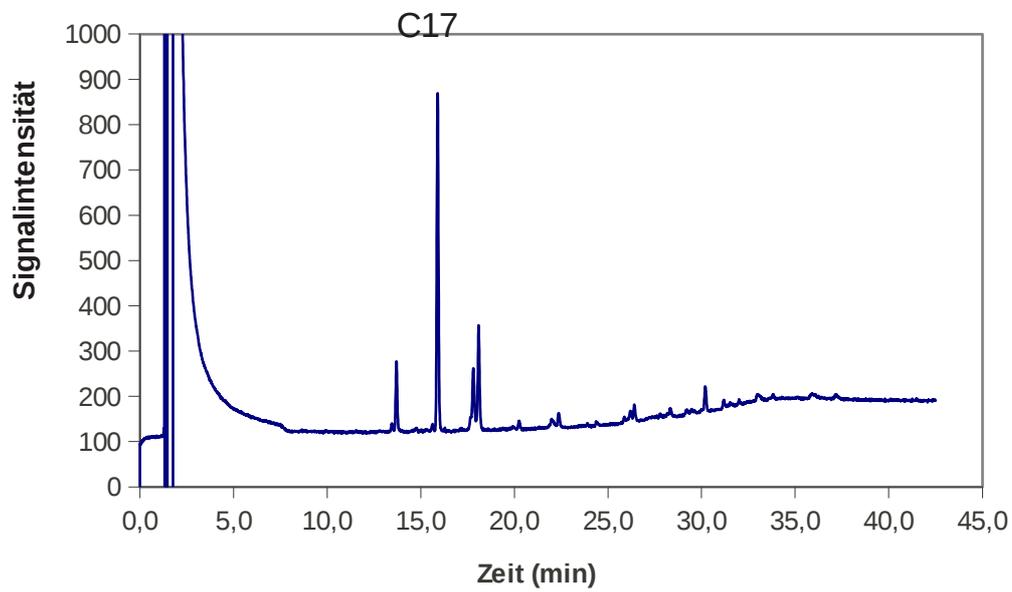


Abbildung 46: GC-Analyse einer Talgprobe zur Quantifizierung der freien Fettsäuren. C17 als interner Standard.

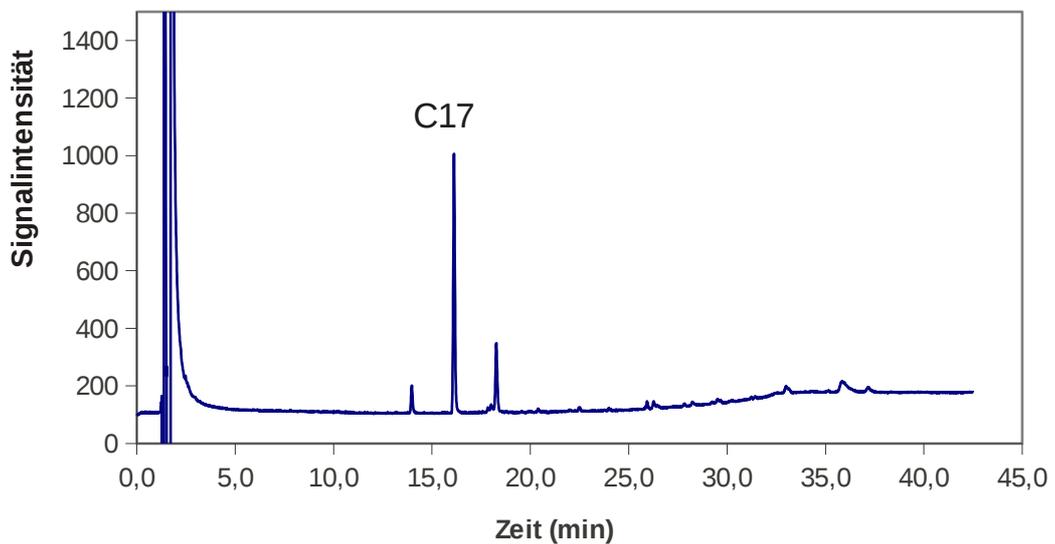
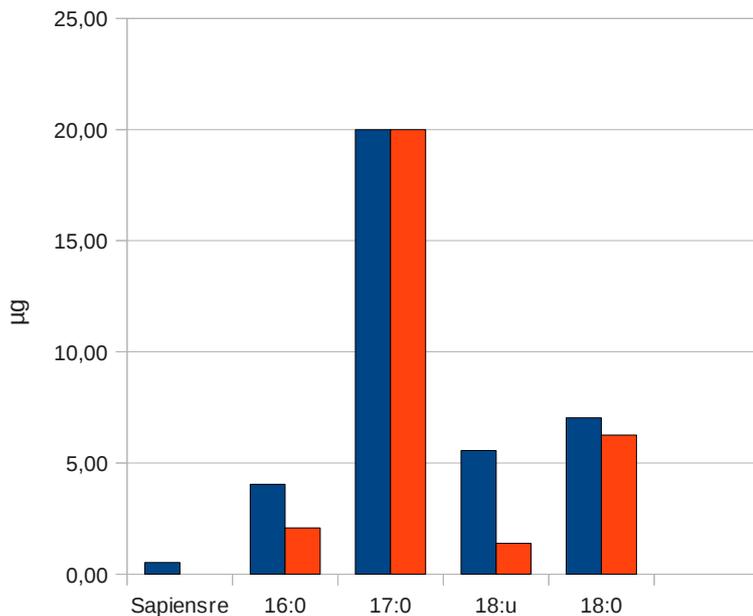


Abbildung 47: GC-Analyse der Kontrolle (leeres Tape) zur Quantifizierung der freien Fettsäuren. C17 als interner Standard.



*Abbildung 48: Quantifizierung der freien Fettsäuren. Blau: Probe. Orange: Kontrolle. 18:u: ungesättigte C18-FS*

Aus Abb. 48 ist ersichtlich, dass die aus Verunreinigungen der Kontrolle stammenden Fettsäuren bei der Palmitinsäure (C16) 50%, bei der Stearinsäure (C18) sogar knapp 90% ausmachten. Die Verunreinigungen in den Kontrollen waren bei der Wiederholung des Versuchs mit einer anderen Talgprobe quantitativ und qualitativ konstant. Sollte sich dies in größeren Reihen so reproduzieren lassen, könnte lediglich die Differenz aus Probe und Kontrolle befriedigende Ergebnisse liefern. Die Relevanz dieser Verunreinigungen ist jedoch auch abhängig von der Gesamtmenge der freien Fettsäuren einer Probe. Um eine abschließende Evaluierung dieser quantitativen Bestimmung freier Fettsäuren anstellen zu können, müssen größere Testreihen durchgeführt werden.

#### **4.6 ZUSAMMENFASSUNG DES ANALYSEVERFAHRENS**

Das Sebutape wird auf eine entfettete Stirn des Probanden geklebt und nach 45 Min entfernt. Die Aufbewahrung des Tapes erfolgt unter Argon oder CO<sub>2</sub> in einem Schraubkappenglas bei -20 °C (s. 4.1.1.2). Nach der Extraktion des Sebutapes wird Heptadekansäure als interner Standard zur Quantifizierung der Sapiensäure und der freien Fettsäuren zugegeben. Der Sebutape-Extrakt wird auf eine vorgewaschene Kieselgelsäule aufgebracht und zunächst mit Hexan nachgewaschen um die Sebutapesubstanzen von den Talglipiden abzutrennen (s. 4.1.3). Mit der folgenden CM 2/1-Fraktion werden die restlichen Talglipide ausgewaschen. Das Eluat wird zu gleichen Hälften aufgeteilt, wobei eine Hälfte für die Sapiensäure-Bestimmung aus den Gesamtfettsäuren verwendet wird, die andere zur Bestimmung der freien Fettsäuren und des Squalens. Das Eluat zur Sapiensäure-Bestimmung wird eingedampft, umgeestert und als FSME in die GC injiziert. Das Eluat für die Bestimmung der freien Fettsäuren und des Squalens wird auf eine DC aufgetragen, die zunächst in 99/1 Hexan/Ether und anschließend in 59/10/1 HEA entwickelt wird. Die entsprechenden Banden werden ausgekratzt und extrahiert (s. 4.4.1.2). Nach der Veresterung sind die freien Fettsäuren als FSME für die GC-Analyse bereit. Das Squalen kann nach Zugabe des internen Standards Hexacosan direkt in die GC injiziert werden (s. 4.5.1).

Sollten in weitergehenden Untersuchungen andere Talgbestandteile bestimmt werden, muss der entsprechende interne Standard (Ergosterol für Cholesterin, Triheptadekanoin für Triglyzeride, Hexadecylheptadekanoat für Wachsester, Cholesterylheptadekanoat für Cholesterinester) nach der Sebutapextraktion dazugegeben und aus der DC die entsprechende Bande ausgekratzt werden (s. 4.3.1 und 4.3.3). Zur Trennung von WE und CE muss die DC mit 95/5 Dekalin/Ether entwickelt werden (s. 4.4.1.3).

##### A. Extraktion des Sebutapes und Zugabe des Heptadekanoats als internem Standard:

1. Extraktion des Sebutapes mit 2ml C/M 2/1. Mischen. Entfernung des Sebutapes aus dem SKG.

2. Zugabe von 5µl Heptadekanoat in Toluol (2mg/ml) als interner Standard.
3. Zugabe von 0,5 ml H<sub>2</sub>O. Mischen.
4. Zentrifugieren bei 2000U/Min (bei ca. 20 °C) für 5 Min.
5. Abhebern und Verwerfen der Oberphase
6. Eindampfen der Unterphase unter leichtem Stickstoffstrom bei 40 °C.

#### B. Säulenchromatografie zur Abtrennung der Tapesubstanzen

1. Packen der Pasteurpipette mit Kieselgel-Hexan-Aufschlammung (Packvolumen 1ml)
2. Lösen des Sebutape-Extrakt in 0,5ml Hexan. Auftragen auf Säule.
4. Elution der Säule mit
  - Frkt 1: Hexan 5ml: Sebutapesubstanzen: Verwerfen
  - Frkt 2: CM 2/1 8ml: Talglipide: Aufteilen
    - 1.Hälfte: Bestimmung Squalen und freie Fettsäuren
    - 2.Hälfte: Bestimmung Sapiensäure aus Gesamtfettsäuren

#### C. Auftrennung der Talgbestandteile mittels DC zur Analyse von Squalen- und FFS

1. Eindampfen der Hälfte der Fraktion 2. Lösen in 100µl Hexan.
2. Auftragen der Probe auf eine DC-Platte (20x20cm) und Entwicklung in 99:1 Hexan/Ether bis ca. 4cm vor Plattenende. Vergleichssubstanzen: Squalen, FFS.
3. Anfärben der Platte mit Primulin und Auskratzen der Squalen-Bande. Extraktion mit 2ml Hexan. Zugabe von 10µg Hexacosan als interner Standard. Zentrifugieren. Überstand abhebern. Eindampfen. Direkte GC-Analyse.
4. Erneute Entwicklung der gleichen Platte in HEA 59/10/1.
5. Auskratzen der FFS-Bande. Extraktion mit 2ml Hexan. Zentrifugieren. Überstand Abhebern. Eindampfen.

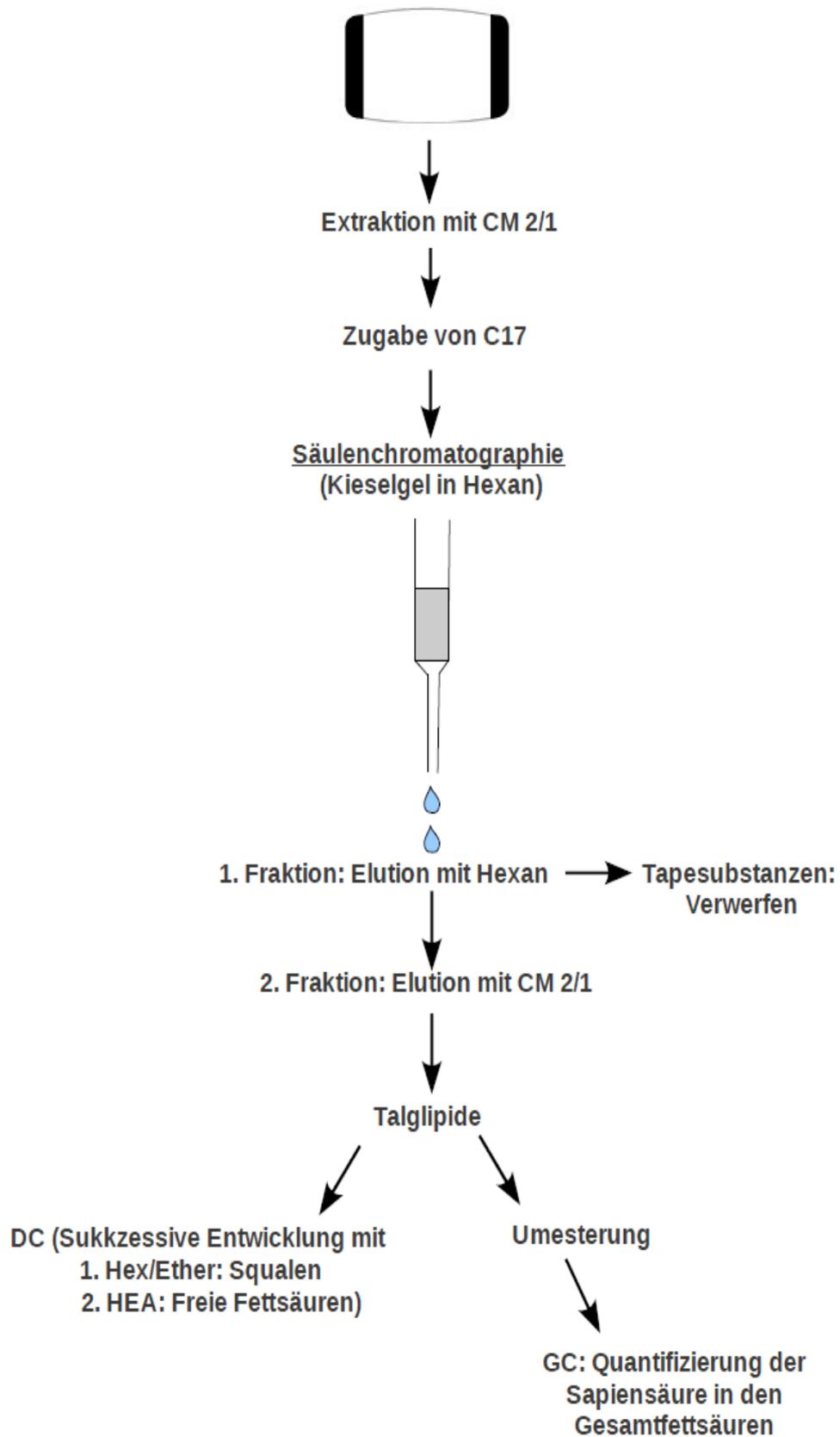
#### D. Um- bzw. Veresterung der Gesamt- und freien Fettsäuren zu FSME

Die zur Sapiensäure-Bestimmung vorgesehene Hälfte der Fraktion 2

enthält die Gesamt-Fettsäuren und wird vollständig umgeestert. Der Überstand der ausgekratzten freien Fettsäuren enthält die freien Fettsäuren der Talgprobe und wird vollständig verestert.

1. Zugabe von 2ml 1M HCl in MeOH zum Extrakt der Gesamtfettsäuren bzw. freien Fettsäuren.
2. Inkubation in geschlossenen SKG für 3 Std. bei 75 °C
3. Abkühlen lassen und Extraktion der FSME mit 2x2ml Hexan. Nach Zugabe des Hexans jeweils Zentrifugation (5Min bei 2000U/Min) und Abhebern der (Hexan-)Oberphase
4. Vereinen der Oberphasen. Eindampfen. Aufnahme in 100 µl Hexan.
5. Aufreinigung der Proben mittels DC: Auftragen der Proben gegen FSME-Standards und Entwicklung in Hexan/Ether 7/3
6. Primulin-Färbung. Auskratzen der FSME-Banden und Extraktion des mit 1,5ml Ether. Zentrifugation. Abhebern des Überstandes. Eindampfen.
7. GC-Analyse

## Talgprobenentnahme mittels Sebutape



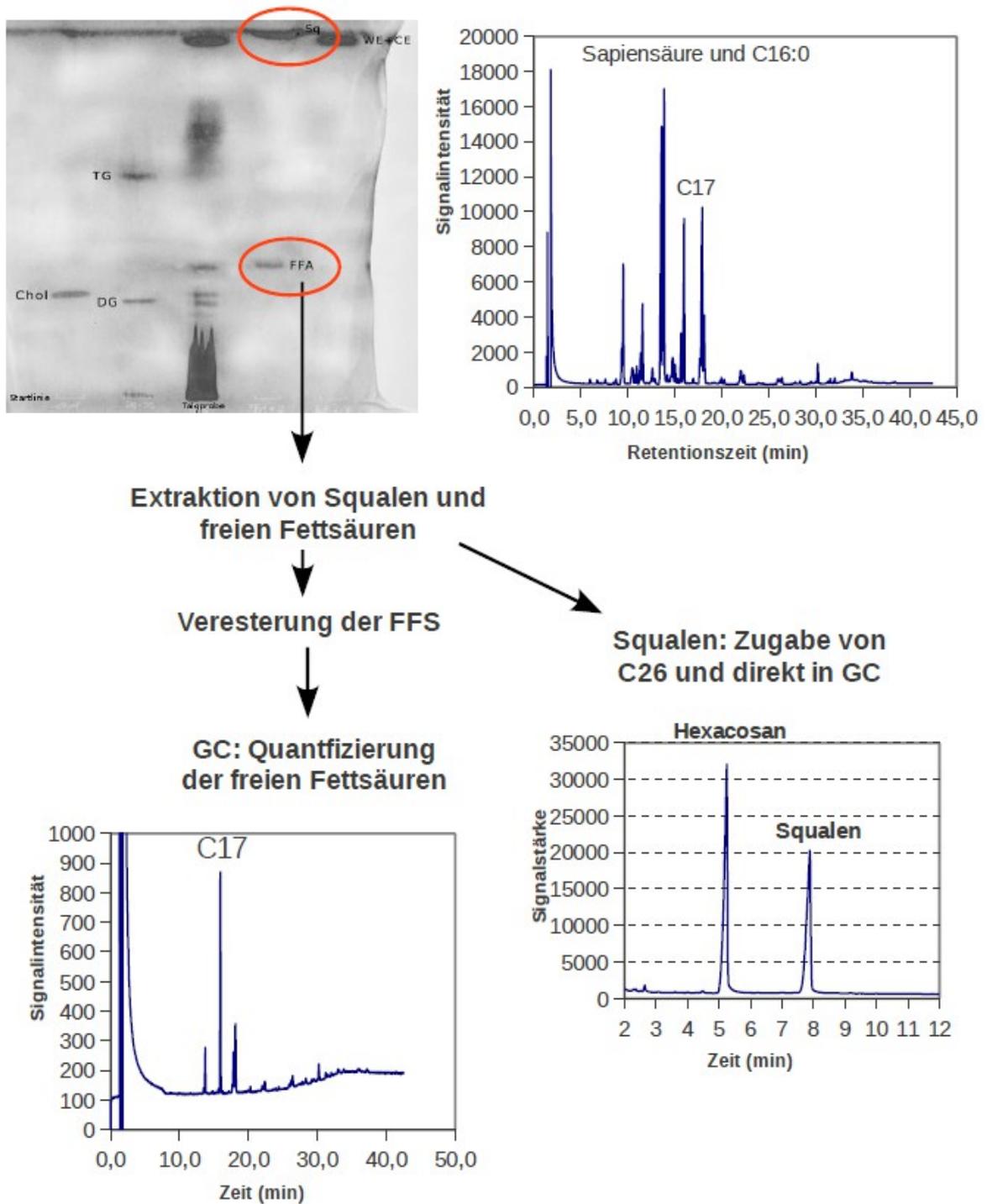


Abbildung 49: Überblick über das Analyseverfahren zur Quantifizierung von Sapiensäure, Squalen und freien Fettsäuren in Talgproben.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 QUALITÄT AUSGEWÄHLTER VERFÜGBARER DATEN

Die Qualität der im Internet und in Bibliotheken verfügbaren Daten, die mir bei meiner Literaturrecherche zur Verfügung standen, war sehr heterogen. Um eine bessere Evaluierung der unter 2. dargelegten Ergebnisse der Literaturrecherche zu ermöglichen, soll im Folgenden auf die Qualität der Daten zur Epidemiologie, zur Transmission und zum Genom und Metabolismus eingegangen werden.

#### 5.1.1 Daten zur Epidemiologie

Die epidemiologischen Daten zur Prävalenz und Inzidenz einer Krankheit haben erhebliche Auswirkungen. Anhand der Anzahl der von der Krankheit betroffenen Menschen (Prävalenz) wird im globalen Kontext die Relevanz eines Gesundheitsproblems abgelesen. Überdies wird von der *case detection rate* (CDR) auf die Inzidenz und somit auf die Aktualität der Krankheit geschlossen. Ebenso wird anhand der Entwicklung von Prävalenz und CDR eine Prognose über die zu erwartende globale Krankheitslast abgegeben. Somit entscheiden diese epidemiologischen Parameter über die öffentliche Wahrnehmung einer Krankheit und haben bedeutenden Einfluss auf die Finanzierung aller Bereiche, die an der Krankheitsbekämpfung beteiligt sind, wie u.a. die Forschung oder medizinische Versorgung der Erkrankten. Im Falle von vernachlässigten Krankheiten (*neglected diseases*) besteht eine noch größere Abhängigkeit der Ressourcen zur Bekämpfung einer Krankheit von der öffentlichen Wahrnehmung dieser Krankheit als globales Gesundheitsproblem. Ursache hierfür ist, dass der Großteil der vernachlässigten Krankheiten in vergleichsweise ressourcenschwachen Gebieten der Welt auftritt, die Ressourcen zur Krankheitsbekämpfung also mittels Lobbyarbeit im Ausland (z.B. bei NGOs) oder bei Institutionen der Staatengemeinschaft (z.B. der WHO) eingeworben werden müssen. *Per se* besitzen die an vernachlässigten und - im Falle von Lepra - stigmatisierten Krankheiten leidenden Menschen keine Lobby und sind somit auf die öffentliche Wahrnehmung ihrer Krankheit angewiesen,

die maßgeblich durch epidemiologische Daten beeinflusst wird. Dementsprechend hoch ist das Ansehen für diejenige Institution, die es schafft, Prävalenz und Inzidenz zu beeinflussen und die Krankheit zurückzudrängen. Dies ist im Bezug auf Lepra und viele andere Krankheiten das erklärte Ziel der WHO. Die Daten zu Prävalenz und CDR haben somit weitreichende Konsequenzen und stellen sowohl für die von der Krankheit Betroffenen als auch für die an der globalen Bekämpfungsstrategie beteiligten Institutionen ein Politikum dar. Entsprechend hoch müssen die Anforderungen an die Qualität dieser Daten sein und die Qualität dieser Daten muss für Dritte evaluierbar sein.

Aus dem Weekly Epidemiological Report 2002 der WHO geht hervor, dass die Lepra-Prävalenz von 5 Mio im Jahre 1985 auf weniger als 1 Mio im Jahr 2001 gesunken ist. Diese Zahlen müssen aus oben genannten Gründen im Spiegel der WHO-Politik betrachtet werden. 1981 empfahl die WHO, dass alle multibazillären Lepra-Patienten eine *multi drug therapy* (MDT) erhalten sollten und 1995 verabschiedete sie eine Resolution, nach der alle Lepra-Patienten weltweit eine kostenfreie MDT erhalten sollten (Feasey et al. 2010). 1991 setzte sich das 44. World Health Assembly der WHO zum Ziel, bis zum Jahr 2000 die Lepra als *public health*-Problem eliminiert zu haben. Das Eliminierungsprogramm wurde später bis 2005 fortgesetzt. Als Ziel wurde eine Prävalenz von weniger als 1 Fall pro 10 000 Personen definiert (World Health Assembly 1991). Die WHO brachte zum Erreichen ihres Ziels ein Eradikationsprogramm auf den Weg, das unter anderem vorsah, nur noch die Leprapatienten als solche in ihre Statistiken aufzunehmen, die eine MDT erhielten. Durch die Verkürzung der Therapiedauer bei der Umstellung von der Mono- auf die Mehrfachtherapie und mit einer weiteren Verkürzung der Therapiedauer von 24 auf 12 Monate im Jahr 1997 fielen somit zahlreiche Patienten aus der statistischen Erhebung heraus und sind am Abfall der Prävalenzzahlen maßgeblich beteiligt (Durrheim & Speare 2003; Fine 1992; Lockwood 2002; WHO Expert Committee on Leprosy 1998). Überdies gibt es begründete Annahmen, dass in vielen Ländern nicht alle Leprapatienten registriert wurden, um das Eradikationsziel erreichen zu können (Rodrigues & Lockwood 2011). Ein weiterer wichtiger Kritikpunkt an den von der WHO

veröffentlichten Lepradaten ist, dass nicht ersichtlich ist, inwiefern sich die Bemühungen um die Datenerhebung in den einzelnen Ländern über die Zeit - v.a. als Folge veränderter WHO-Politik - gewandelt haben. Die Vergleichbarkeit der Prävalenz- und Inzidenzzahlen über den Zeitraum 1985 bis 2001 ist ohne eine Bereinigung hinsichtlich genannter Einflussfaktoren somit nicht gegeben.

Neben der Kritik an der mangelhaften Qualität der WHO-Daten wurde auch das festgesetzte Eradikationsziel stark in Frage gestellt. *Per se* ist die Punktprävalenz als Maßstab für die Eradikation einer Erkrankung ungeeignet, da sie keine Aussage über die Übertragungsereignisse zulässt, die die Basis für das Weiterbestehen einer Infektionskrankheit darstellt. Auch für die von der WHO festgelegte Prävalenzzahl von 1 pro 10 000 Personen gibt es keine wissenschaftliche Evidenz, inwiefern sie Einfluss auf die Weiterverbreitung der Lepra besitzt (Meima et al. 2004a). Hinzu kommt, dass die Prävalenz der Lepra als Mittelwert der Gesamtbevölkerung eines Land angegeben wird. Die clusterartige Verteilung der Krankheit wird somit außer Acht gelassen und eine realistische Einschätzung der Krankheitslast in einem Land ist aus dem WHO-Eradikationsziel nicht abzuleiten (Durrheim & Speare 2003). Aus dem gleichen Grund müssen kumulative CDRs für Ländergruppen, wie beispielsweise bei den WHO-Regionen oder gar weltweiten Betrachtungen, kritisch gesehen werden. Die CDR ist lediglich ein ungefähres Maß zum Vergleich von Ländern hinsichtlich der Rolle der Lepra als public-health-Problem. Wegen der ungleichmäßigen Verteilung der Leprafälle weltweit und der Berechnung der CDR anteilsmäßig an der Bevölkerung macht es einen großen Unterschied, ob Länder wie Indien (viele Fälle, große Bevölkerung) oder China (wenige Fälle, große Bevölkerung) in die Berechnungen mit einbezogen werden oder nicht (Meima et al. 2004a). Um dem Verteilungsmuster der Lepra gerecht zu werden und die epidemiologischen Daten für die Leprakontrolle nutzen zu können, sind detailliertere Daten nötig, wie beispielsweise der Anteil der Kinder an den Neuerkrankungen auf Gemeindeebene anstatt lediglich auf Landesebene.

Um die Übertragungsereignisse der Lepra zu vermindern, muss zunächst der Übertragungsmechanismus eindeutig geklärt sein um dann durch die Identifikation suszeptibler und exponierter Individuen eine gezielte Prophylaxe

durchzuführen. Die Forschung auf diesen Gebieten muss gefördert werden, was durch das WHO-Eradikationsprogramm leider erschwert wurde. In der öffentlichen Wahrnehmung hat die Verwendung des Wortes "Ausrottung" dazu geführt, die Lepra als eine Krankheit anzusehen, die im Verschwinden begriffen ist. Die negative Auswirkung davon war und ist, dass die Finanzierung von Lepraforschung und -kontrolle reduziert wurde (Burki 2009).

Im Gegensatz zu den fraglich aussagekräftigen WHO-Daten stehen gut verwertbaren Daten von großangelegten und aufwändigen epidemiologischen Untersuchungen des *Department of Public Health*, des *Erasmus Medical Centers* und des *University Medical Center Rotterdam* (Niederlande) (Meima et al. 2004a; Moet et al. 2008; Fischer et al. 2008; Fischer et al. 2010).

### **5.1.2 Daten zur Transmission**

Bei der Literaturrecherche zur Transmission der Lepra fiel sowohl in Lehrbüchern als auch in wissenschaftlichen Publikationen auf, dass nur selten eine unvoreingenommene Darstellung des aktuellen Stands der Wissenschaft vorliegt. Vielmehr wird häufig ausschließlich die vom Autor bevorzugte Transmissionshypothese, meist entweder Tröpfchen- oder Hautübertragung, als möglich dargestellt. Zur Übertragung der Lepra kann jedoch unter den aktuell vorliegenden Erkenntnissen noch keine abschließende Aussage getroffen werden. Es gibt momentan Evidenz für mehrere Transmissionsmechanismen und die Relevanz jedes Mechanismus für das globale Krankheitsgeschehen ist noch nicht untersucht worden. Prinzipiell ist festzuhalten, dass die Aufdeckung der Lepraübertragung eine komplexe wissenschaftliche Herausforderung darstellt und man dem in jeder Hinsicht außergewöhnlichen Erreger der Lepra nicht durch (zu) einfache Antworten gerecht werden kann. Das Bedürfnis nach Eindeutigkeit ist in der Wissenschaft allgegenwärtig, darf aber nicht dazu führen, dass durch einzelne neue Erkenntnisse, die für einen bestimmten Transmissionsmodus sprechen, die Evidenz für andere ebenfalls denkbare Übertragungsmöglichkeiten ausgeblendet werden. Ein komplexer Erreger benötigt vielmehr eine differenzierte Betrachtungsweise.

### 5.1.3 Daten zum Genom und Metabolismus

Im Gegensatz zu den z. T. nur mäßig nützlichen Daten zur Epidemiologie und Transmission der Lepra stehen die zahlreichen hervorragenden Publikationen zu Genom und Metabolismus von *M.leprae*. Die KEGG-Datenbank liefert eine sehr nützliche Veranschaulichung der Ergebnisse der Genomschlüsselung von *M.leprae* (Kyoto University Bioinformatics Center 2011). Zur Interpretation der Genomanalysen hinsichtlich der Stoffwechselleistung von *M.leprae* haben zahlreiche Wissenschaftler beigetragen, jedoch sind die Arbeiten von Wheeler und Mitarbeitern hervorzuheben (Wheeler 1983; Wheeler & Ratledge 1988b; Ratledge 1989; Wheeler et al. 1990) . Von ihnen wurden bereits Ende der 1980er Jahre durch die aufwändige Analyse von Enzymaktivitäten beispielsweise Einschränkungen der metabolischen Leistung im Kohlenhydratstoffwechsel festgestellt. Auf Basis dieser Erkenntnisse hat er detaillierte und aufschlussreiche Interpretationen der Genomanalysen verfasst (Wheeler 2003). Eine Übersicht der aktuellen Erkenntnisse von *M.leprae* stellt der umfangreiche Review von Scollard et al. dar (Scollard et al. 2006a).

## **5.2 DISKUSSION DER HYPOTHESE "TALGLIPIDE ALS WIRTSFAKTOR BEI DER HAUTÜBERTRAGUNG"**

### **5.2.1 Diskussion der Rolle von Lipiden für *M.leprae***

#### **5.2.1.1 Diskussion der Lipide im Metabolismus von *M.leprae***

Der Lipidmetabolismus nimmt eine zentrale Stellung im sonst defektbehafteten Stoffwechsel von *M.leprae* ein (s. 2.2.1). Insbesondere sind *M.leprae* einfache Kohlenstoffquellen als Energiequelle verloren gegangen. Glukose kann zwar weiterhin verstoffwechselt werden, zur Energiegewinnung bevorzugt *M.leprae* jedoch Fettsäuren (s. 2.2.4.3.2). *M.leprae* besitzt alle für Lipolyse und Betaoxidation nötigen Enzyme. Die große Anzahl homologer FadD-Gene lässt aber vermuten, dass freie Fettsäuren den veresterten vorgezogen werden. Überdies wird mithilfe des FadD-Genprodukts, der Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetase, die für Mykobakterien toxischen freien Fettsäuren entgiftet und für die Weiterverwendung zu Acyl-CoA aktiviert. Weiterhin ist FadD auch an der Polyketidsynthese beteiligt, was die enge Verbindung von Fettsäure-Verwertung und der Synthese der langkettigen Fettsäuren für die Zellwand verdeutlicht (s.2.2.4.3). Aus dem Lipidanteil des Leprabakteriums und der Verdopplungszeit lässt sich ableiten, dass *M.leprae* auf den Bezug externer Lipide angewiesen ist. Zwar ist *M.leprae* prinzipiell zur de-novo-Fettsäuresynthese in der Lage, bevorzugt, aber diese vom Wirt zu beziehen (s. 2.2.4.1). Dieses Wissen wird weiter untermauert durch neueste Erkenntnisse über die Bildung von Lipid Droplets in Schwanzzellen und die seit langem bekannten Virchow-Zellen, dem Pendant der Lipid Droplets auf kutaner Ebene. Lipid Droplet-Bildung ist ein Ausdruck massiver Beeinflussung des Lipidhaushaltes von *M.leprae*-infizierten Zellen zum Zweck, wirtsbezogene Lipide zu rekrutieren (s. 2.2.4.6). Ob *M.leprae* bestimmte Fettsäuren präferiert, ist bisher nicht bekannt. In Anbetracht der Tatsache, dass *M.leprae* auf Fettsäuren sowohl zur Energiegewinnung als auch zum Aufbau seiner Zellwand stark angewiesen ist, erscheint aber eine Spezialisierung auf die Verwendung nur bestimmter Fettsäuren wenig sinnvoll oder wahrscheinlich.

### **5.2.1.2 Diskussion des Einflusses von Lipiden auf die Epidemiologie**

Inwiefern Lipide auf die Lepraempfindlichkeit und die Epidemiologie Einfluss haben, lässt sich im Gegensatz zu der Beweisbarkeit metabolischer Fakten nur als Hypothese formulieren. Als Ursache für das Clustering von Leprafällen in Haushalten konnte gezeigt werden, dass je nach zugrundegelegter Lepraempfindlichkeit in der Bevölkerung, sowohl ein Haushaltsfaktor, als auch ein genetischer Faktor oder ein zufällig verteilter Suszeptibilitätsfaktor bzw. eine Kombination dieser Faktoren mit den vorliegenden Daten über die Epidemiologie der Lepra vereinbar wäre (s. 2.3.1.1). Als genetischer Faktor, der die Talglipidzusammensetzung beeinflusst, wären Enzymaktivitäten für die Squalen- bzw. Sapiensäuresynthese denkbar (vgl. 5.2.1.3). Die residente Keimflora der Haut könnte einen zufällig in der Bevölkerung verteilten Suszeptibilitätsfaktor darstellen, die für die Menge der im Talg vorkommenden freien Fettsäuren verantwortlich ist (s. 2.6.2). Ein weiterer epidemiologischer Parameter, der mit Talglipiden in Zusammenhang stehen könnte, ist die ungleiche Geschlechterverteilung bei Leprapatienten zugunsten der Männer. Da die Talgproduktion unter hormonellem Einfluss steht, erscheint es möglich, dass Männer aufgrund vermehrter Talgproduktion für Lepra suszeptibler sind als Frauen (s. 2.4.4.2). Der aus Inzidenzpeak und Inkubationszeit abgeleitete Infektionszeitpunkt während der Kindheit könnte in Zusammenhang mit dem überproportional hohen Anteil an freien Fettsäuren im kindlichen Talg stehen (s. 2.6.2.3).

### **5.2.1.3 Mögliche Rolle der Talglipide als Suszeptibilitätsfaktoren**

Die Hauptmanifestationsorte der Lepra sind die Schwannzellen und die Haut. Sowohl im Myelin der Schwannzellen als auch im Talg der Haut sind überdurchschnittlich viele Lipide verfügbar, was für *M.leprae* möglicherweise ein Grund für den präferentiellen Befall dieser beiden Gewebe darstellen könnte. Talgdrüsen kommen an jeder behaarten Hautstelle vor, wobei der Anteil der Talglipide an den Hautoberflächenlipiden in verschiedenen Körperregionen unterschiedlich ist. So ist der Talganteil an den Gliedmaßen geringer, aber immer noch im µg-Bereich, was für ein Bakterium ausreichend sein sollte. Was bevorzugte kutane Eintrittspforten betrifft, ist die Beschädigung der Hautbarriere

z.B. durch Verletzungen vermutlich von größerer Bedeutung (s. 2.5.2.2).

#### **5.2.1.3.1 Sapiensäuremenge als Suszeptibilitätsfaktor**

Wie unter 2.6.2.1 ausgeführt, ist es denkbar, dass die Menge der im Talg vorkommenden Sapiensäure Einfluss auf die Effizienz der nach einer Hautverletzung einsetzenden Immunantwort hat. Auch im Zustand der unverletzten Haut ist Sapiensäure an der Abwehr beteiligt. Sollte Sapiensäure bei einem Individuum nun in geringerem Maße in den Talglipiden vorkommen, ist es möglich, dass diese Person eine verminderte Abwehr gegen die Inokulation von Bakterien wie z.B. *M.leprae* aufweist. Die Ursache für ein vermindertes Vorliegen von Sapienat könnte eine verminderte Expression bzw. Folge eines Regulationsmechanismus sein und eine reduzierte Aktivität des Enzyms nach sich ziehen. Eine unserer Hypothesen ist also, dass das verminderte Vorliegen von Sapiensäure im Talg einen Wirtsfaktor für eine kutane Lepraerkrankung darstellt.

#### **5.2.1.3.2 Squalenmenge als Suszeptibilitätsfaktor**

Wie unter 2.6.2.2 ausgeführt, spielt Squalen eine Schlüsselrolle beim Umgang mit oxidativen Stress auf der Haut. Liegt ein Mangel an Squalen vor, z.B. in Folge mangelnder Aktivität der an der Produktion beteiligten Enzyme, können oxidative Schäden der vitalen Hautschichten auftreten und die Hautbarriere heruntergesetzt werden. Das würde im Bezug auf Lepraempfänglichkeit bedeuten, dass ein erhöhtes Risiko einer Lepraerkrankung gegeben wäre. Aufgrund der eben erläuterten schädlichen Oxidationsmetaboliten, die bei der Oxidation von Squalen entstehen, ist jedoch auch denkbar, dass beim Zusammentreffen einer übermäßigen Squalenproduktion und erhöhtem oxidativen Stress auf der Haut eine Schwächung der Hautbarriere erfolgt. In einer Studie zu der bakteriell verursachten Hauterkrankung Akne konnte nachgewiesen werden, dass Squalen bei Aknepatienten signifikant erhöht ist im Vergleich zur Kontrollgruppe und insgesamt auch einen größeren Anteil an den Gesamtlipiden des Talgs ausmachte (Pappas 2009). Eine über die Normalmenge hinaus gesteigerte Squalenproduktion könnte genetischen Ursprungs sein. Bedeutender oxidativer Stress auf der Haut tritt vor allem an

sonnenexponierten Hautregionen auf. Dass diese von Kleidung unbedeckten und eher peripher gelegenen Körperregionen auch Prädilektionsstellen für kutane Lepraläsionen sind, ist im Kapitel 2.4.3. beschrieben. Armut als entscheidender Risikofaktor für eine Lepraerkrankung geht mit schlechteren hygienischen Verhältnissen und somit auch mit einer verstärkten kutanen bakteriellen Besiedelung einher. Die Folge ist wiederum vermehrter oxidativer Stress auf der Haut. Die Personen, die das *Gros* der Lepra Neuerkrankungen darstellen, erfüllen somit die Voraussetzungen, dass eine erhöhte oder erniedrigte Squalenmenge in den Talglipiden einen Selektionsfaktor für die Empfänglichkeit von Lepra darstellt.

#### **5.2.1.3.3 Menge an freien Fettsäuren als Suszeptibilitätsfaktor**

Die Menge an freien Fettsäuren auf der Hautoberfläche variiert beträchtlich, da sie von der Lipase-Aktivität der in den Talgausführungsgängen und der Talgdrüse vorliegenden Bakterien abhängt, die sie aus Triglyzeriden freisetzen. Liegt nun ein Unterschied in der Menge oder der Aktivität dieser residenten Flora vor, hätte dies Auswirkungen auf den Anteil der freien Fettsäuren im Talg. Personen mit einem hohen Anteil frei vorliegender Fettsäuren könnten für eine Besiedelung und Infektion mit *M.leprae* prädestiniert sein. Ein solcher zufällig verteilter Suszeptibilitätsfaktor wäre mit den bekannten epidemiologischen Daten vereinbar (vgl. 5.2.1.2 und 2.6.2).

Wie unter 2.4.4.2 erläutert, ist der Infektionszeitpunkt mit *M.leprae* in der Kindheit anzusetzen. In der ersten Lebensdekade ist der Gehalt an freien Fettsäuren im Talg des Menschen am höchsten und die Gesamttalgproduktion am niedrigsten (Cotterill et al. 1972). *M.leprae* würde, gemäß unserer Hypothese, dass der Erreger freie Fettsäuren als Nahrung präferiert, auf der Haut von Kindern optimale Wachstumsbedingungen vorfinden. Überdies wäre aufgrund der geringen Talgproduktion die talgbedingte Hautbarriere noch nicht wirksam, was eine bakterielle Besiedelung in diesem Alter erleichtert. Kinder stellen durchschnittlich 10% der Neuerkrankten dar, in bestimmten Regionen zeitweise auch 15% (WHO 2002).

## 5.2.2 Diskussion der kutanen Transmissions-Hypothese

### 5.2.2.1 Infizierte Gewebe als Hinweis auf den Transmissionsmodus

Die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes und die Haut sind die am häufigsten befallenen Körperregionen. Die Haut ist als peripheres Gewebe prädestiniert, von *M.leprae* aufgrund seines niedrigen Temperaturoptimums befallen zu werden. Es ist bekannt, dass aus kutanen Lepraläsionen große Mengen an Erregern in die Umwelt abgegeben werden. Weiterhin dient die verletzte Haut als Inokulationsort für *M.leprae*. Inwiefern jedoch der Inokulationsort auch der Entstehungsort einer Lepraläsion ist, ist unbekannt. Der Nachweis von *M.leprae* in allen Hautschichten, von der Epidermis bis hin zu den Hautgefäßen, erklärt, wie *M.leprae* von der Schleim-/Hautoberfläche in den Blutkreislauf und von dort in weitere Gewebe gelangt (s. 2.5.2.2). Es besteht also die Möglichkeit, dass Hautläsionen erst sekundär nach einer hämatogenen Disseminierung des Erregers entstehen.

Die Transmissionshypothese der Tröpfcheninfektion wurde maßgeblich durch die Erkenntnis befördert, dass es in endemischen Gebieten einen beträchtlichen Anteil asymptomatischer Personen gibt, die *M.leprae*-DNA im Nasenostium tragen. Unter der Hypothese, dass *M.leprae* Talglipide vom Wirt bezieht und Talglipide die Leprasuszeptibilität beeinflussen, stellt der Naseneingang als kühle und talreiche Stelle des Körpers einen logischen Prädilektionsort für die Vermehrung des Erregers dar.

Wie *M.leprae* jedoch dorthin gekommen ist, über Exspiration oder über Autoschmierinfektion mittels Handberührung, ist nicht bekannt. Ebenso wenig ist bekannt, wohin *M.leprae* von diesem Ort aus streut. Außer wenig aussagekräftigen Infektionsversuche von immunsupprimierten Mäusen gibt es hier keine aufschlussreichen Untersuchungen. Neben einer Inhalation ist auch im Bereich des Nasenostiums eine Invasion der Haut vorstellbar. Das früh im Krankheitsgeschehen auftretende Symptom der nasalen Obstruktion lässt eine Beteiligung der Nasenschleimhaut bei der Inokulation und initialen Vermehrung des Erregers möglich erscheinen.

### **5.2.2.2 Extrakorporale Überlebensfähigkeit und Schmierinfektion**

Durch die nachgewiesenermaßen gute extrakorporale Überlebensfähigkeit muss eine Beteiligung der unbelebten Umwelt bei der Transmission der Erkrankung in Betracht gezogen werden (s. 2.1). MB-Patienten geben große Mengen an z.T. lebensfähigen *M.leprae* in die Umwelt ab. Inwiefern auch asymptomatische Träger an der Erregerfreisetzung beteiligt sind, ist noch nicht bekannt. *M.leprae* ist in der Lage nach der Freisetzung in unbelebter Umwelt, z.B. in Wohnräumen, zu überleben. Unter mangelnden hygienischen Verhältnissen (s. 5.2.2.2 und 5.2.2.3) ist vorstellbar, dass Personen des gleichen Haushaltes mit kontaminierten Haushaltsgegenständen, Kleidung oder Boden in Berührung kommen und dadurch zu *M.leprae* exponiert werden. Mangelhafte Körperhygiene könnte zu einer Persistenz des Erregers auf der Haut führen, der in Folge kleiner Hautverletzungen inokuliert werden könnten und bei empfänglichen Personen eine Lepreaerkrankung hervorrufen.

### **5.2.2.3 Der "Haushaltsfaktor" als Hinweis auf kutane Transmission**

Der seit langem bekannte und weltweit beobachtete Risikofaktor des langdauernden, engen Kontakts mit MB-Patienten wurde auf zugrundeliegende Faktoren geprüft. Dabei wurde herausgefunden, dass das Clustering von Leprafällen innerhalb von Haushalten auf häufigere Übertragungsereignisse und davon unabhängige Suszeptibilitätsfaktoren zurückgeführt werden kann. Trotz der sehr hohen Fallzahl von 20 000 konnte jedoch der für die heterogene Lepraempfindlichkeit verantwortliche Mechanismus in dieser Studie nicht eindeutig geklärt werden (Fischer et al. 2010) (vgl. 2.3.1.1). Als möglicher Haushaltsfaktor, der unabhängig von genetischen Determinanten auf alle Mitglieder eines Haushaltes wirkt, kommt Armut in Betracht. Armut wiederum ist ein mehrdimensionaler Einflussfaktor, geht aber nachgewiesenermaßen mit schlechter Körper- und Kleidungshygiene einher (s. 2.4.4.4). Auf der Haut oder in Kleidung vorhandene *M.leprae* würden somit nur unzureichend mittels Seife entfernt werden können. Bereits nach geringen kutanen Traumata könnten so *M.leprae* in die Haut inokuliert werden. Als kutane Traumata, die wiederum mit mangelhafter Körper-, Kleidungs- und Haushaltshygiene korrelieren, kommen entzündliche Hautveränderungen nach Stichen bzw. Bissen durch Flöhe,

Läuse, Wanzen, Mücken und Krätzmilben in Betracht.

Die Entwicklung der Lepra im Mittelalter könnte auch einen Hinweis auf die Relevanz schlechter Wohnbedingungen als Risikofaktor für eine Lepraerkrankung liefern. Die zunehmende Urbanisierung im 13. Jahrhundert koinzidiert mit einer hohen Anzahl von Lepraerkrankungen. Neben anderen Auswirkungen der Urbanisierung ist die Verschlechterung der Wohnverhältnisse auf sehr beengtem Raum eine der maßgeblichsten. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Verschlechterung der Wohnbedingungen und dem Anstieg der Lepraprävalenz - und inzidenz im Mittelalter ist somit denkbar. Der Haushaltsfaktor "Armut" könnte also auf verschiedenen Ebenen Einfluss auf eine kutane Transmission der Lepra haben.

## **5.3 DISKUSSION DER ENTWICKELTEN METHODE**

### **5.3.1 Grenzen der Methode**

#### **5.3.1.1 Gaschromatografische Fettsäure-Analyse**

Die entwickelte Methode basiert auf der gaschromatografischen Analyse von Fettsäuren. Je nach verwendeter Säule sind den Analysen hinsichtlich der detektierten und somit analysierbaren Fettsäuren Grenzen gesetzt. Die von uns zur FSME-Bestimmung eingesetzten Säulen OV1701 und FFAP sind in der Lage, Fettsäuren der Kettenlänge bis C26 zu bestimmen. Für die im Talg auftretenden Fettsäuren ist dieses Spektrum ausreichend (Pappas 2009). Weiterhin kann der Sättigungsgrad der Fettsäuren mittels Vergleich mit Standard-FSME-Mischungen bestimmt werden. Zur sicheren Identifikation von Sapiensäure (C16:1  $\Delta$ 6) dient der Vergleich mit dem entsprechenden Standard des Sapiensäure-Methylesters. Für die Detektion und die genaue Zuordnung von verzweigtkettigen Fettsäuren sind noch hochauflösendere Säulen bzw eine GC-MS-Kombination nötig (Nicolaidis & Apon 1977). Die Menge an verzweigtkettigen Fettsäuren im Talg ist jedoch zu vernachlässigen (Pappas 2009). *M.leprae* ist außerdem in der Lage, die für seine Zellwand benötigten verzweigtkettigen Fettsäuren selbst herzustellen, ist also nicht auf den Bezug dieser Fettsäuren vom Wirt angewiesen. Weiterhin erscheint es angesichts des reduktiven Genoms von *M.leprae* als sehr unwahrscheinlich, dass gerade verzweigtkettige Fettsäuren einen Wirtsfaktor darstellen.

#### **5.3.1.2 Gaschromatografische Squalen-Analyse**

Bei der Analyse von Squalen ist zu berücksichtigen, dass die Oxidations-Produkte von Squalen, wie z.B. Squalen-Monohydroperoxid oder Squalen-Epoxide, die unter entsprechendem oxidativen Stress auf der Haut entstehen, bei unserer Squalen-Analyse nicht erfasst werden. Die chemische Struktur dieser Verbindungen unterscheidet sich zu stark von Squalen als dass sie bei gaschromatografischer Analyse ein vergleichbares Ergebnis liefern würden. Die Menge dieser Oxidationsprodukte ist für die Fragestellung der geplanten

Pilotstudie jedoch noch nicht von Relevanz. Durch die standardisierte Probenentnahme erhält man vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der von einem Individuum in einer bestimmten Zeit produzierten Squalen-Menge. Treten hier nun signifikant unterschiedliche Ergebnisse zwischen Leprapatienten und dem gesunden Vergleichskollektiv auf, ist in einer Folgestudie die Ursache für das vermehrte oder verminderte Vorliegen von Squalen zu klären.

### **5.3.1.3 Sebumextraktion mit Sebutapes**

Die Sebutapes extrahieren lediglich Talg. Eine Aussage über die Stratum corneum-Lipide ist mit dieser Methode also nicht möglich. Zur Untersuchung der Stratum corneum-Lipide müsste die Entnahmetechnik des "Tape-Strippings" verwendet werden, bei der die oberflächlichen Schichten des Stratum corneums mit Tapes sukzessive abgetragen werden (Clarys & Barel 1995; Weerheim & Ponc 2001). Da sich die Zusammensetzung von Stratum corneum Lipiden z.T. von denen des Talgs unterscheidet, müsste auch eine geeignete chromatografische Trennung z.B. von Ceramiden etabliert werden.

### **5.3.2 Anwendung der Methode unter tropischen Bedingungen**

Die Probenentnahme mittels Sebutapes ist auch für den Einsatz unter tropischen Bedingungen geeignet. Zum einen werden die Talgproben so aufgearbeitet, dass durch ein einziges Sebutape alle gewünschten Werte erhalten werden. Zum anderen ist die Applikation der Sebutapes einfach und der Ablauf standardisierbar. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die entnehmende Person ist bei korrekter Anwendung des Entnahmeprotokolls ausgeschlossen. Prinzipiell kann die Probenentnahme wie unter 4.1.1.2 beschrieben, durchgeführt werden. Im Hinblick auf den Einsatz der Sebutapes unter tropischen Klimabedingungen ist die Vermeidung von Schweißbildung vor allem während der Entnahmezeit von größter Bedeutung, da sonst eine Haftung des Tapes auf der Haut nicht gewährleistet ist. Eine Klimatisierung oder ausreichend kühler Luftstrom mittels Ventilator in dem Raum, in dem die Probenentnahme stattfindet, ist unerlässlich. Der Verzicht auf morgendliche lipidhaltige Hautpflegeprodukte ist wünschenswert, kann jedoch durch eine konsequente Reinigung der Haut mit Isopropanol vor der Applikation der

Sebutapes relativiert werden. Makeup-Produkte müssen in jedem Falle soweit entfernt werden, dass das Zellulose Tuch nach der Entnahme keine Farbstoffe mehr aufweist. Den Probanden muss vermittelt werden, dass sie die Sebutapes nicht berühren, da sonst eine Verunreinigung mit den Hautlipiden der Finger stattfindet. Die Sebutapes sollten nach der Probenentnahme umgehend in ein geschlossenes Schraubkappenglas verbracht und mit CO<sub>2</sub> begast werden, um eine Oxidation v.a. der von ungesättigten freien Fettsäuren zu vermeiden. Eine Aufbewahrung bei -20 °C kann beim Transport während des Probenexports mit Trockeneis gewährleistet werden.

## **5.4 SCHLUSSFOLGERUNG AUS DEN ERGEBNISSEN DER LITERATURRECHERCHE UND DER ENTWICKELTEN METHODE**

### **5.4.1 Validierung der Methode**

Die von uns etablierte Methode zur Talganalyse muss noch validiert werden. Um zu prüfen, ob unsere Methode in der Lage ist, die aus der Literatur bekannten Werte zu reproduzieren, wäre ein Signifikanztest sinnvoll, der prüft ob beobachtete Abweichungen vom Richtwert zufällig oder systematisch sind. Dazu müssten verschiedene alternative Verteilungen, gegen die eine Absicherung stattfinden soll, definiert werden. Als Kollektiv für die Validierung der Methode würden sich dermatologisch gesunde Probanden gleicher Altersstufe eignen. Der von uns verwendete Frage- und Aufklärungsbogen kann als Vorlage dienen (s. Annex III).

### **5.4.2 Durchführung einer Fall-Kontroll-Studie**

#### **5.4.2.1 Die Kollektive**

Zur Untersuchung, ob die Zusammensetzung der Talglipide einen Einfluss auf die Lepraempfindlichkeit hat, erscheint eine Fall-Kontroll-Studie geeignet. Als Fälle kommen sowohl Neuerkrankte als auch bereits bekannte oder austherapierte Leprapatienten in Frage. Das Erkrankungsalter, die Dauer und der grobe Verlauf (z.B. MB oder PB, Rückfälle) der Erkrankung, ebenso wie die durchgeführte Therapie sollten dokumentiert werden. Es bieten sich überdies zwei Kontrollgruppen an. Als Kontrolle, mit einer dem gematchten Fall vergleichbaren Exposition zu *M.leprae*, bieten sich Mitglieder des gleichen Haushalts an, z.B. Geschwister. Bei dieser Kontrollgruppe (=Kontrollgruppe 1) sollte im Zweifelsfall die Art der Exposition vor dem Matching Vorrang haben. D.h. wenn ein 15-jähriges erkranktes Mädchen lediglich einen 25 jährigen Bruder hat, ist dieser eine bessere Kontrolle, als ein 15-jähriges Mädchen des Nachbarhaushalts. Die zweite Kontrollgruppe (= Kontrollgruppe 2) besteht aus zufällig gewählten, dermatologisch gesunden Personen der gleichen Region z.B. des Einzugsbereiches des Krankenhauses. Beide Kontrollgruppen sollten

hinsichtlich Geschlecht und Alter dem Fall entsprechen (= Matching). Sollte der Fall im Vergleich mit Kontrollgruppe 1 signifikante Unterschiede in der Menge von Squalen, Sapiensäure oder freier Fettsäuren im Talg aufweisen, könnte dies einen Hinweis auf einen möglichen mit der Lepraempfänglichkeit assoziierten Wirtsfaktor darstellen. Kontrollgruppe 2 dient der Erstellung eines Spektrums an Talglipidmustern und erlaubt eine Evaluierung der im Vergleich von Fall und Kontrollgruppe 1 gewonnenen Ergebnisse.

#### **5.4.2.2 Die Proben**

Es sollten vier Proben von jedem Patienten genommen werden. Dabei ist die mittige Anordnung auf der Stirn zu beachten um eine gleiche Talgausbeute zu gewährleisten. Die eine Hälfte der Stirn wird mit Isopropanol gereinigt (=Probe 1), die andere bleibt ungereinigt (=Probe 2). Im Vergleich beider Proben lässt sich eine Aussage über die eventuellen Auswirkungen der zufällig auf der Haut vorliegenden Lipide auf die Lepraempfänglichkeit treffen. Die doppelte Probengewinnung dient zum Ersatz beim Verlust einer Probe.

#### **5.4.2.3 Die beteiligten Strukturen**

Es bietet sich eine Kooperation des Missionsärztlichen Instituts Würzburg in Zusammenarbeit mit der Deutschen Lepra- und Tuberkulosehilfe DAHW, dem Biozentrum (TBI) der Universität Würzburg und einem indischen Institut an. In Indien ist die für die Studie benötigte Fallzahl an Leprapatienten und geeigneten Kontrollen gewährleistet. Überdies liegt eine vergleichsweise gute Dokumentation von Leprapatienten vor. Die Probenentnahme kann in Zusammenarbeit mit dem indischen Institut erfolgen. Die Probenaufbereitung und -analyse sollte aufgrund der Komplexität der gaschromatografischen Auswertung am Institut für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg, unter Leitung von Prof. Dr. Ernst Conzelmann erfolgen. Eine eventuell daraus resultierende Publikation würde im Namen der indisch-deutschen Kooperation erfolgen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Trotz weltweiter kostenlos zur Verfügung stehender MDT und Eradikationsbemühungen der WHO liegt die Leprainzidenz seit fünf Jahren bei etwa 250 000 Neuerkrankungen pro Jahr. Der massive Abfall der Prävalenz seit 1985 ist zum einen rechnerisch und durch die Art der Datenerhebung bedingt (s. 5.1.1), zum anderen lässt sie keine Rückschlüsse auf die Transmissionsereignisse, also die Aktivität der Krankheit zu. Dazu dient die Inzidenz, die nur unverhältnismäßig gesunken ist (s. 2.4.1). Für eine effektive Bekämpfung der Lepra muss jedoch eine Reduktion der Neuerkrankungen erreicht werden. Bekannt ist, dass nur ein Bruchteil der mit *M.leprae* exponierten Individuen eine manifeste Krankheit entwickelt. Die Suche nach Wirtsfaktoren für eine Lepraerkrankung ist für gezielte Präventions- und Prophylaxe-Maßnahmen, die Neuerkrankungen verhindern sollen, demnach von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse einer Literaturrecherche zum Thema "Talglipide als Wirtsfaktoren für *M.leprae*" präsentiert und eine Methode zur Talganalyse entwickelt.

Anhand wissenschaftlicher Publikationen wurde der aktuelle Stand der Forschung in den verschiedenen Bereichen dieser Hypothese reviewartig dargestellt. Der aktuelle Erkenntnisstand hinsichtlich der Lepraübertragung ist vereinbar mit mehreren Übertragungswegen, wobei die Tröpfchen- und die Hautübertragung favorisiert werden (s. 2.5.1). Die Interpretation der Genomanalysen von *M.leprae* hat in Kombination mit früheren biochemischen Erkenntnissen Aufschluss über die metabolischen Fähigkeiten von *M.leprae* gegeben. *M.leprae* besitzt ein reduktives "Minimalgenom", das sich an die intrazelluläre Nische, in der es lebt, außerordentlich adaptiert hat. Der Verlust wichtiger Kohlenstoffquellen und eine stark eingeschränkte Atmungskette stehen im Gegensatz zu den fast vollständig erhaltenen anabolen und katabolen Stoffwechselwegen der Lipide. Sowohl für die Zellwandsynthese als auch zur Energieproduktion ist *M.leprae* auf wirtsbezogene Lipide angewiesen. Freie Fettsäuren werden dabei veresterten Fettsäuren vorgezogen (s. 5.2.1.1). Epidemiologische Erkenntnisse stehen ebenfalls in Einklang mit unserer

Lipidhypothese. Als Ursache für das Clustering von Leprafällen in Haushalten kommen sowohl genetische als auch zufällig verteilte Faktoren sowie ein auf den gesamten Haushalt wirkender "Haushaltsfaktor" in Frage. Als genetischer Faktor, der die Talglipidzusammensetzung beeinflusst, wären Enzymaktivitäten für die Squalen- bzw. Sapiensäuresynthese denkbar (vgl. 5.2.1.3). Einen in der Bevölkerung zufällig verteilten Suszeptibilitätsfaktor könnte die residente Keimflora der Haut darstellen, die für die Menge der im Talg vorkommenden freien Fettsäuren verantwortlich ist (s. 5.2.1.2). Als möglicher Haushaltsfaktor kommt "Armut" in Betracht, der nachgewiesenermaßen mit schlechter Körper- und Kleidungshygiene einhergeht (s. 5.2.2.3). In Kombination mit einer vermutlich ebenfalls mit Armut assoziierten häufigeren kutanen Verletzung durch Parasiten und Mücken könnte dies eine kutane Schmierinfektion mit *M.leprae* begünstigen. Für eine Schmierinfektion über kontaminierte Gegenstände spricht auch die gute extrakorporale Überlebensfähigkeit des Erregers und der Nachweis von *M.leprae* in Bodenproben (s. 5.2.2.2). Die epidemiologischen Daten zu Geschlechterverhältnis und Infektionszeitpunkt lassen ebenfalls eine Rolle der Talglipide als Wirtsfaktoren für eine Lepraerkrankung vermuten (s. 5.2.1.2).

Auf Basis der Erkenntnis, dass Lipide und insbesondere Talglipide als Wirtsfaktoren für *M.leprae* in Betracht kommen, wurde zu diesbezüglich relevanten Talgkomponenten recherchiert. Als trophischer Wirtsfaktor kommen die individuell in unterschiedlichen Mengen vorliegenden freien Fettsäuren des Sebums in Betracht. Die Menge an Squalen und Sapiensäure im Talg hat nachgewiesenermaßen erheblichen Einfluss auf die Barrierefunktion der Haut gegen bakterielle Erreger (s. 5.2.1.3). Es wurde folglich eine auf Dünnschicht- und Gaschromatografie beruhende Methode zur Quantifizierung dieser Talgbestandteile entwickelt (s. 4.6). Die Probenentnahme erfolgt mittels Sebutape, was eine bewährte, reproduzierbare und auch unter tropischen Bedingungen leicht anwendbare Methode darstellt. Nach einer noch vorzunehmenden Validierung der Methode soll in Kooperation mit einem indischen Forschungsinstitut eine auf der von uns entwickelten Methode beruhende Fall-Kontroll-Studie an Lepraerkrankten durchgeführt werden. Dabei

soll die Talgzusammensetzung von Leprapatienten mit nach Alter und Geschlecht gematchten gesunden Individuen gleicher *M.leprae*-Exposition verglichen werden. Eine zweite Kontrollgruppe zufällig ausgewählter, ebenfalls gematchter Personen dient zur Evaluierung der im Vergleich von Fall- und Kontrollgruppe detektierter Unterschiede (s. 5.4.2).

## LITERATURVERZEICHNIS

- Abel, L. et al., 1998. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *The Journal of infectious diseases*, 177(1), S. 133-45.
- Ratledge, C., 1982b. *The Biology of the Mycobacteria*. Ratledge, C. (Hrsg.), San Diego: Academic Press-Verlag.
- Abulafia, D. et al., 1998-2000. *The New Cambridge Medieval History*. Abulafia, D., Allmand, C., Jones, M. (Hrsg.), Bd. 5-7, Cambridge: Cambridge University Press.
- Akama, T. et al., 2010. Whole-genome expression analysis of *Mycobacterium leprae* and its clinical application. *Japanese journal of infectious diseases*, 63(6), S. 387-92.
- Anon, 2008. Global leprosy situation. *Weekly Epidemiological Record*, 83, S. 293-300.
- Anon, 2009. Global leprosy situation. In *Weekly Epidemiological Record*, 84, S. 333-40.
- Bakker, M.I. et al., 2002. Epidemiology of leprosy on five isolated islands in the Flores Sea, Indonesia. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 7(9), S.780-87.
- Bakker, M.I. et al., 2005. Genetic, household and spatial clustering of leprosy on an island in Indonesia: a population-based study. *BMC medical genetics*, 6, S. 40.
- Banerjee, R. et al., 1991. Transmission of viable *Mycobacterium leprae* by *Aedes aegypti* from lepromatous leprosy patients to the skin of mice through interrupted feeding. *Leprosy review*, 62(1), S. 21-26.
- Baumgart, K.W. et al., 1993. Subclinical infection with *Mycobacterium leprae*--a problem for leprosy control strategies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), S. 412-15.
- Betz, M. & Fox, B.S., 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 146(1), S. 108-13.
- Billheimer, J.T. et al., 1983. Separation of steryl esters by reversed-phase liquid chromatography. *Journal Of Lipid Research*, 24, S. 1646-1651.
- Blackwell, J.M. et al., 2000. Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2(3), S. 317-21.
- Bochud, P.-Y. et al., 2003. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 170(7), S. 3451-54.
- Bozza, P.T. & Viola, J.P.B., 2010. Lipid droplets in inflammation and cancer.

- Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 82(4-6), S. 243-50.
- Bozza, P.T. et al., 2009. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(6), S. 540-51.
- Brandt, L. et al., 2004. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in M.tb-infected guinea pigs. *Infection and immunity*, 72(11), S. 6622-32.
- Braunstein, M. et al., 2003. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 48(2), S. 453-64.
- Brennan, P.J., 1984. *Mycobacterium leprae* — The outer lipoidal surface. *Journal of Biosciences*, 6(5), S. 685-689.
- Brennan, P.J. & Vissa, V.D., 2001. Genomic evidence for the retention of the essential mycobacterial cell wall in the otherwise defective *Mycobacterium leprae*. *Leprosy review*, 72(4), S. 415-28.
- Britton, W.J. & Lockwood, D.N.J., 2004. Leprosy. *Lancet*, 363(9416), S. 1209-19.
- Burki, T., 2009. Old problems still mar fight against ancient disease. *The Lancet*, 373(9660), S. 287-288.
- Buschman, E. & Skamene, E., 2004. Linkage of leprosy susceptibility to Parkinson's disease genes. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 72(2), S. 169-70.
- Chatterjee, K.R. et al., 1959. Electron microscopic observations on the morphology of *Mycobacterium leprae*. *Experimental cell research*, 18, S. 521-27.
- Camera, E. et al., 2010. Comprehensive analysis of the major lipid classes in sebum by rapid resolution high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Journal of lipid research*, 51(11), S. 3377-88.
- Chan, J. et al., 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), S. 2453-57.
- Clarys, P. & Barel, A., 1995. Quantitative evaluation of skin surface lipids. *Clinics in dermatology*, 13(4), S. 307-21.
- Cohen, J., 2010. *Infectious Diseases*. Cohen, J., Powderly, W. (Hrsg.), Edinburgh, New York: Mosby-Verlag.
- Cooper, M. F. et al., 1976. Sebaceous lipogenesis in human skin. Variability with age and with severity of acne. *The British journal of dermatology*, 94(2), S. 165-72.
- Cole, S.T., 1998. Comparative mycobacterial genomics. *Current opinion in microbiology*, 1(5), S. 567-71.

- Cole, S.T., 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409(6823), S. 1007-11.
- Coruh, G. & McDougall, A.C., 1979. Untreated lepromatous leprosy: histopathological findings in cutaneous blood vessels. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 47(3), S. 500-11.
- Cotterill, J.A. et al., 1972. Age and sex variation in skin surface lipid composition and sebum excretion rate. *The British journal of dermatology*, 87(4), S. 333-40.
- Couppié, P. et al., 2004. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with HIV and leprosy. *Archives of dermatology*, 140(8), S. 997-1000.
- Cree, I.A. & Smith, W.C., 1998. Leprosy transmission and mucosal immunity: towards eradication? *Leprosy review*, 69(2), S. 112-21.
- Cruz, D. et al., 2008. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *The Journal of clinical investigation*, 118(8), S. 2917-28.
- Daffé, M. & Draper, P., 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*, 39, S. 131-203.
- Dawes, S.S. & Mizrahi, V., 2001. DNA metabolism in *Mycobacterium leprae*. *Leprosy review*, 72(4), S. 408-14.
- De Luca, C. et al., 1996. Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible rôle in pityriasis versicolor. *Experimental dermatology*, 5(1), S. 49-56.
- De Luca, C. & Valacchi, G., 2010. Surface Lipids as Multifunctional Mediators of Skin Responses to Environmental Stimuli. *Mediators of Inflammation*, 2010.
- Desikan, K.V., 1977. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Leprosy review*, 48(4), S. 231-35.
- Desikan, K.V. & Sreevatsa, 1995. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Leprosy review*, 66(4), S. 287-95.
- Downing, D. T. et al., 1969. Variability in the chemical composition of human skin surface lipids. *The Journal of investigative dermatology*, 53(5), S. 322-27.
- Downing, D. T. et al., 1987. Skin lipids: an update. *The Journal of investigative dermatology*, 88(3 Suppl), 2s-6s.
- Drake, D. R. et al., 2008. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *Journal of lipid research*, 49(1), S. 4-11.
- Draper, P. et al., 1982. The mycolic acids of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected nine-banded armadillos. *Annales de microbiologie*, 133(1), S. 39-47.

- Drutz, D.J. et al., 1972. The continuous bacteremia of lepromatous leprosy. *The New England journal of medicine*, 287(4), S. 159-64.
- Duncan, M.E. et al., 1983. A clinical and immunological study of four babies of mothers with lepromatous leprosy, two of whom developed leprosy in infancy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 51(1), S. 7-17.
- Durrheim, D.N. & Speare, R., 2003. Global leprosy elimination: time to change more than the elimination target date. *Weekly Epidemiological Record*.
- Durrheim, D.N. et al., 2002. Leprosy in Mpumalanga Province, South Africa--eliminated or hidden? *Leprosy review*, 73(4), S. 326-33.
- D'Avila, H. et al., 2008. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International immunopharmacology*, 8(10), S. 1308-15.
- Eiglmeier, K. et al., 2001a. The decaying genome of *Mycobacterium leprae*. *Leprosy review*, 72(4), S. 387-98.
- Eiglmeier, K. et al., 2001b. The integrated genome map of *Mycobacterium leprae*. *Leprosy review*, 72(4), S. 462-69.
- Elias, P. M. & Feingold, K. R., 2001. Coordinate regulation of epidermal differentiation and barrier homeostasis. *Skin pharmacology and applied skin physiology*, 14 Suppl 1, S. 28–34.
- Feasey, N. et al., 2010. Neglected tropical diseases. *British medical bulletin*, 93, S. 179-200.
- Ferreira, F.R. et al., 2004. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAM1 promoter polymorphisms and the lepromin response. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 72(4), S. 457-67.
- Fine, P.E., 1992. Reflections on the elimination of leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 60(1), S. 71-80.
- Fine, P.E., 2001. BCG: the challenge continues. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 33(4), S. 243-45.
- Fine, P.E., 2007. Leprosy: what is being “eliminated”. *Bulletin of the World Health Organization*, 85, S. 2–4.
- Fischer, E. et al., 2008. The spatial distribution of leprosy in four villages in Bangladesh: an observational study. *BMC infectious diseases*, 8, S. 125.
- Fischer, E. et al., 2010. Different mechanisms for heterogeneity in leprosy susceptibility can explain disease clustering within households. *PloS one*, 5(11), S. 14061.
- Folch, J. et al., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*; 226, S. 497-509.
- Franzblau, S.G., 1988. Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an

- axenic medium. *Journal of clinical microbiology*, 26(1), S. 18-21.
- Ge, L. et al. 2003. Identification of the delta-6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity. *The Journal of investigative dermatology*, 120(5), S. 707–14.
- Gelber, R.H. et al., 2004. The relapse rate in MB leprosy patients treated with 2-years of WHO-MDT is not low. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 72(4), S. 493-500.
- Girdhar, B., 2005. Skin to skin transmission of leprosy. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 71(4), S. 223.
- Girdhar, B.K. et al., 2000. Relapses in multibacillary leprosy patients: effect of length of therapy. *Leprosy review*, 71(2), S. 144-53.
- Glickman, M.S. et al., 2000. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular cell*, 5(4), S. 717-27.
- Gruenheid, S. & Gros, P., 2000. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Current opinion in microbiology*, 3(1), S. 43-48.
- Haahti, E. & Horning, E. C., 1963. Isolation and characterization of saturated and unsaturated fatty acids and alcohols of human skin surface lipids. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 15, S. 73–78.
- Hashimoto, K. et al., 2002. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infection and immunity*, 70(9), S. 5167-76.
- Hatta, M. et al., 1995. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(4), S. 381-85.
- Hayes, C.E. et al., 2003. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 49(2), S. 277-300.
- Heine, H. & Lien, E., 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *International archives of allergy and immunology*, 130(3), S. 180-92.
- Hussain, T. et al., 2005. Seroprevalence of HIV infection among leprosy patients in Agra, India: trends and perspective. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 73(2), S. 93-99.
- ILEP, 2010a. ILEP Statistics Brazil. <http://www.ilep.org.uk/en/ilep-co-ordination/leprosy-around-the-world/south-america/brazil/basic-statistics/> [Besucht: 09.08.2011].
- ILEP, 2010b. ILEP Statistics India. [http://www.ilep.org.uk/ilep-co-](http://www.ilep.org.uk/ilep-co-ordination/leprosy-around-the-world/south-america/brazil/basic-statistics/)

ordination/leprosy-around-the-world/asia/india/basic-statistics/ [Besucht: 09.08.2011].

- Ishaque, M. & Sticht-Groh, V., 1994. Oxidation of sphingolipids by *Mycobacterium leprae*. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 62(3), S. 446-47.
- Jamet, P. & Ji, B., 1994. Relapse after long-term follow up of multibacillary patients treated by WHO multidrug regimen. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*, 62(4), S. 622.
- Job, C.K. et al., 1990. New findings on the mode of entry of *Mycobacterium leprae* in nude mice. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 58(4), S. 726-29.
- Job, C.K. et al., 1994. Transmission of leprosy in nude mice through thorn pricks. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 62(3), S. 395-98.
- Job, C.K. et al., 2008. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78(3), S. 518-21.
- Jopling, W.H., 1982. Clinical aspects of leprosy. *Tubercle*, 63(4), S. 295-305.
- Kang, T.J., Lee, S.B. & Chae, G.T., 2002. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine*, 20(2), S. 56-62.
- Kaplan, G. et al., 1983. The cutaneous infiltrates of leprosy. A transmission electron microscopy study. *The Journal of experimental medicine*, 158(4), S. 1145-59.
- Katoch, V.M., 1981. A report on the biochemical analysis of *Mycobacterium W*. *Leprosy in India*, 53(3), S. 385-89.
- Kaushal, D. et al., 2002. Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), S. 8330-35.
- Kelly, G. S., 1999. Squalene and its potential clinical uses. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 4(1), S. 29–36.
- Kerr-Pontes, L.R.S. et al., 2004. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. *International journal of epidemiology*, 33(2), S. 262-9.
- Kerr-Pontes, L.R.S. et al., 2006. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. *International journal of epidemiology*, 35(4), S. 994-1000.
- Kligman A.M. et al., 1986. Sebutape: A device for visualizing and measuring human sebaceous secretion. *J Sot Cosmet Chem*, (37), S. 369-74.
- Kohno, Y. et al., 1995. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and

- scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochimica et biophysica acta*, 1256(1), S. 52–56.
- Kotteeswaran, G. et al., 1980. Skin adnexa in leprosy and their role in the dissemination of *M.leprae*. *Leprosy in India*, 52(4), S. 475-81.
- Krutzik, S.R. et al., 2003. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature medicine*, 9(5), S. 525-32.
- Kurabachew, M. et al., 1998. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 36(5), S. 1352-56.
- Kyoto University Bioinformatics Center, 2011. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=mle&mapno=01100&mapscale=1.0&show\\_description=show](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=mle&mapno=01100&mapscale=1.0&show_description=show) [Besucht: 01.08.2011].
- Lang, W., 2010. Lepra. In *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Lang, W. (Hrsg.), Stuttgart: Thieme-Verlag.
- Lavana, M. et al., 2008. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 8(5), S. 627-31.
- Lawn, S.D. et al., 2003. Borderline tuberculoid leprosy: an immune reconstitution phenomenon in a human immunodeficiency virus-infected person. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(1), S. 5-6.
- Lee, S. H. et al., 2006. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei medical journal*, 47(3), S- 293–306.
- Leprosy Group WHO, 2009. Leprosy. In *Manson's tropical diseases*. Gordon, A.I.Z., Cook, C. (Hrsg) London: Saunders-Verlag, S. 1053-74.
- Levy, L., 1976. Studies in the mouse footpad technique for cultivation of *M.leprae*. *Leprosy Review*, 47, S. 103-106.
- Lockwood, D.N.J., 2002. Leprosy elimination-a virtual phenomenon or a reality? *BMJ (Clinical research ed.)*, 324(7352), S. 1516-18.
- Lockwood, D.N.J., 2004. Leprosy. In *Rook's textbook of dermatology*. Burns, D.A., Breathnach, S.M., Cox N. (Hrsg.), Oxford: Blackwell-Verlag.
- Lockwood, D.N.J., 2010. Leprosy. In *Oxford textbook of medicine*. Warrell, D. (Hrsg.), Oxford: Oxford University Press-Verlag, S. 836-48.
- Lucas, S., 1993. Human immunodeficiency virus and leprosy. *Leprosy review*, 64(2), S. 97-103.
- Madison, K. C. et al., 1998. Lamellar granule biogenesis: a role for ceramide glucosyltransferase, lysosomal enzyme transport, and the Golgi. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 3(2), S. 80–86.

- Makui, H. et al., 2000. Identification of the Escherichia coli K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular microbiology*, 35(5), S. 1065-78.
- Manchester, K., 1984. Tuberculosis and leprosy in antiquity: an interpretation. *Medical history*, 28(2), S. 162-73.
- Mandell, G.L., 2010. Leprosy. In *Principles and Practice of Infectious Disease*. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier.
- Manganelli, R. et al., 1999. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 31(2), S. 715-24.
- Manganelli, R. et al., 2002. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Molecular microbiology*, 45(2), S. 365-74.
- Marques, M.A.M. et al., 2008. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics*, 8(12), S. 2477-91.
- Martinez, T.S. et al., 2010. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.
- Mattos, K.A. et al., 2010. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Journal of leukocyte biology*, 87(3), S. 371-84.
- Mattos, K.A. et al., 2011. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cellular microbiology*, 13(2), S. 259-73.
- McDougall A.C. & Ulrich M.I., 1993. Dermatology in General Medicine. In *Mycobacterial Disease*. V. Fitzpatrick, A.K., Eisen A.Z., Wolff K., Freedberg I.M. (Hrsg.), New York: McGraw Hill-Verlag, S. 2395-2410.
- McDougall, A.C. et al., 1975. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. *The Journal of pathology*, 115(4), S. 215-26.
- McKinney, J.D. et al., 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406(6797), S. 735-38.
- McShane, H. et al., 2001. Enhanced immunogenicity of CD4(+) t-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infection and immunity*, 69(2), S. 681-86.
- Meima, A. et al., 2004a. Trends in leprosy case detection worldwide since 1985. *Leprosy review*, 75(1), S. 19-33.
- Meima, A. et al., 2004b. The future incidence of leprosy: a scenario analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), S. 373-80.
- Menon, G.K. et al., 1992. Lamellar body secretory response to barrier

- disruption. *The Journal of investigative dermatology*, 98(3), S. 279–89.
- Meyers, W.M., 2000. Leprosy. In G. T. Strickland, ed. *Hunter's Tropical Medicine*. Philadelphia [u.a.]: Saunders.
- Meyer, H.J. (Hrsg), 1888. *Meyer Konversations-Lexikon. Eine Enzyklopädie des allgemeinen Wissens*. Mannheim: Bibliographisches Institut.
- Minnikin, D.E. et al., 1985. Distribution of some mycobacterial waxes based on the phthiocerol family. *Journal of general microbiology*, 131(6), S. 1375-81.
- Mira, M.T. et al., 2003. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nature genetics*, 33(3), S. 412-15.
- Mira, M.T. et al., 2004. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*, 427(6975), S. 636-40.
- Modi, K. et al., 2003. Lepromatous leprosy in a heart transplant recipient. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(12), S. 1600-3.
- Moet, F.J. et al., 2006. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *The Journal of infectious diseases*, 193(3), S. 346-53.
- Moet, F.J. et al., 2008. The prevalence of previously undiagnosed leprosy in the general population of northwest bangladesh. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(2), S. 198.
- Mollenkopf, H.J. et al., 2004. Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. *Infection and immunity*, 72(11), S. 6471-79.
- Moran, N.A., 1996. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), S. 2873-78.
- Mueller, D.L., 2004. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nature immunology*, 5(9), S. 883-90.
- Ng, V. et al., 2000. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*, 103(3), S. 511-24.
- Nicolaidis, N., 1967. The monoene and other Wax alcohols of human skin surface lipid and their relation to the fatty acids of this lipid. *Lipids*, 2(3), S. 266–75.
- Nicolaidis, N., 1974. Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science (New York)*, 186(4158), S. 19–26.
- Nicolaidis, N. & Apon, J.M., 1977. The saturated methyl branched fatty acids of adult human skin surface lipid. *Biomedical mass spectrometry*, 4(6), S. 337-47.
- Nordstrom, K.M. et al., 1986. Measurement of sebum output using a lipid

- absorbent tape. *The Journal of investigative dermatology*, 87(2), S. 260-63.
- Ohsawa, K. et al., 1984. The possible role of squalene and its peroxide of the sebum in the occurrence of sunburn and protection from the damage caused by U.V. irradiation. *The Journal of toxicological sciences*, 9(2), S. 151–59.
- Onwueme, K.C. et al., 2005. The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Progress in lipid research*, 44(5), S. 259-302.
- Ottaviani, M. et al., 2006. Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: a possible role in acne vulgaris. *The Journal of investigative dermatology*, 126(11), S. 2430–37.
- Ottenhoff, T.H. & de Vries, R.R., 1987. HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 55(3), S. 521-34.
- Pappas, A., 2009. Epidermal surface lipids. *Dermato-endocrinology*, 1(2), S. 72-76.
- Pappas, A. et al., 2009. Sebum analysis of individuals with and without acne. *Dermato-endocrinology*, 1(3), S. 157-61.
- Peters, E.S. & Eshiet, A.L., 2002. Male-female (sex) differences in leprosy patients in south eastern Nigeria: females present late for diagnosis and treatment and have higher rates of deformity. *Leprosy review*, 73(3), S. 262-67.
- Picardo, M. et al., 1991a. Squalene peroxides may contribute to ultraviolet light-induced immunological effects. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 8(3), S. 105–10.
- Picardo, M. et al., 1991b. Role of skin surface lipids in UV-induced epidermal cell changes. *Archives of dermatological research*, 283(3), S.191–97.
- Porritt, R.J. & Olsen, R.E., 1947. Two Simultaneous Cases of Leprosy Developing in Tattoos. *The American journal of pathology*, 23(5), S. 805-17.
- Pönnighaus, J.M. et al., 1991. Is HIV infection a risk factor for leprosy? *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 59(2), S. 221-28.
- Quadri, L.E. et al., 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chemistry & biology*, 5(11), S. 631-45.
- Ranadive, K.J. et al., 1962. Studies of pathogenicity of the ICRC bacillus isolated from human lepromatous leprosy. *International journal of Leprosy*, 30, S. 442-56.
- Rajalingam, R. et al., 1997. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue antigens*, 49(2), S. 168-72.
- Raman, S. et al., 2001. The alternative sigma factor SigH regulates major

- components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 183(20), S. 6119-25.
- Rambukkana, A. et al., 1997. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- $\alpha$ 2 chain. *Cell*, 88(6), S. 811-21.
- Rambukkana, A. et al., 2002. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5569), S. 927-31.
- Ratledge, C., 1982a. Lipids: cell composition, fatty acid biosynthesis. In *The Biology of the Mycobacteria*. Ratledge, C. (Hrsg.), London: Academic Press-Verlag, S. 53-93.
- Ratledge, C., 1982b. *The Biology of the Mycobacteria*. Ratledge, C. (Hrsg.), San Diego: Academic Press-Verlag.
- Rees, R.J. & McDougall, A.C., 1977. Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. *Journal of medical microbiology*, 10(1), S. 63-68.
- Ridley, D.S. & Jopling, W.H., 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 34(3), S. 255-73.
- Robbins, G. et al., 2009. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PloS one*, 4(5), S. 5669.
- Rodrigues, L.C. & Lockwood, D.N.J., 2011. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *The Lancet infectious diseases*, 11(6), S. 464-70.
- Rook, G.A., 1988. The role of vitamin D in tuberculosis. *The American review of respiratory disease*, 138(4), S. 768-70.
- Roy, S. et al., 1997. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *The Journal of infectious diseases*, 176(2), S. 530-32.
- Roy, S. et al., 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *The Journal of infectious diseases*, 179(1), S. 187-91.
- Saint-Léger, D., 2003. Normal and pathologic sebaceous function. Research in a shallow milieu? *Pathologie-biologie*, 51(5), S. 275-78.
- Sakurai, I. & Skinsnes, O.K., 1970. Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 38(4), S. 389-403.
- Santos, A.R. et al., 2002. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *The Journal of infectious diseases*, 186(11), S. 1687-91.
- De Sarkar, A. et al., 2001. Impact of combined *Mycobacterium w* vaccine and 1 year of MDT on multibacillary leprosy patients. *International journal of*

- leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association, 69(3), S. 187-94.
- Schlesinger, L.S. & Horwitz, M.A., 1991. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 174(5), S. 1031-38.
- Schnappinger, D. et al., 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *The Journal of experimental medicine*, 198(5), S. 693-704.
- Scollard, D.M. et al., 2006a. The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), S. 338-81.
- Scollard, D.M. et al., 2006b. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(2), S. 19-22.
- Serjeantson, S.W., 1983. HLA and susceptibility to leprosy. *Immunological reviews*, 70, S. 89-112.
- Serup, J., 1991. Formation of oiliness and sebum output--comparison of a lipid-absorbant and occlusive-tape method with photometry. *Clinical and experimental dermatology*, 16(4), S. 258-63.
- Siddiqui, M.R. et al., 2001. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nature genetics*, 27(4), S. 439-41.
- Skamene, E. et al., 1982. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature*, 297(5866), S. 506-9.
- Skinsnes, O.K., 1964. The immunopathologic spectrum of leprosy. In R. G. D. and T. F. Cochrane, ed. *Leprosy in theory and practice*. Bristol: John Wright and Sons, S. 152-82.
- Smith, K. R. & Thiboutot, D. M., 2008. Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *Journal of lipid research*, 49(2), S. 271-81.
- Smith, R. N. et al., 2008. The effect of a low glycemic load diet on acne vulgaris and the fatty acid composition of skin surface triglycerides. *Journal of dermatological science*, 50(1), S. 41-52.
- Stewart, M.E. & Downing, D.T., 1981. Separation of wax esters from steryl esters by chromatography on magnesium hydroxide. *Lipids*, 16(5), S. 355-59.
- Stewart, M.E. et al., 1992. Sebaceous gland activity and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in boys and girls. *Archives of dermatology*, 128(10), S. 1345-48.
- Sticht-Groh, V. et al., 1995. An unusual spreading phenomenon in an artificial medium inoculated with *M. leprae*. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy*

- Association, 63(1), S. 100-1.
- Stone, A.C. et al., 2009. Tuberculosis and leprosy in perspective. *American journal of physical anthropology*, 140 Suppl , S. 66-94.
- Thiele, J. J. et al., 1999. Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *The Journal of investigative dermatology*, 113(6), S. 1006–10.
- Trivedi, O.A. et al., 2004. Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature*, 428(6981), S. 441-45.
- Truman, R.W. & Krahenbuhl, J.L., 2001. Viable *M.leprae* as a research reagent. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 69(1), S. 1-12.
- Truman, R.W. et al., 2011. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *The New England journal of medicine*, 364(17), S. 1626-33.
- Vachula, M. et al., 1990. Effect of Mycobacterium leprae's phenolic glycolipid-I on interferon-gamma augmentation of monocyte oxidative responses. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*, 58(2), S. 342-46.
- Van der Meer-Janssen, Y.P.M. et al., 2010. Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Progress in lipid research*, 49(1), S. 1-26.
- Virchow, R., 1863. *Die krankhaften Geschwülste*, Berlin: Hirschwald.
- Vissa, V.D. & Brennan, P.J., 2001. The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set. *Genome biology*, 2(8), S. 1023.
- De Voss, J.J. et al., 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *Journal of bacteriology*, 181(15), S. 4443-51.
- WHO, 2000. Global leprosy situation. In *Weekly Epidemiological Record*. S. 75: 226-31. <http://www.who.int/wer> [Besucht: 03.04.2011]
- WHO, 2002. Leprosy. Global situation. *Weekly Epidemiological Record*, 77, S. 1–8. <http://www.who.int/wer> [Besucht: 03.04.2011]
- WHO, 2006. Global leprosy situation. In *Weekly Epidemiological Record*, 81, S. 309–16. <http://www.who.int/wer> [Besucht: 03.04.2011]
- WHO, 2010. Global leprosy situation. In *Weekly epidemiological record*, S. 337-348. <http://www.who.int/wer> [Besucht: 02.07.2011]
- WHO Expert Committee on Leprosy, 1998. WHO Technical Report Series no. 847., 7th report. [archives.who.int/tbs/rational/h2988e.pdf](http://archives.who.int/tbs/rational/h2988e.pdf) [Besucht: 03.07.2011]
- Weerheim, A. & Ponec, M., 2001. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Archives of dermatological research*, 293(4), S. 191-99.
- Wenk, M.R., 2006. Lipidomics of host-pathogen interactions. *FEBS letters*, 580(23), S. 5541-51.

- Wheeler, P.R., 1983. Catabolic pathways for glucose, glycerol and 6-phosphogluconate in *Mycobacterium leprae* grown in armadillo tissues. *Journal of general microbiology*, 129(5), S. 1481-95.
- Wheeler, P.R., 1989. Biosynthetic pathways in *Mycobacterium leprae*. *Acta leprologica*, 7 Suppl 1, S. 21-24.
- Wheeler, P.R., 2003. Leprosy – clues about the biochemistry of *Mycobacterium leprae* and its host-dependency from the genome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(1), S. 1-16.
- Wheeler, P.R. & Ratledge, C., 1988. Use of carbon sources for lipid biosynthesis in *Mycobacterium leprae*: a comparison with other pathogenic mycobacteria. *Journal of general microbiology*, 134(8), S. 2111-21.
- Wheeler, P.R. & Ratledge, C., 1994. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. Bloom, B.R. (Hrsg.), Washington DC: American Society of Microbiology-Press
- Wheeler, P.R. et al., 1990. Enzymes for biosynthesis de novo and elongation of fatty acids in mycobacteria grown in host cells: is *Mycobacterium leprae* competent in fatty acid biosynthesis? *Journal of general microbiology*, 136(1), S. 211-17.
- Wiker, H.G. & Harboe, M., 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological reviews*, 56(4), S. 648-61.
- Wikimedia, 2010. Neufälle Lepra 2003.  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neufälle\\_Lepra\\_2003..PNG?uselang=de](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neufälle_Lepra_2003..PNG?uselang=de) [Besucht: 02.07.2011]
- Wikipedia, 2010. Phthiocerole.  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Phthiocerole>. [Besucht: 04.04.2011]
- Wikipedia, 2011a. Cholesterinester.  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Cholesterinester> [Besucht: 03.05.2011]
- Wikipedia, 2011b. Glyoxylatzyklus.  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Glyoxylatzyklus> [Besucht: 02.07.2011]
- Wikipedia, 2011c. Mycolic acid.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Mycolic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Mycolic_acid) [Besucht: 04.04.2011]
- Williams, D.L. et al., 2004. Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 8(1), S. 58-72.
- Wittmann, S. et al., 2004. Catecholates and mixed catecholate hydroxamates as artificial siderophores for mycobacteria. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 17(1), S. 53-64.
- Wolff, K. et al., 2009. Leprosy. In *Fitzpatrick's color atlas and synopsis of clinical dermatology*. Wolff, K. (Hrsg.), New York: McGraw-Hill-Verlag, S. 665-70.
- World Health Assembly, 1991. World Health Assembly resolution 1991.

- <http://www.who.int/lep/strategy/wha/en/index.html> [Besucht: 03.06.2011]
- Worobec, S.M., 2009. Treatment of leprosy/Hansen's disease in the early 21st century. *Dermatologic therapy*, 22(6), S. 518-37.
- Yamamoto, Y., 2001. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of dermatological science*, 27 Suppl 1, S. 1–4.
- Zaheer, S.A. et al., 1993. Combined multidrug and Mycobacterium w vaccine therapy in patients with multibacillary leprosy. *The Journal of infectious diseases*, 167(2), S. 401-10.
- Zehmer, J.K. et al., 2009. A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics*, 9(4), S. 914-21.
- Zhang, Y. et al., 2000. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), S. 13354-59.
- Zouboulis, C.C. et al., 2008. Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Experimental dermatology*, 17(6), S. 542–51.

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Klassifikationen der Lepra.....	4
Tabelle 2: Atmungskette: Genomsequenzen und Enzyme .....	14
Tabelle 3: Fettsäure-Biosynthese: Genomsequenzen und Enzyme.....	19
Tabelle 4: Fettsäure-Abbau: Genomsequenzen und Enzyme.....	21

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Funktionelle Einteilung der Gene von <i>M.leprae</i> .....	9
Abbildung 2: Kohlenhydratstoffwechsel von <i>M.leprae</i> .....	11
Abbildung 3: Atmungskette: Komplexe und beteiligte Enzyme.....	13
Abbildung 4: Fettsäure-Biosynthese.....	18
Abbildung 5: Fettsäure-Abbau.....	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Glyoxylatzyklus.....	24
Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Zellwand und Kapsel von <i>M.leprae</i> ...	27
Abbildung 8: Beispiel für eine Alpha-Mykolsäure.....	28
Abbildung 9: PGL-1.....	28
Abbildung 10: Beispiel für ein Phthiocerol.....	30
Abbildung 11: Beispiel für ein Mycocerosat.....	30
Abbildung 12: Zweistufiges Modell genetischer Einflussfaktoren auf die menschliche Immunität gegen <i>M.leprae</i> .....	37
Abbildung 13: Lepra-CDR und -Prävalenz in Indien und Brasilien.....	47
Abbildung 14: Lepra-CDR weltweit.....	48
Abbildung 15: Lepra-CDR weltweit 2003.....	50
Abbildung 16: Entwicklung der ANCDR seit 2003.....	51
Abbildung 17: Entwicklung der ANCDR in Indien 2006-2010.....	52
Abbildung 18: Entwicklung der ANCDR in Brasilien 2006-2010.....	52
Abbildung 19: Anzahl der englischen Leprakrankenhäuser von 1050-1550....	53
Abbildung 20: Anzahl der Lepraerkrankten in Norwegen von 1855 bis 1935...	54
Abbildung 21: Relative Talgzusammensetzung.....	64
Abbildung 22: Repräsentative Strukturformeln von Talglipiden.....	65
Abbildung 23: Chemische Strukturformeln von Squalen und Beiprodukten....	69
Abbildung 24: Sebutape.....	72
Abbildung 25: DC des Sebutapeextrakts.....	75
Abbildung 26: DC des Sebutapeextrakts nach Folch-Verteilung.....	76
Abbildung 27: Abtrennung der Tapesubstanzen von der Talgprobe mittels SC 78	
Abbildung 28: GC-Analyse von 95%igem und 99%igem Diethylether.....	81
Abbildung 29: DC des Produkts der Cholesteryl-Heptadekanoat-Synthese....	86
Abbildung 30: GC-Analyse von Squalen und Hexacosan.....	87
Abbildung 31: Strukturformeln von Cholesterin und Ergosterol.....	88
Abbildung 32: GC-Analyse von Cholesterin- und Ergosterol-TMS-Ether.....	89
Abbildung 33: GC-Analyse zur Squalen-Bestimmung einer Talgprobe.....	91
Abbildung 34: DC von Talgproben mit Laufmittel HEA und CMW.....	92
Abbildung 35: DC von Talgprobe und Standards mit Laufmittel HEA.....	93
Abbildung 36: Beispiel für Cholesterinester und Wachsester.....	94
Abbildung 37: DC der HPLC-Fractionen zur WE und CE-Trennung.....	96
Abbildung 38: Laufmittel zur Trennung von Wachs- und Cholesterinestern....	97
Abbildung 39: DC von Talgprobe und Standards.....	97
Abbildung 40: GC-Analyse einer Talgprobe zur Quantifizierung der Sapiensäure in den Gesamtfettsäuren.....	101
Abbildung 41: Identifikation von Fettsäuren in der Talgprobe am Beispiel der Sapiensäure.....	101
Abbildung 42: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 41.....	102

Abbildung 43: Berechnung und Ergebnisse einer Squalen-Bestimmung von acht Talgproben verschiedener Probanden.....	103
Abbildung 44: GC-Analyse einer Talgprobe zur Quantifizierung der Sapiensäure in den Gesamtfettsäuren.....	104
Abbildung 45: GC-Analyse der Kontrolle (zu Abb. 44).....	105
Abbildung 46: GC-Analyse einer Talgprobe zur Quantifizierung der freien Fettsäuren.....	106
Abbildung 47: GC-Analyse der Kontrolle (zu Abb. 46).....	106
Abbildung 48: Säulendiagramm zur Quantifizierung der freien Fettsäuren.....	107
Abbildung 49: Überblick über das Analyseverfahren zur Quantifizierung von Sapiensäure, Squalen und freien Fettsäuren in Talgproben.....	112

## ANNEX I: CHEMIKALIEN

- Aldrich: Hexacosan, Oxalylchlorid
- Alfa Aesar: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, Ergosterol Hydrat, Hexadecanol
- Applichem: Chloroform 95%, Diethylether 95%, Hexan 95%, Methanol 95%
- Braun: Aqua ad iniectabilia
- Cuderm Corporation (Texas, USA): Sebutapes
- Fluka: Acetylchlorid, Distearin
- Fresenius: Ampuwa
- Merck: Ammoniumacetat, Chlorameisensäureethylester, Chloroform 99%, Cholesteryl-Oleat, Dekahydronaphthalin, Dichlormethan, Diethylether 99%, Essigsäure, 1% Cer-IV-Sulfat, Hexan 99%, Kieselgel, Methanol 99%, 2,5% Molybdätophosphorsäure, Ölsäure, Propanol, 6% konz. Schwefelsäure, Tetrahydronaphthalin, Toluol, Triethylamin, Trilinolein
- Riedel de Haen: Essigsäureethylester
- Serva: DEAE-52-Cellulose
- Sigma: Cholesterin, Heptadecansäure, Magnesiumhydroxid, Primulin
- Sigma-Aldrich: Dichlorethan
- Tyczka Industrie-Gase: Argon, Stickstoff
- VWR: Acetonitril

## **ANNEX II: GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN**

- Dünnschichtchromatographie (DC)-Platten: 20cm x 20cm, TLC Silica Gel 60:
- Färbelösung: 2,5% Molybdätdiphosphorsäure, 1% Cer-IV-Sulfat, 6% konz. Schwefelsäure, 90,5% Wasser
- Gaschromatograph mit Flammen Ionisations Detektor (GC-FID): Trägergas: N<sub>2</sub>; Säulenkopf-Druck: 80kPa; 5890A Hewlett Packard
  - SE 30 Säule: 25m, 0,32mm Innendurchmesser; CS Chromatographie Service
  - FFAP Säule: 25m, 0,32mm Innendurchmesser; CS Chromatographie Service
  - OV 1701 Säule: 30m, 0,32mm Innendurchmesser; Macherey-Nagel
- Glaswolle: Filterwatte extrafein, Hecht
- High Pressure Liquid Chromatography (HPLC): Waters 600
- Schraubgläser: Pyrex; Schott
- Schraubkappengläser: Pyrex
- Spitzgläschen: Wheaton
- UV-Lampe: VL-4LC
- Verdampfer: Reacti-Therm Pierce, Ikamag RCT
- Vortex: Bender und Hobein
- Zentrifuge: Hettich Rotanta/RPC

# ANNEX III: PROBANDENBOGEN TALGPROBENENTNAHME



**Missionsärztliche Klinik**

Gemeinnützige Gesellschaft mbH  
Akademisches Lehrkrankenhaus der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Tropenmedizin  
Chefarzt Priv.-Doz. Dr. med. August Stich

Telefon: 0931/791-2821  
Telefax: 0931/791-2826  
E-Mail: tropenteam@missioklinik.de  
Internet: www.missioklinik.de

## Teilnahmebogen Talgprobenentnahme

Vorname	
Name	
Geburtsdatum	
Geschlecht	
Bei Frauen: 1. Tag der letzten Regel	
Email	
Telefon	

Leiden Sie an einer manifesten chronischen Hauterkrankung wie z.B. Atopische Dermatitis (Neurodermitis), Seborrhoisches Ekzem, Akne vulgaris ?	<input type="radio"/> ja <input type="radio"/> nein
Haben Sie innerhalb der letzten drei Jahre an einer akuten Hauterkrankung gelitten wie z.B. Pyodermie, Pityriasis versicolor (Kleieflechte) ?	<input type="radio"/> ja <input type="radio"/> nein

Ich bin mit der Entnahme einer Talgprobe mittels Sebutape einverstanden. Meine Teilnahme an der Talgprobenentnahme geschieht aus freien Stücken. Ich habe keine weiteren Fragen.

Datum: \_\_\_\_\_

Unterschrift: \_\_\_\_\_

Priv.-Doz. Dr. August Stich  
(Projektleiter)  
Missionsärztliche Klinik  
Salvatorstr. 7  
97074 Würzburg  
Tel. 0931 / 791 - 2821  
Email: august.stich@uni-wuerzburg.de

Prof. Dr. Ernst Conzelmann  
Theodor-Boveri-Institut für  
Biowissenschaften  
Biozentrum  
Am Hubland  
97074 Würzburg  
Tel. 0931 / 31 - 84118

Carolin Philipp  
(Doktorandin)  
Friedenstraße 3  
97072 Würzburg  
Tel: 0176 60 85 63 50  
Email: leprosyresearch@gmail.com



## **Danksagung**

Zahlreiche Menschen haben durch ihre fachliche und menschliche Unterstützung einen wertvollen Beitrag zum Entstehen dieser Dissertation geleistet.

Für die sehr hilfreichen und genauen Korrekturen meiner Doktorarbeit darf ich mich bei den Herren Prof. Dr. med. Stich, Prof. emerit. Dr. med. Fleischer und Prof. Dr. Conzelmann bedanken.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. A. Stich bedanken. Trotz seiner zahlreichen Verpflichtungen und Ämter hat er sich stets Zeit genommen für die umfassende Betreuung während der Entstehung meiner Doktorarbeit. Immer konnte ich mich auf seine freundliche und unkomplizierte Unterstützung verlassen. Von Beginn an durfte ich mich auch auf die außergewöhnliche menschliche und inhaltliche Unterstützung von Herrn Prof. emerit. Dr. med. Fleischer verlassen. Er hat die Realisierung der Dissertation sowohl inhaltlich als auch durch die Vermittlung wertvoller Kontakte maßgeblich mitgetragen.

Herrn Prof. Dr. Conzelmann gilt mein ganz besonderer Dank! Ohne seinen permanenten Einsatz wäre der praktische Teil meiner Dissertation so nicht zustande gekommen. Seine kollegiale Anleitung bei der Laborarbeit habe ich ebenso geschätzt wie den fruchtbaren fachlichen Austausch.

Für die großzügige Unterstützung und den freundlichen Austausch möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Hein-Rothenbücher, stellvertretend für das Missionsärztliche Institut Würzburg, und Herrn Kömm, stellvertretend für das DAHW, bedanken.

Eine unersetzliche Hilfe bei der Literaturrecherche war mir Frau Sieglinde Mauder vom Missionsärztlichen Institut. Vielen Dank hierfür!

Bei Dr. med. Joseph Kawuma möchte ich mich für das aufschlussreiche Gespräch über seine persönlichen Erfahrungen als Mitglied des Leprosy Boards der WHO bedanken.

Meinen Eltern bin ich für ihre vielfältige praktische und menschliche Unterstützung bei der Entstehung meiner Dissertation sehr dankbar!

Als kompetenter Helfer in der Not erwies sich mein langjähriger Freund Daniel Zimmermann, der mir über die Hürden bei der Formatierung meiner Dissertation zuverlässig hinweghalf.



# Lebenslauf

## Personalien

Name: Carolin Philipp  
Geburtsort: Erlangen  
Geburtstag: 20.04.1986  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: Ledig

## Schulbildung

1992 - 1996 Meusssdoerffer Volksschule, Kulmbach  
1996 - 2005 Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasium, Kulmbach  
2005 Abitur

## Studium

2005 - 2007 Medizinstudium (Vorklinik), Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen  
Juli 2007 1. Ärztliche Prüfung (Physikum)  
2007 - 2009 Medizinstudium (Klinik), Universität Hamburg  
2009 - 2010 Medizinstudium, Université Pierre-et-Marie-Curie Paris, Frankreich  
(Erasmus-Stipendium)  
2011 Anfertigung der Dissertation (Julius-Maximilians-Universität  
zu Würzburg) und Mitarbeit im Missionsärztlichen Institut  
2012 Praktisches Jahr:  
Anästhesie: Fundación Jiménez Díaz, Spanien (Erasmus-Stipendium)  
Chirurgie: Hôpitaux Universitaires de Genève, Schweiz  
Innere Medizin: Inselspital Bern, Schweiz  
April 2013 2. Ärztliche Prüfung