

# **Die Bedeutung Pathogen-assoziiertes Moleküle bei der Induktion epithelialer antimikrobieller Proteine und proinflammatorischer Zytokine**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Lars Schwichtenberg

Kiel

Mai 2003

Refrent/in: .....  
Korreferent/in: .....  
Tag der mündlichen Prüfung: .....  
Zum Druck genehmigt: Kiel,den .....

-----  
Der Dekan

## Abkürzungsverzeichnis

3-oxo-C12-HSL	(N-[3-oxododecanoyl]-L-Homoserinlaktone
$\alpha$	alpha
A	Absorption
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AP	antimikrobielle Proteine
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Basenpaare
C4-HSL	N-butyryl-Homoserinlaktone
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CMC	“critical micelle concentration”
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i>
FCS	„Fetal calf serum“ = fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GSP	genspezifische Primer
Std.	Stunden
hBD	humanes $\beta$ -Defensin
HCl	Salzsäure
HPLC	“High performance liquid chromatography”
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase

---

kb / kbp	Kilobasen bzw. Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo-Dalton (Molekularmasse)
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Region
M	molar (mol/l)
mbar	Millibar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	„messenger RNA“
Neutrophile	neutrophile Granulozyten
NCTC	National Collection of Type Cultures
NF	“nuclear factor”
OD	optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
PAM	“pathogen associated molecule”
PBS	“phosphat buffered saline“ = Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMN	polymorphonukleäre Zellen
PZ	proinflammatorische Zytokine
RL	Rhamnolipid
RANTES	“regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted” = CCL5
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SAP	Skin derived antimicrobial peptide
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermis</i>	<i>Streptococcus epidermis</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

TAE	Tris-Acetat-EDTA
Temp.	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TSB	Trypticase-Soy Broth
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumen pro Volumen
WGA	“wheat germ agglutinin”
(w/v)	Gewicht pro Volumen

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1 Die physikalische Barriere	8
1.2 Das chemische Abwehrsystem	8
1.3 Induzierbare Erreger-spezifische antimikrobielle Proteine (AP)	11
1.4 Die Defensine des Menschen – Induzierbarkeit und Wirkungsspektrum	13
1.5 Weitere epitheliale antimikrobielle Proteine des Menschen	14
1.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – ein Induktor der humanen $\beta$ -Defensine	16
1.7 Die Interaktion zwischen <i>P. aeruginosa</i> und humanen Epithelzellen	19
1.8 Ziel der Arbeit	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1 Chemikalien	21
2.2 Oligonukleotide	22
2.3 Enzyme	23
2.4 Nährmedien für Bakterienkulturen	24
2.5 Zellkulturmedium und Zusätze	25
2.6 Bakterienkulturen	26
2.7 Verbrauchsmaterial	27
2.8 HPLC-Anlagen	27
2.9 Geräte	29

---

<b>2.10</b>	<b>Kultivierung eukaryotischer Zellen</b>	<b>29</b>
2.10.1	HaCaT - Zelllinie	29
2.10.2	Isolierung und Kultur primärer humaner Keratinozyten	30
2.10.3	Subbkultivierung der Zellen	30
2.10.4	Einfrieren und Auftauen von adhären wachsenden Zellen	31
2.10.5	Stimulation der Zellen	31
<b>2.11</b>	<b>Anzucht und Aufarbeitung der Bakterienkulturen</b>	<b>32</b>
2.11.1	Nachweis der Ausbildung der adhären Form der Bakterien durch einen „Enzym-Linked Lectinsorbent Assay“ (ELLA)	32
2.11.2	Stimulation der Epithelzellen mit Bakterien	33
2.11.3	Kultivierung der Bakterien zur präparativen Herstellung von Kulturüberständen	34
2.11.4	Einkonzentrierung der Bakterienkulturüberstände	35
2.11.5	Acetonitril- und Säure-Behandlung bakterieller Kulturüberstände	35
2.11.6	Analyse der Kulturüberstände unter Verwendung verschiedener Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Systeme	36
2.11.6.1	Größenausschlußchromatographie	36
2.11.6.2	Anionenaustauschchromatographie	36
2.11.6.3	Reversed Phase Chromatographie	37
<b>2.12</b>	<b>Semiquantitative RT-PCR</b>	<b>39</b>
2.12.1	RNA-Isolierung	39
2.12.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.12.3	Reverse Transkription von RNA (cDNA- Synthese)	40
2.12.4	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
<b>2.13</b>	<b>Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Kultivierungsbedingungen beeinflussen die Morphologie von <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zur Induktion von Abwehrfunktionen epithelialer Zellen durch Mikroorganismen</b>	<b>46</b>
3.2.1	Die Induktion epithelialer antimikrobieller Proteine (AP) und proinflammatorischer Zytokine (PZ) in Keratinozyten durch Gram-negative Bakterien ist abhängig von deren Kultivierungsbedingungen	46

---

3.2.2	Die Induktion von AP und PZ durch Gram-positive Bakterien ist abhängig von deren Kulturbedingungen	59
3.2.3	Biochemische Charakterisierung der AP- und PZ-Induktoren aus <i>P. aeruginosa</i> -Kulturüberständen	61
3.2.3.1	AP-Induktoren von <i>P. aeruginosa</i> besitzen Molekularmassen von mehr als 30 kD und weniger als 3 kD	61
3.2.3.2	Größenausschlußchromatographie	62
3.2.3.3	AP-induzierende Faktoren binden an Anionenaustauscher	64
3.2.3.4	HBD-2- und IL-8-Induktoren aus <i>P. aeruginosa</i> -Kulturüberständen werden durch Acetonitril präzipitiert	71
3.2.3.5	Reversed-Phase Chromatographie	77
3.2.3.6	Mutationen im <i>rhl</i> -Quorum-Sensing-System von <i>P. aeruginosa</i> führen zu einer fehlenden Synthese AP- und PZ-induzierender Faktoren	79
3.2.4	Hinweise auf Inhibitoren der Expression von AP in bakteriellen Kulturüberständen	80
3.2.4.1	Kulturüberstände von <i>P. aeruginosa</i> enthalten einen Inhibitor der AP-Induktion in Keratinozyten	81
3.2.4.2	<i>E. coli</i> produziert Inhibitoren der AP-Expression in Keratinozyten	84
3.2.4.3	Untersuchungen zur Kinetik der Produktion AP-induzierender und inhibierender Faktoren durch <i>P. aeruginosa</i>	87
<b>3.3</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>89</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Morphologie von Bakterien</b>	<b>91</b>
4.1.1	Die Kultivierung von <i>P. aeruginosa</i> unter Stressbedingungen führt zur Ausbildung des mukoiden Phänotyps	92
4.1.2	Die Kultivierung unter Stressbedingungen führt zur Ausbildung von adhärennten Formen durch <i>P. aeruginosa</i>	94
<b>4.2</b>	<b>Die Charakterisierung Keratinozyten-aktivierender Pathogen-assoziiierter Moleküle (PAMs)</b>	<b>98</b>
4.2.1	Mukoide, adhärennte <i>P. aeruginosa</i> weisen eine gesteigerte Synthese AP- und PZ-induzierender PAMs auf	98



---

4.2.2	Das Quorum-Sensing-System reguliert die Synthese der AP- und PZ-Induktoren in <i>P. aeruginosa</i>	101
4.2.3	Die Bedeutung der Expression von <i>rpoS</i> und <i>mucA</i> für die Synthese AP- bzw. PZ- induzierender PAMs durch <i>P. aeruginosa</i>	107
4.2.4	Die molekulare Analyse der induzierenden PAMs - Rhamnolipide als Amplifikatoren der Induktion von AP in Keratinozyten	109
4.2.5	Die zelluläre Erkennung AP- und PZ-induzierender PAMs	112
<b>4.3</b>	<b>Die bakterielle Synthese von Induktionsinhibitoren für AP</b>	<b>114</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>117</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>138</b>
	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>139</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>142</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die physikalische Barriere

Die Körperoberfläche vielzelliger Organismen ist als äußerste Barriere permanent einer Vielzahl potentiell schädlicher Umweltfaktoren ausgesetzt, zu denen eine große Anzahl verschiedenster Mikroorganismen zählen. Trotz dieser Tatsache kommt es nur relativ selten zu einer Infektion der Epithelien durch pathogene Mikroorganismen, wie Pilze, Viren und Bakterien (Fitzpatrick et al., 1993). Die Ursache für diese natürliche Resistenz der Körperepithelien ist bis jetzt noch wenig verstanden.

Eine wichtige Rolle in der epithelialen Abwehr pathogener Mikroorganismen kommt einer intakten physikalischen Barriere zu. Die Desquamation (durch das Stratum corneum) und die Schleimabsonderung (durch die Mukosa der Haut) führen zu einer ständigen Erneuerung der epithelialen Oberflächen und damit zu einer Eliminierung der mikrobiellen Besiedlung. Weitere Faktoren, die zur natürlichen Integrität der Epithelien und insbesondere der Haut beitragen, sind z.B. ein relativ niedriger pH-Wert („Säureschutzmantel“) und eine „Lipidbarriere“ aus langkettigen Fettsäuren. In verschiedenen Studien wurde jedoch nachgewiesen, dass die Bedeutung dieser Faktoren überschätzt wurde (Weinberg und Swartz, 1993).

Es müssen demnach weitere Mechanismen vorhanden sein, die die Integrität der Epithelien gewährleisten, da die physikalische Barriere allein keinen ausreichenden Schutz gegen mikrobielle Erreger bietet.

## 1.2 Das chemische Abwehrsystem

Neben der epithelialen physikalischen Barriere besitzen Wirbeltiere ein hocheffizientes System zur Abwehr von Infektionen, das auf dem Zusammenspiel mehrerer spezialisierter Effektorzellen basiert. Dazu gehören z.B. neutrophile Granulozyten (Abwehr von Bakterien und Pilzen), eosinophile Granulozyten (Abwehr von Parasiten), Natürliche Killerzellen (erkennen virusinfizierte Zellen), Makrophagen und Antikörper-produzierende Zellen sowie T-Lymphozyten. Neutrophile

Granulozyten und Phagozyten, die normalerweise im Blut zirkulieren, werden durch Botenstoffe (z.B. Chemokine) veranlasst, in entzündete Epithelien zu wandern. Diese Effektorzellen befinden sich also normalerweise nicht in den Epithelien und können daher für die natürliche Resistenz der Epithelien gegen ständig drohende bakterielle Infektionen primär nicht verantwortlich sein.

Neuere Studien zeigen, dass Epithelien wie die menschliche Haut neben ihren Funktionen als physikalische Barrieren und den beschriebenen zellulären Abwehrmaßnahmen auch eine „chemische Barriere“ als Abwehrsystem besitzen, die zur Erhaltung der natürlichen Integrität beiträgt (Boman, 2000).

Bereits 1922 konnte Alexander Fleming in menschlichem Nasensekret eine antimikrobielle Aktivität nachweisen, die später als Lysozym identifiziert wurde. Dieses Protein ist in der Lage, in seiner Eigenschaft als Muramidase die Zellwand von Bakterien zu zerstören. Lange Zeit gerieten die Erkenntnisse Flemings in Vergessenheit, aber zahlreiche Studien der letzten Jahre belegen die Bedeutung eines chemischen Abwehrsystems für den Erhalt der Integrität der Epithelien. Es zeigte sich insbesondere, dass antimikrobiell wirksamen Proteinen als phylogenetisch alten Effektormolekülen eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunität („innate immunity“) der Epithelien zukommen könnte (Schröder, 1999).

Dies lässt sich anhand der Evertebraten verdeutlichen, denen im Gegensatz zu den Vertebraten ein effektives System adaptiver Komponenten zur Abwehr von Mikroorganismen fehlt. Wirbellose verfügen nicht über die bereits erwähnten Effektorzellen (z.B. Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten) sowie T-Lymphozyten und Antikörper-produzierende B-Zellen. Sie besitzen jedoch ein effizientes chemisches Abwehrsystem, welches unter anderem auf der Synthese antimikrobiell wirksamer Proteine basiert. In Tabelle 1.1 sind exemplarisch antimikrobielle Proteine von Vertretern verschiedener Tierstämme der Evertebraten aufgelistet. Neben den antimikrobiellen Proteinen werden auch zahlreiche weitere Substanzklassen wie Diterpene, Sesquiterpene und Macrolide, die ebenfalls antibakterielle, -fungale und sogar -virale Aktivität besitzen, von Evertebraten synthetisiert (Übersicht z.B. in Mayer und Lehmann, 2000). Die epitheliale Expression dieser verschiedenen antimikrobiell wirksamen Moleküle fungiert somit als eine Art „chemischer Schutzschild“ des Organismus gegen mikrobielle Infektionen.

<u>Stamm</u>	<u>Organismus</u>	<u>Antimikrobielle Proteine</u>	<u>Antimikrobielles Spektrum</u>		
			<u>Gram+</u>	<u>Gram-</u>	<u>Pilze</u>
<b>Porifera</b>	<i>Discodermia kiiensis</i>	Discodermin A <sup>1</sup>	+	+	-
	<i>Jaspis species</i>	Jasplakinolide <sup>2</sup>	-	-	+
<b>Coelenterata</b>	<i>Actinia equina</i>	Equinatoxin <sup>3</sup>	+	+	-
<b>Annelida</b>	<i>Lumbricus rubellus</i>	Lumbricin I <sup>4</sup>	+	+	-
<b>Arthropoda</b>					
<b>Chelicerata</b>	<i>Lycosa carolinensis</i>	Lycotoxine I + II <sup>5</sup>	-	+	+
<b>Crustacea</b>	<i>Carcinus maenas</i>	Kathelicidin-Ähnlich <sup>6</sup>	+	+	-
	<i>Penaeus vannamei</i>	Penaeidine <sup>7</sup>	+	+	-
<b>Insecta</b>	<i>Hyalophora cecropia</i>	Cecropin <sup>8</sup>	-	+	-
	<i>Bombyx mori</i>	Moricin <sup>9</sup>	+	+	-
<b>Mollusca</b>	<i>Mytilus edulis</i>	Defensine <sup>10</sup>	+	+	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	Mytilin, Myticin und Mytimycin <sup>11</sup>	+	+	-
<b>Tunicata</b>	<i>Styela clava</i>	Styelin A + B <sup>12</sup> (Cecropin-ähnlich) Clavanine A – D <sup>13</sup> (Magainin-ähnlich)	+	+	-
	<i>Halocynthia aurantium</i>	Dicynthaurin <sup>14</sup>	+	+	-

Tabelle 1.1: Antimikrobiell wirksame Substanzen verschiedener Vertreter der Evertebraten und ihr Wirkungsspektrum. <sup>1</sup>Matsunaga et al., 1985; <sup>2</sup>Scott et al., 1988; <sup>3</sup>Pungercar et al., 1997; <sup>4</sup>Cho et al., 1998; <sup>5</sup>Yan und Adams, 1998; <sup>6</sup>Schnapp et al., 1996; <sup>7</sup>Destoumieux et al., 1997; <sup>8</sup>Steiner et al., 1981; <sup>9</sup>Hara und Yamakawa, 1995; <sup>10</sup>Charlet et al., 1996; <sup>11</sup>Mitta et al., 1999; <sup>12</sup>Lee et al., 1997; <sup>13</sup>Lee et al., 1997; <sup>14</sup>Lee et al., 2001. Übersicht bei Zasloff (2002) und in Mayer und Lehmann (2000).

Auch Vertebraten verfügen über diesen epithelialen chemischen Schutzschild (Schröder, 1999). So beobachteten M. Zasloff und Mitarbeiter 1987, dass Frösche, die nach einer Entnahme der Oozyten in ihr natürliches Habitat zurückgesetzt wurden, trotz der frischen, nur notdürftig und unsteril versorgten Wunden, keine nennenswerten Infektionen aufwiesen (Zasloff, 1987). Er spekulierte, dass die

Schleimhaut der Frösche antimikrobielle Proteine produziert und konnte schließlich Peptide aus den Schleimdrüsen isolieren, die er Magainine nannte (nach hebräisch: Schutzschild). Nachfolgend wurde eine Vielzahl an antimikrobiellen Proteinen, beispielsweise Aesculetine und Gaegurine, aus der Schleimhaut verschiedener Froscharten isoliert (Übersicht in Barra und Simmaco, 1995). Diese Proteine besitzen die Eigenschaft, Gram-negative und Gram-positive Bakterien sowie Pilze bereits in geringen Konzentrationen äußerst effektiv abzutöten. Neueste Studien konnten ein in seiner Funktion, nicht aber in der Struktur ähnliches Protein auch in der Haut des Menschen nachweisen („Dermcidin“), welches in Schweißdrüsen synthetisiert wird. Die antimikrobiell aktive Form dieses Peptids wurde schließlich im menschlichen Schweiß gefunden (Schittek et al., 2001).

Auch von Keratinozyten der menschlichen Haut konstitutiv exprimierte antimikrobielle Proteine (AP) wurden bereits nachgewiesen. Neben den Befunden von Chen et al. (1986), die zeigten, dass Lysozym in der Epidermis menschlicher Haut exprimiert wird, wurde auch die sekretorische Phospholipase A2 (Qu und Lehrer, 1998) mit Wirkung gegen Gram-positive Bakterien (Schadow et al., 2001) sowie die antimikrobiell wirksame Antileukoprotease ALP (ein Proteaseinhibitor), auch bezeichnet als „Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, SLPI“, nachgewiesen (Wingens et al., 1998; Wiedow et al., 1998).

### **1.3 Induzierbare Erreger-spezifische antimikrobielle Proteine (AP)**

Bereits 1981 zeigten Untersuchungen der Arbeitsgruppe von H. Boman, dass eine Synthese antimikrobieller Proteine (AP) nicht nur konstitutiv erfolgt. So führte eine Injektion von Bakterien bei der Seidenraupe *Hyalophora cecropia* zu einer Induktion der Synthese antimikrobieller Proteine (sog. Cecropine; Steiner et al., 1981). Untersuchungen an der Taufliege *Drosophila melanogaster* deuteten schließlich darauf hin, dass diese Induktion von AP offenbar Erreger-spezifisch erfolgt. Je nach Art der mikrobiellen Infektion wird also die Expression spezifischer AP mit unterschiedlichen Wirkungsspektren induziert.

Dem entsprechend konnten Fehlbaum et al. (1994) zeigen, dass bei einer Infektion von *Drosophila melanogaster* durch verschiedene Klassen von Mikroorganismen jeweils spezifische AP exprimiert werden. Bei einer systemischen Infektion der

Taufliege mit Pilzen wurde nur das antimykotische Protein Drosomycin durch Zellen des Fettkörpers (einem funktionellen Analogon der Leber bei Vertebraten) synthetisiert. Eine bakterielle Infektion führte hingegen zu einer Induktion von Drosocin (bei Gram-negativen Bakterien) bzw. Defensin (bei Gram-positiven Bakterien) (Lemaitre et al., 1997). Die Synthese der AP wird dabei allein durch den Kontakt mit den Mikroorganismen bzw. mit deren sezernierten Produkten in den Zellen induziert. Zudem konnten durch Versuche an einer *Drosophila*-Mutante mit defektem Toll-Rezeptor, der indirekt der Erkennung von Hefen dient, gezeigt werden, dass diese Taufliegen nach systemischer Pilzapplikation starben (Imler und Hoffmann, 2000).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* bestätigten, dass das Immunsystem der Taufliege in der Lage ist, zwischen verschiedenen Mikroorganismen, wie z.B. Pilzen und Gram-negativen Bakterien, zu unterscheiden. Sie verdeutlichen zudem, dass eine selektive systemische Induktion von verschiedenen AP, an der Toll-Rezeptoren beteiligt sind, erfolgt

Kürzlich konnte unter Verwendung von transgenen GFP-Reporter-Taufliegen gezeigt werden, dass eine Induktion von AP nicht nur systemisch in Zellen des Fettkörpers sondern auch gewebsspezifisch in den unterschiedlichen Epithelien nachzuweisen ist (Tzou et al., 2000; Ferrandon et al., 1998). Dabei zeigte sich, dass die Drosomycin-Induktion in den Epithelzellen nicht über die Toll-Rezeptoren (Ferrandon et al., 1998) sondern über das „Immunodeficiency (imd)“ Genprodukt (Georgel et al., 2001) vermittelt wurde. Dieses Protein könnte eine entscheidende Funktion als Adaptorprotein der Signalwege bei antibakterieller Abwehr der Epithelien besitzen (Lemaitre et al., 1995).

Untersuchungen an Epithelien der Luftröhre von Rindern führten schließlich zur Isolierung des ersten induzierbaren AP in Säugetieren, dem „trachealen antimikrobiellen Peptid“ (TAP; Diamond et al., 1991). Dieses Molekül wird aufgrund seiner sechs durch intramolekulare Disulfidbrücken verbundenen Cysteine der Klasse der sogenannten  $\beta$ -Defensine zugeordnet (Lehrer et al., 1993). Diese kleinen (3-5 kDa), kationischen Peptide sind in der Lage, Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Mykobakterien sowie einige Viren und Pilze abzutöten. Der genaue Wirkungsmechanismus der Defensine ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist aber wahrscheinlich, dass die kationischen Defensine in einer ersten Phase mit negativ geladenen Komponenten der Zellwand der Mikroorganismen elektrostatisch

interagieren (Wimley et al., 1994). Schließlich kommt es durch Oligomerisierung und Einlagerung der Moleküle in die Membran der Mikroorganismen zur Bildung von Poren und damit zur Lyse der Zelle (Ganz und Lehrer, 1998).

Ein weiteres Defensin wurde 1995 aus Rinderzungen isoliert (Schonwetter et al., 1995). Dieses als LAP („lingual antimicrobial peptide“) bezeichnete AP wird primär in Zellen der Zungenepithelien exprimiert. LAP könnte eine Ursache dafür sein, dass die Zunge der Rinder trotz auftretender Verletzungen beim Äsen scharfkantiger Gräser nur selten mit Mikroorganismen infiziert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch primäre Zytokine und Bakterien eine Induktion von TAP bzw. LAP in entzündeter Haut von Rindern erfolgt (Stolzenberg et al., 1997). Untersuchungen zum Mechanismus dieser Induktion ergaben, dass LPS antimikrobielle Proteine induziert und dass dieser Prozeß über NF-kappaB vermittelt wird (Diamond et al., 2000).

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass in Zellen der Epithelien des Ileums und des Kolons von Rindern das „enteric beta-defensin“ (EBD) exprimiert wird. Die Expression der mRNA dieses AP scheint ebenfalls durch Bakterien induziert zu werden. Untersuchungen zum Mechanismus der Induktion ergaben, dass bakterielles L-Isoleucin und verschiedene Analoga als Stimuli fungieren könnten (Fehlbaum et al., 2000).

Auch andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Expression verschiedener AP durch Mikroorganismen aber auch durch proinflammatorische Stimuli induziert werden kann. Diese induzierbaren AP sind deshalb in erhöhten Konzentrationen in entzündeten und infizierten Epithelien zu finden und werden von gesunden Epithelien kaum produziert (Übersicht bei Gallo und Huttner, 1998 und Schröder, 1999).

## **1.4 Die Defensine des Menschen – Induzierbarkeit und Wirkungsspektrum**

Im Menschen wurden die ersten Defensine bereits in den 80er Jahren in neutrophilen Granulozyten entdeckt und als  $\alpha$ -Defensine HNP 1-3 (humane neutrophile Peptide 1-3) (Selsted et al., 1985) bzw. HNP-4 (Wilde et al., 1989) bezeichnet. 1995 gelang es, aus dem Blutplasma des Menschen das humane Beta-

Defensin 1 (hBD-1) zu isolieren (Bensch et al., 1995). Dieses AP ist im Blut in nanomolaren Konzentrationen nachweisbar. Es ist im Gegensatz zum LAP bzw. TAP der Rinder nicht durch inflammatorische Stimuli und Bakterien induzierbar (Zhao et al., 1996) und gehört damit (wie Lysozym) zu den konstitutiv exprimierten AP.

1997 konnte in unserer Arbeitsgruppe als humanes Äquivalent zum bovinen TAP das erste induzierbare humane AP aus läsionalen Hautschuppen identifiziert und aufgereinigt werden (Harder et al., 1997). Dieses AP wurde als humanes Beta-Defensin-2 (hBD-2) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass hBD-2 besonders nach Kontakt mit Gram-negativen Bakterien und proinflammatorischen Stimuli in Epithelzellen gebildet wird. Die Expression von hBD-2 mRNA wurde mittlerweile auch in kultivierten Epithelzellen der Bronchien, der Lunge, der Nase, des Magens und des Darmes nachgewiesen (Schröder und Harder, 1999). hBD-2 zeigt eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und vor allem *Pseudomonas aeruginosa*, jedoch keine Aktivität gegen den Gram-positiven Erreger *Staphylococcus aureus*. Im Folgenden konnten weitere induzierbare AP wie z.B. hBD-3 in Keratinozyten (antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive wie Gram-negative Erreger, (Harder et al., 2001) bzw. hBD-4 in Lungenepithelzellen identifiziert werden (Garcia et al., 2001).

## 1.5 Weitere epitheliale antimikrobielle Proteine des Menschen

Neben der Identifizierung der humanen Defensine gelang es, weitere antimikrobiell aktive Proteine in der Haut des Menschen nachzuweisen. Zu der Gruppe der Cathelicidine wird das offensichtlich induzierbare AP LL-37 gezählt (Frohm et al., 1997). Dieses Peptid stellt ein C-terminales Fragment einer antimikrobiell nicht-aktiven Prä-Pro-Form des sog. „hCAP-18“ dar, welches in großen Mengen aus neutrophilen Granulozyten isoliert werden konnte. Scheinbar wird es jedoch auch in Keratinozyten bei entzündlichen Läsionen exprimiert (Frohm et al., 1996). LL-37 scheint eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Gruppe A Streptokokken zu spielen (Nizet et al., 2001), da *in-vivo* eine Deletion des murinen Äquivalents zu LL-37/CAP-18 zu einer ausgeprägteren und länger persistierenden Infektion als beim Wildtyp führte.



1998 konnten mit den RNasen ECP und EDN, die eine hohe antibakterielle und antivirale Aktivität besitzen, auch in eosinophilen Granulozyten antimikrobiell aktive Proteine nachgewiesen werden (Domachowske et al., 1998) In unserer Arbeitsgruppe gelang es daraufhin aus Stratum corneum hautgesunder Probanden eine antimikrobiell aktive RNase zu isolieren (RNase-7; Harder und Schröder, 2002). Es zeigte sich, dass RNase-7 mRNA in Keratinozyten und respiratorischen Epithelien exprimiert wird, so dass auch dieses Protein zur epithelialen antimikrobiellen Abwehr beiträgt.

Humane Keratinozyten exprimieren Proteaseinhibitoren, die humane Proteasen wie z.B. Elastase inhibieren und somit einer Gewebsschädigung durch körpereigene Proteasen (z.B. aus neutrophilen Granulozyten) vorbeugen könnten. Dabei wurde für die Serinprotease-Inhibitoren Elafin (Wiedow et al., 1990) und Antileukoprotease (Wiedow et al., 1998) auch eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. Zudem wird Elafin in Keratinozyten durch Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* induziert (Nils Wichmann, persönliche Mitteilung).

Laufende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe führten zur Identifizierung von Psoriasin, einem Protein mit präferentiell antimikrobieller Wirkung gegenüber *E. coli* (LD<sub>90</sub>: 0,5 µM). Im Gegensatz zu den β-Defensinen scheint dieses Molekül Bakterien jedoch nicht durch Membran-Perforationen abzutöten, sondern wirkt durch Depletion von Zn<sup>2+</sup>-Ionen, die essentiell für das Überleben der Bakterien erscheinen. Zudem scheinen erste eigene Untersuchungen darauf hinzuweisen, dass die Expression von Psoriasin in Keratinozyten durch Bakterien induzierbar ist.

Diese Befunde lassen vermuten, dass die Haut und andere Epithelien des Menschen den Insekten ähnliche Abwehrmechanismen besitzen, wobei sich konstitutiv exprimierte AP und Erreger-spezifische, induzierbare Proteine zu einer komplexen angeborenen Abwehrstrategie ergänzen.

Die Identifizierung von Erreger-spezifisch wirksamen AP kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass diese Moleküle vielleicht auch spezifisch durch die jeweiligen Mikroorganismen wie z.B. *P. aeruginosa* induziert werden könnten.

## 1.6 *Pseudomonas aeruginosa* – ein Induktor der humanen $\beta$ -Defensine

Pseudomonaden gehören zu den widerstandsfähigsten und opportunistischen Bakterien. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften ermöglicht den Bakterien ein Überleben in nahezu jedem Habitat.

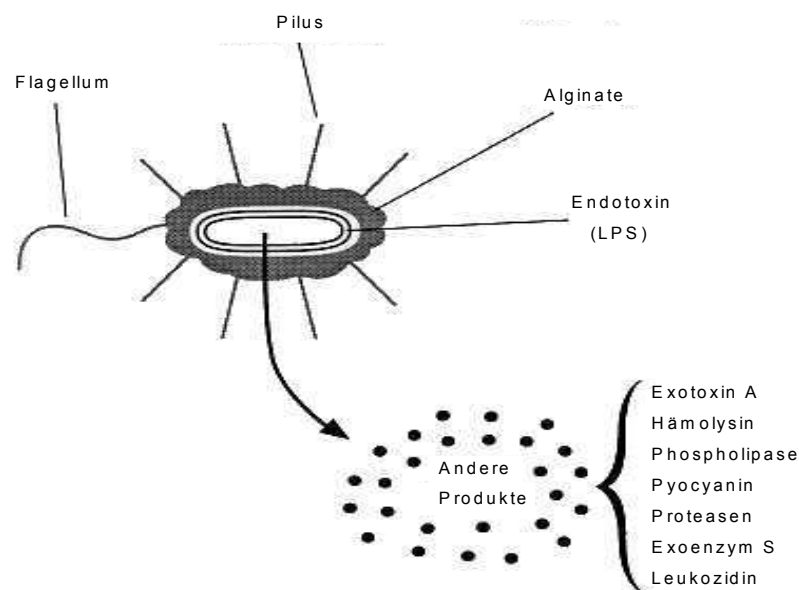
*Pseudomonas aeruginosa* ist ein ubiquitär vorkommendes fakultativ anaerobes, Gram-negatives Bakterium. Es zeichnet sich durch seinen weiten Toleranzbereich gegenüber physikalischen Faktoren und Nahrungsangeboten als extrem opportunistisch aus. Die Stoffwechselenergie wird durch aerobe Atmung gewonnen, *P. aeruginosa* kann jedoch auch unter anaeroben Bedingungen Nitrat veratmen (Denitrifikation). Zum Wachstum reichen dem Bakterium Spuren organischer Substanzen. So ist ein Wachstum in chloriertem Wasser ebenso möglich (Grobe et al., 2001) wie in trockenen Milieus oder ein Überleben bei Temperaturen von über 42 °C oder. Mit Vorliebe wächst dieser Organismus als sog. „Naß- oder Pfützenkeim“ jedoch unter feuchten Bedingungen, was seine ursprüngliche Herkunft aus schlammigen und wässrigen Biotopen unterstreicht.

Bemerkenswert ist die natürliche Resistenz dieses Bakteriums gegenüber einer Vielzahl äußerer Umweltbedingungen. So sind gegen *P. aeruginosa* sogar manche Desinfektionsmittel (z.B. quaternäre Ammoniumverbindungen) unwirksam (Majtan et al., 1995).

Obwohl *P. aeruginosa* in gesunden Organismen nur selten Infektionen auslöst (ca. 50 % der Menschen sind Träger dieses Bakteriums), stellt *P. aeruginosa* als opportunistischer, humanpathogener Erreger die wichtigste Ursache für zahlreiche nosokomiale Infektionen dar (Hospitalismuserreger). Begründet ist dies durch die hohe Resistenz dieses Erregers gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika (Cunha, 2002).

*P. aeruginosa*-Infektionen entwickeln sich vor allem bei Personen mit geschwächter Immunabwehr. Die Abwehrschwäche kann z.B. darin bestehen, dass die Kontinuität der Haut bzw. Schleimhaut unterbrochen ist. So führen Infektionen von Brandwunden mit diesem Erreger immer noch in 60 % aller Fälle zum Tod des Patienten (Richard et al., 1994). Die Abwehrschwäche kann aber auch durch Neutropenie, Komplementdefizienz oder medikamentöse Immunsuppression bedingt sein. So sind ca. die Hälfte der Todesfälle während einer AIDS-Erkrankung auf

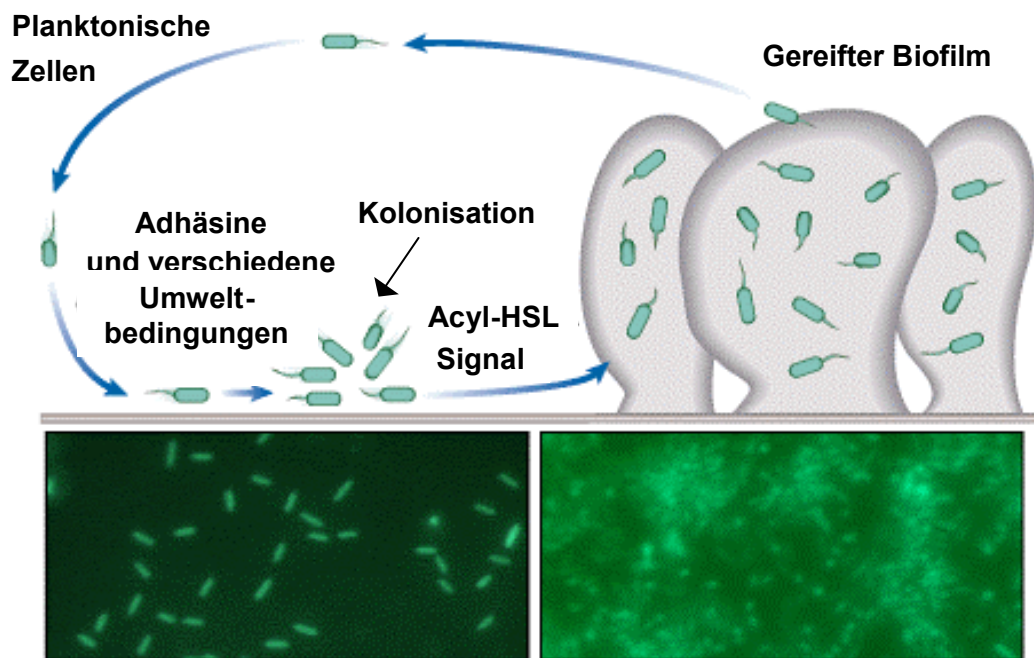
Infektionen mit *P. aeruginosa* zurückzuführen (Mendelson et al., 1994). *P. aeruginosa* ist zudem für verschiedene Lungeninfektionen verantwortlich (Todesrate 30 %; Fergie et al., 1994). Besondere Bedeutung besitzen die Infektionen von *P. aeruginosa* in der Lunge bei Personen, die an zystischer Fibrose (Mukoviszidose) erkrankt sind (Yu et al., 1996). Bei Untersuchungen dieser meist tödlich verlaufenden Infektionen konnte festgestellt werden, dass mukoide, biofilmbildende Formen von *P. aeruginosa* eine Hauptursache für die Mortalitätsrate dieser Erkrankung darstellen. Die mukoide Form von *P. aeruginosa* ist gekennzeichnet durch die Produktion des extrazellulären Polysaccharids Alginate. Entsprechend der Tatsache, dass *P. aeruginosa* sich durch eine besonders häufige Resistenzentwicklung bei Antibiotika-Therapien auszeichnet, zeigten diese mukoiden Formen Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika wie Tetracycline, Imipenem oder verschiedene Aminoglycoside (Hoiby et al., 1994).



**Abb. 1 Struktur und Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* (verändert nach Van Delden und Iglewski, 1998)**

Die hohe Pathogenität von *P. aeruginosa* beruht auf der Expression und dem Zusammenwirken mehrerer Virulenzfaktoren während der verschiedenen Phasen einer Infektion (Abb. 1; Van Delden und Iglewski, 1998). Eine Infektion verläuft in drei Phasen: (1) Kolonisation und nachfolgende Adhärenz der Bakterien, (2) lokale Invasion durch Gewebsschädigung und (3) systemische Verbreitung (Sepsis, z.B. Endocarditis, Meningitis und Pneumonie). Während in Phase (1) vornehmlich die Adhäsion an das Wirtsgewebe durch Fimbrien erfolgt, ist Phase (2) durch die

verstärkte Expression von Virulenzfaktoren gekennzeichnet. Diese verursachen als Proteasen (Elastase, Lecithinase, alkalische Protease) die Auflösung der interzellulären Verbindungen und zerstören dabei Haut-, Lungen- und Kornealgewebe. Aber auch Hämolytine (z.B. Phospholipasen) oder Toxine (Exoenzym S, Exotoxin A) tragen zur Zerstörung von Zellen im Wirtsorganismus bei.



**Abb. 2** *Ausbildung eines Biofilms durch P. aeruginosa:*

Acyl-HSL= Acyl-Homoserinlaktone (nach Kolter und Losick, 1998).

Den wichtigsten Pathogenitätsfaktor stellt jedoch die morphologische Änderung der Bakterien während der verschiedenen Phasen der Infektion dar (s. Abb. 2). Handelt es sich zu Beginn der bakteriellen Besiedlung (Beginn von Phase (1)) noch um planktonische, solitäre Formen, so ändert sich dies mit der beginnenden Besiedlung. Diese Morphologieänderung wird gesteuert durch die beiden miteinander interagierenden rhl- und lasI-Systeme des sog. „Quorum-Sensing“. Durch die konstitutive Expression der jeweiligen „Quorum-Sensing“-Moleküle (Butyrylhomoserinlaktone bzw. 3-oxo-dodecanoyl-Homoserinlaktone) erfolgt ab einer bestimmten Bakteriendichte die koordinierte verstärkte Synthese mukoider Exopolysaccharide und anderer Virulenzfaktoren durch die gesamte Bakterienpopulation. Dies führt schließlich zur Ausbildung extrem diverser und widerstandsfähiger Biofilme durch *P. aeruginosa*, die für eine Anheftung und Verteidigung gegenüber Wirtsabwehrmaßnahmen sorgen. Diese bakterielle

Lebensform, die auch bei anderen bakteriellen Spezies zu finden ist und definiert ist als eine von einer Matrix eingeschlossene Bakterienpopulation, die an einer Oberfläche adhärert (Costerton, 1999), war bis Ende der 70er Jahre nicht bekannt. Wissenschaftler stellten sich Bakterien ausschließlich als solitäre, freischwimmende Zellen vor. J. W. Costerton behauptete daher, dass "man äquivalent zu Botanikern bisher nur die Samen der Pflanzen untersucht habe, nicht jedoch die Pflanzen selber".

## **1.7 Die Interaktion zwischen *P. aeruginosa* und humanen Epithelzellen**

Nach der Zerstörung der physikalischen Barriere (Hornhaut, Schleimhaut) durch *P. aeruginosa* in Phase (2) ist das lebende Epithel direkt den Erregern ausgesetzt. Wie erfolgt nun eine Abwehr der drohenden Infektion durch das lebende Epithel auf molekularer Ebene und welche bakteriellen Faktoren lösen eine Aktivierung der epithelialen Abwehrmechanismen aus?

Verschiedene Mechanismen der molekularen Interaktion von Bakterien mit humanen Epithelzellen sind bereits bekannt. So wurde beispielsweise beobachtet, dass das *Pseudomonas* Pigment Pyocyanin das proinflammatorische Zytokin IL-8 in Epithelzellen induziert und somit Entzündungen auslösen kann (Denning et al., 1998)

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Inkubationen von humanen Keratinozyten mit Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien zu einer Induktion des antimikrobiellen Proteins hBD-2 führten (Schröder und Harder, 1999). Bemerkenswert war bei diesen Untersuchungen jedoch, dass es bei Inkubationen der Zellen mit Gram-positiven Erregern wie *Staphylococcus aureus* nur bei sehr hohen Bakteriendichten ( $>10^8$ /ml) zu einer Erhöhung der mRNA Expression von hBD-2 kommt. Dahingegen führten Inkubationen der Zellen mit einem mukoiden klinischen Isolat von *P. aeruginosa* bereits bei sehr niedrigen Bakteriendichten ( $10^3$ /ml) zu einer erhöhten hBD-2 mRNA Expression.

Diesen Befunden folgten eingehendere Untersuchungen der epithelialen hBD-2-Induktion durch *P. aeruginosa* (Schwichtenberg, 2000). Es zeigte sich, dass mukoiden Formen von *P. aeruginosa* im Gegensatz zu nicht-mukoiden Formen stets eine hBD-2-mRNA Expression in Keratinozyten induzierten (Harder et al., 2000). In

weiteren Untersuchungen konnten hBD-2-induzierende Faktoren auch in Kulturüberständen mukoider *P. aeruginosa* nachgewiesen werden.

## 1.8 Ziel der Arbeit

Primäres Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, zu klären, warum mukoiden Formen von *P. aeruginosa* im Gegensatz zu nicht-mukoiden Formen  $\beta$ -Defensine induzieren. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob die Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf die Morphologie der Bakterien haben (mukoid $\leftrightarrow$ nicht-mukoid, Biofilmbildung) und ob sie die Expression und Freisetzung möglicher  $\beta$ -Defensin-induzierender Faktoren durch die Bakterien bedingen. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob solche Faktoren nur antimikrobielle Proteine induzieren oder ob auch eine Induktion der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und Chemokinen (z.B. IL-8) erfolgt.

Schließlich sollte der Frage nachgegangen werden, ob auch andere Bakterien ähnliche Faktoren freisetzen.

Anschließend sollte eine molekulare Analyse der  $\beta$ -Defensin-induzierenden Faktoren vorgenommen werden. Diese bakteriellen Faktoren würden als eine Art entzündungsfreier Immunstimulus für Epithelien fungieren, wenn ausschließlich eine Induktion von antimikrobiellen Proteinen erfolgen würde. Vor dem Hintergrund zunehmender bakterieller Resistenzen gegenüber handelsüblichen Antibiotika könnte die Identifizierung und Isolierung dieser bakteriellen Faktoren für die Herstellung von Immunstimulantien in menschlichen Epithelien daher von großer therapeutischer Bedeutung sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma Merck (Darmstadt) im Reinheitsgrad P. a. bezogen.

Zur Herstellung der Nährmedien für die Bakterienkulturen wurden Chemikalien der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet.

Acetonitril	Promochem, Wesel
Agar, Select	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Aqua dest.(steril, pyrogenfrei)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Bacto-Trypton	Gibco BRL, Eggenstein
Bacto-Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Blue-Dextran	Pharmacia, Freiburg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Cacodylat-Puffer	Sigma, Deisenhofen
Chill-Out 14™-Flüssigwachs	MJ Research Inc., Watertown, MA (USA)
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
Cytochrom c	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Sigma, Deisenhofen
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DTT	Sigma, Deisenhofen
Desoxy-Nucleotidtriphosphat (dNTPs)	Pharmacia, Freiburg
EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylacetat	Walter GmbH, Kiel

LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Glycerol	USB, Cleveland
H <sub>2</sub> O (für HPLC)	Promochem, Wesel
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
L-Tryptophan	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Promochem, Wesel
o-Phenylendiamindihydrochlorid-Tabletten	Sigma, Deisenhofen
Ovalbumin	Sigma, Deisenhofen
Rhamnolipide (JBR 215, JBR 425, JBR 515)	Jeneil Biosurfactant, Baiersdorf
Safranin	Sigma, Deisenhofen
Sojamehl-Pepton	Unipath LTD., Hampshire
Thesit	Sigma, Deisenhofen
Tricin	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Tween	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma, Deisenhofen
Peroxidase-gebundenes WGA	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

## 2.2 Oligonukleotide

Die in der Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma und der MWG Biotech AG in lyophilisiertem Zustand bezogen. Durch Lösen in RNase-freiem Wasser wurden sie auf eine Stammkonzentration von 100 µM gebracht und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert (siehe Tabelle 2.1).



Produkt	Primer-Name	Sequenz (5' → 3')	Annealing Temp. [°C]
Elafin	PPEL-F	CGTGGTGGTGTTCCTCATC	60
	PPEL-R	TTCAAGCAGCGGTTAGGG	
GAPDH	GA1neu	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	60
	Ga2	CCAAGCCGAGCCACATCGCTC	
Interleukin-1 $\beta$	IL-1 $\beta$ F	CCAGCTACGAATCTCCGACCACCACTAC	59
	IL-1 $\beta$ B	TGCTTGAGAGGTGCTGATGTACCAGTTG	
Interleukin-8	IL-8 Fwd	CTTTCAGAGACAGCAGAGCAC	60
	IL-8C Rev	ACTGTGAGGTAAGATGGTGGC	
oligo (dT)	oligo (dT)	18 x T	42
hBD 2	HBD-2 fA	CCAGCCATCAGCCATGAGGGT	60
	HBD-2 rA	GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA	
RANTES	RANTES For	GGCACGCCTCGCTGTTTCATCCTCA	65
	RANTES Rev	CTTGATGTGGGCACGGGGCAGTG	
TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ For	TCAGCTTGAGGGTTTGCTACAA	59
	TNF- $\alpha$ Rev	TCTGGCCCAGGCAGTCAGATC	
Interleukin 6	IL-6 For	AGGAGCCCAGCTATGAACTCCTTC	61
	IL-6 Rev	TGGAATCTTCTCCTGGGGGTACTG	
HBD-3	S3-13	CTTCGGCAGCATTTCGGCCA	60
	S3-17	AGCCTAGCAGCTATGAGGATC	
RNase-7	S2-31	GGAGTCACAGCACGAAGACCA	60
	S2-33rev	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA	
Psoriasis	Pso1	TTCTTCTACTCGTGACGCTTC	62
	Pso2	CTCTGCTTGTGGTAGTCTGTG	

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) und ihre Nukleotidsequenzen (5' => 3') sowie die dazugehörigen Oligonukleotidprodukte.

## 2.3 Enzyme

Reverse Transkriptase (Superscript™ II) (200 U/ $\mu$ l)

Gibco BRL, Eggenstein

LightCycler-FastStart (DNA-Polymerase) (5 U/ $\mu$ l)

Roche, Mannheim

In der Reversen Transkription wurde der vom Hersteller mitgelieferte Reaktionspuffer verwendet, in der RT-PCR Reaktion wurde das „LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I“ Kit der Firma Roche unter Verwendung der mitgelieferten Reagentien verwendet.

## 2.4 Nährmedien für Bakterienkulturen

„AG-Medium“	67 mM Alanin 8 mM Magnesiumsulfat 0,4 mM Dikaliumhydrogenphosphat 0,04 mM Eisensulfat 1 % Glycerol
„HP-Medium“	40 mM Ammoniumchlorid 20 mM Succinat 10 mM MOPS 4 mM Kaliumdihydrogenphosphat 2 mM Kaliumsulfat 0,4 mM Magnesiumchlorid 1 µM Eisensulfat 1 µM Manganchlorid 1 µM Kalziumsulfat 1 µM Zinkchlorid
„M9-Medium“	240 mM Natriumhydrogenphosphat 110 mM Kaliumdihydrogenphosphat 94 mM Amoniumchlorid 56 mM Succinat 43 mM Natriumchlorid 10 mM Glukose 2 mM Magnesiumsulfat 100 µM Kalziumchlorid 100 µM L-Glutamat



Trypsin – EDTA (10x, ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )  
(Gebrauchslösung - 1:10 in PBS-Puffer verdünnt)

Gibco BRL, Eggenstein

## 2.6 Bakterienkulturen

Bakterienart	ATCC-Nr.	NCTC-Nr.	Besonderes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33354	11446	-
	15442		Keine Pyocyaninsynthese Resistenz gegen verschiedene Antibiotika
	25668	10662	Sensitiv gegenüber Gentamicin und Carbenicilin
	27853		-
	33348	11440	-
	33358	11450	-
<b><i>P. aeruginosa</i> Mutanten</b>			
<b><i>PDO 100</i></b>			rhII-Gen deletiert
<b><i>PAO-JP1</i></b>			lasI-Gen deletiert
<b><i>SS24</i></b>			rpoS-Gen deletiert
<b><i>mucA</i></b>			Mukoider Phänotyp
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13525		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	17588		
<i>Escherichia coli</i>	35218		-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	10788	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615		

**Tabelle 2.2:** Überblick über die in den Stimulationsversuchen verwendeten Bakterienstämme.

Für die Stimulation wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Bakterienstämme verwendet. Diese wurden von der Medizinischen Mikrobiologie, Kiel und dem Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Kiel bezogen.

Überstände der *P. aeruginosa*-Mutanten wurden freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. Dr. J. Heesemann vom Max von Pettenhofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München. Die PDO100-Mutante stammt dabei

ursprünglich von D. Ohman (Brint und Ohman, 1995), PAO-JP1 von B. Iglewski (Pearson et al., 1997) und SS24 von S.J. Suh (Suh et al., 1999). Die mucA-Mutante mit mukoidem Phänotyp ist eine unpublizierte *P. aeruginosa*-Form aus den Laboren von J. Heesemann.

## 2.7 Verbrauchsmaterial

6-Loch und 12-Loch Kultur-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,22 µm Porenweite)	Schleicher & Schuell, Dassel
Stericup Filtrationssystem	Millipore GmbH, Eschborn
Ultrafiltrationsmembran (für Amicon®-Kammer)	Millipore YM 3 und YM 30 (3 kDa und 30 kDa Poren- größe), Millipore GmbH, Eschborn
Zellkulturflaschen (200 ml; 75 cm <sup>3</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht

## 2.8 HPLC-Anlagen

### Säulen

<i>Aqua C-18:</i>	Aqua 5 µ C-18 125A, Code No. 00G-4299-EO, Phenomenex, Aschaffenburg
<i>Resource Q:</i>	6ml Anionenaustauscher, Code No. 17-1179-01, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
<i>Mini Q:</i>	Anionenaustauscher PC 32/33, Code No. 17-0686-01, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

---

<i>C2/C18:</i>	$\mu$ RPC (Reversed Phase) C2/C18 SC 2.1/10, Code No. 17-0704-01, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
<i>Superdex 75:</i>	Gelfiltrationssäule PC 3.2/50, Code No. 17-0771-01, an LKB- $\mu$ Separation-Unit und LKB-Precision Pump, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
<i>Vorsäulenkartusche:</i>	Security Guard™ Kartusche 10/pK ID 3,2-8,0, Code No. AJ0-42871, Phenomenex, Aschaffenburg

**HPLC-Zubehör**

HPLC-Pumpen	SP 8800, Spectra Physics, Hamburg P 4000, Spectra Physics, Hamburg
Degaser	DG-4, Hengeler Gastorr GT-103, Hengeler
Säulenheizung	SP 8792, Spectra Physics, Hamburg
UV-Detektor	Spectra Focus, Spectra Physics, Hamburg Modell Spektroflow 773, Kratos, Karlsruhe
Plotter	PU 4810, Philips (ResourceQ) Model 7475A, Hewlett Packard (Gelfiltration, C2/C18)

## 2.9 Geräte

Light-Cycler	Roche, Mannheim
Photometer	<u>RNA-Messung:</u> Pharmacia Biotech, Freiburg
	<u>Bakterien:</u> Zweistrahl-spektral-photometer HITACHI Modell 150-20, Colora Messtechnik, Lorch
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 Digital, mit regelbarer Vakuumpumpe und regelbarem Umlaufkühler, Heidolph, Kelheim
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Centrifuge 5804R und 5417R, Eppendorf, Hamburg

## 2.10 Kultivierung eukaryotischer Zellen

### 2.10.1 HaCaT - Zelllinie

Die verwendete HaCaT-Zelllinie ist eine humane, immortalisierte, nicht-tumorigene Zelllinie, die spontan aus normalen humanen Keratinozyten durch Kultur bei erhöhter Temperatur und geringer Kalziumkonzentration entstand (Boukamp et al., 1988) .

Die aus bestehenden Kulturen des Labors übernommenen HaCaT-Zellen wurden in 10 ml DMEM-Medium (Dulbecco`s Modified Eagle Medium; Cellconcepts GmbH, Umkirch) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS; PAA GmbH, Linz) angezüchtet. Vor der Verwendung wurde das fetale Kälberserum bei 65 °C für 30 min inaktiviert. Weiterhin enthielt das Nährmedium 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin. Die Kultivierung der HaCaT-Zelllinie erfolgte bei 37 °C wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit CO<sub>2</sub>-Begasung in 200 ml Kulturgefäßen (Sarstedt, Newton). Das Nährmedium wurde zweimal wöchentlich durch 37 °C

vorgewärmtes, frisches Medium ersetzt, wodurch gleichzeitig tote bzw. nicht adhärenente Zellen entfernt wurden.

### **2.10.2 Isolierung und Kultur primärer humaner Keratinozyten**

Humane Keratinozyten wurden aus frischen Vorhäuten isoliert, die bei entsprechenden Operationen anfielen. Nach dem Entfernen von Fett- und Bindegewebe wurden die Präparate in kleine Streifen (1-2 cm lang, 3-5 mm breit) geschnitten und zweimal in PBS gewaschen. Zur Ablösung der Epidermis erfolgte anschließend eine Inkubation in 0,25%iger Trypsinlösung (Gibco BRL, Eggenstein) über Nacht bei 4 °C oder bei 37 °C für 1 Std. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium inhibiert und die Epidermis vom übrigen Gewebe abgezogen. Diese Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und die Suspension bei 600 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde dann in 10 % FCS/EpiLife-Medium (10 ml; Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und in 200 ml Kulturflaschen überführt, die bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Die Lebensfähigkeit der Keratinozyten beschränkte sich auf ca. 3-4 Subkultivierungen, wobei die Zellen schon bei niedriger Konfluenz passagiert wurden, um eine zu schnelle Ausdifferenzierung zu verhindern.

### **2.10.3 Subkultivierung der Zellen**

Eine Subkultivierung adhärent wachsender HaCaT-Zellen erfolgte bei 80-90 % Konfluenz, da diese Zellen in Kultur bei Erreichen der Konfluenz im Wachstum inhibiert werden (Crabtree et al., 1999), während bei den primären Keratinozyten der Grad der Ausdifferenzierung entscheidend für den Zeitpunkt der Subkultivierung war. Zum Ablösen der adhärent wachsenden primären Keratinozyten bzw. HaCaT-Zellen vom Kulturgefäßboden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 0,1%igen Trypsin-0,02 % EDTA-Lösung (Gibco BRL, Eggenstein) inkubiert. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug ca. 5 min. Das Ablösen der Zellen wurde durch mehrmaliges Klopfen an die Kulturflasche unterstützt, um die enzymatische Schädigung der Zellen möglichst gering zu halten. Dabei wurde fortwährend der Grad der Ablösung der Zellen mikroskopisch überprüft.



Anschließend wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an FCS-haltigem Medium die enzymatische Proteolyse abgestoppt. Nach mehrmaligem Resuspendieren der Zellen wurden diese bei 400 x g für 5 min zentrifugiert, mit DMEM-Medium gewaschen und in sterile Kulturflaschen eingesät (Subkultivierung) bzw. für Stimulationsversuche in 6-Loch bzw. 12-Loch Kultur-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt.

#### **2.10.4 Einfrieren und Auftauen von adhärent wachsenden Zellen**

Zur Aufrechterhaltung der Kulturen wurden Zellen in Flüssigstickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen einer Kultur zunächst mit Trypsin-Lösung von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst, trypsiniert und mit FCS-haltigem Medium gewaschen (siehe 2.10.3). Nach Zentrifugation für 5 min bei 400 x g und anschließendem Dekantieren des Überstandes erfolgte eine Überführung des Zellpräzipitats in 2 ml eiskaltes Nährmedium, welches zuvor mit 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), einem zelltoxischen Frostschutzmittel, versetzt wurde. Nach sofortigem Einfrieren der Zellen bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  konnten diese nach 24 Stunden in den Flüssigstickstoff überführt werden.

Zum Auftauen wurden die in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen Zellen in einem Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Um das DMSO möglichst rasch zu entfernen, wurde die 10-fache Menge an vorgewärmten FCS-haltigem Nährmedium ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zu den Zellen gegeben und anschließend für 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpräzipitat in ebenfalls vorgewärmtes FCS-haltiges Medium aufgenommen und in Kulturflaschen angezüchtet.

#### **2.10.5 Stimulation der Zellen**

Die zu stimulierenden Zellen wurden vor Beginn eines Experimentes in 6-Loch- bzw. 12-Loch-Kultur-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 2 ml bzw. 1 ml Medium pro Loch überführt (siehe oben). Um ausschließen zu können, dass im FCS enthaltene, undefinierte Faktoren die Stimulierbarkeit der Zellen beeinflussen, wurde das Zellmedium zwölf Stunden vor dem Versuch nach zweimaligem Waschen mit PBS durch FCS-freies Nährmedium ersetzt.

Es wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte bei der Stimulierung nicht zu hoch war (50-80 %), da eine zu hohe Zelldichte keine reproduzierbaren Stimulationseffekte zuließ (eigene Beobachtung).

Der Stimulus wurde in der gewünschten Konzentration in serumfreien 0,1 % BSA (bovines Serumalbumin)-DMEM-Medium aufgenommen und zu den Zellen gegeben, die zuvor nochmals mit PBS gewaschen wurden. Die Zugabe von BSA sollte dabei eine mögliche unspezifische Wechselwirkung der Stimuli mit den Gefäßwänden verhindern. Verschiedene Verdünnungen eines Stimulus (z.B. Überstände von Bakterienkulturen; siehe unten) wurden direkt im serumfreien Medium erstellt.

## 2.11 Anzucht und Aufarbeitung der Bakterienkulturen

Die Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Pseudomonas stutzeri* (*P. stutzeri*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus.*) und *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) erfolgte bei 37 °C auf Trypticase-Soy-Broth (TSB)-Agarplatten. Die Stammkulturen lagerten bei –70 °C als Flüssigkeitskulturen.

### 2.11.1 Nachweis der Ausbildung der adhärenenten Form der Bakterien durch einen „Enzym-Linked Lectinsorbent Assay“ (ELLA)

Um nachweisen zu können, ob Bakterien unter bestimmten Kultivierungsbedingungen einen adhärenenten Biofilm-bildenden Phänotyp ausbilden, wurden „Enzym-Linked Lectinsorbent Assay“ (ELLA) durchgeführt (Thomas et al., 1997). Dieser Test ermöglicht den Nachweis von N-Acetyl-D-Glukosamin, ein Bestandteil des bakteriellen extrazellulären Matrixmaterials adhärenenter Bakterien eines Biofilms. Dazu wurden 100 µl verschiedener Verdünnungen einer für 24 Std. inkubierten Bakteriensuspension pro Loch einer 96-Loch-Platte für 24-48 Std. inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der 96-Loch-Platte mit PBS-Puffer wurden die adhärenenten Bakterienzellen mit jeweils 200 µl 0,2 M Cacodylat-Puffer (+2 % Glutaraldehyd-Lösung) bei 4 °C für mindestens 16 Std. fixiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen dreimal mit 100 µl 0,2 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 1 % BSA (+0,1 % Tween20 / PBS) zur Blockierung

unspezifischer Bindungen bei Raumtemperatur für 60 min. Danach wurden die adhärenen Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen. Um die adhärenen Bakterien nachzuweisen, wurde Phosphatase-gebundenes „wheat germ agglutinin“ (WGA, aus *Triticum vulgare*, Sigma), welches an N-Acetyl-D-Glukosamin bindet, verwendet. Dazu wurden 200 µl einer 0,05 µg/ml WGA / PBS-Puffer-Lösung zu den Zellen gegeben und nach einer Inkubationszeit von 18 Std. bei 4 °C dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Herstellung der Substratlösung wurde eine o-Phenylendiamindihydrochlorid-Tablette in 20 ml 0,1 M Citratpuffer (pH 5,0) mit 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 200 µl der Substratlösung gestartet und nach ca. 5-10 minütiger Inkubation durch Zugabe von 100 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Der Überstand wurde abgenommen und die OD bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen, wobei es sich nach der Definition von Thomas und Mitarbeitern ab einer OD von 0,15 um die Ausbildung der adhärenen Form und damit um eine Biofilmbildung handelt.

### 2.11.2 Stimulation der Epithelzellen mit Bakterien

Wurden Mikroorganismen für Stimulationsversuche von Keratinozyten benötigt (siehe 2.10.5), so wurde jeweils eine Einzelkolonie einer Plattenkultur oder 7-8 µl einer -70 °C Flüssigkultur des entsprechenden Bakterienstammes entnommen und in 7-8 ml TSB-Medium angeimpft. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 Upm) inkubiert und die Zellzahl anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm ( $A_{620}$ ) bestimmt. Wenn nicht anders beschrieben, so wurde stets eine  $A_{620}$  von 0,2, entsprechend ca.  $10^8$  Bakterien, eingestellt und diese Suspension nochmals 1:10 in DMEM-Medium verdünnt, um eine Endkonzentration von  $10^7$  Bakterien/ml zu erhalten. Die Mikroorganismen wurden vor der Stimulation durch 30 min Inkubation bei 65 °C abgetötet, für 15 min bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert und in PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen.

### 2.11.3 Kultivierung der Bakterien zur präparativen Herstellung von Kulturüberständen

Für die Herstellung von Bakterienkulturüberständen zur Charakterisierung und molekularen Analyse der induzierenden Faktoren (siehe 2.11.4) wurden zunächst 7-8 µl der -70 °C-Flüssigkultur des entsprechenden Bakterienstammes entnommen und in 7-8 ml TSB-Medium angeimpft. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde diese Bakteriensuspension dann auf eine OD von 1,0 bis 1,2 eingestellt. 2 ml dieser verdünnten Flüssigkultur wurden anschließend in 200 ml TSB-Medium angeimpft und über Nacht unter Schütteln (200 Upm) kultiviert.

Nachdem die Bakterien zunächst zum Erreichen einer maximalen Zelldichte unter „optimalen“ Wachstumsbedingungen (TSB-Medium, Suspensionskultur) für ca. 24 Std. inkubiert worden waren, erfolgte eine Zentrifugation der Bakteriensuspension für 15 min bei 6000 x g. Das Bakterienpräzipitat wurde anschließend in 200 ml Medium resuspendiert. Dabei wurden die Bakterien auf 2 grundlegende Arten für 24 Std. weiter kultiviert:

- a.) in TSB-Medium oder definierten Medien (MG, AG, HP, M9) unter Schütteln (200 Upm -> Suspensionskulturen)
- b.) in TSB-Medium oder definierten Medien (MG, AG, HP, M9) unter statischen Bedingungen in 3-Schicht-Zellkulturflaschen (-> statische Kulturen)

Die Bakterienkulturen wurden anschließend erneut zentrifugiert. Auf eine Hitzeinaktivierung wurde jedoch verzichtet, um Denaturierungen eventuell am Stimulationsprozess beteiligter Moleküle in den Kulturüberständen ausschließen zu können. Die Kulturüberstände wurden dekantiert und durch Verwendung des Stericup Filtrationssystems (Millipore GmbH, Eschborn) sterilfiltriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese Überstände bei -20 °C gelagert.

Sollten die Kulturüberstände als Stimuli verwendet werden, so wurden diese zunächst mindestens 1:10 mit FCS-freiem 0,1%igem BSA / DMEM bzw. EpiLife-Medium verdünnt. 1 ml dieser Lösung wurde jeweils zu den Zellen gegeben.

#### **2.11.4 Einkonzentrierung der Bakterienkulturüberstände**

Nach der Sterilfiltration der Bakterienkulturüberstände wurden diese in einer Ultrafiltrationskammer (Amicon®-Kammer, Millipore GmbH, Eschborn) unter Verwendung eines YM30-Filters („Cutoff“: 30 kD) konzentriert. Die Filtrate (<30 kD) wurden anschließend erneut in der Amicon-Kammer mittels eines YM3-Filters konzentriert. Die so erzeugten drei Fraktionen (>30 kD; 3-30 kD; <3 kD) der Kulturüberstände wurden dann separat auf mögliche induzierende Faktoren untersucht und gegebenenfalls mittels verschiedener HPLC-Verfahren weiter fraktioniert.

#### **2.11.5 Acetonitril- und Säure-Behandlung bakterieller Kulturüberstände**

Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der induzierenden Faktoren wurden die 30 kD-Retentate der bakteriellen Kulturüberstände mit Acetonitril bzw. Säure inkubiert.

Bei der Acetonitril-Behandlung der bakteriellen Kulturüberstände wurden 30 kD-Retentate mit einem Anteil von 30 % Acetonitril versetzt und für 16 Std. bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Präzipitate wurden zunächst in einem geringen Volumen 1 M NaOH gelöst und anschließend durch Zugabe von H<sub>2</sub>O dem Volumen des Überstandes angeglichen. Die Überstände wurden in Anwesenheit von 0,1 % BSA lyophilisiert, um das zelltoxische Acetonitril zu entfernen, und ebenfalls in einer dem ursprünglichen Volumen entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O gelöst.

Im Rahmen der Säurebehandlung wurden Kulturüberstände zunächst durch Zugabe von 1 M HCl auf pH 3 eingestellt und anschließend bei 4 °C und 6000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in H<sub>2</sub>O gelöst und der Überstand durch Verwendung von 1 M NaOH wieder auf den ursprünglichen pH-Wert gebracht.

## 2.11.6 Analyse der Kulturüberstände unter Verwendung verschiedener Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Systeme

### 2.11.6.1 Größenausschlußchromatographie

Zur Charakterisierung des Molekulargewichtes der induzierenden Faktoren aus den Bakterienkulturüberständen wurden diese durch Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration) unter Verwendung einer „Smart®-Superdex 75 PC 3.2/50“-Säule (Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) aufgetrennt.

Die Säule wurde in einem Vorlauf zunächst durch die Verwendung folgender Eichsubstanzen kalibriert (Konzentration jeweils 500 µg/ml, Gesamtauftragsvolumen 25 µl), wobei PBS als Laufpuffer diente:

Substanz	Molekularmasse in kD
Blue Dextran	>75
Bovines Albumin.	67
Ovalbumin	43
Cytochrom c	12
L-Tryptophan	0.2

Flussrate: 80 µl/min

Die Messung der UV-Absorption erfolgte bei Wellenlängen von 215, 254 und 280 nm. Die Bakterienkulturüberstände wurden unter identischen Bedingungen chromatographiert.

### 2.11.6.2 Anionenaustauschchromatographie

Um über die Ladungseigenschaften der induzierenden Faktoren eine Aussage treffen zu können, wurden Bakterienkulturüberstände auch mittels Anionenaustauschchromatographie fraktioniert. In qualitativen Untersuchungen wurde eine MiniQ-Säule (Pharmacia, Freiburg) am Smart-System (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Zur präparativen Analyse wurde eine ResourceQ-Säule (Pharmacia, Freiburg) an einer Spectra-Physics-Anlage (Thermo Separation Products, Darmstadt) mit einer 2 ml Probenschleife (Macherey & Nagel, Düren), einer HPLC-Pumpe P 4000 (Spectra Physics, Darmstadt) sowie mit einem UV-

Detektor Spectroflow 773 (Kratos, Karlsruhe) eingesetzt. Die Fraktionierung der aufgearbeiteten Überstände erfolgte manuell nach der Absorption bei 280 nm unter folgenden Bedingungen:

**ResourceQ:**

Puffer A: 20 mM Tris-H<sub>2</sub>O, pH 8,0

Puffer B: 20 mM Tris-H<sub>2</sub>O mit 1M NaCl, pH 8,0

Gradient:

Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0	100	0
5	100	0
30	0	100
40	0	100

Flußrate: 3 ml/min

**MiniQ:**

Puffer A: 20 mM Tris-H<sub>2</sub>O, pH 8,0

Puffer B: 20 mM Tris-H<sub>2</sub>O mit 1M NaCl, pH 8,0

Gradient:

Zeit(min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0	100	0
2	100	0
25	0	100
30	0	100

Flussrate: 100 µl/min

**2.11.6.3 Reversed Phase Chromatographie**

Zur Untersuchung der Hydrophobizität der induzierenden Faktoren wurden verschiedene Reversed-Phase-Chromatographien durchgeführt. Dabei wurde sowohl eine C2/C18-Säule (Pharmacia, Freiburg) mit Hilfe des Smart-Systems als auch eine Aqua C-18-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg) unter folgenden Bedingungen verwendet:

**C2/C18-Säule:**Puffer A: 0,1 % TFA-H<sub>2</sub>O, pH 3,0

Puffer B: 0,1 % TFA- Acetonitril, pH 3,0

Gradient:

Zeit(min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0	100	0
10	75	25
40	30	70
50	0	100
58	0	100

Flussrate: 100 µl/min

Die Messung der UV-Absorption erfolgte bei Wellenlängen von 215, 254 und 280 nm.

**Aqua C-18-Säule:**Puffer A: 0,1 % TFA-H<sub>2</sub>O, pH 3,0

Puffer B: 0,1 % TFA- Acetonitril (95%), pH 3,0

Gradient:

Zeit(min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0	100	0
5	100	0
25	90	10
45	30	70
46	0	100
51	0	100

Flussrate: 1 ml/min

Die Messung der UV-Absorption erfolgte bei 215 nm.

Um das Acetonitril in den gesammelten Fraktionen zu entfernen, wurden die Proben im Lyophilisator (Alpha 2-4, Heraeus) über Nacht in Anwesenheit von 0,1 % BSA gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Fraktionen zur Inkubation von Epithelzellen verwendet.

Fraktionen der HPLC-Läufe, die induzierende Faktoren enthielten, wurden unter Verwendung weiterer HPLC-Trennverfahren aufgereinigt.



## 2.12 Semiquantitative RT-PCR

### 2.12.1 RNA-Isolierung

Aus den kultivierten Keratinozyten wurde die Gesamt-RNA mittels „TRIzol™“-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

Zuerst wurde dazu das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde pro Loch einer 6-Loch-Platte 1 ml der „TRIzol™“-Lösung verwendet. Das Ablösen und die Lyse der Zellen wurde durch wiederholtes Auf- und Abziehen mit einer Pipette unterstützt. Zu jeweils 1 ml dieses Zell-Lysats wurde nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur 200 µl Chloroform gegeben und für ca. 15 Sekunden gemischt. Die für 2-3 min inkubierten Proben wurden dann für 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die entstandene obere, wässrige Phase (ca. 600 µl) wurde von der unteren Chloroform-Phenol-Phase und der Interphase (mit Proteinen und anderen Zellbestandteilen) getrennt und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min bei 4 °C. Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurde das RNA-Präzipitat mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7500 x g für 5 min bei 4 °C). Das so entstandene RNA-Präzipitat konnte in 25 µl 25 %-Formamid-H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C verwahrt werden.

### 2.12.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren aus den RNA-Isolierungen erfolgte photometrisch durch die Bestimmung der Absorption. Die Messung der Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) mittels eines UV-Detektors mit automatischer Quantifizierung durchgeführt. Eine  $A_{260}$ -Extinktion von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 41,2 µg/ml (Sambrook, 1989).

Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung wird unter anderem über ihren Gehalt an Proteinverunreinigungen bestimmt. Das charakteristische Absorptionsmaximum von

Proteinen liegt bei 280 nm. Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $E_{260}/E_{280}$ ) lässt sich die Reinheit einer Nukleinsäureprobe bestimmen; er sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

### **2.12.3 Reverse Transkription von RNA (cDNA- Synthese)**

Zur weiteren Analyse und zum Schutz der RNA vor Degradation wurde die aus Zellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Bei diesem Prozeß der reversen Transkription wird die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase genutzt (Gallo, 1971). Dieses synthetisiert mittels einer RNA-Vorlage die komplementäre DNA (cDNA). Für einen Reaktionsansatz wurden 2 µg Gesamt-RNA und 2,5 µl Oligo(dT)-Primer (20 µM) mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 12 µl gebracht. Dieser Ansatz wurde für 10 min in einem Thermoblock auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben, und sofort auf Eis gestellt. Hinzugefügt wurden:

- 4 µl 5x Reaktionspuffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript II)

Die reverse Transkription erfolgte für 1 Std. bei 42 °C (Anhybridisierung der Oligo(dT)-Primer und Synthese der cDNA). Anschließend wurde die Lösung zur Inaktivierung des Enzyms für 5 min auf 90 °C erhitzt. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert, nachdem die Probe mit 180 µl H<sub>2</sub>O auf 200 µl Gesamtvolumen gebracht wurde.

### **2.12.4 Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die Kombination von reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht es, die Genexpression auf mRNA-Ebene zu untersuchen (Newton und Graham, 1994). Dabei können auch mRNA-Moleküle nachgewiesen werden, die nur in geringer Konzentration in der Zelle vorkommen.

Nachdem die mRNA mittels einer reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben worden war (vgl. 2.12.3), wurde diese in einer PCR-Analyse

mit zwei genspezifischen Primern (GSP 1 und GSP 2) amplifiziert. Es wurden Intron-überspannende Primer eingesetzt, um cDNA verlässlich von genomischer DNA unterscheiden zu können. Zur Ermittlung eines internen Standards wurden die Primer GA1neu und GA2 verwendet. Sie amplifizieren ein spezifisches, 360 Bp großes Fragment der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die in Epithelzellen konstant exprimiert wird. Die PCR-Reaktionen erfolgten dabei unter Verwendung eines Realtime-Cyclers der Firma Roche (Light Cycler). Dabei wurden 10 ng cDNA in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

5,8 µl H<sub>2</sub>O

1,2 µl MgCl<sub>2</sub>

1 µl Enzymlösung

je 0,5 µl der genspezifischen Primer  
(10 µM)

Anschließend konnten mittels zuvor erstellter Standardkurven für die jeweiligen Gene genaue Angaben zu der entsprechenden relativen mRNA Expression gemacht werden.

## 2.13 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit abgebildeten Diagramme zu den Inkubationsexperimenten von Keratinozyten stellen repräsentative Beispiele für mehrfach durchgeführte unabhängige Versuche dar. Versuchsansätze hingegen, die in Wiederholungen abweichende bzw. keine reproduzierbaren Resultate lieferten, fanden in dieser Arbeit keine Berücksichtigung.

Die Relevanz verschiedener Kultivierungsbedingungen für die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* wurde anhand des Student T-Tests unter Verwendung von SPSS 8.0 ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen wurden bei einer Verdünnung von 30 µl Bakteriensuspension in 100 µl Medium in Abb. 5 dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Kultivierungsbedingungen beeinflussen die Morphologie von *P. aeruginosa*

Da in der eigenen Diplomarbeit gezeigt werden konnte, dass ein mukoides klinisches Isolat von *P. aeruginosa* die hBD-2-Expression in Keratinozyten induzierte (Schwichtenberg, 2000), sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der mukoiden Morphologie und der Synthese  $\beta$ -Defensin-induzierender Faktoren der Bakterien besteht. Daher wurden Kultivierungsbedingungen etabliert, die zur Ausbildung der mukoiden Morphologie der *P. aeruginosa* ATCC-Stämme entsprechend dem klinischen Isolat führten.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Medien (TSB, MG, AG, HP, M9, siehe 2.4) zur Kultivierung verwendet. Dabei stellt das TSB-Medium ein Vollmedium mit umfangreichem Nährstoffangebot dar, wohingegen es sich bei den anderen Medien um definierte Magermedien handelt. Während das MG-Medium als einzige Kohlenstoffquelle Glukose enthält, finden sich im AG-Medium Glycerol sowie Alanin als Kohlenstoffquellen und im HP-Medium Succinat. Das M9-Medium ist dadurch gekennzeichnet, dass es Glukose, Glutamat und zusätzlich Succinat als Kohlenstoffquellen enthält. MG- und M9-Medium enthalten zudem relativ hohe Phosphatkonzentrationen (60 bzw. 350 mM), während das AG- und HP-Medium nur geringe Phosphatmengen aufweisen (0,4 mM bzw. 4 mM).

Des weiteren wurden die Bakterienkulturen sowohl unter Schütteln (= Suspensionskulturen; inkubiert bei 200 Upm), als auch unter statischen Bedingungen (= statische Kulturen; inkubiert ohne Schütteln) kultiviert und hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrer Fähigkeit zur  $\beta$ -Defensin-Induktion in Epithelzellen verglichen.

Interessanterweise zeigte sich, dass statische Kulturen von *P. aeruginosa* unter Verwendung des MG-Mediums eine mukoide Morphologie aufwiesen (Abb. 3, links), die derjenigen des untersuchten klinischen Isolats ähnelte. Untersuchungen von MG-Suspensionskulturen ergaben, dass *P. aeruginosa* unter diesen Kulturbedingungen hingegen eine nicht-mukoide Morphologie besitzt (Abb. 3,

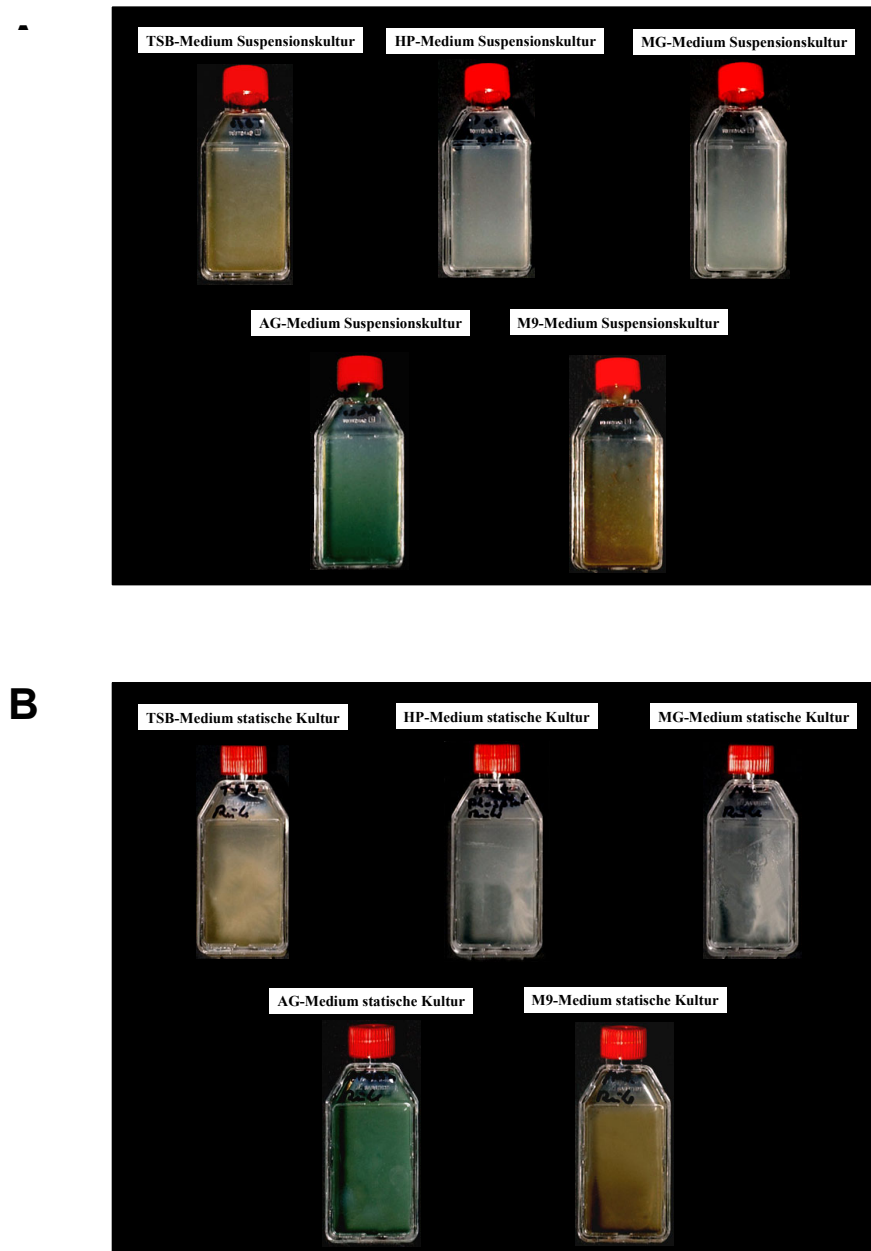
rechts). Identische Ansätze von *P. aeruginosa* unter Verwendung des TSB-Mediums führten ebenfalls zur Ausbildung des mukoiden Phänotyps unter statischen Kulturbedingungen und zur nicht-mukoiden Form bei der Inkubation als Suspensionskultur.



**Abb. 3 Die unterschiedlichen Morphologieformen von *Pseudomonas aeruginosa*:** Links ist jeweils die mukoide Form von *P. aeruginosa* dargestellt, die unter statischen Kulturbedingungen zu beobachten war, während rechts die nicht-mukoide Form der Suspensionskulturen abgebildet ist (jeweils kultiviert in MG-Medium). Deutlich wird die intensive Synthese von Exopolysacchariden durch die mukoide Form von *P. aeruginosa*. Beide morphologischen Formen wurden bei sämtlichen untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen beobachtet.

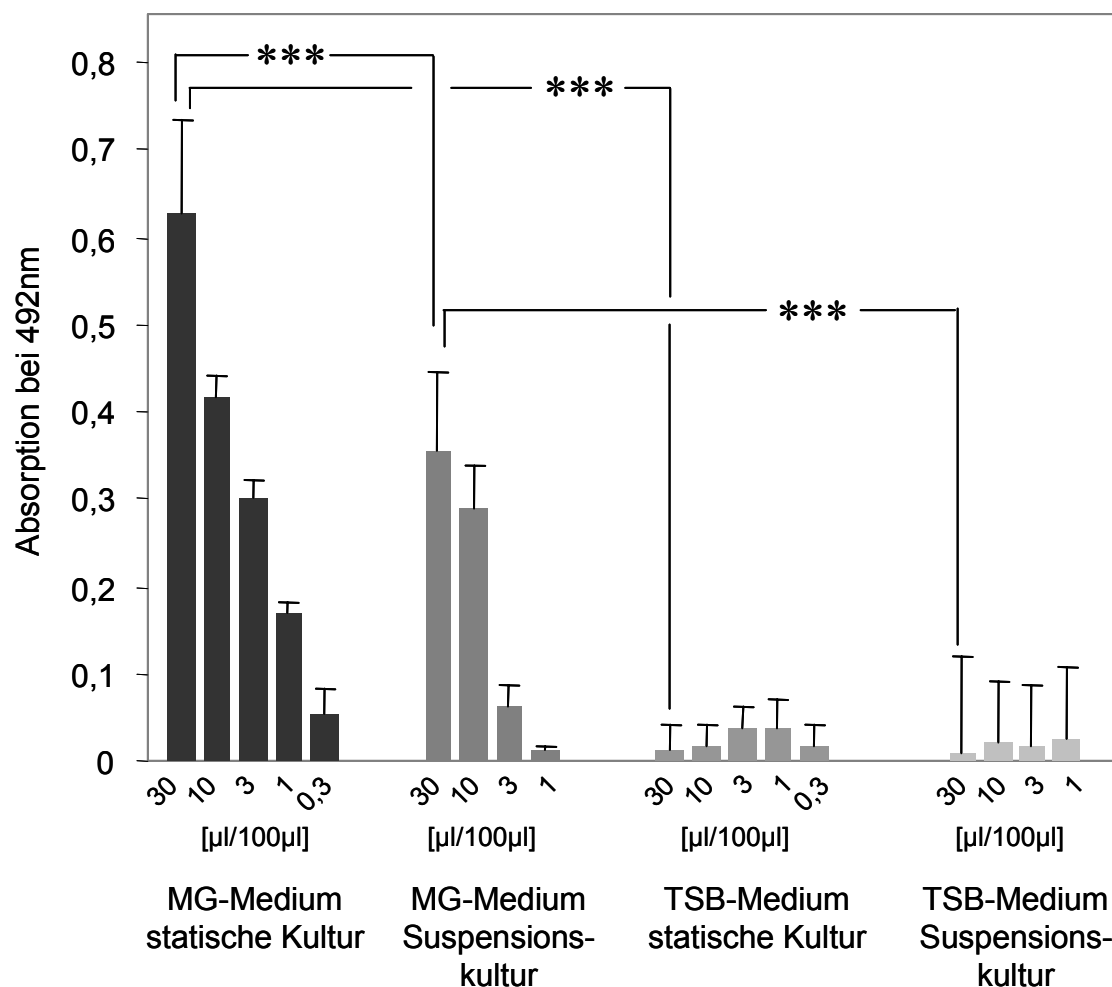
In weiterführenden Studien zur Morphologie von *P. aeruginosa* sollte geklärt werden, ob auch das verwendete Kulturmedium einen Einfluss auf die mukoide Morphologie von *P. aeruginosa* haben könnte. Abb. 4 verdeutlicht, dass diese Hypothese durch die Kultivierung der Bakterien unter Verwendung verschiedener Medien bestätigt werden konnte. So führte die Verwendung von MG-, TSB-, bzw. HP-Medium unter statischen Bedingungen zu einer intensiven Produktion mukoider Exopolysaccharide und somit zu mukoiden Phänotypen („Schleimstrukturen“ in den Kulturflaschen, Abb. 4B). Erfolgte stattdessen eine Kultivierung in AG- oder M9-Medium, so zeigte sich eine grünliche (AG-Medium) bzw. eine bräunliche (M9-Medium) Verfärbung der Bakterienkulturen und keine Ausbildung der mukoiden

Form. Wurden *P. aeruginosa*-Bakterien unter Schütteln, also als Suspensionskulturen inkubiert, so konnte bei keiner der untersuchten Medienarten eine Ausbildung der mukoiden Morphologie nachgewiesen werden (s. Abb. 4A). Aber auch hier führte die Verwendung von AG- bzw. M9-Medium zu der schon bei statischen Kulturbedingungen beschriebenen Verfärbung der Kulturen.



**Abb. 4 Die Morphologie von *P. aeruginosa* bei Verwendung verschiedener Nährmedien als Suspensionskulturen oder unter statischen Kulturbedingungen:** Während eine 24-stündige Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 33354 unter statischen Kulturbedingungen in MG, TSB-, und HP-Medium zu einer Expression mukoider Exopolysaccharide führte (Abbildung B, obere Reihe, „Schleimstrukturen“), zeigten entsprechende AG- bzw. M9-Kulturen keine mukoide Morphologie (Abbildung B, untere Reihe), Kultivierungen von *P. aeruginosa* als Suspensionskulturen führten bei sämtlichen untersuchten Medien zu einer homogenen Bakteriensuspension, die keine mukoide Morphologie aufwies (Abbildung A).

In anschließenden Untersuchungen wurden die Bedingungen zur Ausbildung der adhärennten Biofilm-bildenden Form von *P. aeruginosa* ermittelt (adaptiert nach der Methode von (Thomas et al., 1997; s. 2.11.1). Hierzu wurden *P. aeruginosa*-Bakterien als statische Kulturen bzw. Suspensionskulturen in MG- oder TSB-Medium inkubiert. Die adhärennten Bakterienzellen wurden durch WGA-gekoppelte Peroxidase, die spezifisch an das N-Acetyl-Glukosamin der extrazellulären Matrix bakterieller Biofilme bindet, in einem „Enzyme-linked lectinsorbent Assay“ (ELLA) quantifiziert.



**Abb. 5 Die Ausbildung des adhärennten Phänotyps durch *P. aeruginosa* ist von den Kultivierungsbedingungen abhängig:** *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurden für 24 Std. als Suspensionskultur in TSB-Medium kultiviert. Die Zellpräzipitate wurde in MG- bzw. TSB-Medium resuspendiert, auf Konzentrationen von 30, 10, 3, 1 und 0,3 µl/100µl verdünnt und als statische Kulturen bzw. Suspensionskulturen für 24 Std. inkubiert. Anschließend wurde die Ausbildung der adhärennten Form durch den „enzyme-linked lectinsorbent assay“ (ELLA; S. Abschnitt 2.11.1) nach (Thomas et al., 1997) bestimmt. Angegeben ist der Mittelwert aus 12 Versuchsansätzen mit der entsprechenden Standardabweichung Die Signifikanz wurde unter Verwendung des Student-T-Tests ermittelt ( $p < 0,001$ ). Der Substratumsatz wurde photometrisch bei 492 nm gemessen.  $OD < 0,15$ : keine Biofilmbildung;  $OD 0,15 - 0,3$ : geringe Biofilmbildung;  $OD 0,3 - 0,6$ : moderate Biofilmbildung;  $OD > 0,6$ : starke Biofilmbildung.

Es zeigte sich, dass die Ausbildung adhärenter Phänotypen durch *P. aeruginosa* ebenfalls von den Kulturbedingungen abhängig zu sein scheint (Abb. 5). Während bei der Kultivierung verschiedener Konzentrationen der Bakterien in TSB-Medium unter statischen Bedingungen oder als Suspensionskultur keine adhärenenten Formen durch diesen Test nachweisbar waren (Absorption von 0,02 - 0,04 bei 492 nm), entwickelte sich bei den MG-Suspensionskulturen nach der Klassifizierung des ELLA-Tests eine moderate Ausbildung des adhärenenten Phänotyps (Absorption bei max. 0,35). Die Ausbildung adhärenter Zellen konnte noch einmal signifikant gesteigert werden, wenn die Bakterien unter statischen Kulturbedingungen in MG-Medium inkubiert wurden (Absorption max. 0,63).

Mikroskopische Studien bestätigten, dass es sich bei dem adhärenenten Phänotyp um Bakterienzellen handelte, die in komplexen Biofilmen organisiert sind, während es sich bei den untersuchten TSB-Kulturen vornehmlich um solitäre, planktonische Zellen handelt (Daten nicht gezeigt).

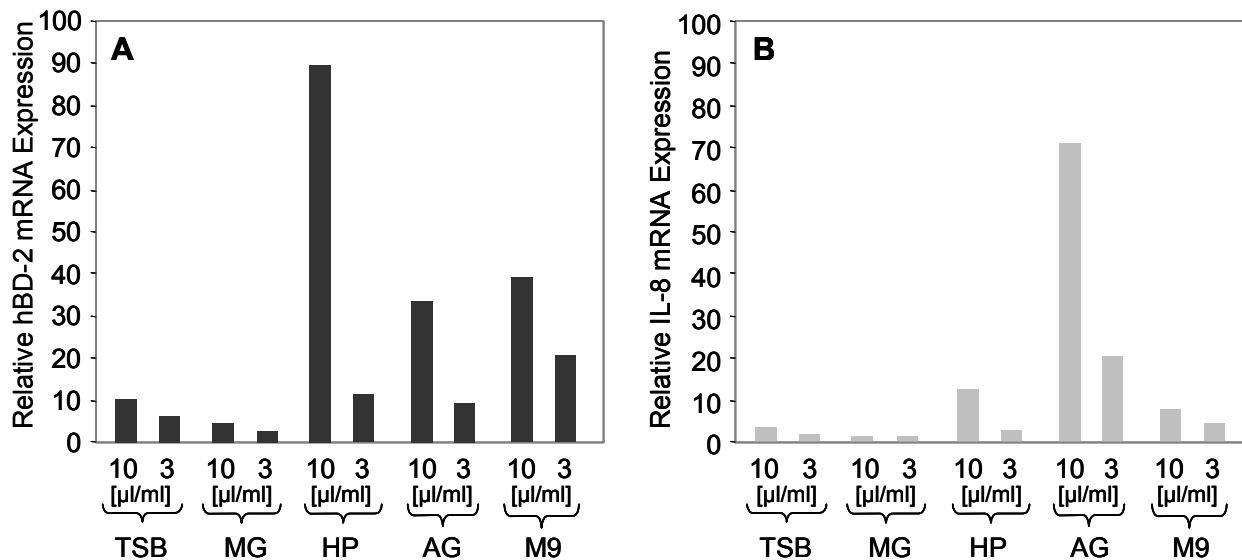
## **3.2 Untersuchungen zur Induktion von Abwehrfunktionen epithelialer Zellen durch Mikroorganismen**

### **3.2.1 Die Induktion epithelialer antimikrobieller Proteine (AP) und proinflammatorischer Zytokine (PZ) in Keratinozyten durch Gram-negative Bakterien ist abhängig von deren Kultivierungsbedingungen**

Nachdem die Kultivierungsbedingungen ermittelt worden waren, unter denen *P. aeruginosa* reproduzierbar eine mukoide, adhärenente Morphologie bildet (MG-Medium, statische Kultur), wurde nun überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Morphologie und der Synthese von Induktoren epithelialer antimikrobieller Proteine (AP) und proinflammatorischer Zytokine (PZ) durch *P. aeruginosa* besteht. Einen ersten Hinweis darauf gab bereits die Induktion von hBD-2 in Keratinozyten durch ein mukoides klinisches Isolat im Rahmen der Untersuchungen in der eigenen Diplomarbeit.



Um diese Hypothese zu prüfen, wurde zunächst *P. aeruginosa* ATCC 33354 in verschiedenen Medien kultiviert<sup>1</sup>, um so Hinweise auf den Einfluss der Komponenten des Kulturmediums für die Synthese des bakteriellen hBD-2-Induktors zu untersuchen. Abb. 6 zeigt die Induktion der hBD-2 mRNA Expression<sup>2</sup> und zum Vergleich die Induktion der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-8.



**Abb. 6 Die hBD-2- und IL-8-Induktion durch Kulturüberstände von *P. aeruginosa* sind abhängig vom verwendeten Bakterienkulturmedium:** HaCaT-Kulturen wurden mit Konzentrationen von 10 µl/ml bzw. 3 µl/ml sterilfiltrierter Kulturüberstände (ATCC 33354; Suspensionskulturen) für 20 Std. inkubiert und die mRNA Expression für hBD-2 (A) und IL-8 (B) quantitativ bestimmt. Als Kulturmedien wurden TSB-, MG-, HP-, AG- und M9-Medien verwendet (s. 2.4). Dargestellt ist ein charakteristisches Ergebnis von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Es zeigte sich, dass die Zusammensetzung der Nährmedien einen Einfluss auf die Synthese der hBD-2- und IL-8-induzierenden Faktoren durch *P. aeruginosa* aufwies. Die Verwendung des HP-Mediums führte zur höchsten hBD-2-Induktion (maximal 90-fach), während bei Gebrauch des TSB- bzw. MG-Mediums nur eine sehr geringe

<sup>1</sup> In den durchgeführten Versuchen wurden, wenn nicht anders beschrieben, stets Kulturüberstände der stationären Phase (24-stündige Kultivierung) verwendet. Die Bakteriendichte in einem definierten Kulturvolumen wurde photometrisch bestimmt, so dass eine Quantifizierung der induzierenden Aktivitäten von verschiedenen Kulturüberständen möglich war. Als unstimulierte Kontrollen dienten in den Experimenten die Kulturmedien in den entsprechenden Konzentrationen.

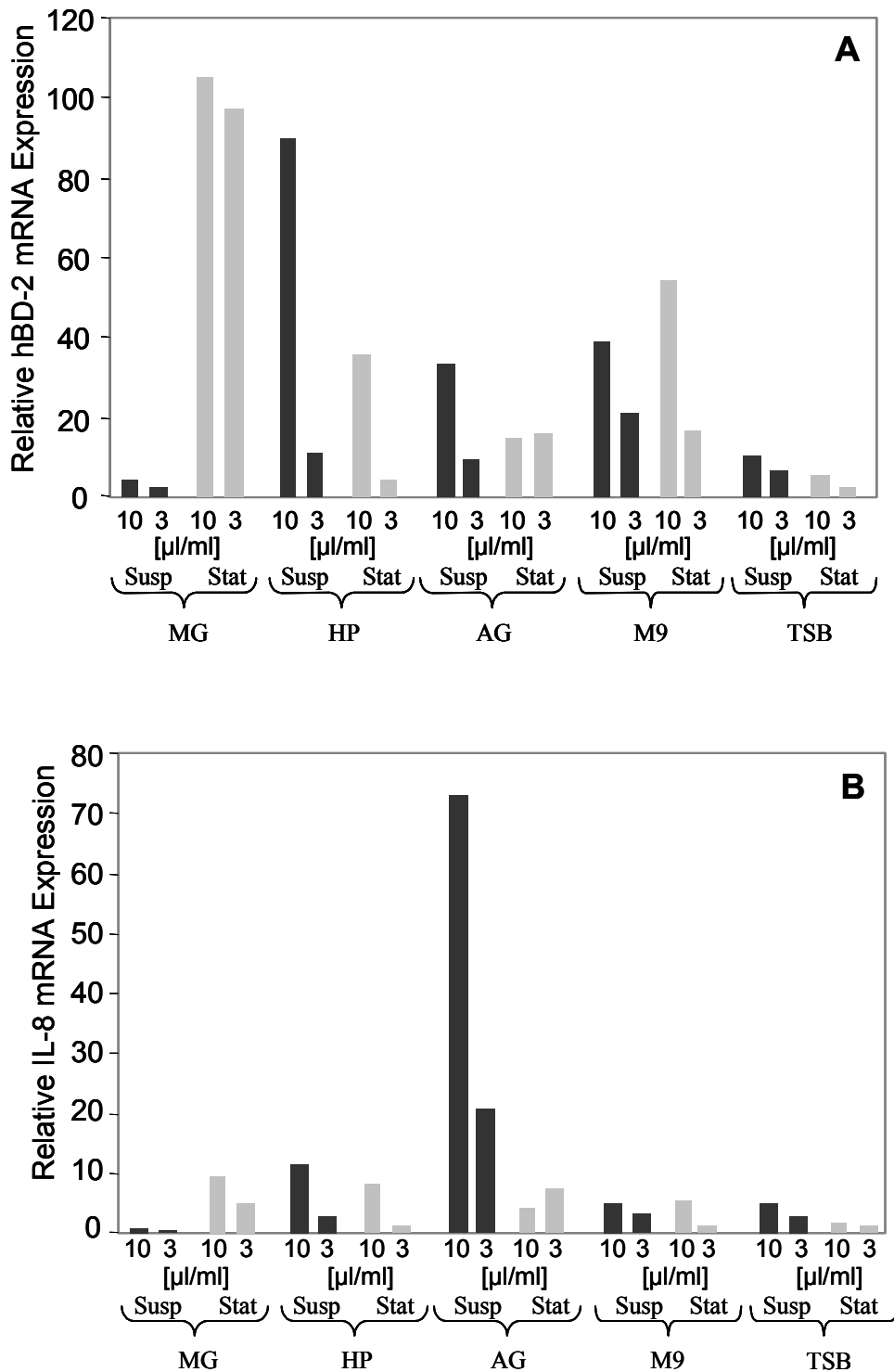
<sup>2</sup> Im Folgenden wird für den Ausdruck „Induktion der hBD-2 mRNA Expression“ die Bezeichnung „hBD-2-Induktion“ verwendet. Gleiches gilt für die entsprechenden Bezeichnungen bei Elafin, IL-8 usw. Die relative mRNA Expression bezieht sich dabei stets auf den entsprechenden Kontrollansatz.

Induktion nachweisbar war (maximal 10- bzw. 5-fach). Bemerkenswert ist zudem, dass die induzierenden Aktivitäten in den Kulturüberständen unterschiedliche Titer aufwiesen. So wurde durch eine Konzentration von 3  $\mu$ l HP-Überstand/ml nur noch eine ca. 10-fache hBD-2-Expression, durch M9-Überstände jedoch eine ca. 25-fache Expression induziert. Interessanterweise ergaben sich hingegen für die Induktion von IL-8 durch die untersuchten Überstände andere Expressionsmuster. Bei der Verwendung von AG-Medium fand sich eine bis zu 70-fache IL-8-Induktion, während bei Stimulationen mit HP- bzw. M9-Überständen nur eine ca. 10-fache Induktion festgestellt wurde. Bei der Inkubation von Keratinozyten mit MG-Suspensionskulturüberständen konnte keine IL-8-Induktion ermittelt werden.

Diese Befunde ließen nun die Frage aufkommen, ob weitere Faktoren (neben der verwendeten Medienart) ebenfalls einen Einfluss auf die Synthese der hBD-2- bzw. IL-8-induzierenden Faktoren durch *P. aeruginosa* haben. Da beobachtet worden war, dass unter statischen Kulturbedingungen die untersuchten *P. aeruginosa*-Stämme in der Morphologie einem klinischen Isolat ähnelten, sollte nun die Induktion von AP bzw. PZ in HaCaT-Keratinozyten durch Überstände statischer Kulturen mit Suspensionskulturen verglichen werden.

In Abb. 7 ist die hBD-2- und IL-8-Induktion der verschiedenen Kulturüberstände des Stammes ATCC 33354 unter statischen Bedingungen bzw. als Suspensionskultur dargestellt. Besonders auffällig war der Unterschied der hBD-2-Induktion durch MG-Überstände von Suspensionskulturen bzw. statischen Kulturen (Abb. 7A). Die Kultivierung unter statischen Bedingungen führte bei Inkubationen von HaCaT-Keratinozyten mit den Überständen zu einer ca. 100-fachen hBD-2-Induktion, während die Überstände der entsprechenden Suspensionskulturen nur eine 2-4-fache Induktion verursachten. Interessanterweise führten unterschiedliche Konzentrationen des MG-Kulturüberstandes aus statischen Kulturen (10  $\mu$ l/ml oder 3  $\mu$ l/ml) zur gleichen hBD-2-Induktion in HaCaT-Zellen.

Untersuchungen der Induzierbarkeit von IL-8 in HaCaT-Keratinozyten durch diese Kulturüberstände führten hingegen zu anderen Ergebnissen (Abb. 7B).

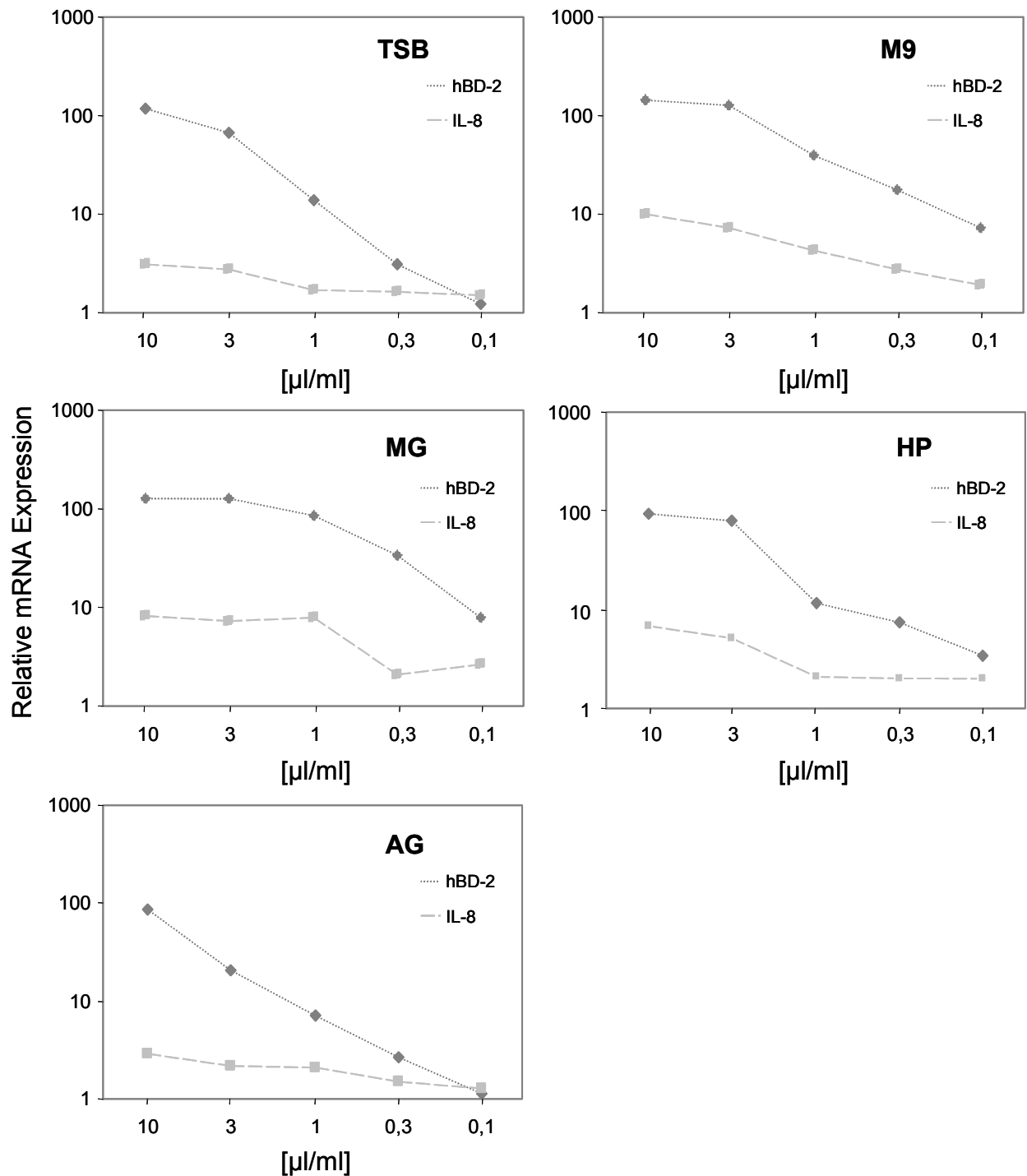


**Abb. 7** *HBD-2- und IL-8-Induktion in HaCaT-Keratinozyten durch Überstände statischer Kulturen und Suspensionskulturen von *P. aeruginosa**: Inkubationen der HaCaT-Keratinozyten wurden mit 10 µl/ml bzw. 3 µl/ml der sterilfiltrierten Kulturüberstände (ATCC 33354) durchgeführt und die hBD-2- (A) bzw. IL-8-(B) mRNA Expression anschließend quantitativ bestimmt. Es wurden Suspensionskulturen (=Susp) und statische Kulturen (=Stat) unter Verwendung von 5 verschiedenen Medien (MG, HP, AG, M9, TSB) verwendet. Das dargestellte Ergebnis ist ein typisches Resultat von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen.

Es zeigte sich, dass beim Vergleich der IL-8-Induktion durch TSB-, HP- und M9-Überstände von Suspensionskulturen bzw. statischen Kulturen nur geringfügige Unterschiede feststellbar waren. Dahingegen ergab sich beim Einsatz des MG-Mediums für die Überstände der Suspensionskulturen hingegen eine geringere Induktion von IL-8 (max. 1,5-fach) als durch die statischen Kulturüberstände (max. 10-fach). Die Verwendung von AG-Medium resultierte in einer höheren IL-8-Induktion durch Überstände von Suspensionskulturen (max. 75-fach) im Vergleich zu entsprechenden Überständen statischer Kulturen (max. 10-fach).

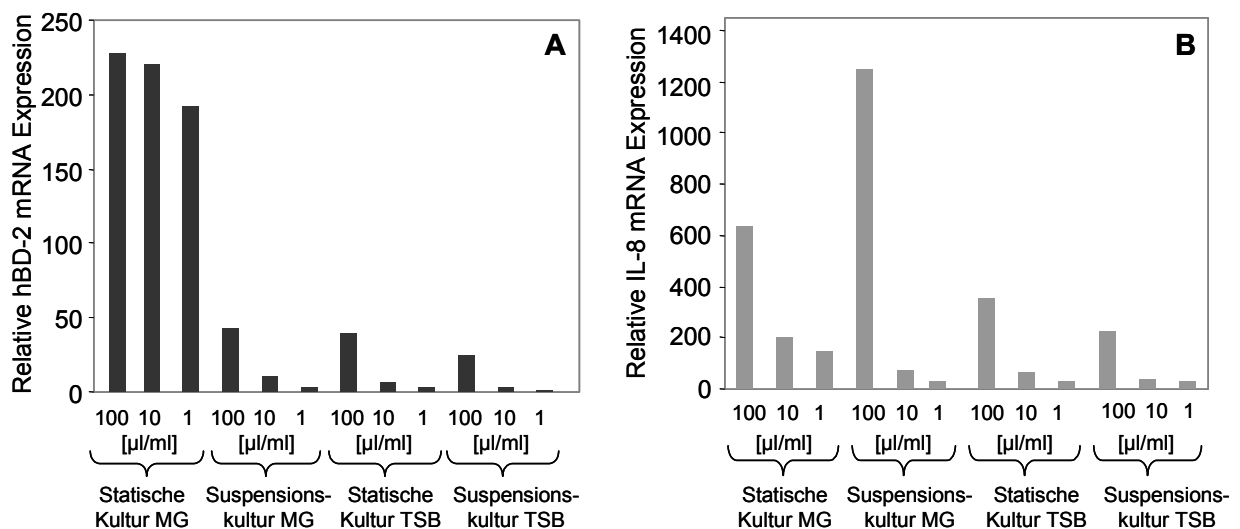
Um zu überprüfen, ob diese Befunde nicht nur für eine immortalisierte Zelllinie (HaCaT-Keratinocyten) gelten, wurden entsprechende Stimulationsexperimente auch mit primären Hautkeratinocyten durchgeführt.

Abb. 8 zeigt, dass bei allen untersuchten Kulturüberständen eine höhere maximale hBD-2-Induktion (ca. 100-fach) als IL-8-Induktion (ca. 10-fach) zu beobachten war. Die Untersuchung unterschiedlicher Konzentrationen dieser Überstände ergab jedoch, dass die IL-8-Induktion bei Inkubationen mit geringeren Konzentrationen nur wenig niedriger ausfiel (von ca. 10-fach auf ca. 2-fach). Die hBD-2-Induktion hingegen nahm deutlich ab (von ca. 100-fach auf bis zu ca. 2-fach), so dass sich die Titrationskurven von IL-8- und hBD-2-induzierender Aktivität bei niedrigeren Konzentrationen angleichen. Inkubationen von primären Keratinocyten mit MG- bzw. M9-Kulturüberständen erzielten jedoch auch bei Konzentrationen von 1 µl Überstand/ml noch eine nahezu 100-fache Induktion von hBD-2. Selbst bei einer 1:10000-fachen Verdünnung (0,1 µl/ml) dieser Kulturüberstände wurde noch eine Induktion von hBD-2 (jeweils ca. 10-fach) nachgewiesen.



**Abb. 8 HBD-2- und IL-8-Induktion in primären Keratinozyten durch verschiedene Kulturüberstände von *P. aeruginosa*:** Kulturen primärer Keratinozyten wurden mit Konzentrationen von 10  $\mu\text{l/ml}$ , 3  $\mu\text{l/ml}$ , 1  $\mu\text{l/ml}$ , 0,3  $\mu\text{l/ml}$  und 0,1  $\mu\text{l/ml}$  sterilfiltrierter Kulturüberstände (statische Kulturen; ATCC 33354) für 20 Std. inkubiert und die hBD-2- bzw. IL-8 mRNA Expression quantitativ bestimmt. Es wurden 5 verschiedene Kulturmedien untersucht (TSB, MG HP AG und M9). Die Darstellung der Induktionen ist logarithmisch aufgetragen und zeigt ein typisches Ergebnis von 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

Um zu klären, welchen Einfluss kurzzeitige Inkubationen primärer Keratinozyten mit *P. aeruginosa*-Kulturüberständen auf die Expression von hBD-2 bzw. IL-8 haben, wurden 6-stündige Inkubationen mit verschiedenen Kulturüberständen durchgeführt. Dazu wurden primäre Keratinozyten mit MG- und TSB-Kulturüberständen statischer Kulturen (MG-Medium: höchste beobachtete hBD-2-Induktion in primären Keratinozyten nach 20-stündiger Stimulation) bzw. von Suspensionskulturen (TSB-Medium: niedrigste beobachtete hBD-2-Induktion in primären Keratinozyten) stimuliert.

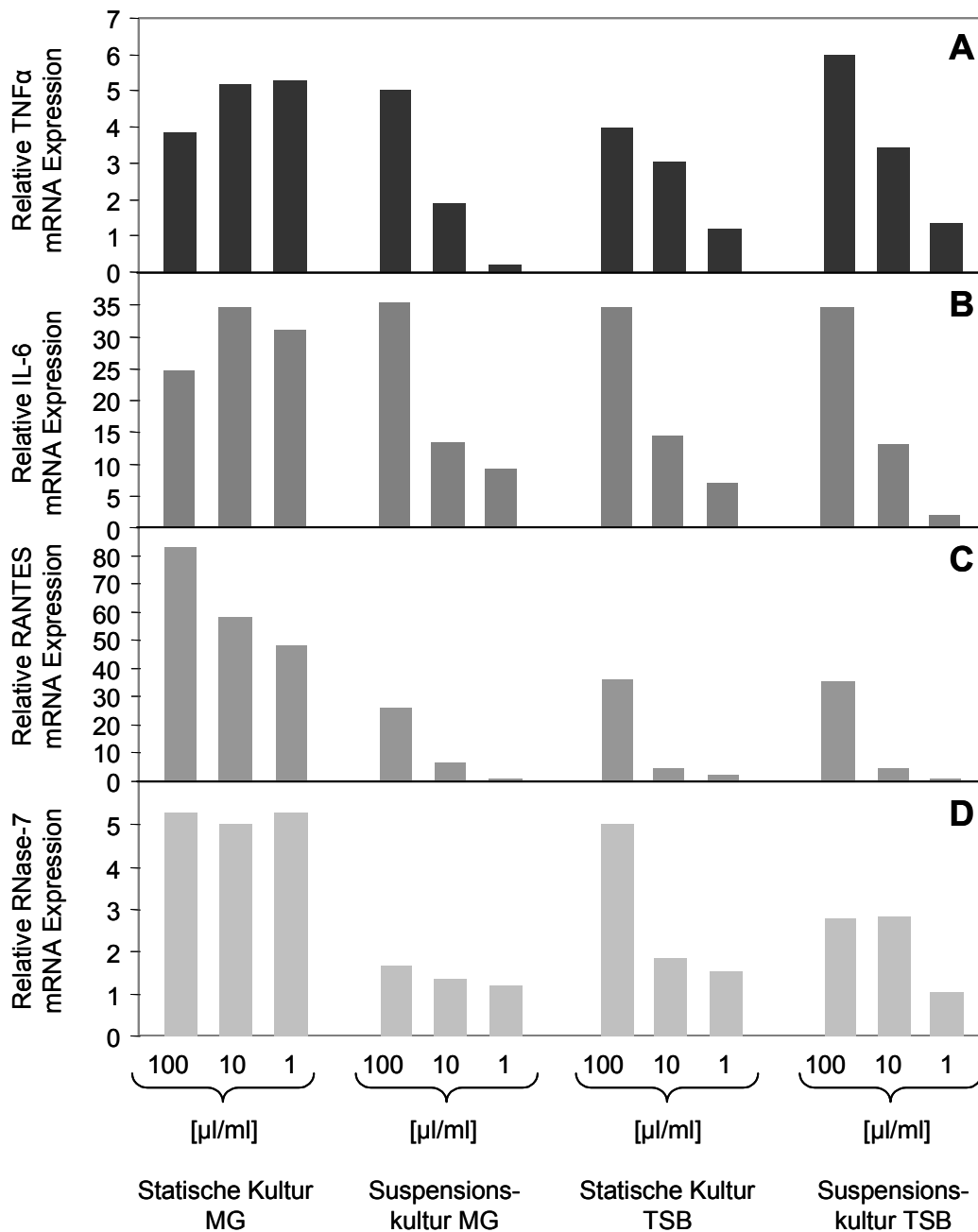


**Abb. 9 HBD-2- bzw. IL-8-Induktion in primären Keratinozyten durch 6-stündige Inkubationen mit *P. aeruginosa* Kulturüberständen:** Primäre Keratinozyten wurden für 6 Std. mit verschiedenen Konzentrationen (100 µl/ml, 10 µl/ml, und 1 µl/ml) von Überständen statischer Kulturen bzw. Suspensionskulturen inkubiert (ATCC 33354). Als Bakterienmedien wurden MG- und TSB-Medium verwendet. Anschließend wurde die hBD-2- (A) bzw. IL-8- (B) mRNA Expression quantitativ bestimmt. Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Die Inkubationen mit Bakterienüberständen verdeutlichten, dass in primären Keratinozyten auch nach 6-stündigen Inkubationen die hBD-2- bzw. IL-8-Induktionen durch *P. aeruginosa*-Überstände abhängig von den Kultivierungsbedingungen waren (Abb. 9). Für die hBD-2-Induktion zeigte sich, dass die statischen Kulturbedingungen unter Verwendung des MG-Mediums nicht nur zu einer über 200-fachen Induktion führten, sondern dass auch eine 100-fache Verdünnung nicht zu einer Abnahme dieser Induktion führte (entspricht einer Stimulationskonzentration von 1 µl Kulturüberstand/ ml Zellmedium).

Untersuchungen der IL-8-Expression ergaben maximal eine 600-fache Induktion durch 6-stündige Inkubationen mit statischen Kulturüberständen und eine 1200-fache Induktion durch Überstände von Suspensionskulturen. Überstände statischer Kulturen führten beim Einsatz geringerer Konzentrationen (1 µl/ml) noch zu einer 200-fachen Induktion von IL-8. Entsprechende Konzentrationen von Überständen der Suspensionskulturen induzierten hingegen keine IL-8 Expression.

Um zu überprüfen, ob auch die Expression anderer AP und PZ durch die Kulturbedingungen der Bakterien beeinflusst wird, wurde die Induktion von RNase-7 (ein antimikrobielles Protein; AP) sowie von TNF $\alpha$ , IL-6 und RANTES (proinflammatorische Zytokine; PZ) in primären Keratinozyten durch bakterielle Kulturüberstände nach einer 6-stündigen Inkubation untersucht. Die TNF $\alpha$ - und RNase-7-Expression wurde selbst bei der höchsten Verdünnung der MG-Kulturüberstände statischer Kulturen (1 µl Überstand / ml) noch maximal 5-fach induziert (Abb. 10). Für IL-6 wurde unter diesen Bedingungen eine bis zu 35-fache Induktion und für RANTES eine maximal 80-fache Induktion festgestellt. Vergleicht man die Induzierbarkeit der untersuchten Faktoren durch die Stimulationskonzentration von 1 µl Bakterienüberstand / ml, so zeigte sich, dass für jeden der untersuchten Faktoren die höchste Induktion - wie schon für hBD-2 und IL-8 gefunden – durch eine Inkubation mit MG-Überständen statischer Kulturen erreicht werden konnte.



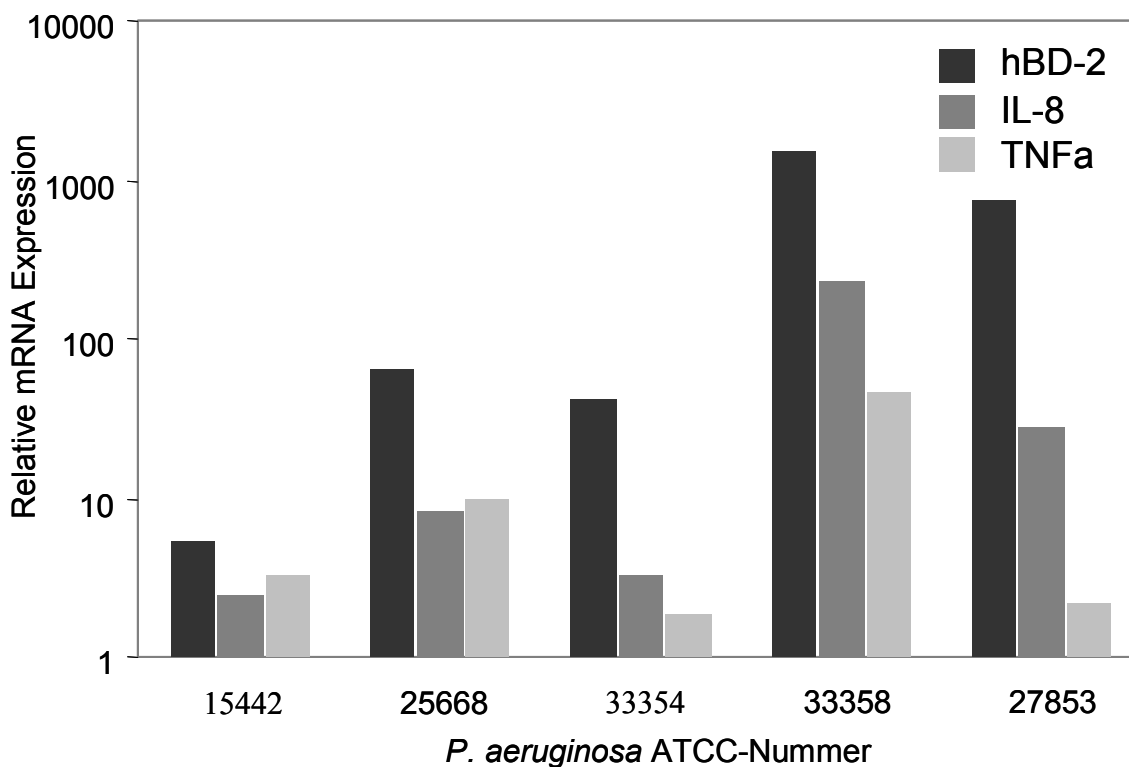
**Abb. 10 Induktion von TNF $\alpha$ , IL-6, RANTES und RNase-7 in primären Keratinozyten durch *P. aeruginosa*-Kulturüberstände:**-Kulturen primärer Keratinozyten wurden mit Konzentrationen von 100 µl/ml, 10 µl/ml bzw. 1 µl/ml der Kulturüberstände (ATCC 33354) für 6 Std. inkubiert und die mRNA Expression für TNF $\alpha$  (A), IL-6 (B), RANTES (C) und RNase-7 (D) quantitativ bestimmt. Die Abbildung zeigt das typische Ergebnis von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Abhängigkeit der Induktion von AP und PZ in Keratinozyten auch durch die Verwendung von Überständen verschiedener *P. aeruginosa*- ATCC-Stämme gegeben ist.



Abb. 11 verdeutlicht, dass MG-Überstände statischer Kulturen verschiedener *P. aeruginosa* ATCC-Stämme eine unterschiedliche Induktion von hBD-2, IL-8 und TNF $\alpha$  in primären Hautkeratinozyten bewirkten.

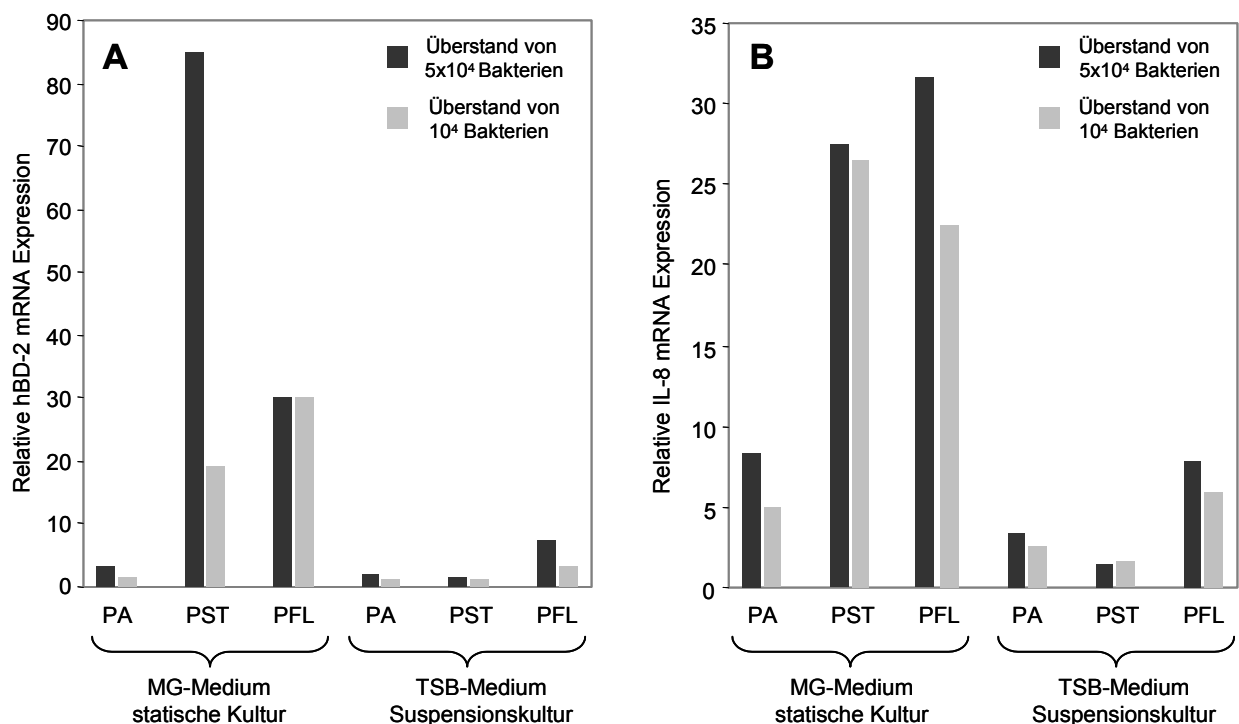
So zeigte sich beispielsweise, dass eine Inkubation mit Überständen von Stamm ATCC 15442 nur zu einer 5-8-fachen Induktion von hBD-2, IL-8 und TNF $\alpha$  führte, während eine Inkubation mit Überständen von Stamm ATCC 33358 eine ca. 100-fache Induktion von IL-8 und TNF $\alpha$  und eine über 1000-fache Induktion von hBD-2 verursachte. Auffällig war dabei, dass die hBD-2-Induktion im Vergleich zur Induktion der PZ stets höher ausfiel. So wurde z.B. durch Überstände von Stamm ATCC 27853 eine 1000-fache hBD-2-Induktion nachgewiesen, während die Induktion der Entzündungsmediatoren IL-8 (50-fach) und TNF $\alpha$  (3-fach) deutlich geringer ausfiel.



**Abb. 11 Induktion von hBD-2, IL-8 und TNF $\alpha$  in primären Keratinozyten durch Überstände verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme:** Primäre Keratinozyten wurden für 6 Std. mit 100 $\mu$ l/ml sterilfiltrierter Überstände verschiedener *P. aeruginosa* ATCC-Stämme inkubiert und die mRNA Expression von hBD-2, IL-8 und TNF $\alpha$  quantitativ bestimmt. Für die Kultivierung der Bakterien (angegeben mit der jeweiligen ATCC-Nummer) wurden statische Bedingungen und MG-Medium verwendet. Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis von 5 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Darstellung ist logarithmisch aufgetragen.

Es stellte sich nun die Frage, ob die für verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme ermittelten Induktionen der AP und PZ auch bei weiteren *Pseudomonas*-Arten und anderen Gram-negativen Bakterien zu beobachten sind. Um dies zu überprüfen wurden Inkubationen von primären Keratinozyten mit Überständen der nicht-pathogenen *Pseudomonas*-Arten *P. stutzeri* und *P. fluorescens* sowie mit Überständen von *E. coli* durchgeführt.

Da die verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten unter identischen Kulturbedingungen aufwiesen (eigene Beobachtung), wurden die Bakteriendichten der verschiedenen Kulturen photometrisch bestimmt und die Keratinozyten jeweils mit einem Überstandsvolumen inkubiert, welches  $1 \times 10^4$  bzw.  $5 \times 10^4$  Bakterienzellen entsprach. So war es möglich, eine vergleichende Aussage zur Induktion von hBD-2 und IL-8 durch Überstände verschiedener *Pseudomonas*-Arten zu treffen.

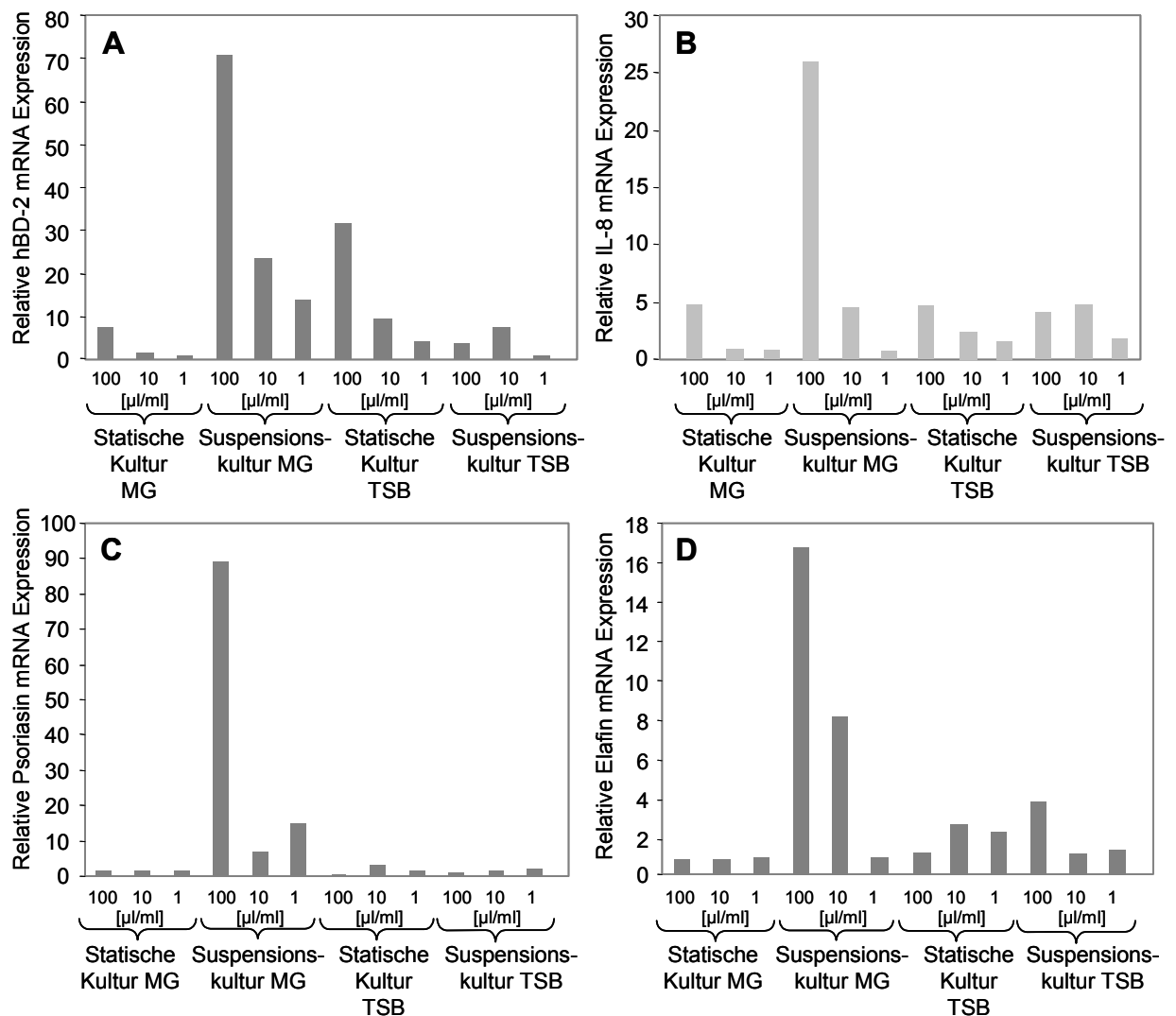


**Abb. 12 Induktion von hBD-2 und IL-8 durch Überstände von *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* und *P. fluorescens*:** HaCaT-Kulturen wurden für 6 Std. mit sterilfiltrierten Überständen der verschiedenen *Pseudomonas*-Arten inkubiert und die hBD-2- (A) bzw. IL-8- (B) mRNA Expression quantitativ ermittelt. Die verwendeten Überstandskonzentrationen entsprachen dabei jeweils  $5 \times 10^4$  bzw.  $10^4$  Bakterienzellen. Verwendet wurden dabei folgende Stämme: *P. aeruginosa* (PA) = ATCC 15442, *P. stutzeri* (PST) = ATCC 17588, *P. fluorescens* (PFL) = ATCC 13525. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 3 voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.

Wie Abb. 12 verdeutlicht, synthetisierten auch die nicht-pathogenen *Pseudomonas*-Arten *P. stutzeri* und *P. fluorescens* hBD-2- und IL-8-Induktoren. So fand sich bei der Verwendung von MG-Medium unter statischen Bedingungen bei *P. stutzeri* maximal eine 85-fache hBD-2- und eine ca. 25-fache IL-8-Induktion, während für *P. fluorescens* eine maximal ca. 30-fache hBD-2- bzw. IL-8-Induktion unter diesen Kultivierungsbedingungen gefunden wurde. Interessanterweise zeigte sich, dass Überstandsvolumina des opportunistisch wachsenden Erregers *P. aeruginosa*, die aus Kulturansätzen von  $1 \times 10^4$  bzw.  $5 \times 10^4$  Bakterienzellen stammten, im Vergleich zu den nicht-pathogenen Spezies *P. stutzeri* und *P. fluorescens* eine kaum nachweisbare hBD-2-Induktion bewirkte und nur eine ca. 10-fache IL-8-Induktion in Keratinozyten verursachte. Überstände von TSB-Suspensionskulturen ergaben für alle in diesem Zusammenhang untersuchten *Pseudomonas*-Arten maximal eine 10-fache Induktion von hBD-2 und IL-8. Morphologische Studien der *P. stutzeri* und *P. fluorescens*-Kulturen zeigten, dass auch bei diesen *Pseudomonas*-Arten die Ausbildung einer mukoiden Form durch MG-Medium und statische Bedingungen induziert wird (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden wurden nun Überstände unterschiedlich kultivierter *E. coli* untersucht, um zu ergründen, ob die beobachteten Phänomene auch bei Inkubationen mit Kulturüberständen anderer Gram-negativer Bakterien gelten. Es zeigte sich, dass Überstände von MG-Suspensionskulturen eine bis zu 70-fache hBD-2- und eine bis zu 25-fache IL-8-Induktion in Keratinozyten bewirkten. Hingegen führten Inkubationen mit den MG-Überständen statischer Kulturen nur zu einer 8-fachen hBD-2- und einer 5-fachen IL-8-Induktion (Abb. 13A und B). Diese Unterschiede zwischen statischen Kulturen und Suspensionskulturen waren bei Verwendung des TSB-Mediums jedoch nicht festzustellen.

Auch die Untersuchung der Induktion weiterer AP (Elafin, Psoriasin) durch diese Kulturüberstände ergab eine maximale Induktion durch MG-Suspensionsüberstände (Abb. 13C und D). Eine Induktion von Psoriasin (welches effektiv *E. coli* Bakterien abtötet) konnte ausschließlich durch Stimulation mit Überständen von MG-Suspensionskulturen erreicht werden (max. 90-fach). Es war durch keinen der anderen Kulturüberstände eine Erhöhung der Psoriasin Expression in Keratinozyten festzustellen. Für die Expression von Elafin fand sich eine max. Induktion (16-fach) durch Überstände von MG-Suspensionskulturen sowie eine geringfügige Induktion (ca. 4-fach) durch TSB-Kulturüberstände.

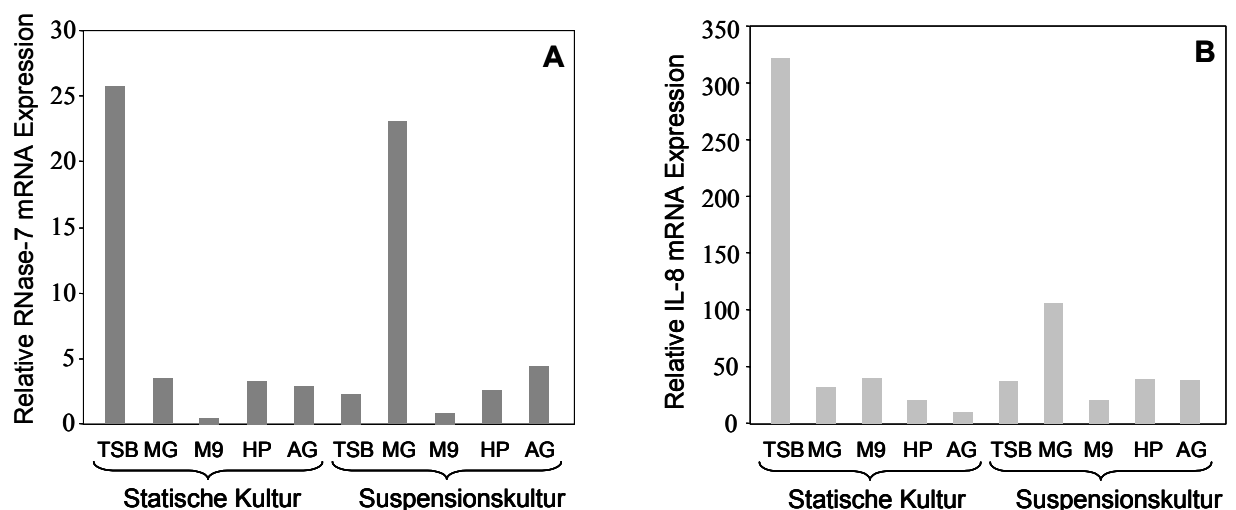


**Abb. 13 Induktion von hBD-2, IL-8, Psoriasisin und Elafin durch Kulturüberstände von *E. coli*:** Kulturen primärer Keratinozyten wurden für 6 Std. mit 100 µl/ml, 10 µl/ml und 1 µl/ml der sterilfiltrierten Überstände (ATCC 35218) inkubiert und anschließend die relative mRNA Expression für hBD-2 (A), IL-8 (B), Psoriasisin (C) und Elafin (D) gemessen. Das dargestellte Ergebnis konnte in 3 unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

Da man vermuten könnte, dass diese beobachteten Phänomene nicht nur spezifisch für Gram-negative Bakterien gelten, wurde nun untersucht, ob eine Induktion von AP und PZ durch Überstände Gram-positiver Bakterien ebenso von den verwendeten Kulturbedingungen der Bakterien abhängig ist.

### 3.2.2 Die Induktion von AP und PZ durch Gram-positive Bakterien ist abhängig von deren Kulturbedingungen

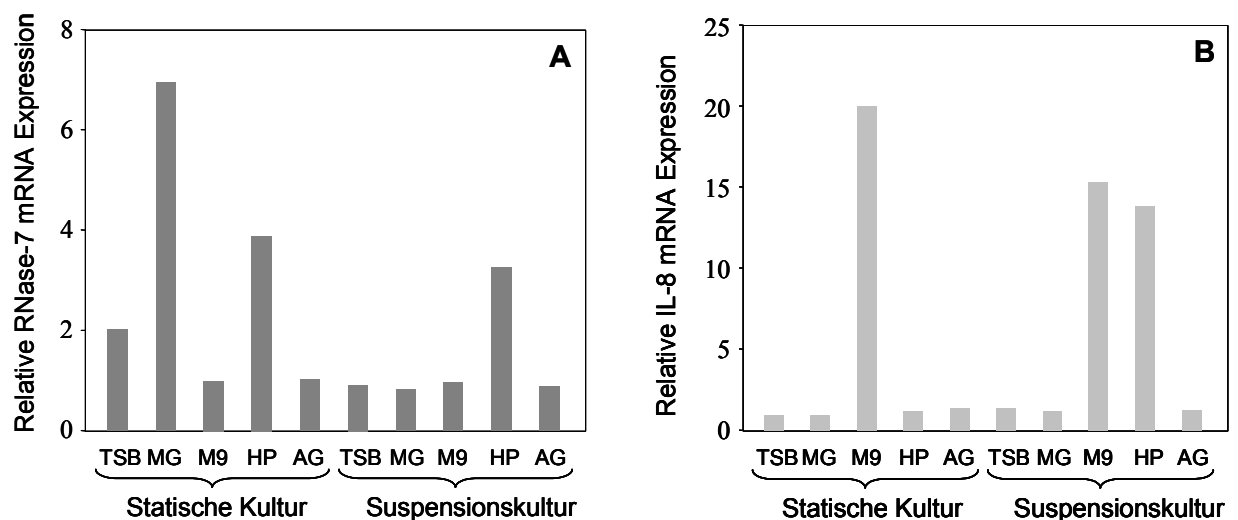
Um zu überprüfen, ob auch Kulturüberstände verschiedener Gram-positiver Bakterien (*S. aureus* und *S. pyogenes*) Induktoren für die hBD-2- und IL-8-Expression enthalten, wurden entsprechende Inkubationsversuche mit Keratinozyten vorgenommen. Es zeigte sich, dass hBD-2, welches primär eine Aktivität gegen Gram-negative Bakterien besitzt, durch keinen der verwendeten Überstände Gram-positiver Bakterien induzierbar war (Dr. Karin Haisch, pers. Mitteilung). Es stellte sich daher die Frage, ob eventuell andere AP mit antimikrobieller Aktivität gegen Gram-positive Bakterien durch Überstände unterschiedlich kultivierter Gram-positiver Bakterien (*S. aureus* und *S. pyogenes*) induziert werden.



**Abb. 14 Induktion von RNase-7 und IL-8 in Epithelzellen durch Kulturüberstände von *S. aureus*:** Primäre Keratinozyten wurden mit 20µl/ml sterilfiltrierter Kulturüberstände (ATCC 6538) von Suspensionskulturen bzw. statischen Kulturen für 6 Std. inkubiert und die mRNA Expression für RNase-7 (A) und IL-8 (B) quantitativ bestimmt. Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die Inkubationen von Keratinozyten mit Kulturüberständen von *S. aureus* zeigten, dass auch Gram-positive Erreger Induktoren für AP und PZ in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen synthetisierten (Abb. 14). Für die Expression von RNase-7 (ein AP mit hoher Aktivität gegen Gram-positive Erreger) in Keratinozyten ergab sich durch Inkubationen mit Überständen statischer TSB-Kulturen und von MG-Suspensionskulturen jeweils eine bis zu 25-fache Induktion. Inkubationen mit den Überständen der anderen Bakterienkulturen führten jedoch nur zu geringen (bis zu 5-

fachen) RNase-7-Induktionen. Für die Expression von IL-8 in Keratinozyten fand sich eine über 300-fache Induktion durch Überstände statischer TSB-Kulturen und eine ca. 100-fache Induktion durch MG-Überstände von Suspensionskulturen. Stimulationen mit Überständen von *S. aureus*, die unter anderen Kultivierungsbedingungen inkubiert wurden, resultierten in einer ca. 10-50-fachen IL-8-Induktion.



**Abb. 15 Die RNase-7- und IL-8-Induktion in Keratinozyten durch Kulturüberstände von *S. pyogenes*:** Kulturen primärer Keratinozyten wurden für 6 Std. mit 30 µl/ml sterilfiltrierten Kulturüberständen von *S. pyogenes* (ATCC 19615) inkubiert und anschließend die RNase-7- (A) bzw. IL-8- (B) mRNA Expression quantitativ ermittelt. Das dargestellte Ergebnis konnte in 3 unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

Um zu prüfen, ob auch andere Gram-positive Bakterien in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen AP und PZ induzieren, wurden anschließend entsprechende Inkubationsexperimente mit Überständen von *S. pyogenes* durchgeführt. Wie Abb. 15 veranschaulicht, zeigte sich bei diesen Experimenten, dass die RNase-7-Expression durch die Überstände statischer Kulturen von *S. pyogenes* bei Verwendung von MG-Medium (ca. 7-fache Induktion) bzw. M9-Medium (ca. 4-fache Induktion) induziert wird. Durch die Inkubationen mit Überständen von *S. pyogenes*-Suspensionskulturen konnte mit Ausnahme der HP-Überstände (ca. 3-fache Induktion) keine Induktion von RNase-7 in Keratinozyten festgestellt werden. Wurden die Bakterien unter statischen Bedingungen kultiviert, so war eine ca. 20-fache IL-8-Induktion bei Verwendung des M9-Mediums festzustellen, während bei Gebrauch der anderen Medien keine Induktion ermittelt werden konnte.

Überstände von Suspensionskulturen ergaben bei Verwendung von M9-Medium bzw. HP-Medium eine jeweils ca. 15-fache IL-8-Induktion. Der Gebrauch anderer Medien bei der Kultivierung verursachte in Keratinozyten keine IL-8-Induktion durch die entsprechenden Überstände.

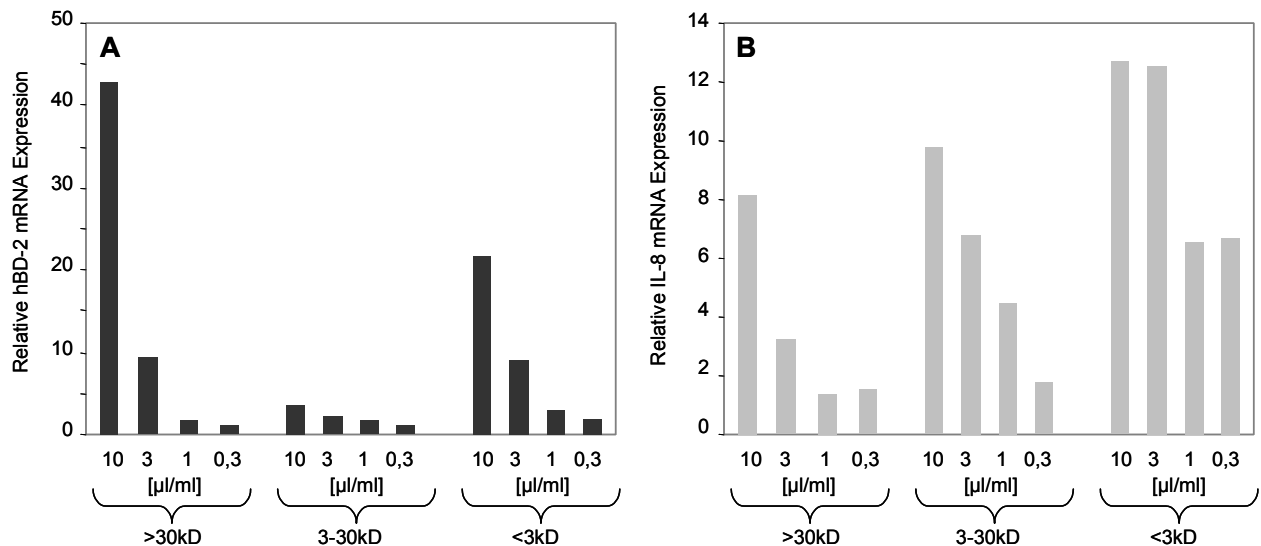
### **3.2.3 Biochemische Charakterisierung der AP- und PZ-Induktoren aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen**

Die Ergebnisse unter 3.2.1 zeigen, dass die Synthese der AP- und PZ-Induktoren je nach Kultivierungsbedingungen der Bakterien unterschiedlich ausfällt. Zur molekularen Analyse der AP- und PZ-induzierenden Faktoren wurden MG-Kulturüberständen statischer Kulturen verwendet. Diese Kulturüberstände wiesen hohe Konzentrationen hBD-2-induzierender Faktoren auf und verursachten gleichzeitig nur eine geringe IL-8-Induktion in Keratinozyten (vgl. Abb. 7A und B). Zudem vermochten diese Überstände auch bei hohen Verdünnungen noch die hBD-2-Expression in Keratinozyten zu induzieren (Abb. 8 und Abb. 8).

#### **3.2.3.1 AP-Induktoren von *P. aeruginosa* besitzen Molekularmassen von mehr als 30 kD und weniger als 3 kD**

Zur Bestimmung der Molekülgröße hBD-2-induzierender Faktoren wurden MG-Überstände statisch kultivierter *P. aeruginosa* über Filter mit einem unterschiedlichen „Cutoff“ separiert. Zunächst wurden die Überstände unter Verwendung eines 30 kD Filters konzentriert. Die Filtrate wurden anschließend mittels eines 3 kD Filters weiter fraktioniert. Anschließend wurden Keratinozyten mit den drei Fraktionen (>30 kD; 3-30 kD; <3 kD) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Abb. 16 verdeutlicht, dass der überwiegende Teil der hBD-2-induzierenden Faktoren in den Kulturüberständen unter diesen Bedingungen in den 30 kD Retentaten zu finden war (maximal ca. 40-fache hBD-2-Induktion). Während Inkubationen mit 3-30 kD-Fraktionen zu keiner hBD-2-Induktion führten, ergaben entsprechende Experimente mit den 3 kD-Filter-Durchläufen eine maximal 25-fache Induktion. IL-8 ließ sich hingegen durch alle drei Fraktionen in Keratinozyten induzieren. So wurde eine max. 8-fache Induktion durch 30 kD-Retentate, eine 10-

fache Induktion durch 3-30 kD Fraktionen und eine max. 12-fache Induktion durch 3 kD-Filterdurchläufe nachgewiesen. Eine Titration der Fraktionen ergab selbst bei einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{l}$  Überstand / ml bei Verwendung des 3 kD-Filterdurchlaufs noch eine 6-fache IL-8-Induktion.



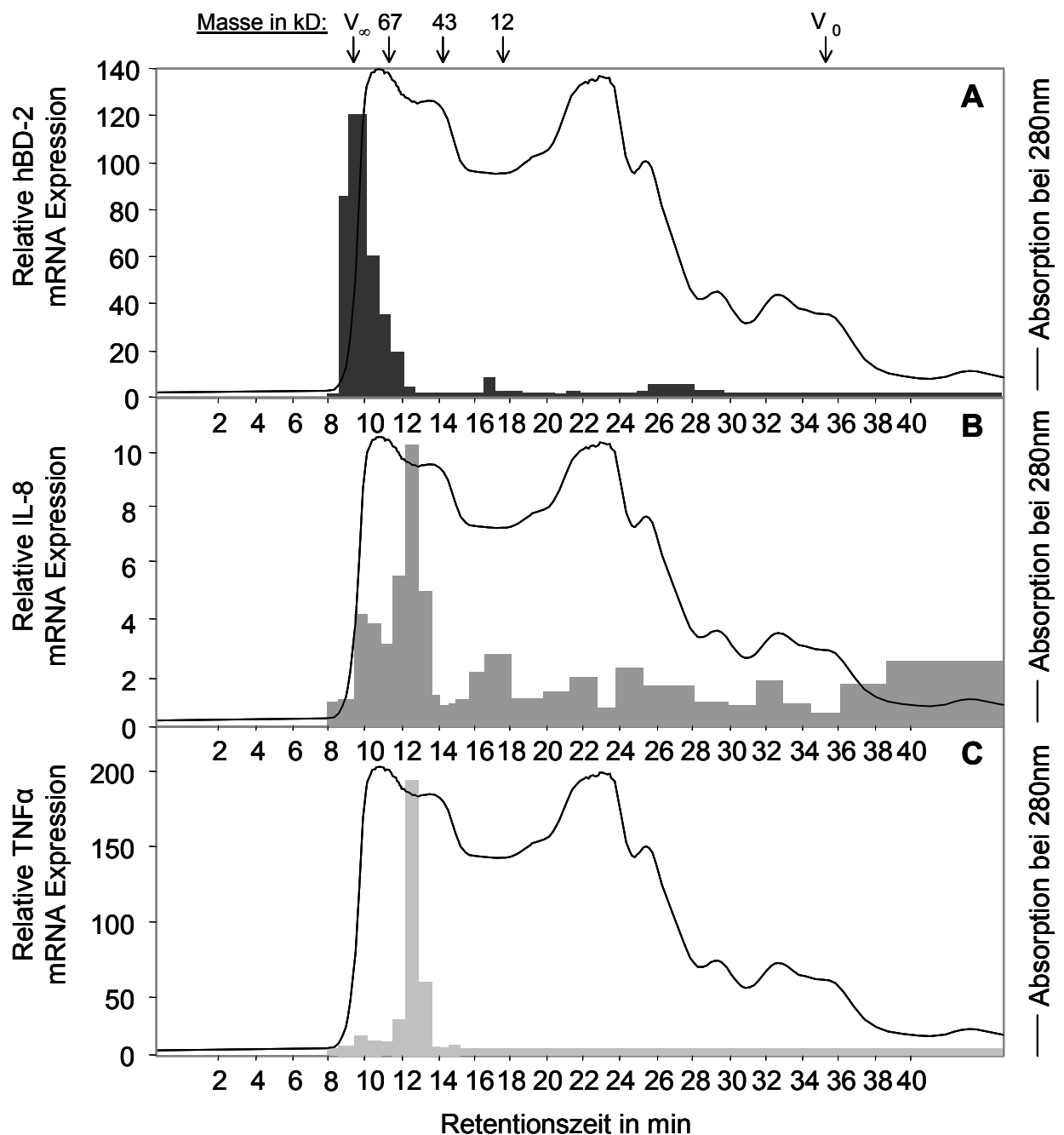
**Abb. 16 HBD-2- und IL-8-Induktion in Keratinozyten durch Fraktionen aus Größenfiltrationen von *P. aeruginosa* Kulturüberständen:** HaCaT-Kulturen wurden für 20 Std. mit 10  $\mu\text{l/ml}$ , 3  $\mu\text{l/ml}$ , 1  $\mu\text{l/ml}$  und 0,3  $\mu\text{l/ml}$  der jeweiligen Fraktionen inkubiert und die mRNA Expression von hBD-2 (A) und IL-8 (B) quantitativ bestimmt. Die Fraktionierung der Kulturüberstände (ATCC 33358, MG-Medium, statische Kultur) erfolgte in einer Amicon-Kammer unter Verwendung von Filtern mit einem „Cutoff“ von 30 kD bzw. 3 kD. Die Abbildung stellt das typische Ergebnisse von 5 voneinander unabhängigen Untersuchungen dar.

### 3.2.3.2 Größenausschlußchromatographie

Um weitere Erkenntnisse über die Molekülgröße der AP- bzw. PZ-induzierenden Faktoren zu erlangen, wurden MG-Kulturüberstände statischer Kulturen mittels Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration, s. 2.11.6.1) fraktioniert. Die HPLC-Fractionen wurden hinsichtlich ihrer hBD-2-, IL-8- und TNF $\alpha$ -induzierenden Eigenschaften in Inkubationsexperimenten von HaCaT-Keratinozyten überprüft. Es zeigte sich, dass eine maximale Eluierung der hBD-2-Induktoren bei einer Gelfiltration mittels Superdex 75 im vorderen Ausschlussvolumen erfolgte (Abb. 17). Dies entspricht einer Molekularmasse von mehr als 75 kD. Eine maximale Eluierung der IL-8-induzierenden Faktoren aus Überständen statischer MG-Kulturen wurde in Fraktionen registriert, die einer Molekularmasse von ca. 65 kD entsprachen. In



nahezu identischen Fraktionen ließ sich auch der Großteil TNF $\alpha$ -induzierender Faktoren nachweisen.



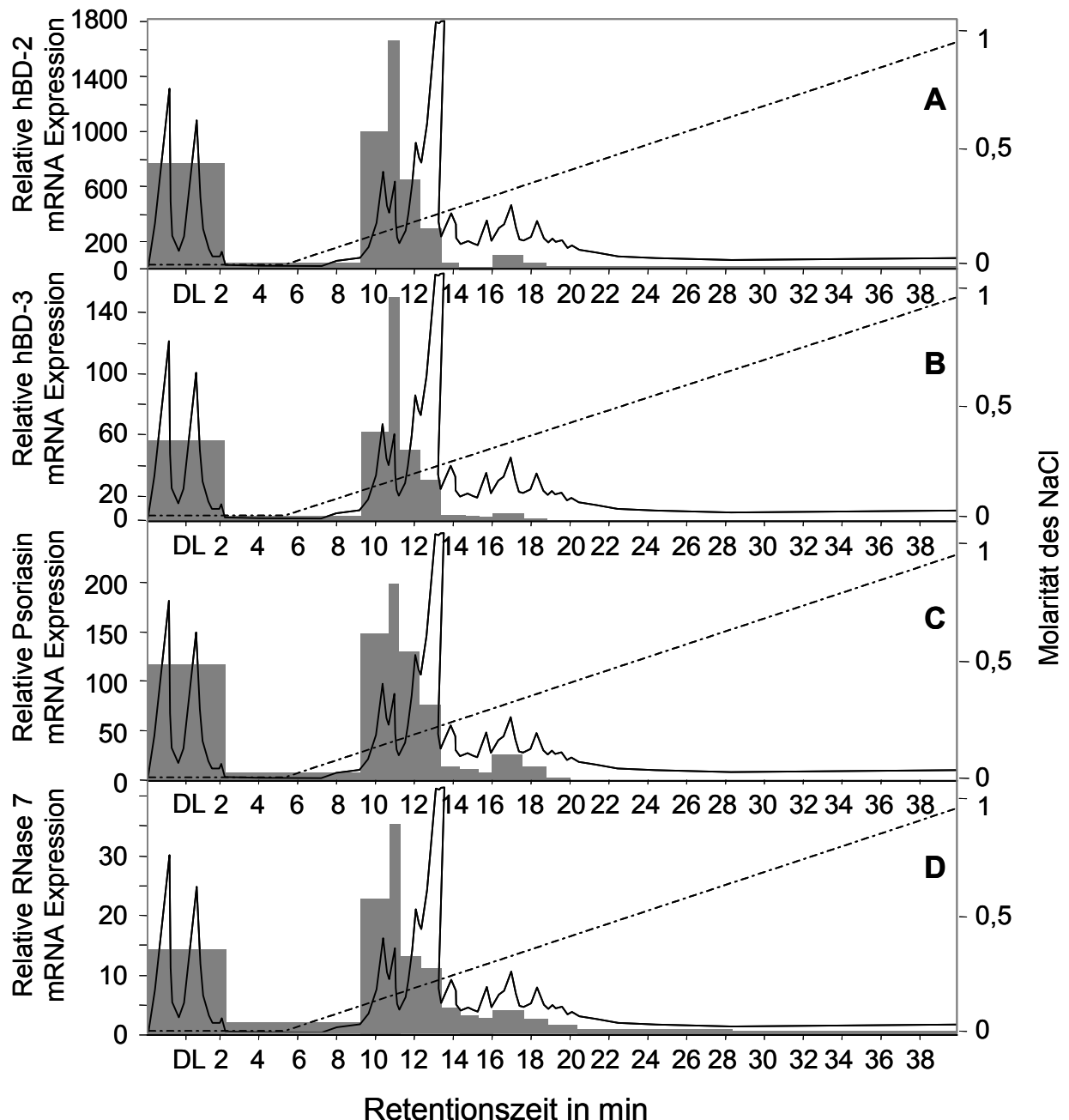
**Abb. 17 HBD-2-, IL-8- und TNF $\alpha$ -Induktoren in den Überständen von *P. aeruginosa* besitzen unterschiedliche molekulare Eigenschaften:** *P. aeruginosa* Kulturüberstände (ATCC 33358, MG-Medium, statische Bedingungen) wurden unter Verwendung einer Größenausschlußchromatographiesäule (Superdex 75) fraktioniert ( $V_{\infty}$  = vorderes Ausschlussvolumen,  $V_0$  = hinteres Ausschlussvolumen). Anschließend wurden HaCaT-Keratinocyten mit den Fraktionen für 20 Std. inkubiert und die mRNA Expression für hBD-2 (A), IL-8 (B) und TNF $\alpha$  (C) ermittelt. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Auch bei Untersuchungen von Überständen entsprechend kultivierter *P. fluorescens* und *P. stutzeri* sowie *E. coli* fand sich eine maximale Eluierung der hBD-2-Induktoren im vorderen Ausschlussvolumen, während IL-8-induzierende Faktoren eine Masse von 65 kD aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

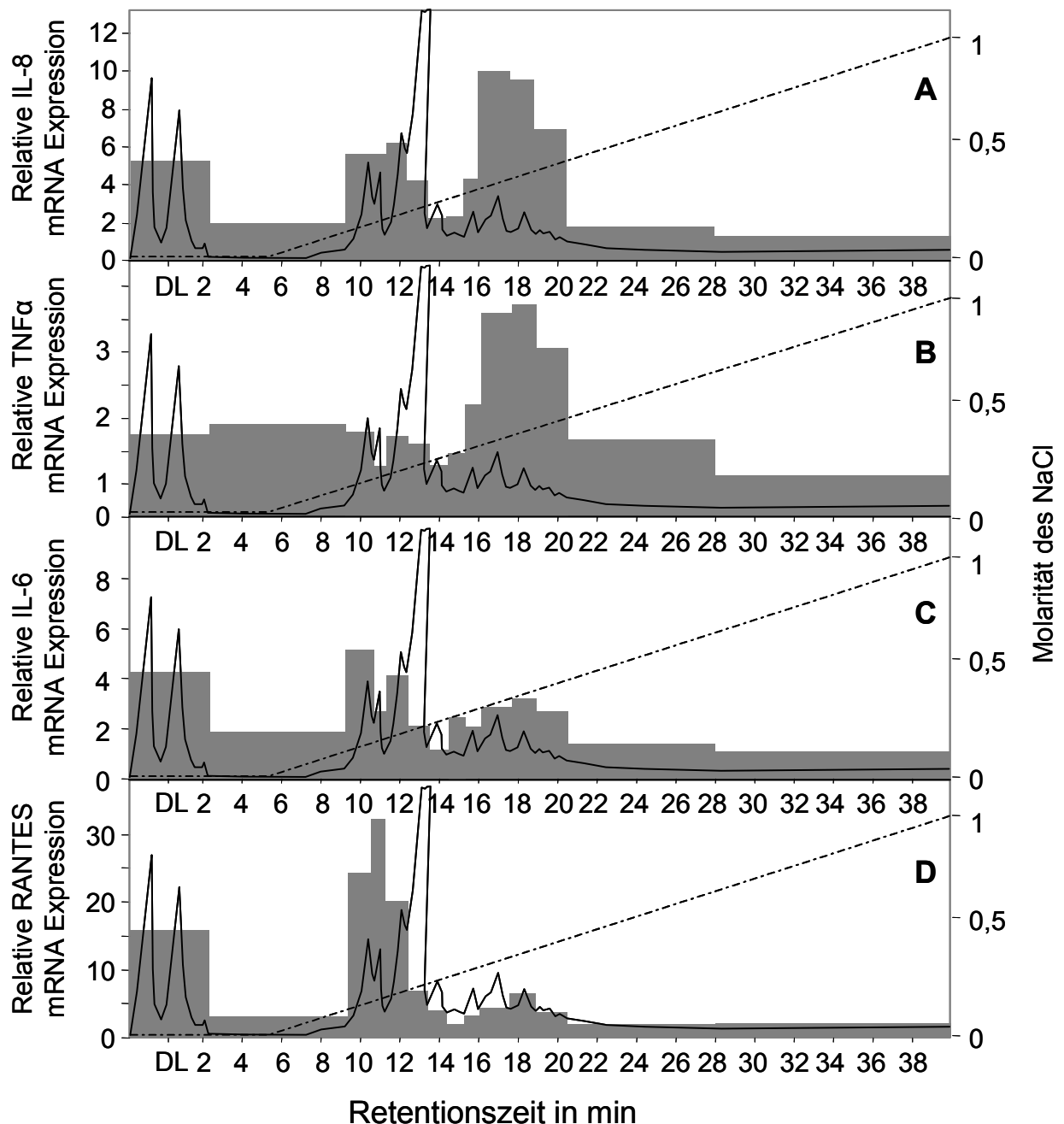
### 3.2.3.3 AP-induzierende Faktoren binden an Anionenaustauscher

Um zu klären, ob die hBD-2-induzierenden Faktoren aus kationischen bzw. anionischen Komponenten bestehen, wurden 30 kD-Retentate von *P. aeruginosa*-Überständen mittels eines Anionenaustauschers (ResourceQ, s. 2.11.6.2) chromatographiert und HaCaT-Keratinocyten mit den resultierenden Fraktionen für 20 Std. inkubiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 18 (AP) und Abb. 19 (PZ) zusammengefasst. Es zeigte sich, dass hBD-2-Induktoren im Durchlauf (DL) der Anionenaustauschchromatographie zu finden waren. Weitere hBD-2-induzierende Faktoren ließen sich von dieser Säule mit 0,25 M NaCl (Retentionszeit 11 min) eluieren. Interessanterweise wurden hBD-3-, Psoriasin- und RNase-7-induzierende Faktoren in identischen HPLC-Fraktionen gefunden. Ein weiterer Induktor dieser AP - mit geringerer Amplitude - fand sich in Fraktionen, die zwischen 16-18 min eluiert worden waren. Durch Inkubationen von Keratinocyten mit diesen Fraktionen konnte eine 100-fache hBD-2-, 5-fache hBD-3-, 25-fache Psoriasin- und eine 5-fache RNase-7-Induktion nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, dass die Amplitude der Induktion verschiedener Zytokine nach 20-stündiger Stimulation generell geringer ausfällt (max. 35-fach) als die der Induktion der untersuchten AP (max. 1700-fach). So ließ sich bei einer Elutionszeit von 16-18 min eine maximale Eluierung der induzierenden Faktoren für IL-8 (10-fach), TNF $\alpha$  (3,5-fach), RANTES (35-fach) und IL-6 (3,5-fach) nachweisen. Daneben wurden IL-8- (6-fach) und IL-6-Induktoren (4,5-fach) auch nach 10 bzw. 12 min eluiert. Zusätzlich konnten IL-8- (5-fach), IL-6- (4-fach) und RANTES-induzierende Faktoren (15-fach) im Durchlauf nachgewiesen werden. Aus Abb. 19 ist zudem ersichtlich, dass eine maximale RANTES-Induktion, wie für die untersuchten AP gefunden und abweichend von den anderen Zytokinen, durch Inkubationen mit Fraktionen erfolgte, die nach 11 min von der Säule eluiert wurden.



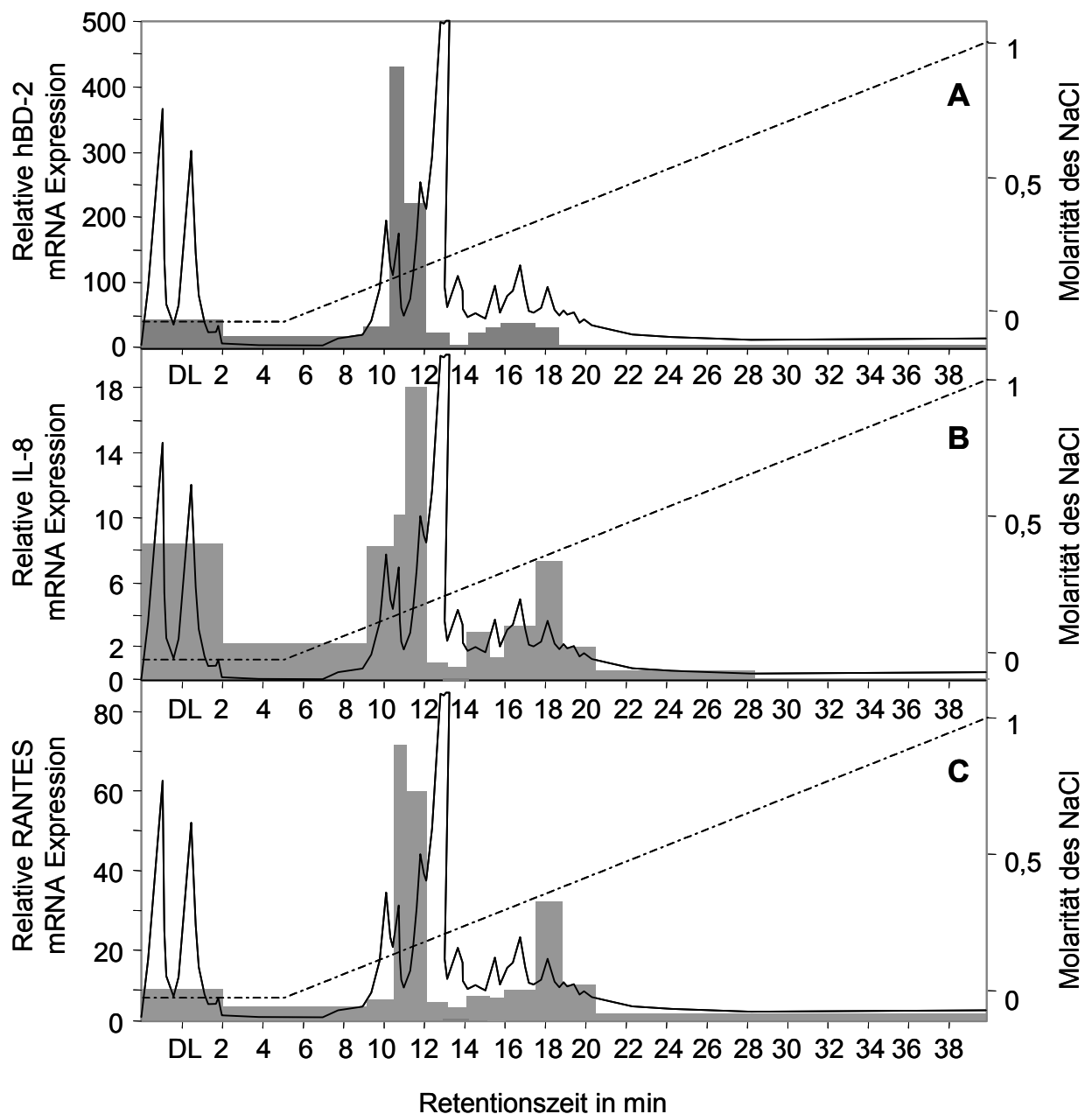
**Abb. 18 Induktion verschiedener antimikrobieller Proteine (AP) durch Fraktionen einer Anionenaustauschchromatographie von *P. aeruginosa*-Überständen:** *P. aeruginosa* Kulturüberstände (30 kD-Retentate; ATCC 33358, MG-Medium, statische Kulturen) wurden mittels eines Gradienten ansteigender NaCl-Konzentration an einem Ionenaustauscher (ResourceQ) getrennt. HaCaT-Kulturen wurden mit den Fraktionen für 20 Std. inkubiert und die mRNA Expression von hBD-2 (A), hBD-3 (B), RNase-7 (C) und Psoriasisin (D) quantitativ ermittelt. Die grauen Säulen repräsentieren die jeweilige relative mRNA Expression (DL = nicht gebundene Substanzen). Die durchgehende Linie stellt den Extinktionsverlauf der aufgetrennten Probe bei 280 nm dar. Die gestrichelte Linie steht für den Gradienten des Elutionspuffers. Die Abbildung stellt ein charakteristisches Ergebnis von 3 voneinander unabhängigen Versuchen dar.



**Abb. 19 Die Induktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine (PZ) durch Fraktionen einer Anionenaustauschchromatographie von *P. aeruginosa*-Überständen:** *P. aeruginosa* Kulturüberstände (30 kD-Retentate; ATCC 33358, MG-Medium, statische Kulturen) wurden unter Verwendung eines Gradienten ansteigender NaCl-Konzentration an einem Ionenaustauscher (Resource Q) getrennt und HaCaT-Keratinocyten mit den Fraktion für 20 Std. inkubiert. Die Bestimmung der mRNA Expression von IL-8 (A), TNF $\alpha$  (B), IL-6 (C) bzw. RANTES (D) erfolgte quantitativ. Die grauen Säulen repräsentieren die jeweilige relative mRNA Expression (DL = nicht gebundene Substanzen). Die durchgehende Linie stellt die Absorption bei 280 nm dar. Die gestrichelte Linie steht für den Gradienten des Elutionspuffers. Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Um der Frage nachzugehen, ob die Inkubationsdauer der Keratinocyten mit den HPLC-Fractionen die Induktionsrate von AP und PZ beeinflusst, wurden HaCaT-

Keratinocyten auch kurzzeitig (6 Std.) mit den entsprechenden Anionenaustauscherfraktionen inkubiert.



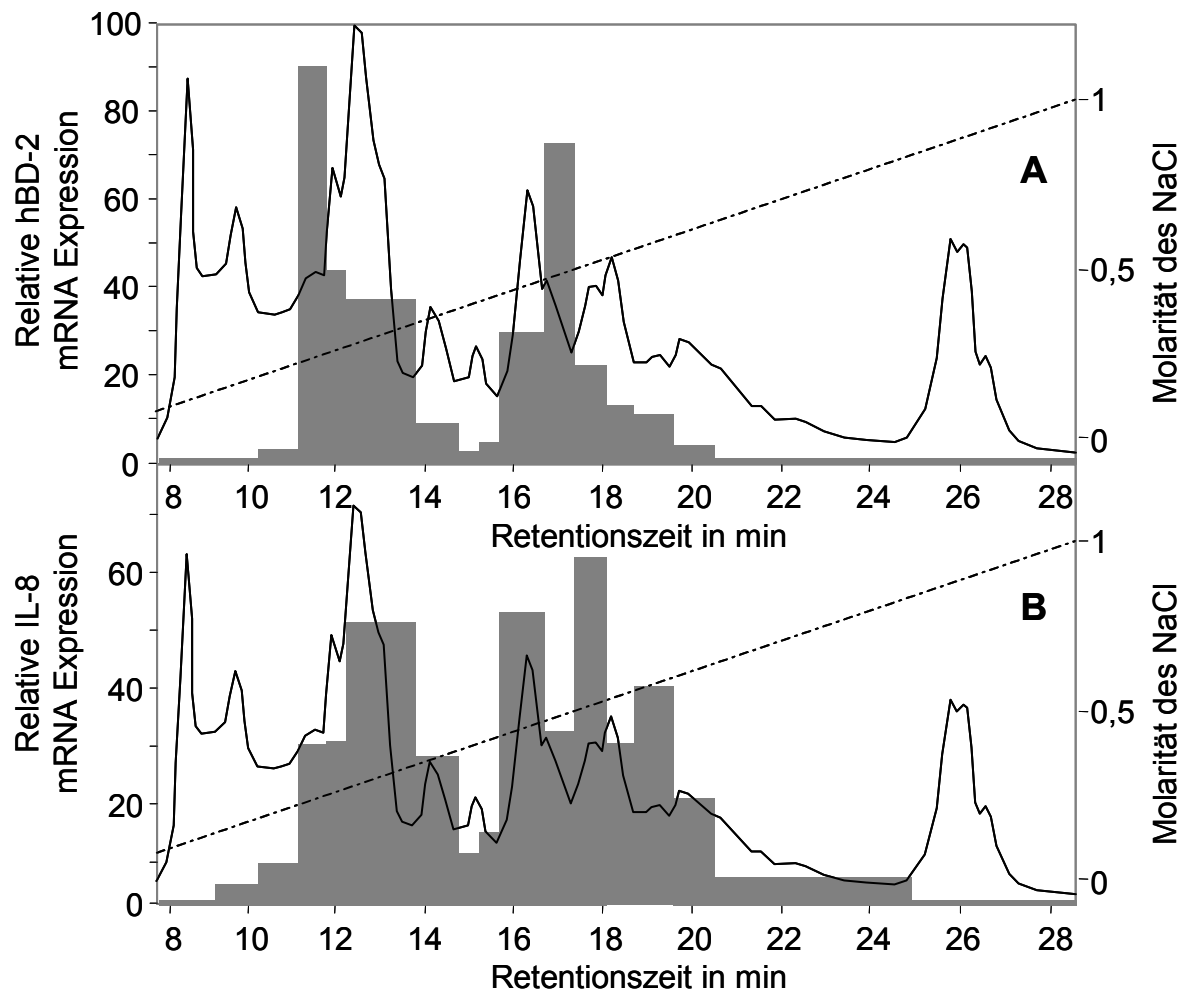
**Abb. 20 HBD-2-, IL-8- und RANTES-Induktion in Keratinocyten nach 6-stündiger Inkubation mit Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie von *P. aeruginosa*-Überständen:** *P. aeruginosa* Kulturüberstände (30 kD-Retentate; ATCC 33358, MG-Medium, statische Kulturen) wurden mittels eines NaCl-Gradienten an einem Ionenaustauscher (Resource Q) getrennt. Anschließend erfolgte eine 6-stündige Inkubation von HaCaT-Kulturen mit den Fraktionen und eine Bestimmung der mRNA Expression von hBD-2 (A), IL-8 (B) und RANTES (C). Die grauen Säulen repräsentieren die jeweilige relative mRNA Expression (DL = Säulendurchlauf). Die durchgehende Linie stellt die Absorption bei 280 nm dar. Die gestrichelte Linie steht für den Gradienten des Elutionspuffers. Die Abbildung stellt das typische Ergebnis von 4 voneinander unabhängigen Untersuchungen dar.

Abb. 20 stellt exemplarisch einen Vergleich der Elutionsprofile der Induktoren an einem Anionenaustauscher für hBD-2, IL-8 und RANTES nach 6-stündiger Inkubation von Keratinozyten dar.

Für alle Faktoren fanden sich Induktoren, die nicht an die Säule gebunden wurden (DL). Während weitere, hBD-2- und RANTES-induzierende Faktoren bei 0,2 M NaCl (11 min) eluiert wurden, konnten IL-8-Induktoren ca. 1 min später (ca. 0,25 M NaCl) nachgewiesen werden. Schließlich fanden sich weitere hBD-2-Induktoren nach ca. 16 min (0,3 M NaCl) und IL-8- bzw. RANTES-induzierende Faktoren nach ca. 17-18 min (0,35 M NaCl). Im Vergleich zu einer 20-stündigen Inkubation der Keratinozyten erschien die hBD-2-Induktion nach 6 Std. stets niedriger (hier: 1700-fache und 430-fache Induktion), die IL-8- und RANTES-Induktion jedoch höher (hier: 10-fache und 19-fache Induktion).

Im Folgenden wurden die biochemischen Eigenschaften der hBD-2-Induktoren anderer Bakterien untersucht und mit denen von *P. aeruginosa* verglichen. Dazu wurden MG-Kulturüberstände statischer Kulturen von *P. fluorescens* und *P. stutzeri* unter identischen Bedingungen chromatographiert. Nach der Fraktionierung entsprechender Überstände an einem Anionenaustauscher und der Inkubation von HaCaT-Keratinozyten zeigte sich, dass auch die hBD-2-Induktoren von *P. fluorescens* (s. Abb. 21) und *P. stutzeri* (Daten nicht gezeigt) ein Elutionsprofil zeigten, welches den hBD-2-Induktoren aus *P. aeruginosa*-Überständen entsprach. So wurde ein Großteil der hBD-2-induzierenden Faktoren aus *P. fluorescens*-Überständen ebenfalls nach Elutionszeiten von ca. 11 min (ca. 90-fache Induktion) und 17 min (ca. 70-fache Induktion) gefunden.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass auch die von *P. fluorescens* freigesetzten IL-8-Induktoren von den hBD-2-Induktoren molekular verschieden sind, da Maxima für die IL-8-induzierenden Aktivitäten - abweichend von den Befunden für hBD-2 - nach 13 min (50-fache Induktion), 16 min (50-fache Induktion), 18 min (60-fache Induktion), und 19 min (40-fache Induktion) gefunden wurden (Abb. 21).

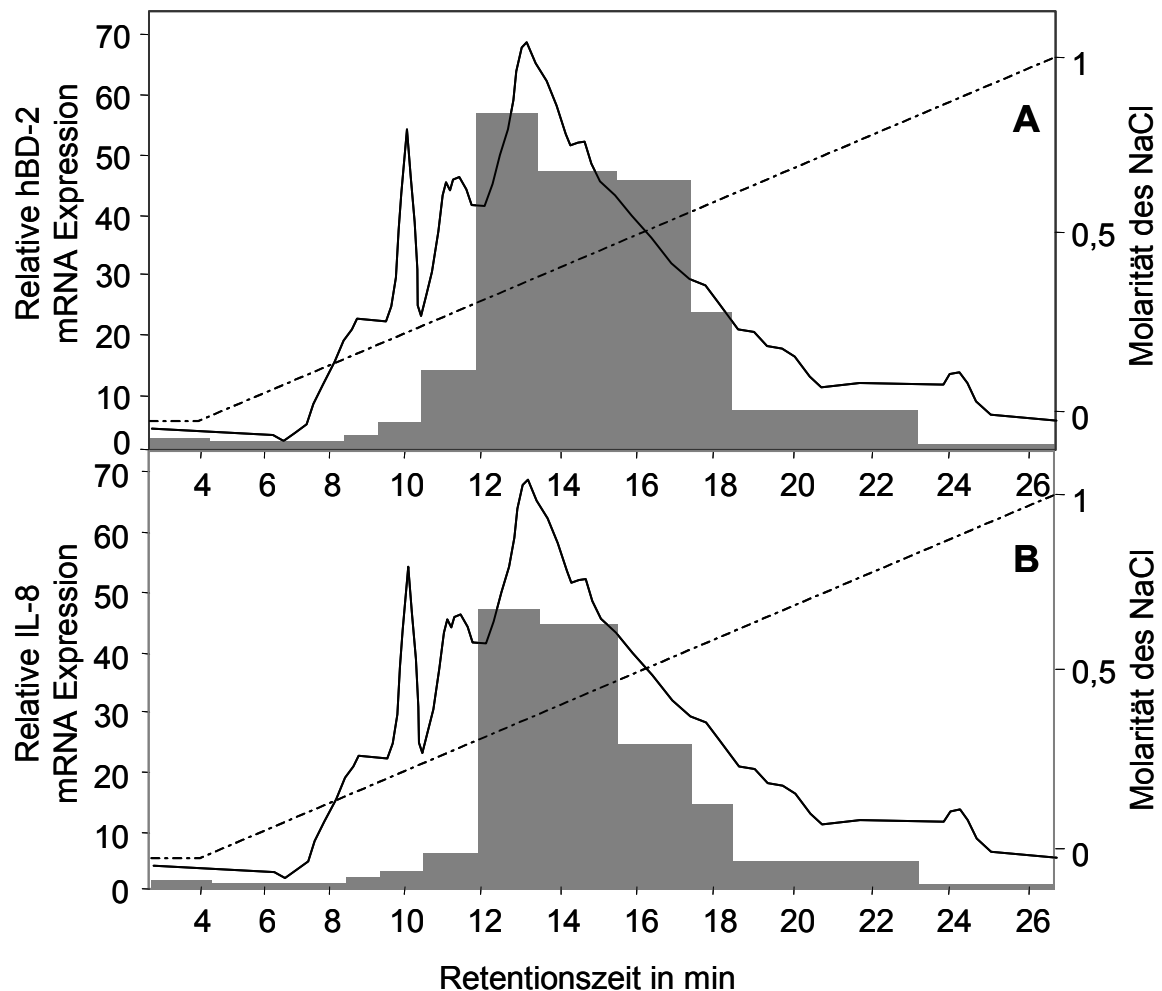


**Abb. 21 HBD-2- und IL-8-Induktion in Keratinozyten durch Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie von *P. fluorescens*-Überständen:** HaCaT-Kulturen wurden für 6 Std. mit Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie von *P. fluorescens* Kulturüberständen (30 kD-Retentat; ATCC 13525, MG-Medium, statische Kulturen) inkubiert. Anschließend wurde die mRNA Expression von hBD-2 (A) und IL-8 (B) quantitativ ermittelt. Die dunkelgrauen Säulen repräsentieren die relativen hBD-2 Expressionen, die hellgrauen Säulen die entsprechende relativen IL-8- Expressionen. Die durchgehende Linie stellt die Absorption bei 280 nm dar und die gestrichelte Linie steht für den Gradienten des Elutionspuffers. Das dargestellte Ergebnis konnte in 3 von einander unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

Es wurde nun untersucht, ob die in den Kulturüberständen von *E. coli* entdeckten hBD-2-Induktoren ebenfalls ähnliche Eigenschaften wie die induzierenden Faktoren von *P. aeruginosa* aufweisen.

Dazu wurden 30 kD-Retentate adhärent kultivierter *E. coli* unter Verwendung des Anionenaustauschers ResourceQ fraktioniert und HaCaT-Keratinozyten mit den Fraktionen inkubiert. Wie in Abb. 22 dargestellt, wurde eine maximale Eluierung der hBD-2-Induktoren nach ca. 13 min (= 0,4 M NaCl) detektiert. Für die Induktion von IL-8 durch die entsprechenden Fraktionen fand sich ebenfalls eine maximale Induktion nach ca. 13 min Elutionszeit (ca. 50-fach). Diese Daten zur maximalen

Induktion von hBD-2 und IL-8 durch Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie entsprechen somit nicht denen aus *P. aeruginosa*-Überstände ermittelten Werten, die eine maximale Induktion mit einer Retentionszeit von 10 und 12 min bzw. 16 und 18 min zeigten (s. Abb. 18 und Abb. 19).



**Abb. 22 HBD-2- und IL-8-Induktion in primären Keratinozyten durch Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie von *E. coli*-Überständen:** HaCaT-Keratinozyten wurden für 6 Std. mit Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie von *E. coli* Kulturüberständen (30 kD-Retentat; ATCC 35812, MG-Medium, statische Kulturen) inkubiert. Anschließend wurde die mRNA Expression von hBD-2 (A) und IL-8 (B) quantitativ ermittelt. Die dunkelgrauen Säulen repräsentieren die relativen hBD-2 Expressionen zu den entsprechenden Retentionszeiten und die hellgrauen Säulen die entsprechenden IL-8 Expressionen. Die durchgehende Linie stellt die Absorption bei 280 nm dar und die gestrichelte Linie steht für den Gradienten des Elutionspuffers. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis für 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

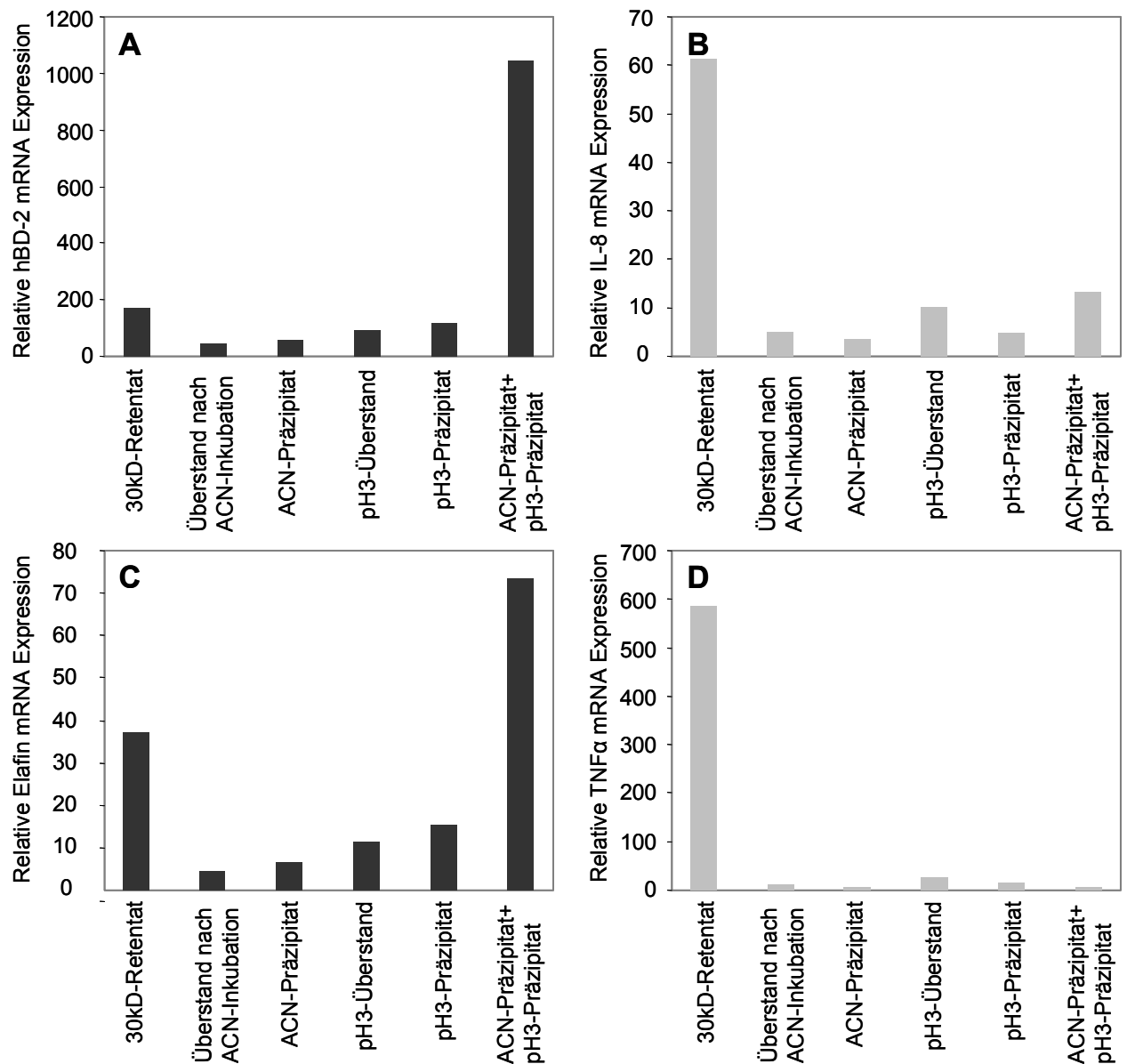


### 3.2.3.4 HBD-2- und IL-8-Induktoren aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen werden durch Acetonitril präzipitiert

Im Folgenden wurde nun untersucht, ob sich hBD-2- und IL-8-induzierende Faktoren an Reversed-Phase-Säulen chromatographieren lassen.

Dazu wurden zunächst 30 kD-Retentate von *P. aeruginosa*-Kulturüberständen an einer C2/C18-Säule bzw. Aqua-C-18-Säule mittels Acetonitril-Gradienten fraktioniert (s. 2.11.6.3). Es zeigte sich, dass nach der Inkubation von Keratinozyten mit sämtlichen Fraktionen dieser Chromatographien keine oder kaum induzierende Faktoren für IL-8 bzw. hBD-2 nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob das als Elutionspuffer verwendete Acetonitril bzw. die vor der Reversed-Phase-Chromatographie erfolgte Ansäuerung (pH3) der Überstände die Integrität der Induktoren in den 30 kD-Retentaten beeinträchtigte, wurden diese mit 30 % Acetonitril versetzt bzw. angesäuert (s. 2.11.5). Da Acetonitril auf Keratinozyten toxisch wirkt (eigene Beobachtung), wurden die Acetonitril-haltigen Proben lyophilisiert und die Acetonitril-freien Präzipitate in einem entsprechenden Volumen H<sub>2</sub>O gelöst. Angesäuerte Überstände wurden vor der Inkubation neutralisiert. Keratinozyten wurden dann sowohl mit den gelösten Präzipitaten wie auch mit den entsprechenden Überständen inkubiert und die Induktionen von AP (hBD-2, Elafin) und PZ (IL-8, TNF $\alpha$ ) untersucht.

Wie in Abb. 23 dargestellt, zeigte sich, dass die 16-stündige Inkubation der 30 kD-Retentate mit Acetonitril eine Abnahme der hBD-2- (von 170 auf 30-fach), Elafin- (von 40 auf 4-fach), IL-8- (von 60 auf 5-fach) sowie TNF $\alpha$ -Induktion (von 600 auf 10-fach) bei Inkubationen von Keratinozyten mit den behandelten Überständen bewirkte. Außerdem war ein Teil der Induktionsmediatoren nach der Acetonitril-Inkubation der Überstände in den Präzipitaten zu finden.

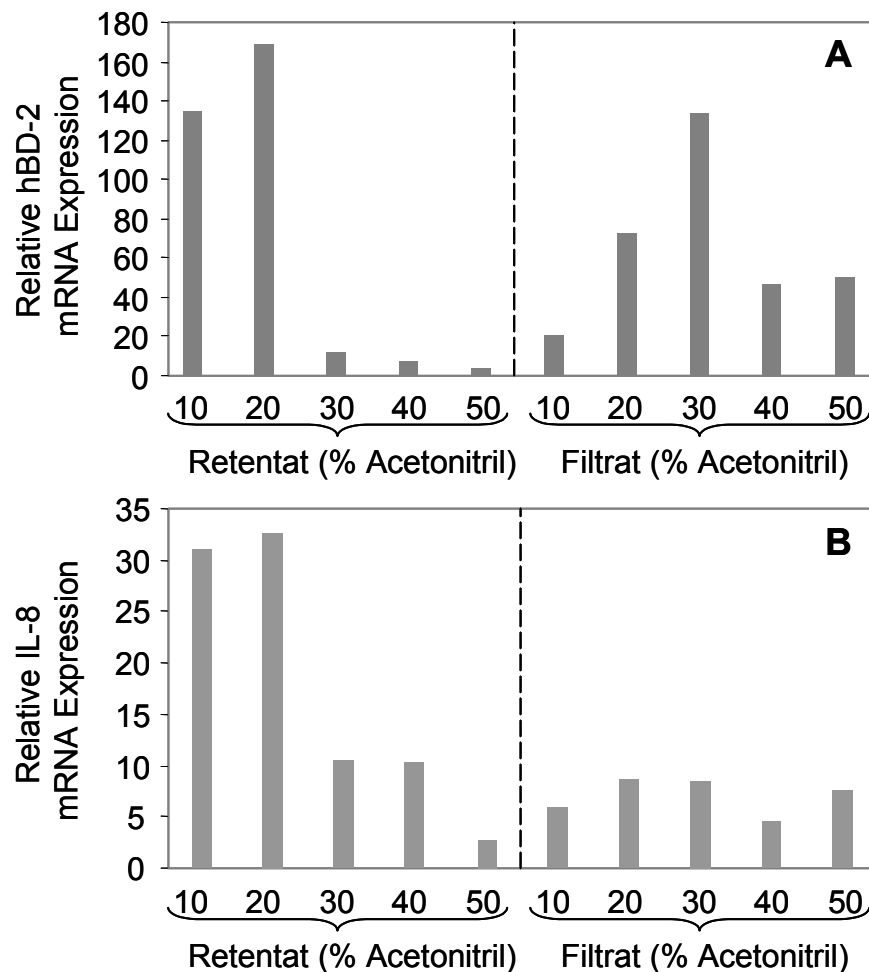


**Abb. 23 Die Induktion der AP hBD-2 und Elafin sowie der PZ IL-8 und TNF $\alpha$  durch Acetonitril-behandelte bzw. Säure-behandelte Kulturüberstände von *P. aeruginosa*:** HaCaT-Kulturen wurden für 20 Std. mit den Acetonitril- (ACN) bzw. Säure-behandelten (pH3) Kulturüberständen (30 kD Retentate, ATCC 33358, MG-Medium statische Kultur) und den jeweiligen gelösten Präzipitaten inkubiert und die mRNA Expression von hBD-2 (A), IL-8 (B), Elafin (C) und TNF $\alpha$  (D) quantitativ bestimmt. Die Präzipitate wurden in einem dem ursprünglichen Überstandsvolumen entsprechenden Volumen H<sub>2</sub>O gelöst. Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Eine Ansäuerung der Kulturüberstände hatte zur Folge, dass die untersuchten AP- und PZ-Induktoren sowohl in den Überständen wie auch in den gelösten Präzipitaten nachzuweisen waren. Es zeigte sich jedoch, dass insbesondere die IL-8- bzw. TNF $\alpha$ -Induktoren nach einer Ansäuerung bzw. Acetonitrilinkubation kaum noch zu detektieren waren.

Verschiedene Versuche, die zum Ziel hatten, die AP- und PZ-Induktoren dieser behandelten Überstände zu rekonstituieren, führten dazu, dass es bei der Inkubation von Keratinozyten mit einer Mischung von pH3-Präzipitaten und Acetonitrilpräzipitaten aus den Kulturüberständen zu hohen hBD-2- (ca. 1000-fach) und Elafin-Induktionen (ca. 75-fach) kam. Für die beiden Zytokine konnten keine entsprechenden Effekte festgestellt werden (IL-8: 12-fach, TNF $\alpha$ : 6-fach, s. Abb. 23).

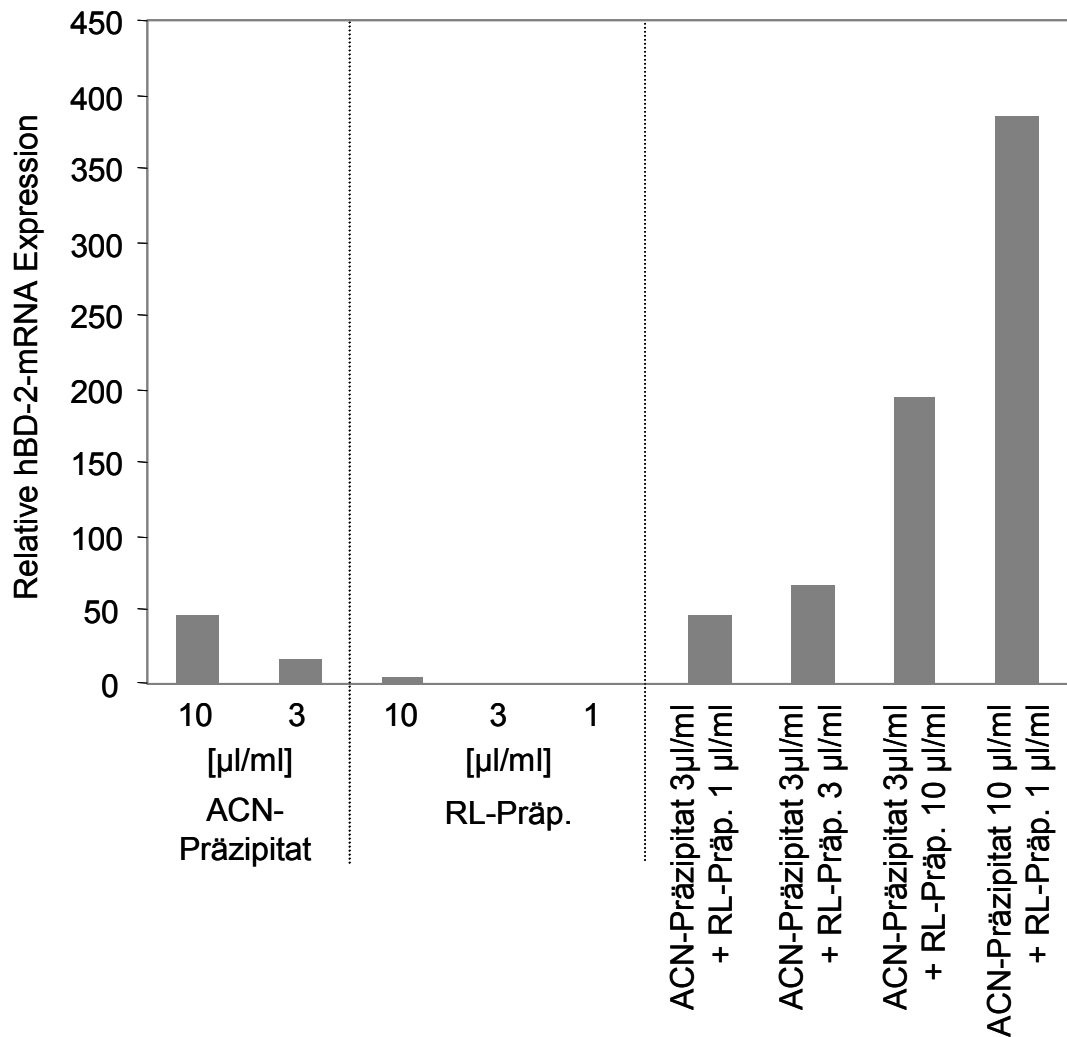
Um die Wirkung von Acetonitril auf die Induktoren genauer zu testen, wurden 30 kD-Retentate von Kulturüberständen mit unterschiedlichen Anteilen Acetonitril versetzt und diese Mischungen direkt mittels eines 30 kD Filters erneut filtriert. Nach der Lyophilisierung wurden Retentat und Filtrat in identischen Volumina H<sub>2</sub>O gelöst und hinsichtlich der hBD-2-Induktion in Keratinozyten untersucht. Es zeigte sich, dass Acetonitril offensichtlich die molekularen Eigenschaften der hBD-2-induzierenden Faktoren beeinflusst (Abb. 24). Es stellte sich heraus, dass bei einer Acetonitril-Konzentration >30 % nahezu keine hBD-2-Induktoren im Retentat (Molekülgrößen von >30 kD) nachweisbar sind (ca. 5-10-fache Induktion). Dagegen fand sich nach der Inkubation der Kulturüberstände der Großteil der induzierenden Faktoren im Filtrat wieder (ca. 130-fache hBD-2-Induktion). Bei einer Konzentration von >40 % Acetonitril nahmen dann jedoch auch die Konzentration hBD-2-induzierender Faktoren im Filtrat ab (ca. 50-fache Induktion). Interessanterweise zeigte sich bei Untersuchungen der IL-8-induzierenden Faktoren durch diese Fraktionen, dass die Expression mit steigendem Acetonitrilgehalt im Überstand von einer ca. 30-fachen Induktion (10% ACN) auf eine ca. 10-fache absank (>40% ACN). Es war jedoch keine Erhöhung der IL-8-Induktion durch die entsprechenden Fraktionen des Filtrats festzustellen (zwischen 5 und 10-facher Induktion).



**Abb. 24 HBD-2- und IL-8-induzierende Faktoren in den Retentaten und Filtraten (30 kD Filter) von *P. aeruginosa* Kulturüberständen in Anwesenheit unterschiedlicher Anteile Acetonitril:** HaCaT-Keratinocyten wurden für 20 Std. mit den von Acetonitril befreiten Retentaten bzw. Filtraten von Kulturüberständen inkubiert, die in Anwesenheit verschiedener Anteile Acetonitril mittels eines 30 kD-Filters fraktioniert wurden, inkubiert. Anschließend wurde die hBD-2- (A) und IL-8- (B) mRNA Expression quantitativ bestimmt. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuche.

Um die molekularen Eigenschaften der hBD-2-Induktoren zu klären, sollte nun eingehender untersucht werden, was zu der hohen hBD-2-Induktion durch Mischungen von Präzipitaten aus Säure- bzw. Acetonitril-behandelten Kulturüberständen führte (s. Abb. 23). Da Präzipitate aus Säure-behandelten Kulturüberständen nach eigenen massenspektrometrischen Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) und nach Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Deziel et al., 1999) große Mengen an Rhamnolipiden enthalten, wurde vermutet, dass diese für die hBD-2-Induktion in Keratinocyten von Bedeutung sein könnten. Es wurde daher untersucht, ob Rhamnolipide einen Einfluss auf die hBD-2-Induktoren in den Kulturüberständen besitzen. Zu diesem Zweck wurden *P. aeruginosa* Kulturüberstände mit 30 % Acetonitril inkubiert, die resultierenden Präzipitate in H<sub>2</sub>O

gelöst und mit verschiedenen Konzentrationen einer Rhamnolipid-Präparation (JBR 515, Jeneil Biosurfactant) bestehend aus Monorhamnolipid ( $C_{10}C_{10}$ ) und Dirhamnolipid ( $C_{10}C_{12}$ ) versetzt. Anschließend wurden HaCaT-Keratinozyten mit diesen Ansätzen inkubiert.

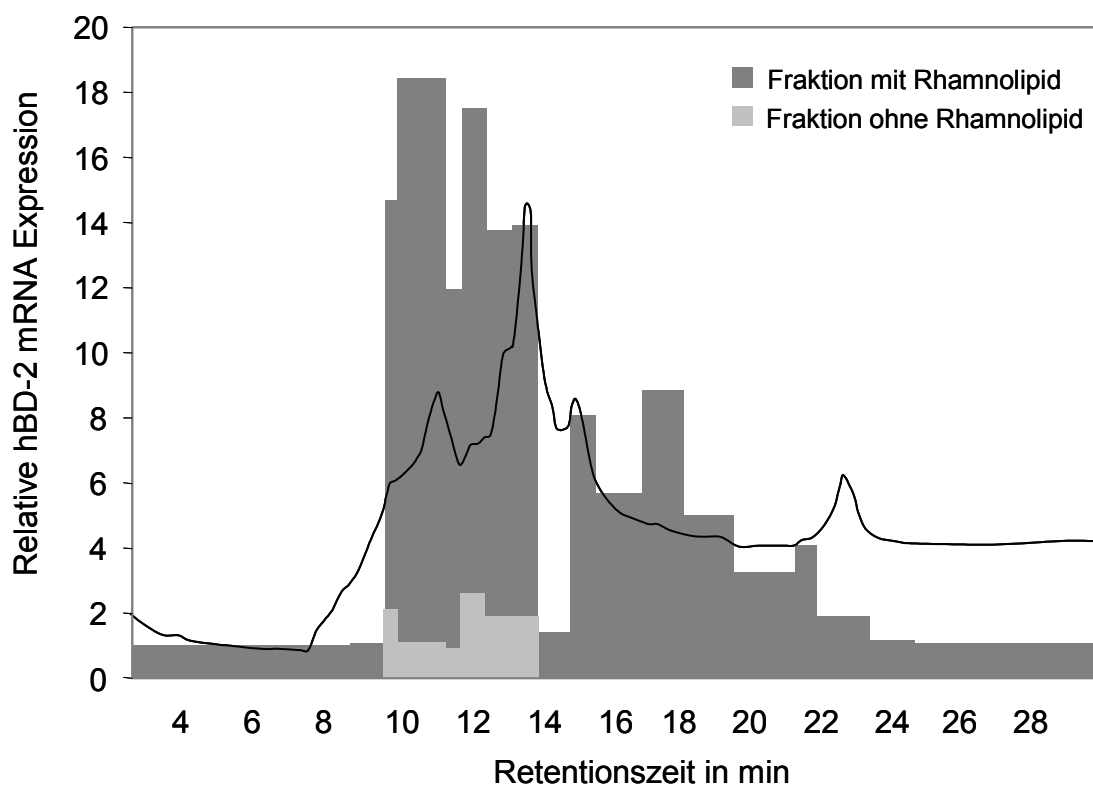


**Abb. 25 HBD-2-Induktion in HaCaT-Keratinozyten durch Präzipitate Acetonitril-behandelter *P. aeruginosa* Kulturüberstände und durch Rhamnolipidpräparationen:** HaCaT-Kulturen wurden für 6 Std. mit verschiedenen Konzentrationen gelöster Acetonitril-(ACN) Präzipitate von *P. aeruginosa*-Überständen (ATCC 33358, MG-Medium, statische Kultur) und einer Rhamnolipid-Präparation (RL-Präp., JBR 515; Stammkonzentration 0,1 µl/ml) inkubiert und die hBD-2 mRNA Expression quantitativ ermittelt. Das dargestellte Resultat ist charakteristisch für die Ergebnisse aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Es zeigte sich, dass Präzipitate Acetonitril-behandelter Überstände ohne Rhamnolipid-Zugabe eine maximal 50-fache hBD2-Induktion in Keratinozyten bewirkten. Wurden die gelösten Präzipitate Acetonitril-behandelter *P. aeruginosa*-

Kulturüberstände jedoch mit der Rhamnolipid-Lösung versetzt, so ließ sich die hBD-2-Expression bis zu 400-fach steigern (Abb. 25).

Um die molekularen Eigenschaften der hBD-2-Induktoren aus Präzipitaten ACN-behandelter Überstände zu analysieren, wurden diese an einem Anionenaustauscher chromatographiert. Die hBD-2-induzierenden Eigenschaften der HPLC-Fractionen wurden in Ab- und Anwesenheit von Rhamnolipid (0,1 µl/ml Rhamnolipidlösung; Präparation JBL 515) analysiert.



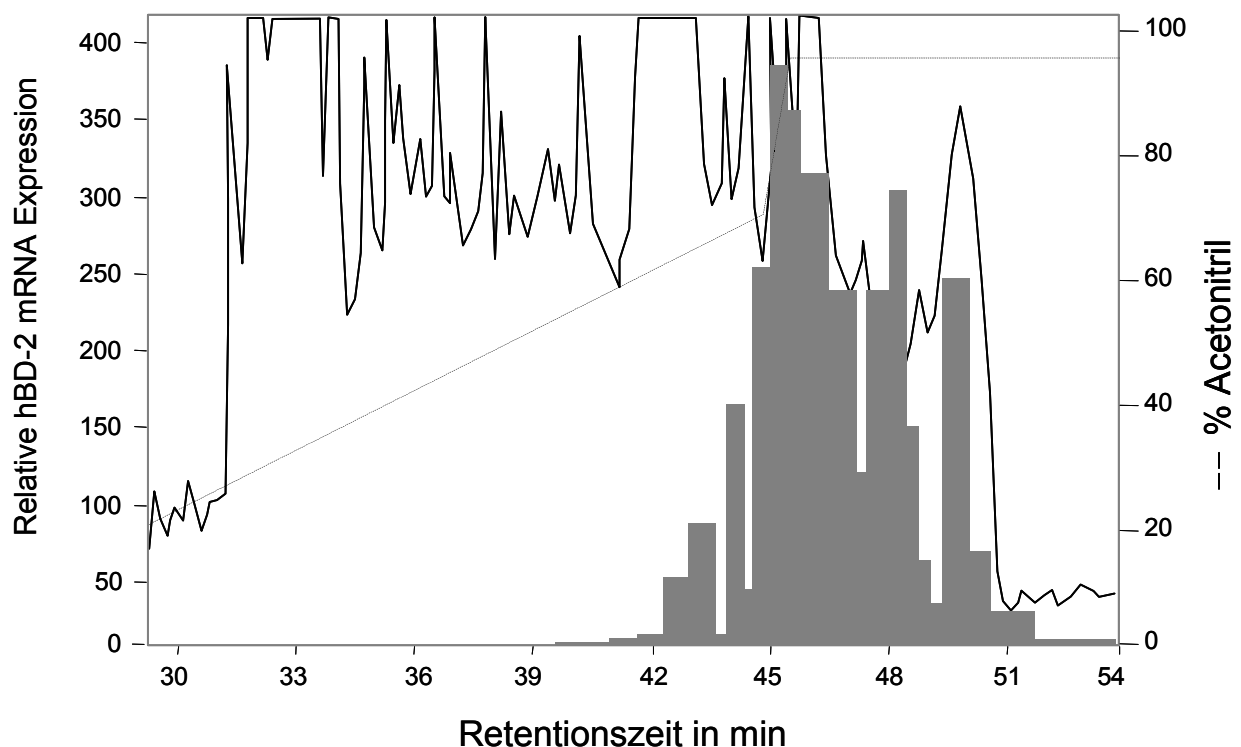
**Abb. 26 HBD-2-Induktion in Keratinozyten durch Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie von ACN-Präzipitaten aus *P. aeruginosa* Kulturüberständen:** HaCaT-Keratinozyten wurden für 20 Std. mit den Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie inkubiert und die hBD-2 mRNA Expression quantitativ bestimmt. Die Fraktionen wurden entweder ohne oder in Anwesenheit von 0,1 µl/ml Rhamnolipidlösung (= RL; Präparation JBR 515, Jeneil Biosurfactant) inkubiert. Die Kulturüberstände stammten von ATCC 33358 (MG-Medium, statische Bedingungen). Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Es zeigte sich, dass die Fraktionen in Abwesenheit von Rhamnolipid keine oder nur eine geringe hBD-2-Induktion in Keratinozyten bewirkten (max. 3-fach; Abb. 26). Wurden die Keratinozyten jedoch mit den entsprechenden Fraktionen in Anwesenheit von 0,1 µl/ml Rhamnolipidlösung inkubiert, so ergab sich durch einzelne Fraktionen eine bis zu 20-fache Induktion von hBD-2 in Keratinozyten. Ein

Vergleich der Retentionszeiten mit denen der hBD-2-induzierenden Faktoren aus 30 kD-Retentaten (vgl. Abb. 18) zeigte zudem, dass in beiden experimentellen Ansätzen eine maximale Eluierung der hBD-2-Induktoren nach 11 min bzw. zwischen 16-18 min erfolgte.

### 3.2.3.5 Reversed-Phase Chromatographie

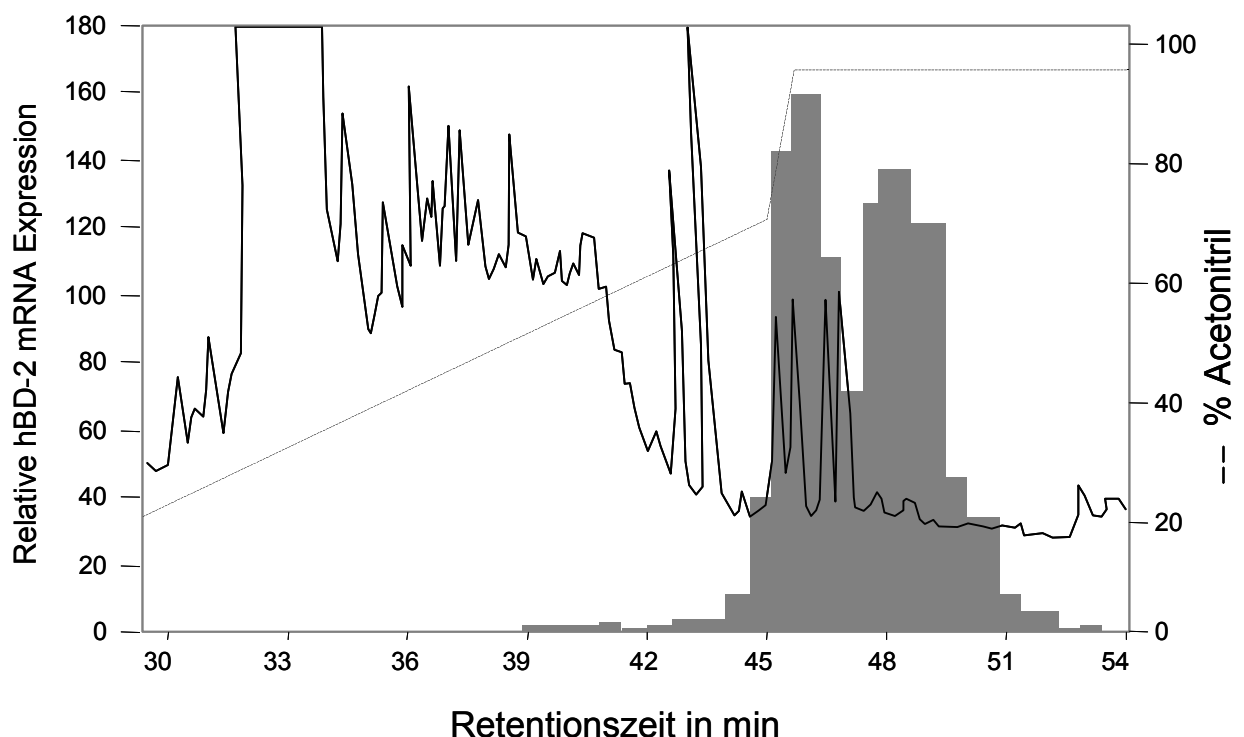
Nach den Befunden, dass die hBD-2-Induktoren scheinbar Massen von >30 kD bzw. <3 kD aufweisen (3.2.3.1), und dass es nach einer Acetonitril-Inkubation der Überstände möglich ist, die hBD-2-Induktoren durch Zugabe von Rhamnolipiden zu rekonstituieren (3.2.3.4), wurden Reversed-Phase-Chromatographien unter Verwendung eines Acetonitril-Gradienten durchgeführt.



**Abb. 27 HBD-2-Induktion in HaCaT-Keratinocyten durch Fraktionen einer Reversed-Phase-Chromatographie von 30 kD Retentaten aus *P. aeruginosa*-Überständen:** HaCaT-Keratinocyten wurden für 20 Std. mit den Fraktionen einer Reversed-Phase-Chromatographie inkubiert und die hBD-2-mRNA Expression quantitativ bestimmt. Chromatographiert wurden 30 kD-Retentate von MG-Kulturüberständen (ATCC 33358, statische Bedingungen) an einer Aqua C-18-Säule mittels eines Wasser-Acetonitril-Gradienten (pH 3,0). Die Fraktionen wurden vor der Inkubation der Keratinocyten durch Lyophilisierung von Acetonitril befreit und mit 0,1 µl/ml Rhamnolipid (JBR 515) versetzt. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Dazu wurden Aliquots sowohl der 30 kD-Retentate wie auch der 3 kD-Filterdurchläufe von Überständen (s. Abb. 16) an einer Aqua C-18-Säule mittels eines Wasser-Acetonitril-Gradienten unter sauren Bedingungen (pH 3,0) getrennt. Da Vorversuche gezeigt hatten, dass bei direkter Testung der Fraktionen keine hBD-2-Induktoren nachweisbar waren (s. 3.2.3.4), wurden die Fraktionen mit 0,1 µl/ml Rhamnolipid (JBR 515) versetzt und zur Inkubation von Keratinozyten verwendet.

Interessanterweise ließen sich in spät eluierbaren Fraktionen hBD-2-Induktoren nachweisen. Dabei konnten ab einer Retentionszeit von ca. 43 min mehrere Fraktionen identifiziert werden, die hBD-2-Induktoren enthielten und bei einem Acetonitril-Gehalt des Elutionsmittels von 70-95 % von der Säule eluiert wurden (Abb. 28).



**Abb. 28** *HBD-2-Induktion in HaCaT-Keratinozyten durch Fraktionen einer Reversed-Phase-Chromatographie von 3 kD Filterdurchläufen aus *P. aeruginosa*-Überständen:* In 20 stündigen Experimenten wurden HaCaT-Kulturen mit den Fraktionen einer Reversed-Phase-Chromatographie inkubiert. Die 3 kD Filterdurchläufe stammten von MG-Kulturüberständen (ATCC 33358, statische Bedingungen) und wurden an einer Aqua C-18-Säule mittels eines Wasser-Acetonitril-Gradienten (pH 3,0) chromatographiert. Die Fraktionen wurden vor der Inkubation lyophilisiert und mit 0,1 µl/ml Rhamnolipid (JBR 515) versetzt. Das dargestellte Ergebnis konnte in 3 von einander unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

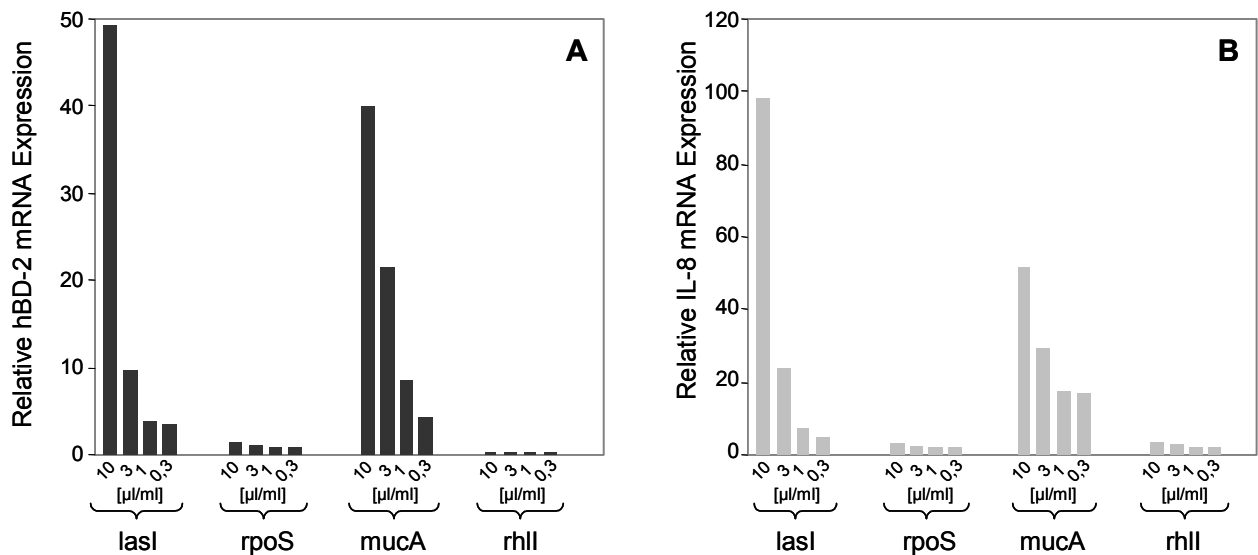


Entsprechende Untersuchungen wurden auch mit den 3kD-Filterdurchläufen von *P. aeruginosa*-Kulturüberständen durchgeführt. Hierbei ergab sich, dass eine Elution der hBD-2-induzierenden Faktoren ebenfalls mit 70-95 % Acetonitril erfolgte (Abb. 29). Dabei entsprachen die einzelnen Retentionszeiten der hBD-2-Induktoren exakt denen, die bei der Chromatographie der 30 kD-Retentate gefunden worden waren.

### **3.2.3.6 Mutationen im *rhl*-Quorum-Sensing-System von *P. aeruginosa* führen zu einer fehlenden Synthese AP- und PZ-induzierender Faktoren**

Durch die Kultivierung mehrerer *P. aeruginosa*-Mutanten wurde nun überprüft, inwieweit *P. aeruginosa*-Stämme, denen die Fähigkeit zur Rhamnolipid-Synthese fehlt, in der Lage sind, hBD-2- bzw. IL-8-Induktoren zu exprimieren. Dazu wurden zum einen *P. aeruginosa*-Mutanten verwendet, die durch Deletionen der Gene *rpoS* bzw. *rhlI* nicht in der Lage sind, Rhamnolipide zu synthetisieren. Diese Gene stellen essentielle Bestandteile des *rhl*-Quorum-Sensing-Systems dar. Zum anderen wurden Mutanten mit einer Deletion des *lasI*-Gens (*lasI*) verwendet, die somit nicht über ein funktionierendes *las*-Quorum-Sensing-System verfügen. Des Weiteren wurden Mutanten untersucht, die eine permanent mukoide Morphologie durch eine Mutation des *mucA*-Gens aufweisen (*mucA*-Mutanten).

Es zeigte sich, dass in den Überständen von *P. aeruginosa* bei denen das *rpoS*- bzw. *rhlI*-Gen deletiert wurde, keine hBD-2- und IL-8-Induktoren nachweisbar waren (Abb. 29). Dahingegen fand sich bei Inkubationen von Keratinozyten mit Überständen der *mucA*-Mutante sowohl hBD-2- (max. ca. 40fach) als auch IL-8-induzierende Faktoren (ca. 60-fach). Wurden die HaCaT-Keratinozyten mit Überständen der *lasI*-Mutante inkubiert, so ergab sich für die hBD-2- und IL-8-Expression jeweils die höchste Amplitude der Induktion (hBD-2: ca. 50-fach, IL-8: ca. 100-fach). Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei Stimulationen primärer Keratinozyten mit diesen Überständen unter identischen Bedingungen erzielt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 29 HBD-2- und IL-8-Induktion durch Überstände verschiedener *P. aeruginosa*-Mutanten:** HaCaT-Keratinocyten wurden in 20-stündigen Experimenten mit verschiedenen Konzentrationen (10 µl/ml, 3 µl/ml, 1 µl/ml, und 0,3 µl/ml) der MG-Kulturüberständen (statische Kulturen) von *P. aeruginosa*-Mutanten (lasI, rpoS, mucA, rhII) inkubiert. Anschließend wurde die mRNA Expression von hBD-2 (A) und IL-8 (B) quantitativ bestimmt. Die Nomenklatur der Mutanten ist unter 2.6 beschrieben. Dargestellt ist das Ergebnis von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

### 3.2.4 Hinweise auf Inhibitoren der Expression von AP in bakteriellen Kulturüberständen

Verschiedene Ergebnisse, die sich im Rahmen der Untersuchung zur bakteriellen Expression induzierender Faktoren für AP ergaben, ließen die Vermutung aufkommen, dass Bakterien in der Lage sind, Induktionsinhibitoren für AP und PZ zu exprimieren (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2):

1. Einzelne Kulturüberstände adhärent gewachsener mukoider *P. aeruginosa* führten in Inkubationsversuchen mit Keratinocyten zu keiner oder nur zu einer äußerst geringen Induktion von hBD-2, während andere Kulturüberstände eine bis zu 1000-fache Induktion zeigten (s. Abb. 11).
2. Inkubationsexperimente von Keratinocyten mit Überständen pathogener und nicht-pathogener *Pseudomonas*-Arten ergaben, dass in den Überständen des opportunistischen Erregers *P. aeruginosa* im Vergleich zu den nicht-pathogenen Formen *P. stutzeri* und *P. fluorescens* eine geringere Konzentration hBD-2-induzierender Faktoren nachzuweisen war (s. Abb. 12).

Deshalb sollte nun der Hypothese nachgegangen werden, ob pathogene bzw. opportunistische Bakterien potentiell in der Lage sind, eine Induktion von hBD-2 und anderen AP oder PZ in Keratinozyten durch sezernierte Inhibitoren zu verhindern.

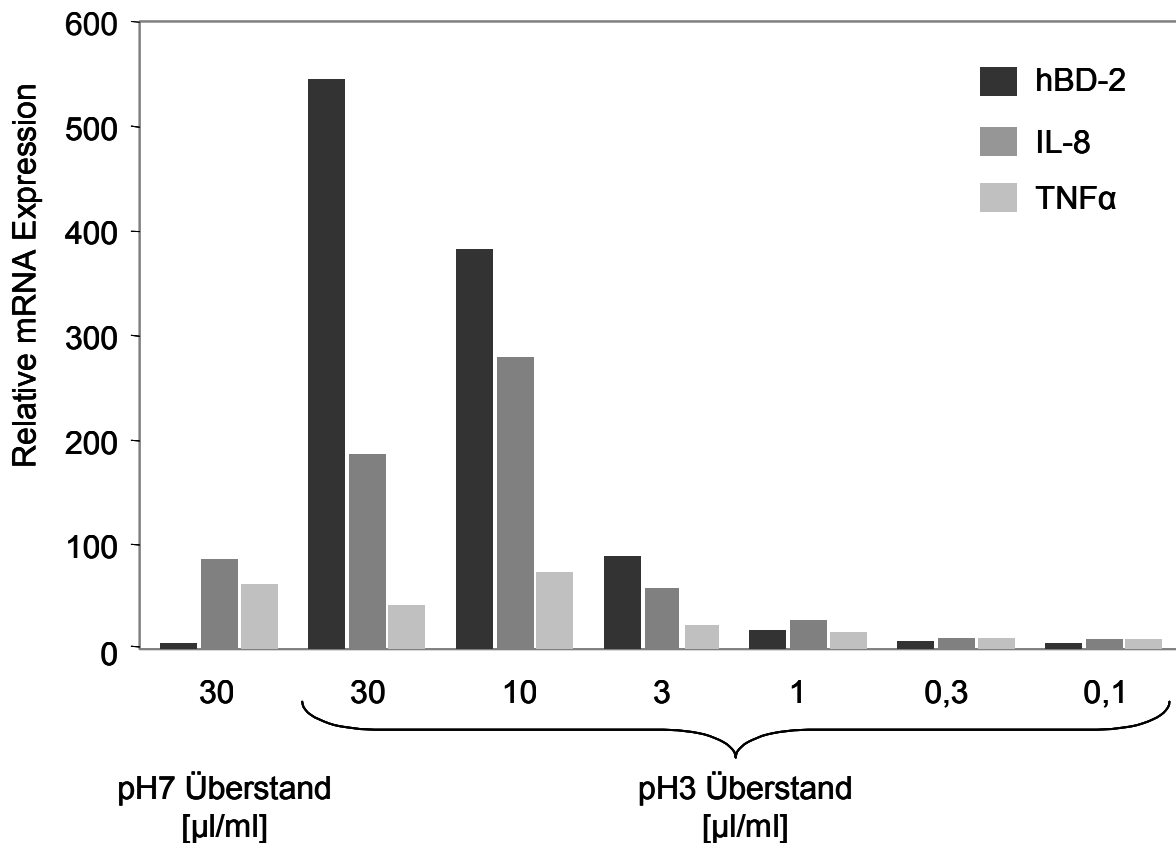
#### **3.2.4.1 Kulturüberstände von *P. aeruginosa* enthalten einen Inhibitor der AP-Induktion in Keratinozyten**

In verschiedenen Kulturüberständen adhärent wachsender *P. aeruginosa* ließen sich zum Teil trotz optimierter Kulturbedingungen (MG-Medium, statische Bedingungen) nur geringe Konzentrationen hBD-2-induzierender Faktoren nachweisen (s. z.B. Abb. 11). Um zu klären, ob diese Beobachtungen auf die Synthese inhibitorischer Faktoren durch *P. aeruginosa* zurückzuführen ist und ob diese in den Kulturüberständen nachweisbar sind, wurden Kulturüberstände von *P. aeruginosa*, die trotz optimierter Bedingungen keine hBD-2-Induktion in Keratinozyten bewirkten, näher untersucht.

Im Rahmen von Reinigungs- und Charakterisierungsexperimenten wie der Säure-Behandlung der Kulturüberstände vor der Reversed-Phase-Chromatographie stellte sich heraus, dass die hBD-2-Induktoren säurestabil sind (s. 3.2.3.5). Daher wurden Überstände, die keine hBD-2-Induktion bewirkten, zunächst angesäuert (pH 3), zentrifugiert und nach Neutralisation in Inkubationsexperimenten mit Keratinozyten verwendet.

Inkubationen primärer Keratinozyten mit derart behandelten, zuvor nicht-hBD-2-induzierenden Überständen führten überraschenderweise zu einer hBD-2-Induktion in primären Keratinozyten (Abb. 30). Ähnliche Ergebnisse ergaben auch Untersuchungen zur Induktion weiterer AP wie RNase-7 und Elafin (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigte sich, dass eine Ansäuerung von MG-Kulturüberständen statischer Kulturen, die ursprünglich keine AP-Induktion bewirkten, zu einer AP-Induktion durch diese behandelten Kulturüberstände führte.

Im Gegensatz zur hBD-2-Induktion waren IL-8- bzw. TNF $\alpha$ -Induktoren in den verwendeten Kulturüberständen auch ohne eine Ansäuerung nachweisbar. Der Unterschied der IL-8-Induktion durch Kulturüberstände ohne Ansäuerung (ca. 100-fach) und die angesäuerte Form (max. 300-fach) stellte sich als gering dar. Für die TNF $\alpha$ -Induktion ergab sich durch eine Ansäuerung der Kulturüberstände keine Steigerung.

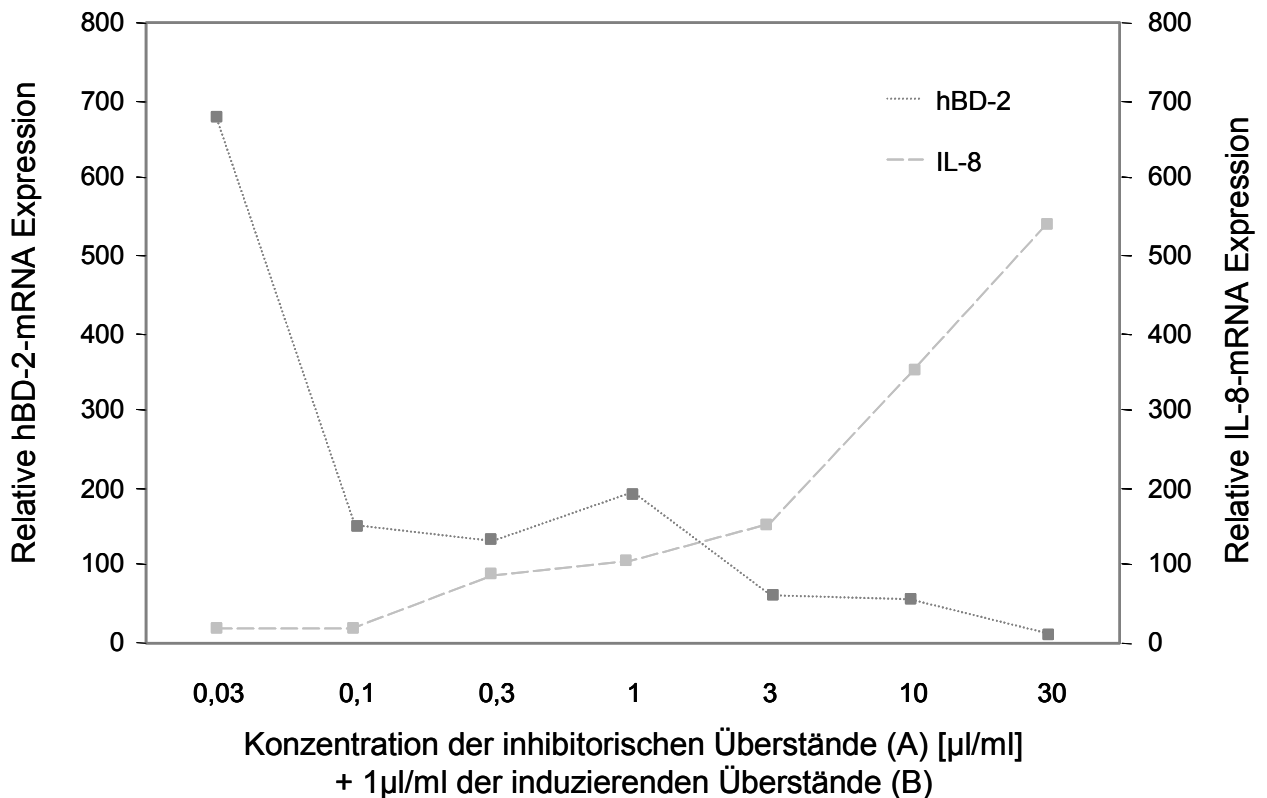


**Abb. 30 HBD-2-, IL-8- und TNFα-Induktion in primären Keratinozyten durch Säure-behandelte Kulturüberstände von *P. aeruginosa*:** HaCaT-Keratinozyten wurden mit Säure-behandelten (pH3) bzw. unbehandelten (pH7) Aliquots von *P. aeruginosa*-Überständen (ATCC 15442, MG-Medium, statischen Kulturen) für 6 Std. inkubiert. Es wurden Konzentrationen von 30 µl/ml, 10 µl/ml, 3 µl/ml, 1 µl/ml, 0,3 µl/ml und 0,1 µl/ml der Säure-behandelten Kulturüberstände verwendet. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für eine Reihe von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

In nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob dieser beobachtete Effekt tatsächlich auf einen durch *P. aeruginosa* freigesetzten Inhibitor der hBD-2-Induktion zurückzuführen war. Zu diesem Zweck wurden Kulturüberstände, die hBD-2- und IL-8-induzierende Faktoren enthielten (B) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Überständen versetzt, für die keine hBD-2-Induktion in Inkubationsversuchen nachweisbar war (A). Diese Mischungen wurden dann in Stimulationsversuchen mit primären Keratinozyten eingesetzt.

Der Verlauf der resultierenden Titrationskurven fiel für hBD-2 und IL-8 unterschiedlich aus (Abb. 31). Demnach schienen die Überstände (A) Inhibitoren der hBD-2-Induktion nicht jedoch der IL-8-Induktion zu enthalten. So ergab sich bei einem Mischungsverhältnis von 0,03 µl Überstand A zu 1 µl Überstand B eine maximale hBD-2-Induktion (ca. 700-fach), während nur eine geringe IL-8-Induktion zu verzeichnen war (ca. 5-fach). Durch steigende Konzentrationen von Überstand A

konnte die hBD-2-Induktion konzentrationsabhängig inhibiert werden, während die IL-8-Induktion sogar anstieg. Bei einem Verhältnis von 30  $\mu\text{l}$  Überstand A zu 1  $\mu\text{l}$  Überstand B ergab sich schließlich nur noch eine ca. 3-fache hBD-2-Induktion, während eine maximale IL-8-Induktion (ca. 600-fach) registriert wurde.

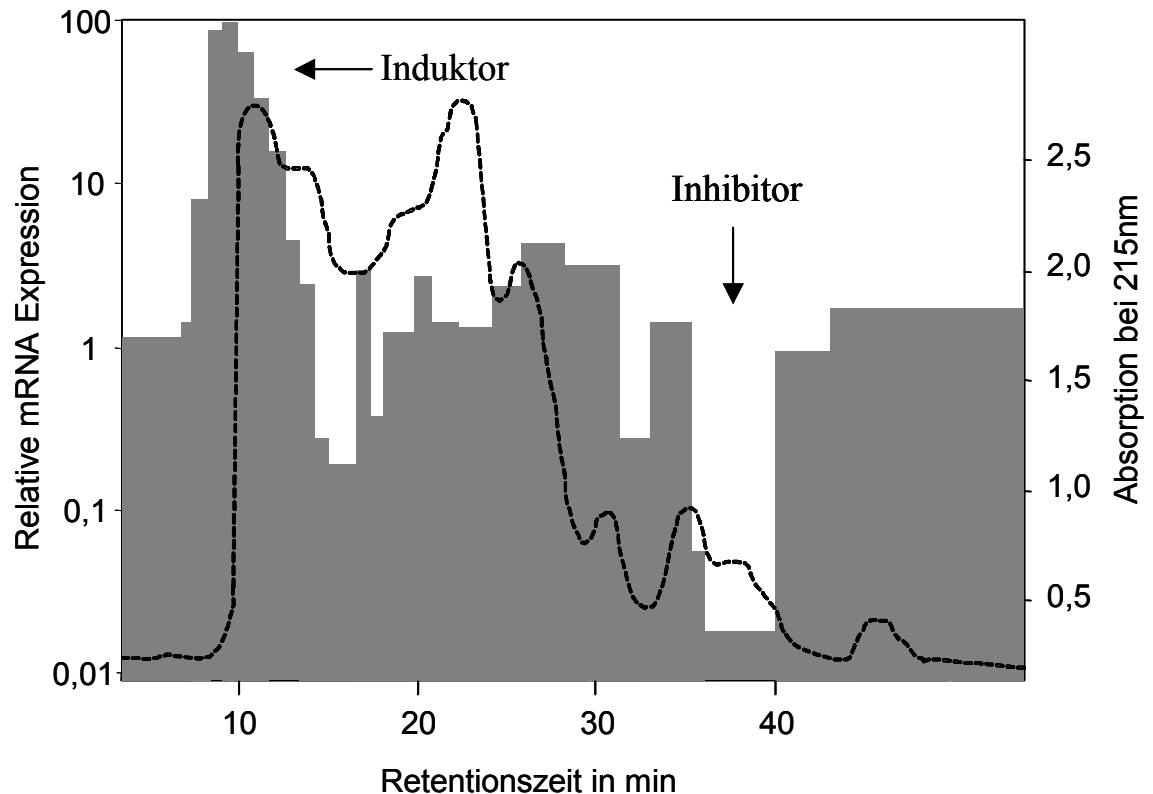


**Abb. 31 Bakterielle Inhibition der hBD-2-Induktion in Keratinozyten durch Kulturüberstände von *P. aeruginosa*:** Kulturen primärer Keratinozyten wurden für 6 Std. mit Gemischen aus 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  hBD-2-induzierenden Überständen (B) und verschiedenen Konzentrationen (30  $\mu\text{l}/\text{ml}$ -0,03  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) eines Kulturüberstandes (A), der keine hBD-2-Induktion bewirkte, inkubiert. Die hBD-2- bzw. IL-8 mRNA Expression wurde quantitativ bestimmt. Überstand A stammte von *P. aeruginosa* ATCC 33358 Kulturen Überstand B von *P. aeruginosa* ATCC 15442 Kulturen (jeweils MG-Medium; statische Kulturen). Das dargestellte Ergebnis ist charakteristisch für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Eine molekulare Charakterisierung der Inhibitoren wurde unter Verwendung inhibitorisch wirkender Überstände an einer Größenausschlußchromatographiesäule (s. 2.11.6.1) durchgeführt und die HPLC-Fractionen hinsichtlich ihrer hBD-2-induzierenden Eigenschaften in HaCaT-Keratinozyten überprüft.

Interessanterweise führten Fraktionen, die im Bereich des vorderen Ausschlussvolumens (ca. 8-12 min; Molekularmasse >75 kD) eluiert wurden, zu einer bis zu 100-fachen hBD-2-Induktion, obwohl bei Inkubationen mit den entsprechenden Kulturüberständen keine hBD-2-Induktion zu verzeichnen war. Dahingegen war bei

der Inkubation mit Fraktionen im Bereich des hinteren Ausschlussvolumens (ca. 35-40 min; Molekularmasse <3 kD) eine nahezu 100-fache Inhibition der hBD-2-Grundexpression (definiert als 1) festzustellen (Abb. 32).

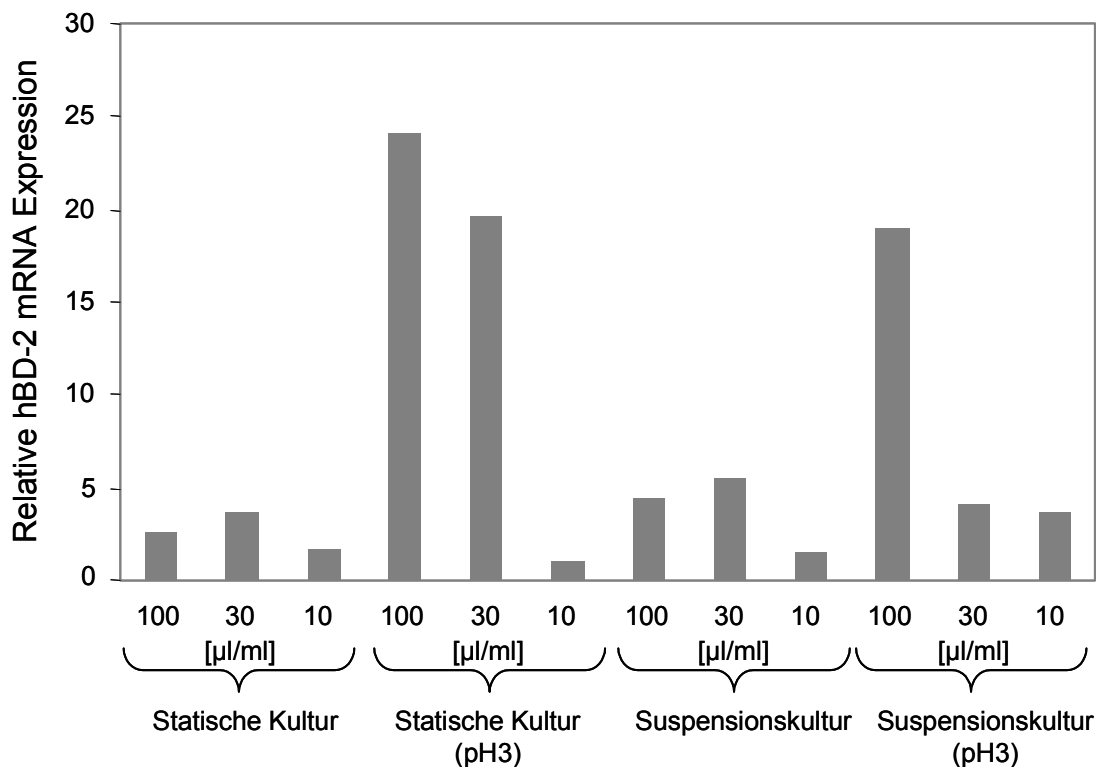


**Abb. 32 HBD-2-induzierende und hBD-2-inhibierende Faktoren aus *P. aeruginosa* Kulturüberständen besitzen unterschiedliche molekulare Eigenschaften** HaCaT-Kulturen wurden für 6 Std. mit den Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie von Kulturüberständen (ATCC 15442, statische Kulturen, MG-Medium), die hBD-2-inhibierende Faktoren enthielten, inkubiert. Die quantitativ ermittelte hBD-2-Expression ist als graue Fläche logarithmisch dargestellt. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Absorption bei 215 nm. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

### 3.2.4.2 *E. coli* produziert Inhibitoren der AP-Expression in Keratinozyten

Um zu ergründen, ob auch andere Bakterien in der Lage sind, die AP-Induktion in Keratinozyten zu inhibieren, wurden Kulturüberstände von *E. coli* auf hBD-2-Inhibitoren untersucht. Hierzu wurden Suspensionskulturen und Überstände adhärent wachsender Kulturen (= statische Kulturen) von *E. coli* entsprechend den Versuchen mit Überständen von *P. aeruginosa* auf pH3 angesäuert und zentrifugiert.

Der verbleibende Überstand wurde anschließend neutralisiert und zur Inkubation von Keratinozyten eingesetzt.

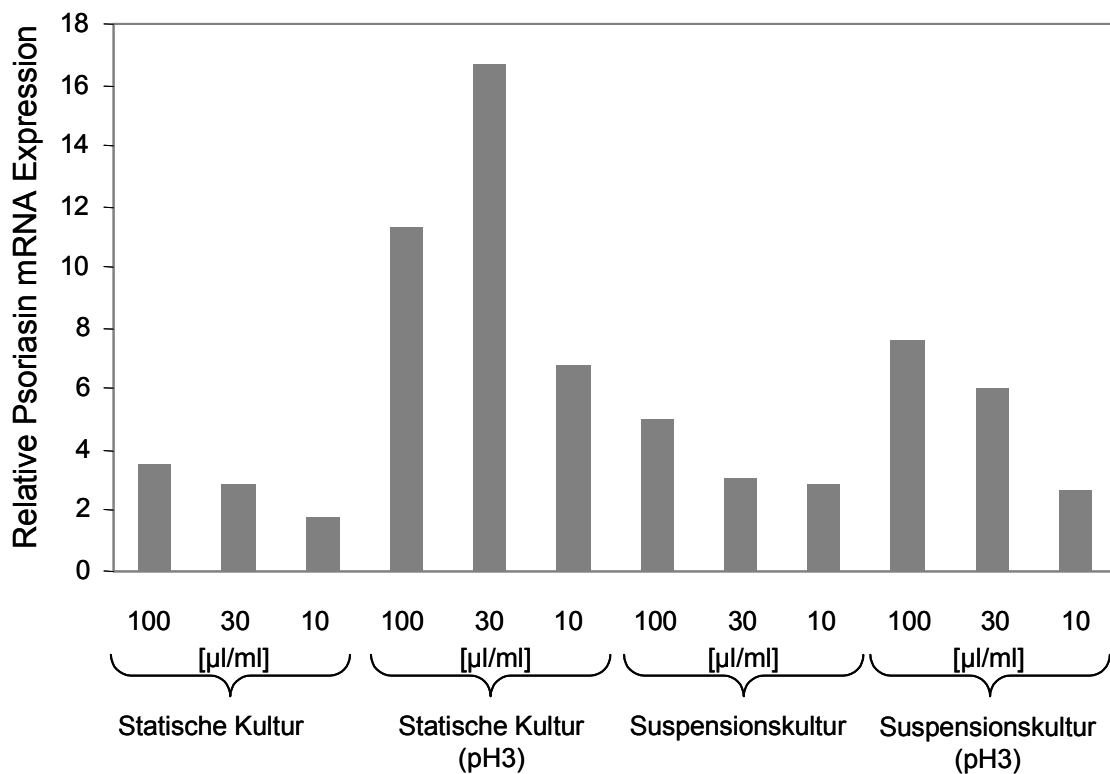


**Abb. 33 HBD-2-Induktion in Keratinozyten durch unbehandelte und Säure-behandelte Kulturüberstände von *E. coli*:** Primäre Keratinozyten wurden in 6-stündigen Experimenten mit unbehandelten (pH7) und Säure-behandelten (pH3) *E. coli*-Kulturüberständen (ATCC 35218, statische Bedingungen bzw. Suspensionskulturen in MG-Medium) inkubiert. Anschließend wurde die hBD-2-mRNA Expression quantitativ bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 100 µl/ml, 30 µl/ml und 10 µl/ml verwendet. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 3 voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.

Tatsächlich zeigte sich, dass bei einer Inkubation von Keratinozyten mit angesäuerten Überständen (pH3) eine erhöhte hBD-2-Induktion feststellbar war (s. Abb. 33). So fand sich bei der Inkubation mit nicht-angesäuerten Kulturüberständen statischer Kulturen bzw. Suspensionskulturen eine ca. 3-5-fache hBD-2-Induktion. Experimente mit den entsprechenden angesäuerten Überständen führten jedoch zu einer ca. 25-fachen hBD-2-Induktion durch Überstände statischer Kulturen bzw. einer 20-fachen Induktion durch Suspensionskulturen.

Da durch unbehandelte *E. coli*-Überstände - mit Ausnahme von MG-Suspensionskulturen - bisher keine Induktion des gegen *E. coli* hoch wirksamen AP Psoriasin gefunden wurde (vgl. Abb. 13C), wurde nun überprüft, ob eine

Säurebehandlung der Überstände auch zu einer erhöhten Psoriasis-Expression in Keratinozyten führte.



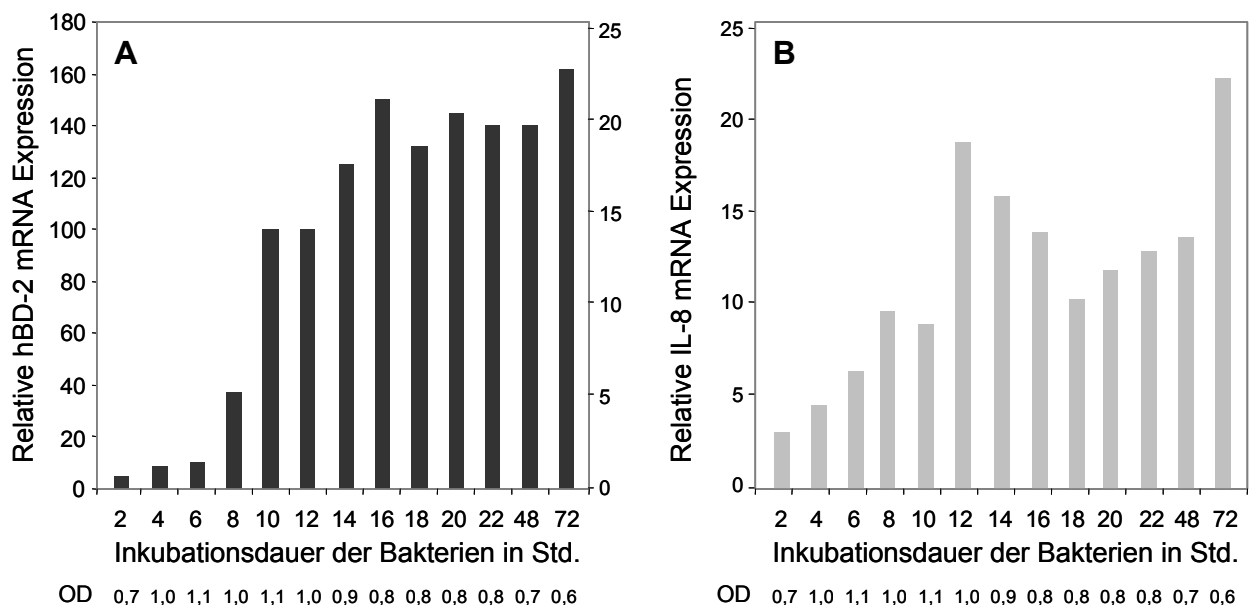
**Abb. 34 Psoriasis-Induktion in Keratinozyten durch unbehandelte und Säure-behandelte Kulturüberstände von *E. coli*:** Primäre Keratinozyten wurden in 6-stündigen Experimenten mit unbehandelten (pH7) und Säure-behandelten (pH3) Aliquots von *E. coli* Kulturüberständen (ATCC 35218 statische Bedingungen bzw. Suspensionskulturen in MG-Medium) inkubiert. Danach erfolgte eine quantitative Bestimmung der Psoriasis-mRNA Expression. Es wurden Konzentrationen von 100 µl/ml, 30 µl/ml und 10 µl/ml verwendet. Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Wie in Abb. 34 dargestellt, führte eine Säurebehandlung der *E. coli*-Kulturüberstände zu einem Anstieg der Psoriasis-Expression. Während die unbehandelten Kulturüberstände zu einer max. 4-fachen (statische Kulturen) bis 5-fachen (Suspensionskulturen) Induktion von Psoriasis in Keratinozyten führten, bewirkten Inkubationen mit den entsprechenden angesäuerten Überständen eine 16-fache (statische Kulturen) bzw. 8-fache (Suspensionskulturen) Induktion der Psoriasis-Expression.



### 3.2.4.3 Untersuchungen zur Kinetik der Produktion AP-induzierender und inhibierender Faktoren durch *P. aeruginosa*

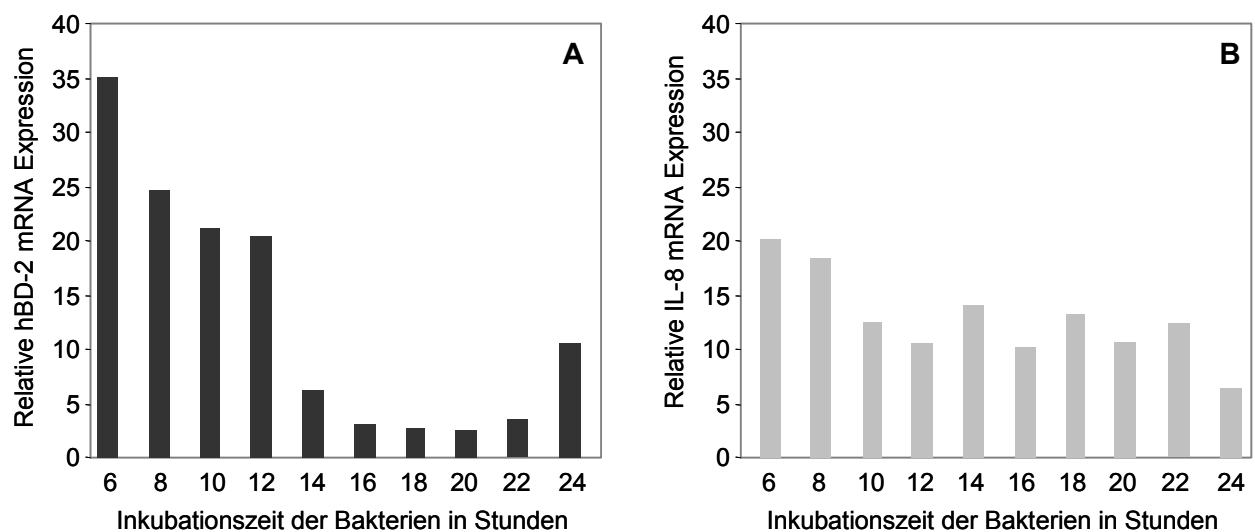
Um die Kinetik der Freisetzung von hBD-2-induzierenden und inhibierenden Faktoren durch *P. aeruginosa* zu untersuchen, wurden die Bakterien unter den in 3.2.1 beschriebenen optimierten Bedingungen inkubiert und die Produktion der hBD-2- bzw. IL-8-Induktoren zu verschiedenen Zeitpunkten durch Inkubationen mit Keratinozyten überprüft.



**Abb. 35 Die Abhängigkeit der Synthese hBD-2- bzw. IL-8-induzierender Faktoren durch *P. aeruginosa* von der Kultivierungsdauer:** Kulturen primärer Keratinozyten wurden für 6Std. mit Überständen von *P. aeruginosa* (ATCC 33358, MG-Medium, statische Kultur für 6–72 Std.) inkubiert. Die Bestimmung der hBD-2- (A) bzw. IL-8- (B) mRNA Expression erfolgte quantitativ. Angegeben ist die OD (optische Dichte) der Bakteriensuspension bei 620 nm. Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Wie aus Abb. 35 ersichtlich, war bereits nach 2-stündiger Inkubation der Bakterien eine ca. 5-fache hBD-2- und eine 4-fache IL-8-Induktion in Keratinozyten durch die Überstände nachweisbar. Zwischen 6 Std. und 16 Std. Inkubationsdauer war ein Anstieg der Konzentration für hBD-2- (bis zu 150-fach) und IL-8-Induktoren (bis zu ca. 20-fach) zu verzeichnen. Während die Konzentration IL-8-induzierender Faktoren bis zu einer Inkubationszeit von 18 Std. abnahm (ca. 10-fach), blieb die Konzentration der hBD-2-Induktoren auch nach 3 Tagen Inkubationszeit auf konstant hohem Niveau (ca. 150-fache Induktion).

Die Untersuchung der Kulturüberstände von *P. aeruginosa*-Stämmen, die Inhibitoren der hBD-2-Induktion in Keratinozyten freisetzen, führte zu dem Ergebnis, dass die hBD-2-Induktion durch diese Bakterienkulturüberstände mit längerer Inkubationsdauer abnahm (Abb. 36A). So verringerte sich die Konzentration der hBD-2-Induktoren zwischen 6 und 18 Std. Inkubationszeit von 35-fach auf 2,5-fach und erreicht nach 24 Std. wieder einen höheren Wert (ca. 10-fach). Bei einer Inkubation der Kulturen von bis zu 14 Tagen blieb die maximale hBD-2-Induktion durch diesen Überstand dann konstant bei einer 10-fachen gesteigerten hBD-2-Expression (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 36 Abhängigkeit der bakteriellen Synthese von hBD-2-Inhibitoren durch *P. aeruginosa* von der Kultivierungsdauer:** Kulturen primärer Keratinozyten wurden für 6Std. mit Kulturüberständen (ATCC 15442, MG-Medium, statische Kultur für 6–72 Std.) inkubiert, die für 6–72 Std. kultiviert worden waren. Die Bestimmung der hBD-2- (A) bzw. IL-8- (B) mRNA Expression erfolgte quantitativ. Angegeben ist die OD (optische Dichte) der Bakteriensuspension bei 620 nm. Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen.

Untersuchungen zur Induktion der IL-8 Expression zeigten, dass in Keratinozyten nach 6 Std. Inkubationszeit eine 20-fache Induktion erreicht wurde. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hBD-2-Induktion ergab sich jedoch für die länger inkubierten Kulturüberstände nur eine geringfügige Abnahme der IL-8-Induktion (Abb. 36B). Auch eine verlängerte Kulturdauer von bis zu 14 Tage resultierte stets in einer ca. 15-fachen Induktion durch die entsprechenden Überstände.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist der Befund, dass die Kultivierungsbedingungen der Bakterien die bakterielle Synthese der induzierenden Faktoren für antimikrobielle Proteine (AP) und proinflammatorische Zytokine (PZ) beeinflussen. Die Verwendung von Überständen aus MG-Kulturen statischer Kulturbedingungen führte zu einer maximalen AP-Induktion sowohl in HaCaT- wie auch in primären Keratinozyten. Eine maximale Induktion von AP und PZ erfolgte zudem durch Überstände von Bakterien, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden.

Auch die Synthese der AP- und PZ-induzierenden Faktoren durch andere Gram-negative und Gram-positive Bakterien ist von deren Kulturbedingungen abhängig. So konnte auch in den Überständen nicht-pathogener Pseudomonaden und von *E. coli* eine maximale hBD-2-Induktion bei Kultivierung in MG-Medium unter statischen Bedingungen (bei *E. coli* als Suspensionskulturen) nachgewiesen werden. Dabei sind in den Überständen nicht-pathogener *Pseudomonas*-Arten scheinbar höhere Konzentrationen an hBD-2-Induktoren nachweisbar als in den Überständen entsprechend kultivierter *P. aeruginosa*. Auch die Induktion von AP und PZ durch Gram-positive Bakterien (*S. aureus*, *S. pyogenes*) ist abhängig von den verwendeten Kulturbedingungen.

Die biochemische Charakterisierung ergab, dass die AP-Induktoren aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen Molekularmassen von >75 kD (Gelfiltration) bzw. weniger als 3 kD besitzen. Untersuchungen der Überstände mittels der Gelfiltration zeigten zudem, dass die IL-8- (ca. 65 kD) bzw. hBD-2-Induktoren (>75 kD) unterschiedliche Molekularmassen aufwiesen.

Des weiteren handelt es sich bei den AP- und PZ-Induktoren um anionische Komponenten, wobei im Rahmen von Anionenaustauschchromatographien interessanterweise für AP-induzierende Faktoren andere Retentionszeiten ermittelt wurden als für PZ-Induktoren.

Reversed-Phase-Chromatographien ergaben, dass die hBD-2-induzierenden Faktoren bei hohen ACN-Konzentrationen eluiert wurden und somit hydrophobe Eigenschaften besitzen.

Die molekulare Integrität der AP- wie auch der PZ-induzierenden Faktoren wird durch unpolare Lösungsmittel wie Acetonitril beeinträchtigt. Es konnte jedoch zumindest für die hBD-2-Induktoren gezeigt werden, dass es möglich ist, diese

Faktoren nach einer Acetonitril-Inkubation durch die Zugabe von Rhamnolipiden zu rekonstituieren.

Weitere Inkubationsexperimente ergaben, dass *P. aeruginosa* aber auch andere Gram-negative Bakterien (z.B. *E. coli*) Induktionsinhibitoren für AP in Keratinozyten synthetisieren. Diese Inhibitoren sind säurelabil, besitzen Molekularmassen von weniger als 3 kD und wirken spezifisch auf die AP-Expression in Epithelzellen.

## 4 Diskussion

Frühere Untersuchungen (Schwichtenberg, Diplomarbeit) zeigten, dass ein klinisches Isolat von *P. aeruginosa* mit mukoider Morphologie im Gegensatz zu verschiedenen nicht-mukoiden ATCC-Stämmen die hBD-2-Expression in Keratinozyten induzierte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Bakterienmorphologie und der bakteriellen Synthese hBD-2-induzierender Faktoren besteht. Die Kultivierungsbedingungen der Bakterien sollten dabei so modifiziert werden, dass verschiedene *P. aeruginosa*-ATCC-Stämme eine adhärente, mukoide Morphologie ausbildeten.

### 4.1 Der Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Morphologie von Bakterien

In den unter 3.1 beschriebenen Untersuchungen zur Morphologie von *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass sowohl die Art des verwendeten Nährmediums als auch der Gasaustausch der Kulturen (Suspensionskulturen, statische Kulturen) die Ausbildung des adhären, mukoiden Phänotyps entscheidend beeinflussten. Bei der Inkubation als Suspensionskultur herrschte der nicht-mukoide Phänotyp vor, während unter statischen Kulturbedingungen der mukoide Phänotyp dominierte. Untersuchungen zur Ausbildung der adhären Form und damit zur Biofilmbildung von *P. aeruginosa* in TSB- bzw. MG-Kulturmedium ergaben, dass trotz der augenscheinlich mukoiden Morphologie beider statischer Kulturen (Abb. 4) nur die in MG-Medium kultivierten *P. aeruginosa* den adhären Phänotyp bildeten (Abb. 5). Im Folgenden wird daher bei der morphologischen Beschreibung der Kulturen zwischen „mukoid / nicht-mukoid“ sowie zwischen „adhären / nicht-adhären“ unterschieden.

#### 4.1.1 Die Kultivierung von *P. aeruginosa* unter Stressbedingungen führt zur Ausbildung des mukoiden Phänotyps

Der mukoide Phänotyp von *P. aeruginosa* ist gekennzeichnet durch die Überexpression verschiedener Exopolysaccharide (EPS), insbesondere jedoch von O-acetylierten Alginaten (s. Abb. 3 links; Evans und Linker, 1973). Diese bestehen aus variablen Anteilen von D-Mannuronsäure und L-Glukuronsäure. Als Zuckerkomponenten kommen neutrale Zucker wie Rhamnose, Mannose, Glukose, Galaktose, N-Glukosamin und N-Galaktosamin vor (Marty et al., 1998). Aber auch (Phospho)lipide und andere Makromoleküle, die sich im interzellulären Raum nachweisen lassen, zählen zu den EPS (Wingender, Neu, Flemming, 1999). Die Zusammensetzung der mukoiden EPS ist wichtig für die Virulenz von *P. aeruginosa*, da an Alginat assoziierte neutrale Polysaccharide bei akuten Infektionen unter anderem als Liganden zur Adhäsion an Epitheloberflächen dienen können (Ramphal und Pier, 1985).

Die besondere Pathogenität bei Infektionen mit der mukoiden Form, wie z.B. bei der zystischen Fibrose, wird zudem durch weitere virulente Faktoren, die charakteristisch für diese Morphologie sind, hervorgerufen: (I) Mukoide, adhärente *P. aeruginosa*-Phänotypen zeigen eine erhöhte Expression zahlreicher Virulenzfaktoren (z.B. Elastase) und toxischer Faktoren (z.B. Zyanidsynthase) und bedingen so die erhöhte Pathogenität der Bakterien (Firoved und Deretic, 2003). (II) Eine Opsonierung durch Antikörper ist bei mukoiden Formen im Vergleich zu nicht-mukoiden Formen erschwert (Baltimore und Shedd, 1983). Durch die Zugabe von Alginat aus Braunalgen konnte dieses Phänomen auch in Kulturen nicht-mukoider Formen beobachtet werden. (III) Mukoide Exopolysaccharide unterdrücken die Aktivität neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten (Friedl et al., 1992; May et al., 1991). (IV) Die O-acetylierten Gruppen der Alginate mukoider Formen inaktivieren von neutrophilen Granulozyten freigesetztes Hypochlorit. Nicht-mukoide Phänotypen von *P. aeruginosa* werden durch Hypochlorit abgetötet (Learn et al., 1987). (V) Die Wirkung verschiedener Antibiotika ist bei mukoiden Formen von *P. aeruginosa* vermindert (Anwar et al., 1992).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen verschiedener ATCC-Stämme zeigte sich, dass die Kulturbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der mukoiden Morphologie hatten. So konnte eine Ausbildung der mukoiden Form durch die Verwendung von statischen Bedingungen und MG-, TSB-,

bzw. HP-Medium induziert werden (vgl. Abb. 4). Es wurde hingegen bei der Untersuchung von entsprechenden Suspensionskulturen keine mukoide Morphologie festgestellt. Damit scheint die mukoide Morphologie von *P. aeruginosa* im wesentlichen ein Resultat der statischen Kulturbedingungen zu sein. Aber auch die Zusammensetzung des Kulturmediums ist von Bedeutung, da sich bei der Verwendung von AG- bzw. M9-Medium keine mukoide Formen der Bakterien entwickelten.

Besonders ausgeprägt war die Bildung des mukoiden Phänotyps bei der Verwendung von MG-Medium unter statischen Kulturbedingungen. Die Zusammensetzung des MG-Mediums ist durch eine relativ geringe Konzentration von Glukose (30 mM) als einzige Kohlenstoffquelle, eine niedrige Stickstoffkonzentration (7 mM Ammoniumsulfat) und durch ein Mangel an verschiedenen Spurenelementen (besonders durch die Abwesenheit von Eisen) als typisches Magermedium gekennzeichnet. Daher könnte die Dominanz der mukoiden Form bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* in MG-Medium unter statischen Bedingungen auf das schlechte Nährstoffangebot verbunden mit einem O<sub>2</sub>-Mangel zurückzuführen sein und somit eine Adaptierung der Bakterien an eine Stress-Situation darstellen. Speert und Mitarbeiter beschrieben bereits 1990, dass eine Ausbildung der mukoiden Morphologie nicht auf Besonderheiten der untersuchten *P. aeruginosa*-Stämmen zurückzuführen ist, sondern dass vielmehr eine Nährstofflimitierung hierfür ursächlich ist (Speert et al., 1990). Zudem konnte gezeigt werden, dass es durch die suboptimale Nährstoffversorgung zu einer vermehrten Expression sog. „rauer“ (rough) LPS-Moleküle kommt, wohingegen nicht-mukoide Formen hauptsächlich glatte (smooth) LPS-Moleküle aufweisen. Aber auch durch den Eisen-Mangel des MG-Mediums (frei von Eisen) bzw. des HP-Mediums (enthält 1 µM Eisensulfat) könnte die Dominanz der mukoiden Morphologie in den durchgeführten Untersuchungen zu erklären sein. Es ist bekannt, dass erst ab einer Konzentration von 10 µM Eisen in Nährmedien die nicht-mukoide Form gegenüber der mukoiden Morphologie (ca. 100:1) in *P. aeruginosa*-Kulturen dominiert (Boyce und Miller, 1982). Auch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches *in-vivo* durch polymorphkernige Leukozyten (PMN) freigesetzt wird, kann einen Wechsel zur mukoiden Morphologie induzieren (Mathee et al., 1999). Die Ausbildung des mukoiden Phänotyps bei Verwendung von TSB-Medium unter statischen Bedingungen muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Ein weiterer Faktor, der zur Ausbildung der mukoiden Morphologie beitragen kann, ist oxidativer Stress. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Alginateproduktion durch *P. aeruginosa* bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (<5 % DOT Luftsättigung) ein Maximum erreicht (Leitao und Sa-Correia, 1993). Aber auch bei längerer Inkubation mit extrem hohen O<sub>2</sub>-Konzentrationen bildet *P. aeruginosa* verstärkt eine mukoiden Morphologie aus (Sabra et al., 2002). Die Autoren deuten dieses Phänomen als eine Verteidigungsstrategie des Bakteriums gegenüber reaktiven O<sub>2</sub>-Intermediaten, da eine Diffusion dieser Moleküle durch die mukoiden Polysaccharidhülle erschwert ist. Eine andere Arbeitsgruppe konnte kürzlich in diesem Zusammenhang ein weiteres Phänomen beschreiben (Wyckoff et al., 2002). So soll in *P. aeruginosa*-Kulturen nach längerer Inkubation unter statischen Bedingungen wieder vermehrt eine Änderung zur nicht-mukoiden Morphologie hin erfolgen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass mukoiden *P. aeruginosa*-Kulturen verstärkt das Gen *algU* (= Sigma-Faktor *rpoE*) exprimieren, welches die Alginate synthese induziert und gleichzeitig die Flagellenausbildung unterdrückt. (Garrett et al., 1999). Damit die Bakterien aus der mukoiden Kolonie austreten können, müssen sie in die nicht-mukoiden jedoch Flagellen-bildende Form übergehen. Diese Flagellen-bewehrten nicht-mukoiden „Schwärmer“ dienen somit der Verbreitung der Art.

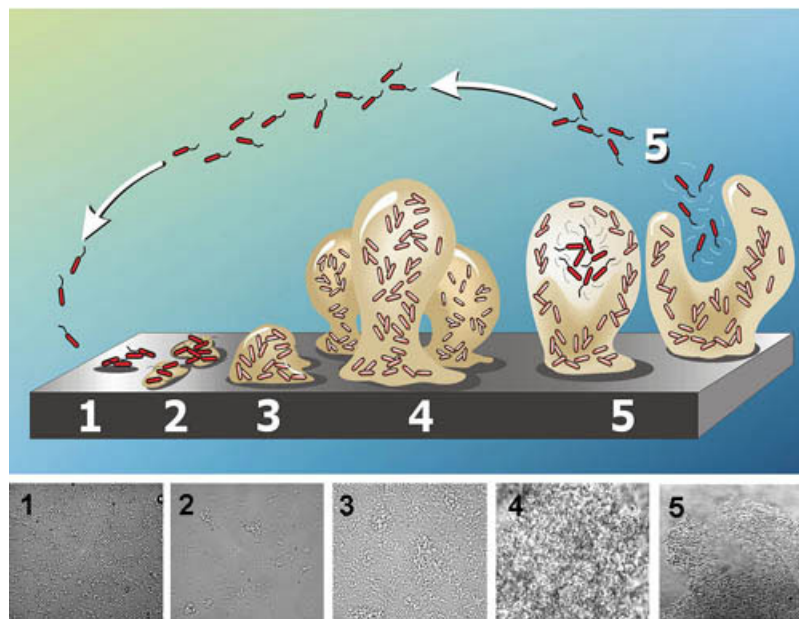
#### **4.1.2 Die Kultivierung unter Stressbedingungen führt zur Ausbildung von adhärennten Formen durch *P. aeruginosa***

In weiteren Untersuchungen zum Einfluss der Kulturbedingungen auf die Morphologie der Bakterien wurde überprüft, inwiefern die Kulturbedingungen einen Einfluss auf die Adhärenz von *P. aeruginosa* und damit auf die Bildung sog. Biofilme haben. Im Rahmen eigener Untersuchungen waren adhärennte Formen von *P. aeruginosa* bei Kulturen festzustellen, die unter statischen Bedingungen und insbesondere bei Verwendung des MG-Mediums inkubiert worden waren. Man könnte somit auch für dieses Phänomen postulieren, dass die erwähnten Kulturbedingungen eine Stress-Situation für *P. aeruginosa* darstellen und dazu führen, dass sich die Bakterien durch eine veränderte Genexpression als adhärennte Phänotypen in den äußerst widerstandsfähigen Biofilmen organisieren (s. Abb. 5). Dafür spricht auch, dass bei Verwendung optimaler Wachstumsbedingungen für die



Bakterien (TSB-Medium, Suspensionskultur) in den Untersuchungen zur Biofilmbildung nahezu keine adhärenenten Zellen nachgewiesen werden konnten.

Unter einem Biofilm versteht man die Aggregation sessiler Mikroorganismen, die innerhalb einer Schleimmatrix leben und im Vergleich zur ihrer planktonischen Form einen veränderten Phänotyp aufweisen (Mayer et al., 1999; Shirtliff et al., 2002). Die Besiedlung erfolgt an sogenannten Grenzflächen, die sich durch den Übergang zweier Aggregatzustände beschreiben lassen. Es wird dabei zwischen fest und gasförmig wie auf der Oberfläche einer Hausfassade, zwischen fest und flüssig wie bei der inneren Auskleidung eines Blasenkatheters oder zwischen flüssig und gasförmig (z.B. an einer Wasseroberfläche) unterschieden. Die Bakterien siedeln jeweils auf dem erstgenannten Untergrund und sind in das zweitgenannte Medium exponiert.



**Abb. 37 Die Ausbildung eines Biofilms durch *P. aeruginosa* gliedert sich in 5 Phasen:** **Phase 1:** reversible Anheftung von solitären, planktonischen Zellen an eine Oberfläche. **Phase 2:** Die solitären Zellen beginnen mit der Synthese extrazellulärer Polysaccharide (z.B. Alginate) und verlieren ihre Flagellen. Es bildet sich verstärkt der mukoide Phänotyp. **Phase 3:** erste Phase der Ausreifung („Maturation“) des Biofilms durch Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen. **Phase 4:** Fortsetzung der Ausreifung, es beginnen sich Bereiche mit hoher Zelldichte und offene Kanäle zum Stofftransport zu bilden, so dass eine Heterogenität bezüglich genetischer Expression und Physiologie der Bakterienzellen abhängig von ihrer Lage im Biofilm entsteht. **Phase 5:** Es stellt sich ein Gleichgewicht von Neubildung und Absterben des Biofilms ein. Die einzelnen Bakterienzellen weisen eine extreme hohe Diversität hinsichtlich ihrer Genexpression auf. Es bildet sich zum Teil wieder der nicht-mukoide Phänotyp mit Flagellen, der für eine Weiterverbreitung der Kolonie sorgt („swarming“). Graphik und Photos nach Sauer und Mitarbeitern (2002).

Die Ausbildung eines Biofilms kann nach der Definition von Sauer und Mitarbeitern in 5 Phasen gegliedert werden (Stoodley et al., 2002; Abb. 37). Phase I der Biofilmbildung ist durch eine reversible Anheftung von planktonischen Zellen über schwache Bindungskräfte (elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen u. ä.) an Oberflächen charakterisiert. Von *P. aeruginosa* ist bekannt, dass sich die Bakterien mit Hilfe von Typ IV-Pili in dieser Phase auch noch in zweidimensionaler Richtung auf der Oberfläche bewegen und so für eine weitere Ausbreitung sorgen („twitching motility“; O'Toole und Kolter, 1998). Phase II beginnt, wenn es durch die Expression von extrazellulären polymeren Substanzen (z.B. Alginaten) durch die Bakterien zu einer Anheftung auf der Siedlungsmatrix kommt. Die adhärenen Zellen zeigen in dieser Phase durch eine veränderte Genexpression bereits einen anderen Phänotyp als die solitären, planktonischen Zellen. In den Phasen III und IV der Biofilmbildung erfolgt die Maturation („Ausreifung“) des Biofilms. Diese ist charakterisiert durch die Ausbildung dreidimensionaler Strukturen, die durch Bereiche mit hoher Zelldichte und dichter Polymermatrix, sowie Kanälen mit geringer Polymerkonzentration gekennzeichnet sind (Nickel et al., 1994). Diese Kanäle ermöglichen einen konvektiven Stofftransport und ergänzen die Diffusionsphänomene innerhalb der Polymermatrix. Durch den Stoffwechsel der Bakterien kommt es zu einer Ausbildung von O<sub>2</sub>- und pH-Gradienten innerhalb des Biofilms, was zu einer starken Heterogenität der Bakterien und in der Folge zur Entwicklung einer komplexen Lebensgemeinschaft führt. In Phase V stellt sich nun ein Gleichgewicht von weiterem Wachstum und Absterben von Teilen des Biofilms ein. In dieser Phase weisen die verschiedenen Bakterienzellen in Abhängigkeit von ihrer Position im Biofilm einen derart hohen Grad an differentieller Genexpression auf, dass man den Biofilm als ein Analogon zu den Geweben höherer Lebewesen ansehen kann (Costerton, 1999).

Das Leben als adhärenente Form in einem Biofilm bietet den Bakterien eine Reihe von Vorteilen. So zeigen bereits Bakterien der Phase II (Monolayer-adhärenente Zellen) gegenüber planktonischen Zellen eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika, die bei Bakterien, die in ausgereiften Biofilmen leben, nochmals gesteigert ist. (Aaron et al., 2002). In weiteren Studien anderer Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass bei Bakterien, die als Biofilm wuchsen, teilweise eine 100-1000-fach erhöhte Konzentration verschiedener Antibiotika zur Inaktivierung eingesetzt werden musste (Ceri et al., 1999). Da im Rahmen dieser Arbeit keine Ausbildung von adhärenenten

Kulturen durch *P. aeruginosa* unter optimalen Wachstumsbedingungen (TSB-Medium, Suspensionskultur) gefunden wurde, könnte man spekulieren, dass bei fehlenden Stressfaktoren als Phänotyp die planktonische, solitäre Einzelzelle dominiert. Denn durch eine anschließende Kultivierung dieser Bakterien unter suboptimalen Wachstumsbedingungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nicht-adhärenente *P. aeruginosa* zu einer Alginat-produzierenden, adhärenenten Form konvertierten. Somit könnte die beobachtete Ausbildung adhärenenter Kulturen auf das schlechte Nährstoffangebot und auf eine O<sub>2</sub>-Limitierung zurückzuführen sein und eine Adaptierung der Bakterien an eine Stress-Situation darstellen. Auch die Tatsache, dass im verwendeten MG-Medium - im Gegensatz zu den anderen untersuchten Medien - Glukose die einzige Kohlenstoffquelle darstellt, könnte ein entscheidender Faktor für die Biofilmbildung darstellen. So zeigten verschiedene Studien, dass bei Verwendung von Nährmedien, die Glukose als einzige Kohlenstoff-Quelle enthielten, die Biofilmbildung durch *P. aeruginosa* gesteigert wird (De Kievit et al., 2001).

Auch in den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte *in-vitro* ein Wechsel zwischen dem Biofilm-bildenden Phänotyp und der nicht-adhärenenten Form induziert werden. So wurde nachgewiesen, dass in M9-Medium kultivierte *P. fluorescens* eine verstärkte Expression von Adhesinen im Vergleich zu *P. fluorescens* aufwies, die in einem Vollmedium (LB-Medium) inkubiert wurden (Nikolaev et al., 2000). Die Adhäsion der Bakterien aus M9-Kulturen an Glasoberflächen (fest / flüssig) hatte eine signifikant erhöhte Ausbildung von Biofilmen zur Folge. Auch die Zugabe geringer Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu nicht-mukoiden Formen von *P. aeruginosa* bewirkte *in-vitro* eine Alginatsynthese (Mathee et al., 1999) und die Ausbildung eines Biofilmphänotyps, der eine gesteigerte Resistenz gegenüber verschiedenen Bioziden und insbesondere oxidierenden Substanzen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl) aufwies (Hassett et al., 1999). Dieser Effekt ließ sich auch durch polymorphkernige Leukozyten, die *in-vivo* nach Aktivierung ebenfalls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freisetzen, erzielen. Bereits 1990 wurde gezeigt, dass die hohe NaCl-Konzentration (ca. 75-125 mM) in einer an zystischer Fibrose erkrankten Lunge die Ausbildung eines mukoiden Biofilm-bildenden Phänotyps begünstigt (Mohr et al., 1990). Die adhärenente, mukoiden Form von *P. aeruginosa* stellt somit den dominierenden Phänotyp während einer Infektion dar. Da dieser Phänotyp, wie bereits erwähnt, zudem eine erhöhte Virulenz und damit Pathogenität aufweist, könnten Epithelzellen auf das verstärkte Auftreten der adhärenenten, mukoiden Formen

in statischen MG-Kulturen mit einer erhöhten Expression von AP wie hBD-2 reagieren, um so eine Infektion durch diese virulente Form abzuwehren.

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass nur die adhärente, mukoide *P. aeruginosa*-Form einen Phänotyp darstellt, der von Keratinozyten als „Gefahr“ erkannt wird und nachfolgend eine Induktion von PZ und AP erfolgt. Die Interaktion von Keratinozyten mit Überständen dieser Kulturen stellt somit im Gegensatz zu Überständen von Kulturen, die unter optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert wurden, ein Modell für die *P. aeruginosa*-Epithel-Interaktion während einer *in-vivo* Besiedlung der Haut dar.

## **4.2 Die Charakterisierung Keratinozyten-aktivierender Pathogen-assoziiertes Moleküle (PAMs)**

### **4.2.1 Mukoide, adhärente *P. aeruginosa* weisen eine gesteigerte Synthese AP- und PZ-induzierender PAMs auf**

Nachdem deutlich geworden war, dass die Ausbildung der mukoiden bzw. adhären Morphologie durch *P. aeruginosa* von den gewählten Kultivierungsbedingungen abhängt, sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen dieser Morphologie und der AP- bzw. PZ-Induktion in Keratinozyten durch die entsprechenden Kulturüberstände besteht. Dabei stellte sich heraus, dass Überstände von *Pseudomonas*-Kulturen, die unter Stressbedingungen kultiviert worden waren (Nährstofflimitation, mangelnde O<sub>2</sub>-Versorgung) und eine mukoide, adhärente Morphologie aufwiesen, eine über 1000-fache Induktion von hBD-2 in Keratinozyten bewirkten. Überstände von *Pseudomonas*-Kulturen, die unter optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert worden waren, vermochten hingegen nur in geringem Ausmaß hBD-2 bzw. IL-8 in Keratinozyten zu induzieren. Die unter Stressbedingungen kultivierten *P. aeruginosa* synthetisieren demnach AP- bzw. PZ-Induktoren, die zu den sogenannten Pathogen-assoziierten Molekülen (PAMs) zu zählen sind. Unter dieser Bezeichnung werden hochkonservierte mikrobielle Strukturen wie beispielsweise LPS, Peptidoglykan oder bakterielle DNA zusammengefasst. Wirtszellen wie z.B. Epithelzellen erkennen die Anwesenheit

(pathogener) mikrobieller Organismen anhand dieser Substanzen, um im Folgenden Abwehrmechanismen (wie die gesteigerte Synthese von AP und PZ) zu initiieren (Hornef et al., 2002).

Sowohl bei immortalisierten HaCaT-Keratinocyten (s. Abb. 7A) als auch bei primären Keratinocyten (s. Abb. 9) wurde die höchste hBD-2-Induktion durch Stimulationen mit Überständen statischer MG-Kulturen erzielt. Diese Kulturen sind durch eine ausgeprägte mukoide und adhärente Morphologie der Bakterien charakterisiert. Die hohe IL-8-Induktion durch die AG-Überstände (s. Abb. 7B) kann durch die unter diesen Bedingungen gesteigerte Synthese des Pigments Pyocyanin begründet sein, für welches bereits eine IL-8-induzierende Wirkung in Epithelzellen der Lunge beschrieben worden ist (Denning et al., 1998). Zudem kommt es bei einer Phosphat-Limitierung, wie sie auch beim AG-Medium gegeben ist, zu einer gesteigerten Pyocyanin-Synthese durch *P. aeruginosa* (Hassett et al., 1992). Grundlegend wird die Expression von Pyocyanin jedoch über das Quorum-Sensing-System reguliert (Brint und Ohman, 1995). Auch für weitere AP (z.B. RNase 7) und PZ (z.B. IL-6) konnte in dieser Arbeit eine erhöhte Induktion durch Überstände „gestresster“ Bakterien mit adhärenenten, mukoiden Phänotypen gezeigt werden (Abb. 10), so dass die Erkennung spezifischer Bakterien-substanzen dieses Phänotyps ein generelles Prinzip der epithelialen Abwehr der Keratinocyten darstellen könnte. Stimulationen mit Überständen von Bakterien, die unter optimalen Wachstumsbedingungen kultiviert worden waren und somit keine adhärente, mukoide Morphologie aufwiesen, führten hingegen nur zu einer geringfügigen Induktion von AP und PZ (vgl. Abb. 6, Abb. 7, Abb. 9).

Die Bedeutung dieser Befunde wird noch durch die Tatsache gestärkt, dass auch die Induktion von AP und PZ durch Überstände weiterer *Pseudomonas*-Arten (vgl. Abb. 12) aber auch weiterer Gram-negativer (vgl. Abb. 13) und sogar Gram-positiver Bakterien (s. Abb. 14 und Abb. 15) abhängig von den Kultivierungsbedingungen der Bakterien sind. Dabei konnte zumindest für verschiedene *Pseudomonas*-Spezies gezeigt werden, dass auch durch nicht-pathogene Arten eine gesteigerte Synthese der hBD-2- und IL-8-Induktoren bei der Kultivierung unter Stressbedingungen erfolgt. Auch hier war die Ausbildung von mukoiden, adhärenenten Phänotypen verstärkt zu beobachten (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Ausbildung des mukoiden, adhärenenten Phänotyps durch *P. fluorescens* in Stress-Situationen wie bei *P. aeruginosa* durch den AlgU-MucA-MucB-Cluster

reguliert wird (s. Abschnitt 4.2.3; Schnider-Keel et al., 2001). Die Tatsache, dass die nicht-pathogenen *Pseudomonas*-Arten *P. fluorescens* und *P. stutzeri* eine höhere hBD-2- und IL-8-Induktion in Keratinozyten bewirkten als *P. aeruginosa*, könnte ein Hinweis auf die Synthese von hBD-2-Inhibitoren durch *P. aeruginosa* sein. Auf diese Hypothese wird in Abschnitt 4.3 eingegangen.

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass *E. coli*-Bakterien Biofilme bilden, wenn die Kultivierung in einem Minimalmedium mit Glukose als Substrat statt mit Glycerol, Laktose, Mannose, Succinat, Natriumpyruvat oder Laktat erfolgt (Dewanti und Wong, 1995). Auch bei eigenen Untersuchungen mit *E. coli*-Überständen fand sich ein Zusammenhang zwischen einer mukoiden, adhärenen Morphologie (insbesondere bei Verwendung des MG-Mediums, Daten nicht gezeigt) und einer gesteigerten Synthese AP-induzierender Faktoren (wie z.B. hBD-2, vgl. Abb. 13).

Damit ist ein Zusammenhang zwischen einer Stress-Situation für Bakterien (limitierte Nährstoff- und O<sub>2</sub>-Bedingungen), der Morphologie der Bakterien und der Induktion epithelialer Abwehrmechanismen hergestellt. Diese Erkenntnisse könnten helfen, die *in-vivo*-Situation einer bakteriellen Infektion besser zu verstehen. So befinden sich *P. aeruginosa* und andere Mikroorganismen während der *in-vivo* Besiedlung von Epithelien in einer Stress-Situation, da die Bakterien epitheliale Abwehrmechanismen überwinden und gleichzeitig Nahrungsressourcen für ihr Wachstum erschließen müssen. Wie bereits erwähnt (s. 4.1), konnte im Rahmen dieser Arbeit, wie zuvor durch andere Arbeitsgruppen (Speert et al., 1990), gezeigt werden, dass Stressbedingungen zur Ausbildung der adhärenen, mukoiden Morphologie durch *P. aeruginosa* führen. Diese Form von *P. aeruginosa* stellt *in-vivo* den dominierenden Phänotyp während einer Infektion dar (Cheng et al., 1996). *P. aeruginosa* ist beispielsweise während einer chronischen Infektion der Lunge durch verschiedene Abwehrmechanismen des Wirtsimmunsystems (z.B. Freisetzung von Hypochlorit oder von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch PMNs) einer Stress-Situation ausgesetzt. Auch in dieser Stress-Situation wechselt *P. aeruginosa* von einer nicht-mukoiden zu einer mukoiden Morphologie (Marshall und Carroll, 1991). Marshall und Carroll stellten fest, dass bei 90 % der an zystischer Fibrose erkrankten Patienten mukoide Formen von *P. aeruginosa* die primären Pathogene darstellen. Diese Arbeiten belegen somit, dass adhärenente, mukoide Formen von *P. aeruginosa* während einer Infektion dominieren. Es stellt sich daher die Frage, wie die Morphologieänderung von

*P. aeruginosa* und die damit verbundene unterschiedliche Synthese der hBD-2- und IL-8-induzierenden PAMs gentisch reguliert wird.

#### **4.2.2 Das Quorum-Sensing-System reguliert die Synthese der AP- und PZ-Induktoren in *P. aeruginosa***

Der Wechsel des Phänotyps von der planktonischen Einzelzelle zur mukoiden, adhärenen Zelle ist das Resultat einer Änderung des Genexpressionsprofils bei *P. aeruginosa*. In Untersuchungen zur Genexpression planktonischer und sessiler *P. putida* wurden 40 Gene identifiziert, die eine unterschiedliche Expression aufweisen (Sauer und Camper, 2001). Weitere Studien zeigten, dass die genetische Verwandtschaft zwischen verschiedenen *Pseudomonas*-Arten höher einzustufen ist als die Verwandtschaft zwischen der planktonischen und der Biofilm-bildenden Form einer einzelnen *Pseudomonas*-Art (Stoodley et al., 2002). Die Änderung der Morphologie beinhaltet nach einer anderen Untersuchung eine Änderung der Expression von ca. 1% der Gene (Whiteley et al., 2001). Jeweils die Hälfte dieser Gene wurde aktiviert bzw. deaktiviert. Es muss jedoch erwähnt werden, dass bei diesen Untersuchungen die durchschnittliche Genexpression des gesamten Biofilms analysiert wurde, der aber, wie bereits erwähnt, äußerst heterogen erscheint.

Der Übergang von der planktonischen zur adhärenen Form ist bei *P. aeruginosa* zudem mit der verstärkten Expression zahlreicher systemischer extrazellulärer und zell-assoziiierter Virulenzfaktoren verbunden (Van Delden und Iglewski, 1998; s. Tabelle 4.2). Während der Kolonisationsphase, also nach Sauer und Mitarbeitern in Phase I und II der Biofilmbildung (s. Abschnitt 4.1), werden zell-assoziierte Virulenzfaktoren wie Adhesine, aber auch Alginate, verstärkt exprimiert. Kommt es daraufhin zu einer akuten Infektion durch Biofilm-bildende *P. aeruginosa*, werden außerdem zahlreiche extrazelluläre Virulenzfaktoren synthetisiert, die als Invasine und Toxine charakterisiert sind (z.B. Elastasen und Lipasen).

Doch wie wird der Wechsel des Phänotyps und die damit verbundene veränderte Genexpression von z.B. Virulenzfaktoren durch *P. aeruginosa* reguliert?

Die Expression zahlreicher Gene von *P. aeruginosa* wird im Rahmen des sog. „Quorum-Sensing-Systems“ über die Konzentration löslicher „Autoinducer“ (Acyl-Homoserinlaktone) kontrolliert (Übersicht in Whitehead et al., 2001). Dieses System ermöglicht es den Bakterien, Änderungen ihrer Umwelt wahrzunehmen und

entsprechend zu reagieren, so dass die Bakterien eher wie ein „Organismus“ reagieren und nicht wie eine Ansammlung individueller Zellen. Dabei sind die Bakterien in der Lage, durch die konstitutive Expression der Acyl-Homoserinlaktone die bakterielle Zelldichte und somit die eigene Populationsgröße zu überwachen. Daher erfolgt erst bei einer bestimmten bakteriellen Populationsdichte ein koordinierter Wechsel des Phänotyps zur mukoiden, adhärenen Form und damit einhergehend eine gleichzeitig einsetzende Expression verschiedener Virulenzfaktoren durch die gesamte Bakterienpopulation.

Art des Virulenzfaktors	Virulenzfaktor	Wirkung
<u>Adhesine</u>	Fimbrien (N-Methyl-Phenylalanin-Pili)	Adhäsion der Bakterien an verschiedene Oberflächen
	Alginate	Adhäsion und Schutzfunktion
<u>Invasine</u>	Elastase LasA	Serin-Protease; zerstört Elastin; wirkt synergistisch mit LasB und der alkalischen Protease
	Elastase LasB	Zink-Metalloprotease; zerstört Elastin, Kollagen, IgG und IgA sowie Lysozym und besitzt weitere proteolytische Aktivität (z.B. auf Casein)
	Alkalische Proteasen	Lysiert Fibrin, zerstört zusammen mit Elastasen Fibrin-Elastin Strukturen wie die Cornea und inaktiviert IFN und TNF $\alpha$
	Rhamnolipid	Zerstört Phospholipidoberflächen von z.B. Lungenepithelzellen durch seine Detergenz-ähnliche Struktur; inhibiert die Zilienfunktion respiratorischer Gewebe
	Phospholipase C	Wirkt synergistisch mit Rhamnolipiden
	Leukocidin	Bildet Poren in eukaryotischen Zellen (z. B. in neutrophilen Granulozyten)
<u>Toxine</u>	Exotoxin A (ADP-Ribosyl-Transferase)	Inhibiert wie das Diphtherie-Toxin die Proteinbiosynthese durch Inaktivierung von Elongationsfaktoren
	Exoenzym S (ADP-Ribosyl-Transferase)	Zerstört Gewebe der Lunge und beeinträchtigt die Funktion phagozytotischer Zellen
	Pyocyanin	Erzeugt freie Radikale und zerstört so Epithelien; besitzt proinflammatorische Wirkungen auf Phagozyten
	LPS	Ermöglicht die Adhärenz an Oberflächen und verhindert die Phagozytose

**Tabelle 4.2:** Überblick über einige der bekannten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*

Untersuchungen von Whiteley et al. zeigten, dass die Expression von ca. 4% der *P. aeruginosa*-Gene durch das „Quorum-Sensing-System“ kontrolliert wird (Whiteley et al., 1999). Die molekularen Grundlagen der Interaktionen innerhalb einer Bakteriengemeinschaft sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Für *P. aeruginosa*



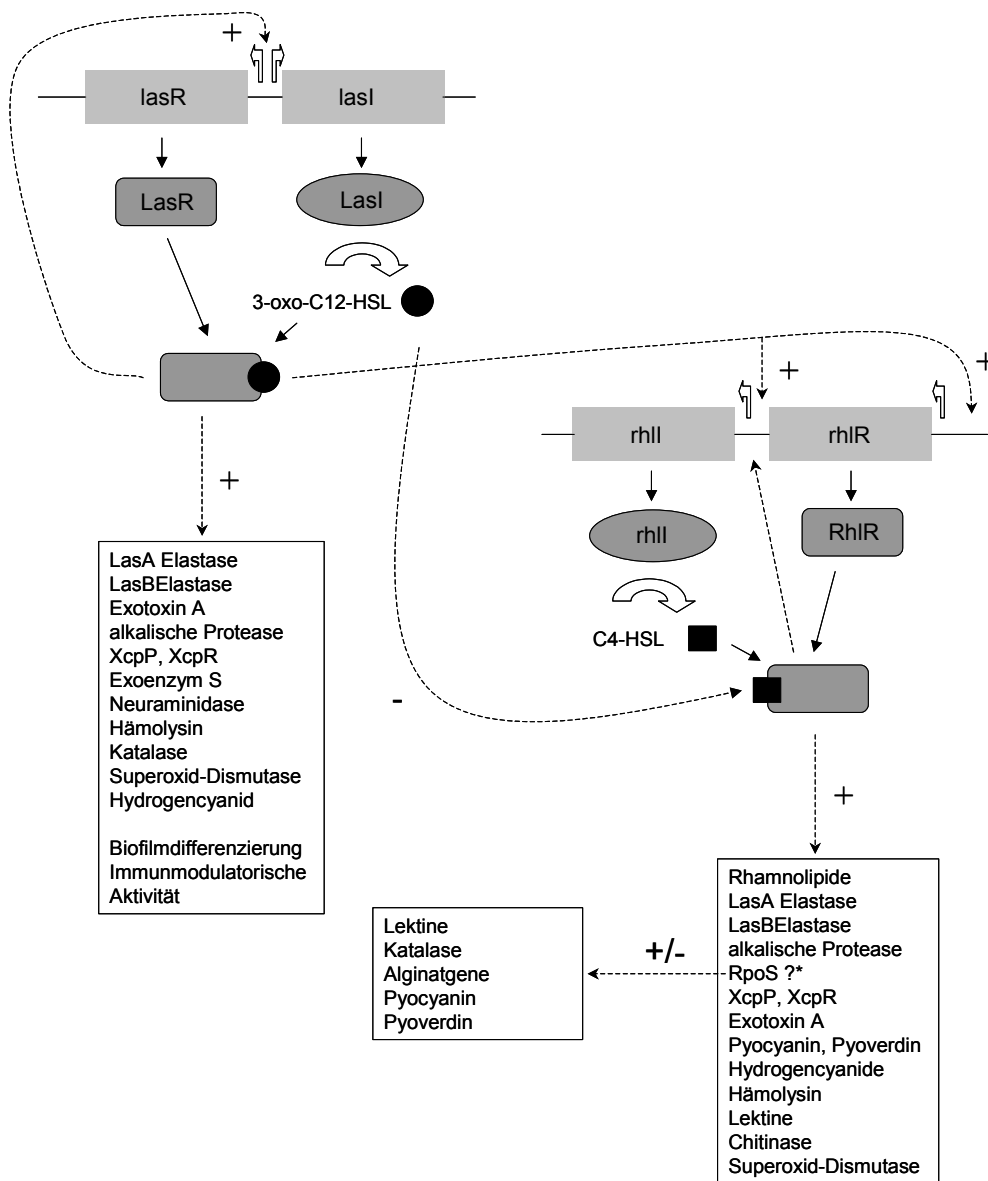
konnten bisher zwei, zum Teil interagierende Subsysteme des „Quorum-Sensing“ (*las*-System und *rhl*-System) identifiziert werden.

Durch die Verwendung von *P. aeruginosa*-Mutanten, die gezielte Deletionen bestimmter Gene dieser Subsysteme aufweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob das „Quorum-Sensing-System“ auch die Expression der hBD-2- bzw. IL-8-induzierenden PAMs kontrolliert. Die in Abschnitt 3.2.3.6 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass in den Überständen von *P. aeruginosa*-Mutanten, bei denen bestimmte Gene des „Quorum-Sensing-Systems“ deletiert sind, keine hBD-2- und IL-8-induzierenden PAMs nachweisbar waren. Interessanterweise war diese Eigenschaft nur bei Deletion der Gene *rhlI* oder *rpoS* zu beobachten (s. Abb. 29). Da beide Gene als Teile des „Quorum-Sensing-Systems“ essentiell für die koordinierte Synthese und Freisetzung zahlreicher Exoprodukte und insbesondere Virulenzfaktoren sind, scheint auch die Expression hBD-2- und IL-8-induzierender PAMs der Kontrolle des „Quorum-Sensing-Systems“ zu unterliegen.

Wie bereits erwähnt, besteht das „Quorum-Sensing-System“ von *P. aeruginosa* aus zwei miteinander interagierenden Subsystemen (s. Abb. 38). Das erste System wurde über seine regulatorische Kontrolle der Expression der LasB-Elastase identifiziert (Toder et al., 1991) und dementsprechend *las*-System genannt (Passador et al., 1993). Dieses System besteht aus dem Autoinducer-Synthase-Gen *lasI*, welches für die Synthese von 3-oxo-C12-HSL (N-[3-oxododecanoyl]-L-Homoserinlaktone) verantwortlich ist (Pearson et al., 1994), und dem Gen *lasR*, welches für ein Transkriptionsaktivatorprotein kodiert (Gambello und Iglewski, 1991). Ein Komplex aus 3-oxo-C12-HSL und LasR fungiert dann sowohl als Aktivator verschiedener Gene für bestimmte Virulenzfaktoren aber auch als Aktivator von *lasI*, so dass ein sich selbstverstärkender Prozess („Autoregulatory loop“) vorliegt. Die Synthese der Virulenzfaktoren ist somit entscheidend von der 3-oxo-C12-HSL-Konzentration abhängig.

Das *las*-System reguliert neben der LasB-Elastase die Synthese verschiedener weiterer Virulenzfaktoren wie z.B. LasA Elastase (Passador et al., 1993), alkalische Proteasen und Exotoxin A (Gambello et al., 1993). Daneben aktiviert es die Gene *xcpP* und *xcpR*, die für Proteine des Sekretionsapparates der Exoprodukte kodieren (Chapon-Herve et al., 1997). Zudem scheint 3-oxo-C12-HSL immunmodulatorische Aktivität zu besitzen, da dieses Molekül in der Lage ist, Cyclooxygenase-2 (Cox-2)

über NF- $\kappa$ B und Prostaglandin E2 in Fibroblasten zu induzieren und somit Entzündungen auszulösen (Smith et al., 2002).



**Abb. 38 Das Quorum-Sensing-System von *P. aeruginosa*:** Das *las*-System kontrolliert das *rhl*-System, indem der Komplex aus LasR / 3-oxo-C12-HSL die Transkription von *rhlR* aktiviert und die Aktivierung von RhIR durch C4-HSL verhindert. 3-oxo-C12-HSL ist essentiell für die Biofilmdifferenzierung und besitzt immunmodulatorische Aktivität. Beide Systeme regulieren die Expression zahlreicher Gene zum Teil spezifisch, zum Teil kooperativ. *XcpP* und *xcpR* sind Gene die für Proteine des Xcp-Sekretionsapparates kodieren. \*Zur Zeit ist nicht klar, ob die Expression von *RpoS* („stationary phase sigma factor“) vom *rhl*-System reguliert wird (Latifi et al., 1995) oder umgekehrt (Whiteley et al., 2000). *RpoS* kontrolliert seinerseits die Expression verschiedener Gene und physiologischer Prozesse von denen einige dargestellt sind.

Die Verwendung der Überstände von *Pseudomonas*-Mutanten, bei denen das *lasI*-Gen deletiert worden war, führte zu keiner veränderten hBD-2- bzw. IL-8-Induktion in Keratinozyten (s. Abb. 29). Man könnte daher vermuten, dass Gene, die

ausschließlich durch das *las*-System in *P. aeruginosa* kontrolliert werden, keine Bedeutung für die Synthese der hBD-2- bzw. IL-8-induzierenden PAMs besitzen.

*P. aeruginosa* besitzt darüber hinaus ein weiteres Quorum-Sensing-System, welches aufgrund seiner Eigenschaft, die Expression von Rhamnolipiden zu kontrollieren, *rhl*-System genannt wurde (Pearson et al., 1995). Das *rhl*-System besteht aus dem Autoinducer-Synthase-Gen *rhlI*, das für C4-HSL (N-butyryl-Homoserinlaktone) kodiert, und dem Gen *rhlR*, welches für die Expression des entsprechenden Transkriptionsaktivatorproteins RhlR verantwortlich ist (Winson et al., 1995). Ein Komplex aus C4-HSL und RhlR kontrolliert die Expression des *rhlAB*-Operons, welches für das Enzym Rhamnosyltransferase kodiert (Ochsner und Reiser, 1995). Dieses Enzym ist für die Synthese der verschiedenen Rhamnolipide in *P. aeruginosa* von essentieller Bedeutung. Darüber hinaus ist das *rhl*-System auch für die Synthese einer Reihe weiterer Exoprodukte wie LasB Elastase (Brint und Ohman, 1995), LasA Protease (Winson et al., 1995), Pyocyanin (Ochsner und Reiser, 1995), Cyanide (Pearson et al., 1997), Lektine (Winzer et al., 2000) und alkalische Protease (Pessi und Haas, 2000) von Bedeutung.

Durch die Verwendung von Überständen von *rhlI*-Mutanten in Inkubationsexperimenten im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich (vgl. Abb. 29), dass die Expression dieses Gens für die Synthese der hBD-2- bzw. IL-8-induzierenden PAMs essentiell zu sein scheint, da keine induzierenden Faktoren in Überständen dieser Mutanten nachgewiesen werden konnten. Da das *rhl*-System für die Rhamnolipid-Synthese wesentlich erscheint, unterstützen auch eigene Ergebnisse (s. Abschnitt 3.2.3.4) die Hypothese, dass Rhamnolipiden anscheinend eine Bedeutung bei der hBD-2- und IL-8-Induktion in Keratinozyten zukommt. Die Rolle der Rhamnolipide bei der Induktion von AP und PZ wird ausführlich im Abschnitt 4.2.4 diskutiert.

Weitere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die beiden Quorum-Sensing-Systeme nicht unabhängig voneinander arbeiten, sondern vielmehr auf verschiedenen Ebenen interagieren (Pearson et al., 1997). Beide Systeme sind hoch spezifisch in der Hinsicht, dass der Autoinducer des einen Systems nicht das Transkriptionsaktivatorprotein des anderen Systems aktivieren kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Komplex aus LasR/ 3-oxo-C12-HSL die Expression von *rhlR* aktiviert und die Bindung von C4-HSL an *rhlR* verhindert (s. Abb. 38). Damit befindet sich das *las*-System in der Hierarchie über dem *rhl*-System (Latifi et al.,

1996). Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe (Chapon-Herve et al., 1997) ergaben zudem, dass beide Systeme für die Expression der Gene *xcpP* und *xcpR*, die für Komponenten des Xcp-Sekretionssystem kodieren, verantwortlich sind. Dieses Sekretionssystem steuert die Freisetzung verschiedener Virulenzfaktoren wie Exotoxin A, Elastase und Phospholipase durch die äußere Membran des Bakteriums (Tommassen et al., 1992). Die Kontrolle über die Expression und die Sekretion der Virulenzfaktoren erlaubt es *P. aeruginosa*, die Freisetzung entscheidend zu verzögern, bis die Populationsdichte hoch genug ist, um Abwehrmechanismen des Wirts zu überwinden. Aus diesen Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass auch Faktoren, die durch die beiden Quorum-Sensing-Systeme co-reguliert werden (wie z.B. Las-Elastasen oder Exotoxin A, s. Abb. 38), keine Bedeutung für die Synthese AP- und PZ- induzierender Faktoren haben können. Es muss sich demnach um Faktoren handeln, deren Expression ausschließlich unter Kontrolle des *rhl*-Systems steht.

Interessanterweise zeigten neuere Untersuchungen von Iglewski und Mitarbeitern (2003), dass die Expression von LPS nicht der Kontrolle des Quorum-Sensing-Systems unterliegt (De Kievit et al., 2003). Sowohl eine *las*-System-Mutante (PAO-JP1) als auch eine *rhl*-System-Mutante (PDO-100) zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp qualitativ und quantitativ identische Expression von LPS. In eigenen Untersuchungen war zudem eine (geringe) hBD-2- bzw. IL-8-Induktion nur bei der Verwendung supraphysiologischer Dosen von *Pseudomonas*-LPS (>10µg LPS/ml, Serotyp 10, Sigma) feststellbar (Daten nicht gezeigt). Darüberhinaus zeigte sich in den unter 3.2.3.1 dargestellten Untersuchungen, dass 3-30 kD Fraktionen, in denen sich ihrer Molekularmasse zufolge wahrscheinlich LPS-Moleküle (10-12 kDa) aus den Kulturüberständen befanden, kaum hBD-2-induzierende Aktivitäten enthielten. Da schließlich auch die Inkubation von Überständen mit dem LPS-Inhibitor Polymyxin B zu keiner Abnahme der hBD-2-Induktion in Keratinozyten im Vergleich zur Inkubation mit unbehandelten Überständen führte (Daten nicht gezeigt), erscheint die Bedeutung von LPS als relevanter hBD-2-Induktor in Epithelzellen gering. Auch andere Studien unterstützen die Hypothese, dass LPS nicht für die epitheliale Induktion von AP verantwortlich zu sein scheint. So wurde beispielsweise gezeigt, dass hBD-2 in oralen Epithelzellen durch Produkte von *Fusobacterium nucleatum* induziert wird. LPS zeigte jedoch auch im Rahmen dieser Untersuchungen nur bei

Verwendung sehr hoher Dosen nur eine geringe hBD-2-Induktion (Krisanaprakornkit et al., 2000).

#### **4.2.3 Die Bedeutung der Expression von *rpoS* und *mucA* für die Synthese AP- bzw. PZ-induzierender PAMs durch *P. aeruginosa***

Die Versuche mit Überständen von *rpoS*-Mutanten ergaben, dass auch bei einer Deletion dieses Gens keine hBD-2- und IL-8-induzierenden PAMs in den Überständen nachzuweisen sind (vgl. Abb. 29). Daraus lässt sich schließen, dass auch die Expression dieses Gens, neben der Expression von *rhlI*, für eine Synthese der hBD-2-induzierenden PAMs gewährleistet sein muss.

Das *rpoS*-Gen kodiert für den sog. RpoS-Sigma-Faktor ( $\sigma^S$ ), der wiederum eine zentrale Rolle in der Regulierung der Genexpression während der stationären Wachstumsphase vieler Gram-negativer Bakterien einnimmt. Dementsprechend ist eine maximale Expression von *rpoS* zu Beginn der stationären Phase zu verzeichnen (Fujita et al., 1994). Die Expression von *rpoS* ist zudem signifikant erhöht, wenn die Bakterien in Biofilmen wachsen statt als solitäre, planktonische Zellen (Xu et al., 2001). Der RpoS-Sigma-Faktor ( $\sigma^S$ ) spielt eine bedeutende Rolle bei verschiedenen *Pseudomonas*-Arten hinsichtlich der Toleranz gegenüber zahlreichen Umweltfaktoren wie Hyperosmolarität, Temperaturschwankungen und gegenüber Substanzen, die reaktive Sauerstoffintermediate generieren (Jorgensen et al., 1999; Sarniguet et al., 1995). Die Untersuchungen von Jorgensen und Mitarbeitern zeigten dem entsprechend, dass *rpoS*-Mutanten einen Defekt in der Stressantwort aufweisen. *Pseudomonas*-Kulturen, die im Rahmen dieser Arbeit unter Stressbedingungen und in der stationären Phase als adhärenzte, mukoide Formen kultiviert wurden (Kultivierungsdauer >16 Std.; MG-Medium, statische Bedingungen) könnten demnach auch eine erhöhte Expression von *rpoS* aufweisen. Diese erhöhte *rpoS*-Expression würde demzufolge eine erhöhte hBD-2- und IL-8-Induktion durch die Überstände adhärenzter, mukoider Kulturen, wie sie in dieser Arbeit gefunden wurden, erklären. Darüber hinaus wäre die gesteigerte Expression von *rpoS* zu Beginn der stationären Phase auch eine mögliche Erklärung für die gefundene maximale hBD-2-Induktion in Überständen von Kulturen, die bis zur stationären Phase kultiviert worden waren (s. Kinetik der bakteriellen Expression der hBD-2-induzierenden Faktoren; Abb. 35).

Des Weiteren wurde auch eine veränderte Synthese verschiedener „Exoprodukte“ durch *rpoS*-Mutanten gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch diese Bakterien die Expression des Exotoxin A-Proteins um 50 % und die von Elastase um 20% verringert. Während die Synthese der Phospholipase C anscheinend nicht beeinträchtigt ist, ergeben sich jedoch erhöhte Syntheseraten der Pigmente Pyocyanin und Pyoverdin (Suh et al., 1999). Dies führt zu einer erhöhten Virulenz dieser Bakterien-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp, da diese Pigmente freie Radikale erzeugen und so für eine Zerstörung von Epithelien sorgen. Darüber hinaus wird auch die Expression und Synthese der Lektine PA-IL und PA-III, die neben einer zytotoxischen Wirkung als Adhärenzfaktoren für *P. aeruginosa* während der Biofilmbildung fungieren, über das *rhl*-System und insbesondere durch *rpoS* reguliert (Winzer et al., 2000). Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob diese Faktoren auch für eine hBD-2-Induktion in Keratinozyten von Relevanz sind.

Die Regulationsmechanismen von *rpoS* sind bisher nicht eindeutig geklärt. Nach Untersuchungen von Latifi und Mitarbeitern scheint die Expression des *rpoS*-Gens unter der Kontrolle des *rhl*-Systems zu stehen (Latifi et al., 1996; s. Abb. 38). Dem widersprechen jedoch Untersuchungen von Whiteley und Mitarbeitern, wonach der Sigma-Faktor RpoS vielmehr das *rhl*-System reguliert (Whiteley et al., 2000). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit der Hypothese vereinbar, dass ein regulativer Zusammenhang zwischen *rpoS* und einer *rhlI* Expression besteht. Sowohl die Deletion von *rhlI* wie auch *rpoS* führten zu einer vollständigen Abwesenheit hBD-2- und IL-8-induzierender Faktoren in den Überständen dieser Mutanten. Daraus lässt sich schließen, dass die hBD-2-Induktoren einer regulativen Kontrolle dieser Gene unterliegen. Falls sich die Befunde von Whiteley und Mitarbeitern bestätigen würden, hätte auch *rpoS* eine regulative Kontrolle über die vom *rhl*-System gesteuerte Rhamnolipid-Expression. Da Rhamnolipide den eigenen Ergebnissen zufolge als eine Art „Amplifikator“ für die Induktion von AP und PZ in Keratinozyten fungieren könnten (vgl. Abschnitt 3.2.3.4), wäre die fehlende Rhamnolipid-Synthese der *rpoS*- und *rhlI*-Mutanten eine mögliche Erklärung für die nicht vorhandene Induktion von hBD-2 und IL-8 durch die Überstände dieser Mutanten.

Die Inkubation von Keratinozyten mit Überständen von *mucA*-deletierten *P. aeruginosa* führte hingegen zu einer hBD-2- und IL-8-Induktion. Dieses Resultat unterstreicht die Bedeutung des mukoiden Phänotyps für eine hBD-2- bzw. IL-8-Induktion, da diese Mutanten stets eine mukoide Morphologie aufweisen. Martin und

Mitarbeiter konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die mukoide Morphologie von einem Gencluster aus den Genen *algU*, *mucA* und *mucB*, kontrolliert wird (Martin et al., 1994), wobei die Gene *algU* und *mucA / mucB* Antagonisten darstellen (Boucher et al., 1997). Während eine Inaktivierung letztgenannter Gene zu einer Synthese der mukoiden Exopolysaccharide durch bisher nicht-mukoide Formen führte (wie bei der verwendeten *mucA*-Mutante), verursachte eine Inhibition des *algU*-Gens einen Wechsel zur nicht-mukoiden Form, da das entscheidende Enzym zur Alginatsynthese fehlt. Eingehendere Untersuchungen von *algU*-deletierten Mutanten werden zeigen, inwiefern die Expression der Gene, die die Ausbildung des mukoiden Phänotyps kontrollieren, einen Einfluss auf die Synthese AP- und PZ-induzierender PAMs besitzen.

#### **4.2.4 Die molekulare Analyse der induzierenden PAMs - Rhamnolipide als Amplifikatoren der Induktion von AP in Keratinozyten**

Vorläufige, molekulare Analysen hBD-2- bzw. IL-8-induzierender PAMs aus *P. aeruginosa* ergaben, dass es sich hierbei zum Teil um relativ große (Makro-)Moleküle zu handeln scheint (s. Abschnitt 3.2.3). So zeigte sich, dass nach einer Filtration mit einem 30 kD-Filter, ein Großteil der (insbesondere hBD-2-) induzierenden PAMs im Retentat zu finden war und dass diese Moleküle damit Massen von mehr als 30 kD besitzen. Weitere Studien mittels der Größenausschlusschromatographie (s. Abschnitt 3.2.3.2) lassen vermuten, dass die Molekularmasse hBD-2-induzierender PAMs größer als 75 kD zu sein scheint. Dahingegen wurde für IL-8-induzierende PAMs eine Masse von ca. 65 kD bestimmt. Nur ein geringer Teil der IL-8-induzierenden PAMs wies Massen von mehr als 75 kD auf. Untersuchungen zur Ladung dieser PAMs mittels Anionenaustauschchromatographie (s. Abschnitt 3.2.3.3) führten zu dem Ergebnis, dass es sich hierbei überwiegend um schwach negativ geladene (anionische) Substanzen handeln muss. Auch die Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie deuten darauf hin, dass ein Teil der PAMs jeweils spezifisch AP bzw. PZ in Keratinozyten zu induzieren scheint, da für AP-induzierende (hBD-2, hBD-3, RNase-7) und PZ-induzierende (IL-8, IL-6, TNF $\alpha$ ) PAMs teilweise unterschiedliche Retentionszeiten gefunden wurden.

Interessant und ungewöhnlich waren die Ergebnisse von Experimenten zum Einfluß von Acetonitril auf die hBD-2-induzierende Aktivität (s. Abschnitt 3.2.3.4). Nach einer Reversed-Phase-Chromatographie der Kulturüberstände mittels eines Acetonitril-Gradienten ließen sich keine oder nur noch eine äußerst geringe Konzentration hBD-2- bzw. IL-8-induzierender Faktoren in den Fraktionen nachweisen. Anschließende Studien zur Wirkung von Acetonitril auf die PAMs zeigten, dass eine Behandlung der Überstände mit Acetonitril zu einer erheblichen Reduktion der Konzentrationen von hBD-2- und IL-8-Induktoren führte. Versuche, diese Faktoren aus den Überständen bzw. Präzipitaten dieser behandelten Überstände zu rekonstituieren (s. Abb. 23), ergaben, dass die AP-Induktoren in Präzipitaten durch Zugabe von Rhamnolipiden, die aus Überständen durch Säurebehandlung gewonnen waren (Deziel et al., 1999), nachzuweisen waren. Auch die Verwendung von kommerziell erhältlichen Rhamnolipidpräparationen führte zu einer Rekonstitution bzw. Amplifikation der hBD-2-Induktion durch Präzipitate Acetonitril-behandelter Überstände in Keratinozyten. Es zeigte sich, dass AP-Induktoren in den gelösten Präzipitaten Acetonitril-behandelter Überstände in Abhängigkeit von der Rhamnolipidkonzentration nachweisbar sind (vgl. Abb. 25). Diese Rekonstitution gelang für PZ jedoch nicht (s. Abb. 23), was erneut auf ein unterschiedliches Prinzip der Induktion von AP und PZ in Keratinozyten hindeutet.

Inkubationen von Keratinozyten mit Fraktionen von Reversed-Phase-Chromatographien der Kulturüberstände, ergaben, dass hBD-2-induzierende Faktoren in spät eluierten HPLC-Fraktionen nur in Abhängigkeit von dem Zusatz von Rhamnolipiden nachweisbar waren (vgl. Abb. 27).

Wurden die Kulturüberstände nicht über längere Zeit (16 Std.) mit ACN inkubiert sondern nach der Zugabe sofort mittels eines 30 kD-Filters diafiltriert, so zeigte sich interessanterweise, dass die Induktoren unter diesen Bedingungen (ACN-Konzentration >30 %) eine Molekularmasse von weniger als 30 kD aufwiesen (vgl. Abb. 24). Inkubationen in Anwesenheit von Rhamnolipiden mit Fraktionen von Größenausschlußchromatographien unter Verwendung Acetonitril-haltiger Puffer bestätigten, dass die hBD-2- und IL-8-induzierenden Faktoren unter diesen Bedingungen Molekularmassen von weniger als 30 kD besitzen (Daten nicht gezeigt).

Welche Bedeutung besitzen die Rhamnolipide aber für Gram-negative Bakterien wie *P. aeruginosa*?



Rhamnolipide gehören zu der Gruppe der sog. „Biosurfaktantien“. Dies sind von Mikroorganismen produzierte amphipatische Moleküle mit hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften, die somit als Detergentien bzw. Emulgator fungieren. Diese Moleküle setzen konzentrationsabhängig die Oberflächenspannung in verschiedenen Lösungen herab, bis es bei Erreichen einer kritischen Konzentration zur Ausbildung von supramolekularen Strukturen wie Mizellen, „Bilayern“ oder Vesikeln durch die Rhamnolipide kommt. Dieser kritische Wert ist bekannt als „critical micelle concentration“ (CMC) und ist ein Maß für die jeweilige Effizienz der Biosurfaktantien zur Mizellenbildung. In Flüssigkulturen produziert *P. aeruginosa* hauptsächlich zwei verschiedene Rhamnolipide: L-Rhamnosyl- $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoat (Monorhamnolipid) und L-Rhamnosyl-L-rhamnosyl- $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoat (Dirhamnolipid) (Rendell et al., 1990). Daneben werden noch mindestens 28 weitere Variationen (C10-C18) durch *P. aeruginosa* synthetisiert (Deziel et al., 1999), was im wesentlichen durch die relative Unspezifität der Rhamnosyltransferasen gegenüber  $\beta$ -Hydroxydecanoat begründet ist. Die Synthese der Rhamnolipide wird, wie bereits erwähnt, vom *rhl*-Quorum-Sensing-System kontrolliert (s. Abschnitt 4.2.2). Sie scheint aber auch von bestimmten Sigma-Faktoren (z.B. *rpoS*) abhängig zu sein und erfolgt damit verstärkt in der stationären Wachstumsphase (Medina et al., 2003). Eine erhöhte Expression von *rpoS* in der stationären Phase könnte erklären, warum eine maximale hBD-2- und IL-8-Induktion in Keratinozyten durch Überstände von *P. aeruginosa* erfolgte, die von Kulturen aus der stationären Phase stammten (14-16 Std., s. Abb. 35).

Die Bedeutung der Rhamnolipide für *P. aeruginosa* ist noch nicht vollständig verstanden. Es gibt aber Hinweise darauf, dass Rhamnolipide als Mizellenbildner die Löslichkeit und somit die Aufnahme hydrophober Substanzen in wässrigen Systemen erhöhen und so Nährstoffe für das Bakterium verfügbar machen (Noordman und Janssen, 2002). Des Weiteren scheinen Rhamnolipide den Verlust von LPS in den Membranen von *P. aeruginosa* zu induzieren (Al Tahhan et al., 2000) und erhöhen damit die Hydrophobizität der gesamten Bakterienzelle. Rhamnolipide sorgen somit für eine gesteigerte Adhärenz der Bakterien an die zu besiedelnden Oberflächen. Daneben scheinen Rhamnolipide für die als „twitching motility“ bekannte Art der Bewegung der Bakterien auf Oberflächen essentiell zu sein (Kohler et al., 2000). Nicht zuletzt sind Rhamnolipide für die Ausbildung der Biofilme durch *P. aeruginosa* von immenser Bedeutung (Davey et al., 2003). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen,

dass Rhamnolipide dazu dienen, Kanäle innerhalb der Biofilme zur optimalen Nährstoffversorgung offen zu halten.

Auch die Nährstoffbedingungen, unter denen eine Rhamnolipid-Synthese erfolgt, legen eine Beteiligung von Rhamnolipiden an der hBD-2-Induktion durch Überstände „gestresster“ Bakterien (statische Kulturen, MG-Medium) nahe. So zeigten Ochsner und Mitarbeiter, dass hohe Konzentrationen von Stickstoff zu einer Inhibition der Rhamnolipid-Synthese führte, während ein Mangel (wie im Fall des MG-Mediums) einen Anstieg der Syntheserate bewirkte (Ochsner et al., 1994). Darüber hinaus bewirkt auch eine Limitierung von Eisen, Calcium, Natrium und verschiedener Spurenelemente, wie sie auch im MG-Medium vorhanden ist, eine gesteigerte Synthese von Rhamnolipiden durch *P. aeruginosa* (Reiling et al., 1986).

#### 4.2.5 Die zelluläre Erkennung AP- und PZ-induzierender PAMs

Im Rahmen der molekularen Analyse der AP- bzw. PZ-induzierenden PAMs aus *P. aeruginosa* Kulturüberständen stellte sich die Frage, wie eine zelluläre Erkennung dieser Faktoren erfolgen könnte. Die Untersuchungen von Imler und Hoffmann (2000) verdeutlichten, dass an einer systemischen Induktion von antimikrobiellen Proteinen in *Drosophila melanogaster* sogenannte membranständige Toll-Rezeptoren beteiligt sind (Imler und Hoffmann, 2000). Toll-Rezeptoren gehören zu einer Familie phylogenetisch hochkonservierter Mediatoren der „innate immunity“ und sind anscheinend essentiell für die Erkennung von Mikroorganismen. Für den Menschen sind bisher 10 verschiedene Toll-artige Rezeptoren („toll like receptor“, TLR) identifiziert worden, die sowohl gewebspezifisch wie auch zellspezifisch unterschiedlich exprimiert werden. Sie gehören zu der Gruppe der Typ-1-Membranproteine und besitzen eine extrazelluläre Leucin-reiche Region (LRR), die der Ligandenerkennung dient (Lien et al., 2000). Das durch die Bindung eines Liganden ausgelöste Signal wird anscheinend bei allen bekannten TLRs über die gleiche Signalkaskade geleitet (Muzio et al., 1998; Zhang et al., 1999). So rekrutiert der intrazelluläre zytoplasmatische Abschnitt, bezeichnet als die Toll / IL-1R homologe Domäne (TIR), nach Aktivierung das Adaptorprotein MyD88 (Medzhitov et al., 1998). Durch dessen aminoternale Domäne wird das Signal auf die Serinkinase IRAK (IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase) übertragen (Muzio et al., 1997),

was schließlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP1 führt (Medzhitov et al., 1997).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch humane Keratinozyten TLRs exprimieren (TLR2, TLR4; Pivarcsi et al., 2003). Die Autoren stellten dabei eine erhöhte Expression der Rezeptoren nach einer Inkubation mit LPS und IFN $\gamma$  fest. Zudem konnte eine IL-8-Induktion nach Inkubation mit verschiedenen mikrobiellen Produkten durch anti-TLR2 und anti-TLR4-Antikörper inhibiert werden. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Expression von TLR2 durch Überstände adhärenter, mukoider *P. aeruginosa* in Keratinozyten induziert wird (max. 10-fach, Daten nicht gezeigt), was auf eine Beteiligung von TLRs an der AP-Induktion in Keratinozyten durch bakterielle PAMs hindeuten könnte. Hinweise zu dieser Hypothese lieferten auch die Untersuchungen von Birchler und Mitarbeitern (2001), die zeigten, dass die humane Lungenepithelzelllinie A549 TLR2 exprimiert und dass die Expression von hBD-2 nach Inkubation mit bakteriellem Lipoprotein induziert wird. Diese Induktion konnte in A549-Zellen, die mit dominant-negativem IRAK-2 transfiziert wurden, jedoch nicht nachgewiesen werden.

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass eine Zellaktivierung durch mikrobielle Faktoren auch durch endozytotische Vorgänge und cytosolische Rezeptoren möglich ist. So bindet das „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“-Protein (CFTR) spezifisch an *Pseudomonas*-LPS, extrahiert dieses aus der Membran der Bakterien und wird als Komplex endozytotisch von den Epithelzellen aufgenommen (Schroeder et al., 2002). Das Signal wird dann über einen NF-kappaB-Signalweg weitergeleitet. Dem entsprechend könnten endozytotische Vorgänge auch bei der AP-Induktion durch *P. aeruginosa* von Bedeutung sein. Die erhöhte AP-Induktion in Keratinozyten durch Überstände, die mit Rhamnolipiden versetzt wurden, könnte auf die Bildung von Mizellen durch die Rhamnolipide zurückzuführen sein. Aufgrund der amphipathischen Eigenschaften der Mizellen, die möglicherweise eine Durchquerung von Zellmembranen ermöglichen, könnte eine Aktivierung der Epithelzellen dann durch cytosolische Rezeptoren erfolgen. Entsprechende intrazelluläre, zytosolische Rezeptoren für verschiedene bakterielle Virulenzfaktoren konnten kürzlich identifiziert werden (Girardin et al., 2001). Diese sog. NOD-Rezeptoren erkennen und binden PAMs wie z.B. LPS durch ihre Leucin-reiche Region (LRR) und fungieren somit als Mediatoren inflammatorischer Prozesse. Mutationen des NOD2-Gens (verantwortlich für die

zytosolische Erkennung von Muramyl-Dipeptid) sind z.B. assoziiert mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001).

Einen weiteren interessanten Aspekt liefert in diesem Zusammenhang das sog. „surface blebbing“, welches bei *P. aeruginosa* beobachtet werden konnte. *P. aeruginosa* bildet Membranvesikel durch ein Abschnüren von Teilen der Zellhülle (Durchmesser 50-250 nm; Kadurugamuwa und Beveridge, 1995). Diese Vesikel enthalten in hohen Konzentrationen verschiedene Virulenzfaktoren wie alkalische Phosphatase, Elastase und Phospholipase C und können in Epithelzellen eindringen (Kadurugamuwa und Beveridge, 1995). Das „surface blebbing“ spielt somit neben den Endotoxinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von *P. aeruginosa* Infektionen. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass dieser Prozess auch für die Induktion epithelialer Abwehrmechanismen von Bedeutung ist.

### **4.3 Die bakterielle Synthese von Induktionsinhibitoren für AP**

Im Rahmen der Untersuchungen zur Identifizierung der hBD-2-Induktoren legten verschiedene Ergebnisse die Vermutung nahe, dass *P. aeruginosa* (und andere pathogene Bakterien) in der Lage sein könnten, Inhibitoren der Expression epithelialer antimikrobieller Proteine zu synthetisieren. So ergaben sich für die Überstände verschiedener ATCC-Stämme von *P. aeruginosa* trotz scheinbar identischer Kultivierungsmethoden erhebliche Schwankungen in der Amplitude der hBD-2-Induktion (von 10-1000-fach s. Abb. 11). Aber auch durch Stimulationen mit Überständen verschiedener Kulturansätze desselben ATCC-Stammes kam es zum Teil zu stark abweichenden Amplituden der hBD-2-Induktion (Daten nicht gezeigt). Bei Inkubationen primärer Keratinozyten ist diese Schwankung sicherlich auch auf eine biologische Streuung zurückzuführen, da Keratinozyten-Präparationen von verschiedenen Spendern stammten. Bei Stimulationen von HaCaT-Keratinozyten sollte dies jedoch keine besondere Rolle spielen, da es sich dabei um eine Zelllinie handelt und diese Zellen unter normalen Kultivierungsbedingungen nicht ausdifferenzieren. Dennoch wurden auch in HaCaT-Keratinozyten zum Teil erhebliche Schwankungen in der Amplitude der hBD-2-Induktion festgestellt.

Es wurde daher vermutet, dass für diese Schwankungen in der Amplitude der hBD-2-Induktion auch von den Bakterien sezernierte Faktoren verantwortlich sein könnten. Interessanterweise zeigte sich in diesem Zusammenhang, dass in vergleichenden Experimenten mit Überständen opportunistischer (*P. aeruginosa*) und nicht-pathogener (*P. stutzeri* und *P. fluorescens*) *Pseudomonas*-Spezies eine hBD-2- und IL-8-Induktion durch die nicht-pathogenen Vertreter höher war als durch den opportunistischen Vertreter *P. aeruginosa* (s. Abb. 12). Dieser Befund lässt vermuten, dass pathogene Bakterien in der Lage sind, eine Induktion von Abwehrmaßnahmen durch Epithelzellen, wie z.B. die Induktion von AP durch die Synthese entsprechender Inhibitoren zu verhindern. Nicht-pathogene Bakterien wie *P. fluorescens* würden diese Fähigkeit dementsprechend nicht aufweisen und somit nicht in der Lage sein, Epithelien erfolgreich zu besiedeln, da die Bakterien mit beginnender Biofilmbildung durch die Induktion von epithelialen AP sofort abgetötet würden.

Die in Abschnitt 3.2.4 dargestellten Ergebnisse weisen auf eine mögliche Expression von hBD-2-Inhibitoren durch *P. aeruginosa* hin. So führte eine Säurebehandlung von Kulturüberständen, die keine hBD-2-Induktion in Keratinozyten auslösten, in anschließenden Inkubationsversuchen zu einer gesteigerten hBD-2 Expression. Dieses Phänomen war auch bei der Untersuchung von Überständen entsprechend kultivierter *E. coli*-Bakterien zu beobachten und könnte eine Erklärung für die schlechte Induzierbarkeit von AP (hBD-2, Elafin und Psoriasin) durch die Überstände statischer MG-Kulturen von *E. coli* sein (vgl. Abb. 13).

Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Kulturüberstände einen Inhibitor der AP-Induktion in Keratinozyten enthielten, der säurelabil ist und durch die Behandlung degradiert wurde. Die Versuche zur konzentrationsabhängigen Inhibition der hBD-2-Induktion wiesen darauf hin (vgl. Abb. 31), dass *P. aeruginosa* Inhibitoren synthetisiert, die selektiv eine Expression von AP in Keratinozyten inhibiert. Da die Induktion des PZ IL-8 von diesen Inhibitoren nicht beeinträchtigt zu werden scheint, stellen diese Ergebnisse auch einen weiteren Beleg für die Hypothese dar, dass die Induktion von AP und PZ über unterschiedliche Rezeptoren bzw. Signaltransduktionswege vermittelt wird. Erste Untersuchungen zur molekularen Struktur dieser Inhibitoren (vgl. Abb. 32) lassen vermuten, dass es sich dabei um niedermolekulare Substanzen (<3kD) zu handeln scheint. Wie die Studien zur Kinetik der Freisetzung induzierender und inhibierender Faktoren zeigten, scheint die

Synthese der Inhibitoren in einer späteren Wachstumsphase zu erfolgen als die der Induktoren. Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, ob es sich hierbei um eine generelle Strategie der Bakterien zum Überleben im Wirtsorganismus handelt und welche molekularen Eigenschaften diese Inhibitoren besitzen.

Über bakterielle Strategien zur Überwindung der epithelialen Abwehr sind bisher nur wenige Details bekannt. Wie bereits erwähnt (s. Abschnitt 4.1), stellt die veränderte Morphologie von *P. aeruginosa* und die Bildung von Biofilmen während einer Infektion auch ein Versuch der Bakterien dar, sich der epithelialen Abwehr zu entziehen. Aber auch durch die koordinierte Expression zahlreicher Toxine (z.B. Elastase, Exotoxin A, s. Abschnitt 4.2.2) durch die Biofilm-bildenden Bakterien kann die epitheliale Abwehr beeinträchtigt werden. So ist bekannt, dass die Virulenzfaktoren Exotoxin A und Exoenzym S in ihrer Eigenschaft als ADP-Ribosyltransferasen in Epithelzellen eingeschleust werden, um dort die Proteinbiosynthese irreversibel zu inhibieren (Pollack, 1983).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass von *P. aeruginosa* synthetisierte Elastase sowohl das humane antimikrobielle Protein LL-37 (Schmidtchen et al., 2002) als auch das antimikrobielle Protein Cecropin in Insekten degradiert (Jarosz, 1997). Verschiedene Bakterien sind jedoch auch in der Lage entscheidende Signaltransduktionswege des epithelialen Abwehrsystems zu blockieren. So ist bekannt, dass *Yersinia pestis* das Effektorprotein YopJ exprimiert, welches die Aktivierung wichtiger Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, CREB und AP-1 verhindert, die für die Expression zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren in Epithelzellen entscheidend sind (Ruckdeschel et al., 1998; Rhen et al., 2000). Während einer Infektion verhindern die Bakterien eine Aktivierung des Immunsystems anscheinend auch durch eine verringerte Expression bestimmter PAMs, die über spezifische Rezeptoren (wie z.B. TLRs) erkannt werden. So ergaben Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen, dass eine veränderte Struktur des bakteriellen LPS zu unterschiedlich ausgeprägten inflammatorischen Immunantworten führt (Cowley et al., 1996). Cowley und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Veränderung der LPS-Struktur von *Francisella tularensis* das intrazelluläre Wachstum des Bakteriums begünstigt und Abwehrmaßnahmen der Wirtszellen (wie z.B. die NO-Freisetzung) beeinträchtigt. Des Weiteren verhindern Bakterien wie *E. coli* und *Salmonella enteritidis* durch eine drastisch verringerte Expression verschiedener Oberflächenproteine (z.B. Curli oder Fimbrien), eine Aktivierung des humanen

Abwehrsystems (Harel und Martin, 1999; Olsen et al., 1989). Eine weitere Möglichkeit der Bakterien sich den Abwehrmaßnahmen des Wirtes zu entziehen, besteht darin, in entsprechende Abwehrzellen einzudringen, um so den zahlreichen extrazellulären Abwehrmechanismen zu entgehen. So dringen uropathogene *E. coli* in das Blasenepithel ein und umgehen so epitheliale Abwehrmechanismen (Mulvey et al., 1998). Internalisierte *Shigella flexneri* produzieren das Protein IpaB, welches die Phagosomen lysiert und es den Bakterien ermöglicht, das Zytosol der Zellen zu besiedeln (Bhatti et al., 1999).

Das Prinzip einer bakteriellen Inhibition der Expression epithelialer AP, die einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr der Epithelien darstellen, ist bisher jedoch völlig unbekannt. Dieses Phänomen könnte für die Überwindung des epithelialen Abwehrsystems durch pathogene Bakterien von Bedeutung sein und würde einen entscheidenden Beitrag zur Virulenz der Mikroorganismen darstellen.

#### **4.4 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass *P. aeruginosa*, aber auch andere Gram-negative und Gram-positive Bakterien, unter bestimmten Kulturbedingungen verstärkt Induktoren für antimikrobielle Proteine (AP) und proinflammatorische Zytokine (PZ) sezernieren. Daher sollte in weiterführenden Untersuchungen eine weitere Optimierung der Medienzusammensetzung vorgenommen werden und analysiert werden, ob sich die HBD-2-Induktor-Produktion etwa durch anaerobe Bedingungen, durch Zugabe von Metall-Chelatoren bzw. Acyl-Homoserinlaktone oder durch eine Kombination dieser Bedingungen weiter steigern lässt.

Die Untersuchungen deuten zudem darauf hin, dass *P. aeruginosa* AP-spezifische Induktoren synthetisiert, die keine entzündlichen Prozesse in Epithelzellen auslösen. Aufgrund zunehmender bakterieller Resistenzen gegenüber handelsüblichen Antibiotika, wären diese bakteriellen Faktoren für die Synthese von Immunstimulantien von großer therapeutischer Bedeutung. Daher sollte ein wichtiges Ziel weiterführender Arbeiten die Identifizierung dieser bakteriellen Stimulantien der epithelialen Produktion von AP sein. Dabei wäre eine Verwendung von Überständen weiterer *P. aeruginosa*-Mutanten in Inkubationsversuchen und eine molekulare bzw. biochemische Analyse dieser Überstände von großer Bedeutung.

Des Weiteren würden Untersuchungen dieser AP-spezifischen-Induktoren in verschiedenen (knock-out-) Mausmodellen zu Erkenntnissen über die in-vivo Bedeutung dieser Abwehrstrategien führen.

Auch die Relevanz der Rhamnolipide für den Induktionsprozess bzw. für den Signaltransduktionsprozess sollte in weiterführenden Studien untersucht werden. Zu diesem Zweck könnten optimierte Kulturbedingungen zur Rhamnolipid-Produktion von *P. aeruginosa* etabliert werden. Zudem sollten Inkubationen von Rhamnolipid-defizienten *P. aeruginosa*-Mutanten mit Rhamnolipid-Präparationen durchgeführt werden.

Darüberhinaus sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen *P. aeruginosa* und andere Bakterien Inhibitoren der Expression antimikrobieller Proteine synthetisieren und anschließend eine physikochemische Analyse dieser Faktoren erfolgen.



## 5 Zusammenfassung

Epithelien wie die menschliche Haut sind permanent einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen ausgesetzt. Trotzdem kommt es bei gesunder Haut nur relativ selten zu Infektionen. Die Entdeckung verschiedener konstitutiv exprimierter (z.B. hBD-1) und induzierbarer (z.B. hBD-2) antimikrobieller Proteine (AP) bestätigte die Hypothese, dass neben einer physikalischen Barriere auch ein epitheliales chemisches Abwehrsystem einen wichtigen Aspekt der natürlichen Resistenz der Epithelien darstellt. Die mRNA Expression der induzierbaren AP wird in zahlreichen Epithelzellen wie z.B. Keratinozyten durch eine Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (PZ) aber auch durch Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* induziert. In früheren Untersuchungen (Schwichtenberg, 2000) konnte gezeigt werden, dass insbesondere ein mukoides (= schleimbildendes) klinisches Isolat von *P. aeruginosa* im Gegensatz zu verschiedenen nicht-mukoiden *P. aeruginosa*-Stämmen eine hBD-2-Induktion in Keratinozyten bewirkte. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, den Zusammenhang zwischen der Bakterienmorphologie und der Induktion antimikrobieller Proteine (AP) in Keratinozyten näher zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere die Bedeutung der Kultivierungsbedingungen für die bakterielle Synthese der AP- und PZ-Induktoren, die zu den sogenannten Pathogen-assoziierten Molekülen (PAMs) gezählt werden können, untersucht werden. Des Weiteren sollte eine partielle molekulare Analyse der bakteriellen AP-induzierenden PAMs erfolgen.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Nährmedien und Kultivierungsbedingungen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bakterien-Morphologie und die bakterielle Synthese AP-induzierender PAMs untersucht. Die Analysen der Inkubationsexperimente von Keratinozyten mit den entsprechenden Kulturüberständen mit Hilfe der Real-Time-PCR zeigten, dass die mRNA Expression von AP und PZ insbesondere durch Überstände Nährstoff-limitierter statischer Kulturen induziert wurde, die eine mukoiden Morphologie zeigten und als adhärente Phänotypen wuchsen. Die Überstände nicht Nährstoff-limitierter Suspensionskulturen, die aus nicht-mukoiden planktonischen Phänotypen bestehen, zeigten nur minimale oder keine Induktion von AP und PZ. Eine Abhängigkeit der Synthese AP- und PZ-induzierender PAMs von den Kulturbedingungen der Bakterien konnte für sämtliche untersuchte Gram-negative (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*,

*P. stutzeri*, *E. coli*) und Gram-positive Bakterien (*S. aureus*, *S. pyogenes*) gezeigt werden.

Versuche zur molekularen Analyse der AP-induzierenden PAMs ergaben, dass es sich bei diesen Faktoren um anionische, hydrophobe Moleküle handelt, die eine Molekularmasse von mehr als 75 kD aufweisen. Reinigungsversuche (Acetonitril- bzw. Säurepräzipitationen) der PAMs aus Bakterienkulturüberständen sowie Versuche mit *P. aeruginosa*-Bakterien, die spezifische Mutationen im „Quorum-Sensing-System“ aufwiesen, lassen vermuten, dass Rhamnolipide für die AP- und PZ-Induktion von Bedeutung sind. Mehrere Ergebnisse im Rahmen der molekularen Analyse deuten zudem darauf hin, dass *P. aeruginosa* und andere Gram-negative Bakterien PAMs exprimieren, die selektiv eine Induktion antimikrobieller Proteine bewirken ohne eine Entzündungsreaktion durch die Induktion proinflammatorischer Zytokine auszulösen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem erstmalig ein Prinzip der bakteriellen Inhibition der Expression antimikrobieller Proteine beschrieben werden. Demnach sezerniert *P. aeruginosa* im Gegensatz zu nicht-pathogenen *Pseudomonas*-Arten Faktoren, die selektiv die Expression antimikrobieller Proteine in Epithelzellen inhibieren. Diese Inhibitoren sind säurelabil und besitzen Molekularmassen von weniger als 3 kD.

Keratinocyten scheinen somit in der Lage zu sein, auf die Anwesenheit infektiöser Mikroorganismen spezifisch mit der Synthese antimikrobieller Proteine zu reagieren, deren Expression pathogene Bakterien jedoch durch die Synthese entsprechender Inhibitoren verhindern können.

## 6 Abstract

Epithelia, like human skin, is constantly exposed to various potentially pathogenic micro-organisms. Nevertheless, healthy skin is not normally infected by pathogens. One reason for this natural epithelial resistance to pathogens is the physical barrier function of the skin. But several recent investigations indicate that a chemical defense system which is characterized by the release of antimicrobial peptides (AP; e.g. human  $\beta$ -defensin-1 and -2) represents a pivotal aspect of epithelial resistance. Moreover, mRNA expression of several antimicrobial peptides (like human  $\beta$ -defensin-2; hBD-2) is increased in keratinocytes upon contact with proinflammatory cytokines (PC) or with bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Preliminary studies (Diplomarbeit Schwichtenberg, 2000) revealed that hBD-2 mRNA expression was particularly increased after incubation with a mucoid clinical isolate of PA but not with several non-mucoid PA strains. Consequently, the aim of this study was to clarify the relevance of bacterial morphology on the induction of AP and PC in keratinocytes. Moreover, the bacterial mediators of this induction, so-called pathogen-associated molecules (PAMs), were characterized by performing partial molecular analyses.

In order to investigate the effect of culture conditions on the bacterial morphology and the release of AP-inducing PAMs, different types of (nutrient-limited) media were tested. Furthermore, the bacteria were cultured either under shaking or static conditions. Supernatants of these cultures were subsequently tested in incubation experiments with keratinocytes and the induction of AP and PC mRNA expression was measured using Real-Time-PCR. It appears that mRNA expression of both AP and PC is maximally induced by supernatants derived from stressed (i.e. nutrient-limited, static conditions) PA which show adherent, mucoid phenotypes. In contrast, the use of supernatants from unstressed bacteria (nutrient-rich media, shaking conditions) showing a non-mucoid, planktonic morphology results in no AP and PC induction. This correlation between bacterial morphology and the production of AP- and PC-inducing PAMs is found for all investigated Gram-negative (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *E. coli*) and Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *S. pyogenes*). Molecular analyses of AP-inducing PAMs reveal that these molecules are anionic and hydrophobic, showing a molecular mass of more than 75 kD. Different chemical investigations of PA supernatants (acetonitrile and acid

precipitation) as well as the use of PA mutants deficient in “Quorum-Sensing“ in incubation experiments indicate that bacterial biosurfactants called rhamnolipids play an essential role in epithelial AP- and PC-induction. Moreover, it appears that PA and other Gram-negative bacteria release PAMs which specifically induce APs in epithelial cells without causing inflammatory host reactions.

In addition, several results confirm the hypothesis that pathogens are able to specifically inhibit the expression of antimicrobial peptides. It is shown that PA in contrast to non-pathogenic *Pseudomonas*-species produces inhibitors which have a suppressive effect on epithelial expression of different APs. These inhibitors appear to be acid labile and to have a molecular mass of less than 3 kD.

In conclusion, keratinocytes seem capable of specifically responding to the presence of infectious micro-organisms by the release of APs. Bacteria react to this defence mechanism by producing specific substances that inhibit epithelial AP expression.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aaron,S.D., Ferris,W., Ramotar,K., Vandemheen,K., Chan,F., und Saginur,R. (2002). Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4172-4179.
- Al Tahhan,R.A., Sandrin,T.R., Bodour,A.A., und Maier,R.M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3262-3268.
- Anwar,H., Strap,J.L., Chen,K., und Costerton,J.W. (1992). Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1208-1214.
- Baltimore,R.S. und Shedd,D.G. (1983). The role of complement in the opsonization of mucoid and non-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatr. Res.* **17**, 952-958.
- Barra,D. und Simmaco,M. (1995). Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol.* **13**, 205-209.
- Bensch,K.W., Raida,M., Magert,H.J., Schulz-Knappe,P., und Forssmann,W.G. (1995). hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**, 331-335.
- Bhatti,A.R., Kumar,K., Stobo,C., Chaudhry,G.R., und Ingram,J.M. (1999). High temperature induced antibiotic sensitivity changes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios* **97**, 103-115.
- Birchler,T., Seibl,R., Buchner,K., Loeliger,S., Seger,R., Hossle,J.P., Aguzzi,A., und Lauener,R.P. (2001). Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3131-3137.
- Boman,H.G. (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* **173**, 5-16.
- Boucher,J.C., Yu,H., Mudd,M.H., und Deretic,V. (1997). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect. Immun.* **65**, 3838-3846.
- Boukamp,P., Petrussevska,R.T., Breitkreutz,D., Hornung,J., Markham,A., und Fusenig,N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761-771.

- Boyce, J.R. und Miller, R.V. (1982). Selection of nonmucoid derivatives of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is strongly influenced by the level of iron in the culture medium. *Infect. Immun.* **37**, 695-701.
- Brint, J.M. und Ohman, D.E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* **177**, 7155-7163.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., und Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1771-1776.
- Chapon-Herve, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A., und Bally, M. (1997). Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **24**, 1169-1178.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., und Bulet, P. (1996). Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**, 21808-21813.
- Chen, V.L., France, D.S., und Martinelli, G.P. (1986). De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells. *J. Invest Dermatol.* **87**, 585-587.
- Cheng, K., Smyth, R.L., Govan, J.R., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., Heaf, D.P., van Saene, H., und Hart, C.A. (1996). Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* **348**, 639-642.
- Cho, J.H., Park, C.B., Yoon, Y.G., und Kim, S.C. (1998). Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 67-76.
- Costerton, J.W. (1999). Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**, 217-221.
- Cowley, S.C., Myltseva, S.V., und Nano, F.E. (1996). Phase variation in *Francisella tularensis* affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol. Microbiol.* **20**, 867-874.
- Crabtree, J.E., Kersulyte, D., Li, S.D., Lindley, I.J., und Berg, D.E. (1999). Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue. *J. Clin. Pathol.* **52**, 653-657.
- Cunha, B.A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. *Semin. Respir. Infect.* **17**, 231-239.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., und O'Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**, 1027-1036.

- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., und Iglewski, B.H. (2001). Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns.
- Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L.L., und Britigan, B.E. (1998). *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 5777-5784.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., und Bachere, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* 272, 28398-28406.
- Dewanti, R. und Wong, A.C. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 147-164.
- Deziel, E., Lepine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A., und Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta* 1440, 244-252.
- Diamond, G., Kaiser, V., Rhodes, J., Russell, J.P., und Bevins, C.L. (2000). Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect. Immun.* 68, 113-119.
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W.L., und Bevins, C.L. (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 3952-3956.
- Domachowske, J.B., Dyer, K.D., Adams, A.G., Leto, T.L., und Rosenberg, H.F. (1998). Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res.* 26, 3358-3363.
- Evans, L.R. und Linker, A. (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 116, 915-924.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W.F., Hetru, C., und Hoffmann, J.A. (1994). Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.* 269, 33159-33163.
- Fehlbaum, P., Rao, M., Zasloff, M., und Anderson, G.M. (2000). An essential amino acid induces epithelial beta -defensin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12723-12728.
- Fergie, J.E., Shema, S.J., Lott, L., Crawford, R., und Patrick, C.C. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. *Clin. Infect. Dis.* 18, 390-394.

Ferrandon,D., Jung,A.C., Criqui,M., Lemaitre,B., Uttenweiler-Joseph,S., Michaut,L., Reichhart,J., und Hoffmann,J.A. (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.* 17, 1217-1227.

Firoved,A.M. und Deretic,V. (2003). Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185, 1071-1081.

Fitzpatrick,T.B., Eisen,A.Z., Woff,K., Freedberg,I.M., und Austen,K.F. *Dermatology in general medicine*. Fourth Edition. 1993. New York, McGraw-Hill.

Friedl,P., Konig,B., und Konig,W. (1992). Effects of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients on inflammatory mediator release from human polymorphonuclear granulocytes and rat mast cells. *Immunology* 76, 86-94.

Frohm,M., Agerberth,B., Ahangari,G., Stahle-Backdahl,M., Liden,S., Wigzell,H., und Gudmundsson,G.H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* 272, 15258-15263.

Frohm,M., Gunne,H., Bergman,A.C., Agerberth,B., Bergman,T., Boman,A., Liden,S., Jornvall,H., und Boman,H.G. (1996). Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur. J. Biochem.* 237, 86-92.

Fujita,M., Tanaka,K., Takahashi,H., und Amemura,A. (1994). Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Mol. Microbiol.* 13, 1071-1077.

Gallo,R.C. (1971). Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* 234, 194-198.

Gallo,R.L. und Huttner,K.M. (1998). Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J. Invest Dermatol.* 111, 739-743.

Gambello,M.J. und Iglewski,B.H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* 173, 3000-3009.

Gambello,M.J., Kaye,S., und Iglewski,B.H. (1993). *LasR* of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.* 61, 1180-1184.

Ganz,T. und Lehrer,R.I. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 41-44.



- Garcia,J.R., Krause,A., Schulz,S., Rodriguez-Jimenez,F.J., Kluver,E., Adermann,K., Forssmann,U., Frimpong-Boateng,A., Bals,R., und Forssmann,W.G. (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt- sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 15, 1819-1821.
- Garrett,E.S., Perlegas,D., und Wozniak,D.J. (1999). Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgU. *J. Bacteriol.* 181, 7401-7404.
- Georgel,P., Naitza,S., Kappler,C., Ferrandon,D., Zachary,D., Swimmer,C., Koczyński,C., Duyk,G., Reichhart,J.M., und Hoffmann,J.A. (2001). Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev. Cell* 1, 503-514.
- Girardin,S.E., Tournebise,R., Mavris,M., Page,A.L., Li,X., Stark,G.R., Bertin,J., DiStefano,P.S., Yaniv,M., Sansonetti,P.J., und Philpott,D.J. (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* 2, 736-742.
- Grobe,S., Wingender,J., und Flemming,H.C. (2001). Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204, 139-142.
- Hara,S. und Yamakawa,M. (1995). Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 270, 29923-29927.
- Harder,J., Bartels,J., Christophers,E., und Schröder,J.M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861.
- Harder,J., Bartels,J., Christophers,E., und Schröder,J.M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276, 5707-5713.
- Harder,J., Meyer-Hoffert,U., Teran,L.M., Schwichtenberg,L., Bartels,J., Maune,S., und Schröder,J.M. (2000). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 714-721.
- Harder,J. und Schröder,J.M. (2002). RNase 7: a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.*
- Harel,J. und Martin,C. (1999). Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30, 131-155.
- Hassett,D.J., Charniga,L., Bean,K., Ohman,D.E., und Cohen,M.S. (1992). Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese- cofactored superoxide dismutase. *Infect. Immun.* 60, 328-336.

- Hassett,D.J., Elkins,J.G., Ma,J.F., und McDermott,T.R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm sensitivity to biocides: use of hydrogen peroxide as model antimicrobial agent for examining resistance mechanisms. *Methods Enzymol.* 310, 599-608.
- Hoiby,N., Giwercman,B., Jensen,E.T., Pedersen,S.S., Koch,C., und Kharazmi,A. (1994). Mechanism of action of antibiotics in chronic pulmonary *Pseudomonas* infection. *Adv. Pharmacol.* 30, 53-84.
- Hornef,M.W., Wick,M.J., Rhen,M., und Normark,S. (2002). Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 3, 1033-1040.
- Hugot,J.P., Chamaillard,M., Zouali,H., Lesage,S., Cezard,J.P., Belaiche,J., Almer,S., Tysk,C., O'Morain,C.A., Gassull,M., Binder,V., Finkel,Y., Cortot,A., Modigliani,R., Laurent-Puig,P., Gower-Rousseau,C., Macry,J., Colombel,J.F., Sahbatou,M., und Thomas,G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.
- Imler,J.L. und Hoffmann,J.A. (2000). Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors signaling infection. *Rev. Immunogenet.* 2, 294-304.
- Jarosz,J. (1997). Identification of immune inhibitor from *Pseudomonas aeruginosa* of inducible cell-free antibacterial activity in insects. *Cytobios* 89, 73-80.
- Jorgensen,F., Bally,M., Chapon-Herve,V., Michel,G., Lazdunski,A., Williams,P., und Stewart,G.S. (1999). RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145 ( Pt 4), 835-844.
- Kadurugamuwa,J.L. und Beveridge,T.J. Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria.
- Kadurugamuwa,J.L. und Beveridge,T.J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* 177, 3998-4008.
- Kohler,T., Curty,L.K., Barja,F., Van Delden,C., und Pechere,J.C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182, 5990-5996.
- Kolter,R. und Losick,R. (1998). One for all and all for one. *Science* 280, 226-227.
- Krisanaprakornkit,S., Kimball,J.R., Weinberg,A., Darveau,R.P., Bainbridge,B.W., und Dale,B.A. (2000). Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect. Immun.* 68, 2907-2915.

- Latifi,A., Foglino,M., Tanaka,K., Williams,P., und Lazdunski,A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* *21*, 1137-1146.
- Learn,D.B., Brestel,E.P., und Seetharama,S. (1987). Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Infect. Immun.* *55*, 1813-1818.
- Lee,I.H., Cho,Y., und Lehrer,R.I. (1997). Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* *118*, 515-521.
- Lee,I.H., Lee,Y.S., Kim,C.H., Kim,C.R., Hong,T., Menzel,L., Boo,L.M., Pohl,J., Sherman,M.A., Waring,A., und Lehrer,R.I. (2001). Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *Biochim. Biophys. Acta* *1527*, 141-148.
- Lee,I.H., Zhao,C., Cho,Y., Harwig,S.S., Cooper,E.L., und Lehrer,R.I. (1997). Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes.
- Lehrer,R.I., Lichtenstein,A.K., und Ganz,T. (1993). Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 105-128.
- Leitao,J.H. und Sa-Correia,I. (1993). Manipulation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate pathway by varying the level of biosynthetic enzymes and growth temperature. *J. Appl. Bacteriol.* *74*, 452-459.
- Lemaitre,B., Kromer-Metzger,E., Michaut,L., Nicolas,E., Meister,M., Georgel,P., Reichhart,J.M., und Hoffmann,J.A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 9465-9469.
- Lemaitre,B., Reichhart,J.M., und Hoffmann,J.A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 14614-14619.
- Lien,E., Means,T.K., Heine,H., Yoshimura,A., Kusumoto,S., Fukase,K., Fenton,M.J., Oikawa,M., Qureshi,N., Monks,B., Finberg,R.W., Ingalls,R.R., und Golenbock,D.T. (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest* *105*, 497-504.
- Majtan,V., Majtanova,L., Hostacka,A., Hybenova,D., und Mlynarcik,D. (1995). Effect of quaternary ammonium salts and amine oxides on *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios* *84*, 41-51.
- Marshall,B.C. und Carroll,K.C. (1991). Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and host defenses in cystic fibrosis. *Semin. Respir. Infect.* *6*, 11-18.

- Martin,D.W., Schurr,M.J., Yu,H., und Deretic,V. (1994). Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to sigma E and stress response. *J. Bacteriol.* *176*, 6688-6696.
- Marty,N., Pasquier,C., Dournes,J.L., Chemin,K., Chavagnat,F., Guinand,M., Chabanon,G., Pipy,B., und Montrozier,H. (1998). Effects of characterised *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharides on adherence to human tracheal cells. *J. Med. Microbiol.* *47*, 129-134.
- Mathee,K., Ciofu,O., Sternberg,C., Lindum,P.W., Campbell,J.I., Jensen,P., Johnsen,A.H., Givskov,M., Ohman,D.E., Molin,S., Hoiby,N., und Kharazmi,A. (1999). Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* *145 ( Pt 6)*, 1349-1357.
- Matsunaga,S., Fusetani,N., und Konosu,S. (1985). Bioactive marine metabolites, IV. Isolation and the amino acid composition of discodermin A, an antimicrobial peptide, from the marine sponge *Discodermia kiiensis*. *J. Nat. Prod.* *48*, 236-241.
- May,T.B., Shinabarger,D., Maharaj,R., Kato,J., Chu,L., DeVault,J.D., Roychoudhury,S., Zielinski,N.A., Berry,A., Rothmel,R.K., und . (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Rev.* *4*, 191-206.
- Mayer, A. und Lehmann, V. *Marine Pharmacology*. Carrico,C. K. *The Pharmacologist.* *42*, 62-69. 2000.
- Mayer,C., Moritz,R., Kirschner,C., Borchard,W., Maibaum,R., Wingender,J., und Flemming,H.C. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* *26* , 3-16.
- Medina,G., Juarez,K., und Soberon-Chavez,G. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* *185*, 377-380.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., und Janeway,C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., Kopp,E., Stadlen,A., Chen,C., Ghosh,S., und Janeway,C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* *2*, 253-258.
- Mendelson,M.H., Gurtman,A., Szabo,S., Neibart,E., Meyers,B.R., Policar,M., Cheung,T.W., Lillienfeld,D., Hammer,G., Reddy,S. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* *18*, 886-895.

- Mitta,G., Hubert,F., Noel,T., und Roch,P. (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* 265, 71-78.
- Mohr,C.D., Rust,L., Albus,A.M., Iglewski,B.H., und Deretic,V. (1990). Expression patterns of genes encoding elastase and controlling mucoidy: co-ordinate regulation of two virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* 4, 2103-2110.
- Mulvey,M.A., Lopez-Boado,Y.S., Wilson,C.L., Roth,R., Parks,W.C., Heuser,J., und Hultgren,S.J. (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282, 1494-1497.
- Muzio,M., Natoli,G., Sacconi,S., Levrero,M., und Mantovani,A. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.* 187, 2097-2101.
- Muzio,M., Ni,J., Feng,P., und Dixit,V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL- 1 signaling. *Science* 278, 1612-1615.
- Newton, C. R. und Graham, A. PCR. (1994). Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum, Akad. Verlag.
- Nickel,J.C., Costerton,J.W., McLean,R.J., und Olson,M. (1994). Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 33 *Suppl A*, 31-41.
- Nikolaev,I., Prosser,J.I., und Panikov,N.S. (2000). [Extracellular factors of adaptation of *Pseudomonas fluorescens* batch cultures to adverse conditions]. *Mikrobiologija* 69, 629-635.
- Nizet,V., Ohtake,T., Lauth,X., Trowbridge,J., Rudisill,J., Dorschner,R.A., Pestonjamp,V., Piraino,J., Huttner,K., und Gallo,R.L. (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414, 454-457.
- Noordman,W.H. und Janssen,D.B. (2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4502-4508.
- O'Toole,G.A. und Kolter,R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295-304.
- Ochsner,U.A., Koch,A.K., Fiechter,A., und Reiser,J. (1994). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176, 2044-2054.

- Ochsner,U.A. und Reiser,J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92, 6424-6428.
- Ogura,Y., Inohara,N., Benito,A., Chen,F.F., Yamaoka,S., und Nunez,G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. J. Biol. Chem. 276, 4812-4818.
- Olsen,A., Jonsson,A., und Normark,S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli. Nature 338, 652-655.
- Passador,L., Cook,J.M., Gambello,M.J., Rust,L., und Iglewski,B.H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to- cell communication. Science 260, 1127-1130.
- Pearson,J.P., Gray,K.M., Passador,L., Tucker,K.D., Eberhard,A., Iglewski,B.H., und Greenberg,E.P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91, 197-201.
- Pearson,J.P., Passador,L., Iglewski,B.H., und Greenberg,E.P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92, 1490-1494.
- Pearson,J.P., Pesci,E.C., und Iglewski,B.H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol. 179, 5756-5767.
- Pessi,G. und Haas,D. (2000). Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes hcnABC by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 182, 6940-6949.
- Pivarcsi,A., Bodai,L., Rethi,B., Kenderessy-Szabo,A., Koreck,A., Szell,M., Beer,Z., Bata-Csorgoo,Z., Magocsi,M., Rajnavolgyi,E., Dobozy,A., und Kemeny,L. (2003). Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. Int. Immunol. 15, 721-730.
- Pollack,M. (1983). The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease and immunity. Rev. Infect. Dis. 5 Suppl 5, S979-S984.
- Pungercar,J., Anderluh,G., Macek,P., Franc,G., und Strukelj,B. (1997). Sequence analysis of the cDNA encoding the precursor of equinatoxin V, a newly discovered hemolysin from the sea anemone Actinia equina. Biochim. Biophys. Acta 1341, 105-107.
- Qu,X.D. und Lehrer,R.I. (1998). Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. Infect. Immun. 66, 2791-2797.
- Ramphal,R. und Pier,G.B. (1985). Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. Infect. Immun. 47, 1-4.

- Reiling,H.E., Thanei-Wyss,U., Guerra-Santos,L.H., Hirt,R., Kappeli,O., und Fiechter,A. (1986). Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* *51*, 985-989.
- Rendell,N.B., Taylor,G.W., Somerville,M., Todd,H., Wilson,R., und Cole,P.J. (1990). Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochim. Biophys. Acta* *1045*, 189-193.
- Rhen,M., Eriksson,S., und Pettersson,S. (2000). Bacterial adaptation to host innate immunity responses. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 60-64.
- Richard,P., Le Floch,R., Chamoux,C., Pannier,M., Espaze,E., und Richet,H. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J. Infect. Dis.* *170*, 377-383.
- Ruckdeschel,K., Harb,S., Roggenkamp,A., Hornef,M., Zumbihl,R., Kohler,S., Heesemann,J., und Rouot,B. (1998). *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- $\kappa$ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* *187*, 1069-1079.
- Sabra,W., Kim,E.J., und Zeng,A.P. (2002). Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology* *148*, 3195-3202.
- Sambrook, J. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 1-3 (second edition). (1989). Cold Spring Harbor, Cold Spring Laboratory Press.
- Sarniguet,A., Kraus,J., Henkels,M.D., Muehlchen,A.M., und Loper,J.E. (1995). The sigma factor sigma s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 12255-12259.
- Sauer,K. und Camper,A.K. (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* *183*, 6579-6589.
- Sauer,K., Camper,A.K., Ehrlich,G.D., Costerton,J.W., und Davies,D.G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm.
- Schadow,A., Scholz-Pedretti,K., Lambeau,G., Gelb,M.H., Furstenberger,G., Pfeilschifter,J., und Kaszkin,M. (2001). Characterization of group X phospholipase A(2) as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA. *J. Invest Dermatol.* *116*, 31-39.
- Schittek,B., Hipfel,R., Sauer,B., Bauer,J., Kalbacher,H., Stevanovic,S., Schirle,M., Schroeder,K., Blin,N., Meier,F., Rassner,G., und Garbe,C. (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* *2*, 1133-1137.

Schmidtchen,A., Frick,I.M., Andersson,E., Tapper,H., und Bjorck,L. (2002). Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* 46, 157-168.

Schnapp,D., Kemp,G.D., und Smith,V.J. (1996). Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* 240, 532-539.

Schnider-Keel,U., Lejbolle,K.B., Baehler,E., Haas,D., und Keel,C. (2001). The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5683-5693.

Schonwetter,B.S., Stolzenberg,E.D., und Zasloff,M.A. (1995). Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267, 1645-1648.

Schröder,J.M. (1999). Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57, 121-134.

Schröder,J.M. und Harder,J. (1999). Human beta-defensin-2. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 645-651

Schroeder,T.H., Lee,M.M., Yacono,P.W., Cannon,C.L., Gerceker,A.A., Golan,D.E., und Pier,G.B. (2002). CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6907-6912.

Schwichtenberg,L. Untersuchungen zur Induktion von Abwehrfunktionen epithelialer Zellen durch Mikroorganismen. (Diplomarbeit). (2000). Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Scott,V.R., Boehme,R., und Matthews,T.R. (1988). New class of antifungal agents: jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1154-1157.

Selsted,M.E., Harwig,S.S., Ganz,T., Schilling,J.W., und Lehrer,R.I. (1985). Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest* 76, 1436-1439.

Shirtliff,M.E., Mader,J.T., und Camper,A.K. (2002). Molecular interactions in biofilms. *Chem. Biol.* 9, 859-871.

Smith,R.S., Kelly,R., Iglewski,B.H., und Phipps,R.P. (2002). The *Pseudomonas* autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *J. Immunol.* 169, 2636-2642.

Speert,D.P., Farmer,S.W., Campbell,M.E., Musser,J.M., Selander,R.K., und Kuo,S. (1990). Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to the phenotype characteristic of strains from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 28, 188-194.



- Steiner,H., Hultmark,D., Engstrom,A., Bennich,H., und Boman,H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-248.
- Stolzenberg,E.D., Anderson,G.M., Ackermann,M.R., Whitlock,R.H., und Zasloff,M. (1997). Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 8686-8690.
- Stoodley,P., Sauer,K., Davies,D.G., und Costerton,J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
- Suh,S.J., Silo-Suh,L., Woods,D.E., Hassett,D.J., West,S.E., und Ohman,D.E. (1999). Effect of rpoS mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181, 3890-3897.
- Thomas,V.L., Sanford,B.A., Moreno,R., und Ramsay,M.A. (1997). Enzyme-linked lectinsorbent assay measures N-acetyl-D-glucosamine in matrix of biofilm produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Curr. Microbiol.* 35, 249-254.
- Toder,D.S., Gambello,M.J., und Iglewski,B.H. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol. Microbiol.* 5, 2003-2010.
- Tommassen,J., Filloux,A., Bally,M., Murgier,M., und Lazdunski,A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 9, 73-90.
- Tzou,P., Ohresser,S., Ferrandon,D., Capovilla,M., Reichhart,J.M., Lemaitre,B., Hoffmann,J.A., und Imler,J.L. (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity.* 13, 737-748.
- Van Delden,C. und Iglewski,B.H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 551-560.
- Weinberg,A.N. und Swartz,M.N. Bacterial diseases with cutaneous involvement. Fitzpatrick,T.B., Eisen,A.Z., Woff,K., Freedberg,I.M., und Austen,K.F. *Dermatology in general medicine*. Fourth Edition. 1993. New York, McGraw-Hill.
- Whitehead,N.A., Barnard,A.M., Slater,H., Simpson,N.J., und Salmond,G.P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 365-404.
- Whiteley,M., Banger,M.G., Bumgarner,R.E., Parsek,M.R., Teitzel,G.M., Lory,S., und Greenberg,E.P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413, 860-864.
- Whiteley,M., Lee,K.M., und Greenberg,E.P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13904-13909.
- Whiteley,M., Parsek,M.R., und Greenberg,E.P. (2000). Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 4356-4360.

- Wiedow,O., Harder,J., Bartels,J., Streit,V., und Christophers,E. (1998). Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 904-909.
- Wiedow,O., Schröder,J.M., Gregory,H., Young,J.A., und Christophers,E. (1990). Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **265**, 14791-14795.
- Wilde,C.G., Griffith,J.E., Marra,M.N., Snable,J.L., und Scott,R.W. (1989). Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J. Biol. Chem.* **264**, 11200-11203.
- Wimley,W.C., Selsted,M.E., und White,S.H. (1994). Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* **3**, 1362-1373.
- Wingens,M., van Bergen,B.H., Hiemstra,P.S., Meis,J.F., Vlijmen-Willems,I.M., Zeeuwen,P.L., Mulder,J., Kramps,H.A., van Ruissen,F., und Schalkwijk,J. (1998). Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* **111**, 996-1002.
- Winson,M.K., Camara,M., Latifi,A., Foglino,M., Chhabra,S.R., Daykin,M., Bally,M., Chapon,V., Salmond,G.P., Bycroft,B.W. (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 9427-9431.
- Winzer,K., Falconer,C., Garber,N.C., Diggle,S.P., Camara,M., und Williams,P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* **182**, 6401-6411.
- Wyckoff,T.J., Thomas,B., Hassett,D.J., und Wozniak,D.J. (2002). Static growth of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* selects for non-mucoid variants that have acquired flagellum-dependent motility. *Microbiology* **148**, 3423-3430.
- Xu,K.D., Franklin,M.J., Park,C.H., McFeters,G.A., und Stewart,P.S. (2001). Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 67-71.
- Yan,L. und Adams,M.E. (1998). Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2059-2066.
- Yu,H., Boucher,J.C., Hibler,N.S., und Deretic,V. (1996). Virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* lacking the extreme- stress sigma factor AlgU (sigmaE). *Infect. Immun.* **64**, 2774-2781.
- Zasloff,M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 5449-5453.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Mancinelli, R., Xu, X.P., Jin, Y., Faure, E., Mantovani, A., Rothe, M., Muzio, M., und Arditì, M. (1999). Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- $\kappa$ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 7611-7614.

Zhao, C., Wang, I., und Lehrer, R.I. (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* 396, 319-322.

## Danksagung

Herrn Prof. Schröder danke ich aufrichtig für die Vergabe des Themas, sein großes Interesse an dieser Arbeit und die intensive Betreuung. Insbesondere waren seine zahlreichen Ratschläge und Hilfestellungen für die Durchführung und Erstellung dieser Arbeit von größtem Nutzen für mich.

Herrn Prof. T. Bosch gilt mein Dank für die spontane Bereiterklärung zur Begutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Claudia Mehrens und Jutta Quitzau für die tatkräftige Unterstützung bei der Bakterienkultivierung und den HPLC-Analysen. Ohne ihre Hilfe wäre die Durchführung der Arbeit in diesem Rahmen nicht möglich gewesen. Heidi Pönicke und Dagmar Blankenburg danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der fotografischen Abbildungen

Prof. Dr. Dr. Heesemann und Mitarbeitern (Max von Pettenhofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München) danke ich für die Kultivierung der *P. aeruginosa*-Mutanten

Dr. Michael Schunck möchte ich insbesondere für seine sorgfältige und ausführliche Durchsicht dieser Arbeit danken.

Zudem sei natürlich allen lieben Kollegen aus der Hautklinik gedankt, insbesondere jedoch Dr. Ulf Meyer-Hoffert und Berit Göthel. Dr. Jürgen Harder danke ich für seine zahlreichen, wertvollen Anregungen, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit auch im Laboralltag sehr geholfen haben.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir stets einen Rückhalt und Unterstützung bei allen meinen Entscheidungen gegeben haben.

Die schönsten Stunden während dieser Zeit verbrachte ich jedoch mit meiner lieben Jana! Ich danke Dir dafür!

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig verfaßt wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt wurden. Die Stellen der Arbeit, einschließlich Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, sind in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen und wurde, abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht. Eine solche Veröffentlichung wird von mir auch nicht vor Abschluß des Promotionsverfahrens vorgenommen werden. Die Bestimmungen der Promotionsordnungen sind mir bekannt.

Kiel, den

Lars Schwichtenberg

## Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

L. Schwichtenberg, J. Harder, J.-M. Schröder (2000): Human Beta-Defensin-2 is Induced by Mucoïd Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Wien (Poster).

L. Schwichtenberg, J. Harder, J.-M. Schröder (2000): Unique *Pseudomonas aeruginosa*-derived Pathogen-Associated Molecules Induce hBD-2 in Keratinocytes. Norddeutsche Immunologen-Tagung, Borstel (Vortrag).

L. Schwichtenberg, J. Harder, M. Sticherling, J.-M. Schröder (2001): Unique *Pseudomonas aeruginosa*-derived Pathogen-Associated Molecules Induce Interleukin-8 in Keratinocytes. Kongreß der European society of dermatological research (ESDR): Stockholm Schweden (Poster). J. Invest. Dermatol. **117** (3): 807 (Abstract 250).

L. Schwichtenberg, J. Harder, M. Sticherling, J.-M. Schröder (2001): Unique *Pseudomonas aeruginosa*-derived Pathogen-Associated Molecules Induce Interleukin-8 in Keratinocytes. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), München (Vortrag).

L. Schwichtenberg, J. Harder, M. Sticherling, J.-M. Schröder (2001): Unique *Pseudomonas aeruginosa*-derived Pathogen-Associated Molecules Induce Interleukin-8 in Keratinocytes. Kiel-Aarhus Meeting, Aarhus (Vortrag).

L. Schwichtenberg, B. Göthel, J. Harder, J.-M. Schröder (2002): Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*: A new approach for understanding *P. aeruginosa* skin infections.

Kongreß der European society of dermatological research (ESDR), Genf, Schweiz (Poster). J. Invest. Dermatol. **119** (3): 727 (Abstract 088).

L. Schwichtenberg, B. Göthel, J. Harder, J.-M. Schröder (2002): Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*: A new approach for understanding *P. aeruginosa* skin infections. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Berlin (Poster). Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Berlin (Poster). Arch. Dermatol. Res. (2002) **294**:66 (Abstract P126).

L. Schwichtenberg, J. Harder, J.-M. Schröder (2003): *P. aeruginosa* produces a specific inhibitor of human  $\beta$ -Defensin-2 induction in primary keratinocytes. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Frankfurt am Main (Vortrag). Arch. Dermatol. Res. (2003) **294**:456 (Abstract V21).

L. Schwichtenberg, U. Meyer-Hoffert, O. Wiedow, J.-M. Schröder (2003). Soluble factors released by *Pseudomonas aeruginosa* induce a  $\text{Ca}^{2+}$ -influx in keratinocytes via a G-protein linked pathway. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Frankfurt am Main (Poster). Arch. Dermatol. Res. (2003) **294**:491 (Abstract P119).

## Weitere Publikationen

J. Harder, U. Meyer-Hoffert, L.M. Teran, L. Schwichtenberg, J. Bartels, S. Maune, J.-M. Schröder: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 Jun;22(6):714-21

U. Meyer-Hoffert, N. Wichmann, L. Schwichtenberg, E. Christophers, O. Wiedow (2001): Elafin - a serine-protease inhibitor with antimicrobial activity, inducible by supernatants of *Pseudomonas aeruginosa*. Kongreß der European society of dermatological research (ESDR), Stockholm, Schweden (Poster). J. Invest. Dermatol. **117** (3): 807 (Abstract 251)

B. Göthel, L. Schwichtenberg, J.-M. Schröder, J. Bartels (2002): Identification of differentially expressed keratinocytes genes upon stimulation with microbial supernatants.

Kongreß der European society of dermatological research (ESDR), Berlin (Poster)

J. Harder, U. Meyer-Hoffert, L. Schwichtenberg, J.-M. Schröder (2002). Induction of human  $\beta$ -defensin gene expression in keratinocytes is downregulated by retinoic acid. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Berlin (Poster). Arch. Dermatol. Res. (2002) **294**:56 (Abstract P086).

U. Meyer-Hoffert, N. Wichmann, L. Schwichtenberg, P. White und O. Wiedow (2003): Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocytes.

J. Exp. Dermatology (im Druck)

U. Meyer-Hoffert, J. Harder, L. Schwichtenberg, J.-M. Schröder: Differential gene induction of human beta-defensins in keratinocytes is inhibited by retinoic acid.

J. Invest. Dermatology (in Revision)

R. Gläser, J. Harder, J. Bartels, L. Schwichtenberg, E. Christophers, J.-M. Schröder (2003): *E. coli* selective Innate Skin Resistance by Release of Antibacterial Psoriasin (S100A7).

Nature Immunol. (eingereicht)

B. Göthel, L. Schwichtenberg, U. Meyer-Hoffert, J.-M. Schröder, J. Bartels (2003): *Pseudomonas aeruginosa* selectively induces a novel interferon responsive gene in human keratinocytes.

Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Frankfurt am Main (Poster). Arch. Dermatol. Res. (2003) **294**:485 (Abstract P095).

## Lebenslauf

Name: Schwichtenberg

Vorname Lars

Geburtstag und -ort: 26.7.72 in Rendsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Gerd - Uwe Schwichtenberg,  
Sabine Schwichtenberg, geb. Ramm,

Schulbildung: August 1979 – Juni 1983  
Emil - Nolde Grundschule in Büdelsdorf

August 1983 – Juni 1992  
Kronwerk Gymnasium in Rendsburg

Zivildienst: Juli 1992 - September 1993:  
Kindertagesstätte Eiderstraße (Rendsburg)

Studium: September 1993 – Juni 2000  
Biologie an der Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Christian-Albrechts-Universität,  
Kiel: Abschluß am 11.04.2000 mit dem Diplom

Diplomarbeit: März 1999 – März 2000  
„Untersuchung zur Induktion von  
Abwehrfunktionen epithelialer Zellen durch  
Mikroorganismen“



- Promotionsstudium: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie: Medizinische Fakultät des Universitätsklinikums, CAU, Kiel  
Juni 2000 – Mai 2003  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie: Medizinische Fakultät des Universitätsklinikums, CAU, Kiel
- Wissenschaftliche Tätigkeit: Januar 2002 –  
Sonderforschungsbereich 617  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie: Medizinische Fakultät des Universitätsklinikums, CAU, Kiel