

# **Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in Hautkeratinozyten nach mikrobiellem Kontakt**

DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Berit Friederike Göthel**

Kiel

Dezember 2003

Referent/in: .....

Koreferent/in: .....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, den .....

-----

Der Dekan

FÜR TIMMIE UND MEINE FAMILIE

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Die Haut als physikalische Barriere	5
1.2	Die angeborene und die adaptive Immunität	5
1.3	Die chemische Barriere der Haut – Antimikrobielle Proteine als Bestandteil der angeborenen epithelialen Immunität	8
1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Candida albicans</i> als Induktoren der epithelialen Abwehr	9
1.4	Die Interaktion zwischen Mikroorganismen und humanen Epithelzellen	12
1.5	Differentielle Genexpression in <i>Drosophila</i>	13
1.6	Methoden für die <i>in vitro</i> -Untersuchung differentieller Genexpression	15
1.7	Ziel der Arbeit	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	
2.1	Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide und sonstige Materialien	18
2.2	Nährmedien für Kulturen von Mikroorganismen	18
2.3	Puffer und Lösungen	19
2.4	Bakterien- und Hefestämme	20
2.5	HPLC-Säulen	20
2.6	Molekularbiologische Standardmethoden	21
2.7	Kultivierung eukaryotischer Zellen	21
2.7.1	HaCaT – Zelllinie	21
2.7.2	Isolierung und Kultur primärer humaner Keratinozyten	21
2.7.3	Subkultivierung der Zellen	22
2.7.4	Stimulation der Zellen	22
2.8	Anzucht von Mikroorganismen und Aufarbeitung von Kulturüberständen	23
2.8.1	Kultivierung der Mikroorganismen zur Gewinnung von Kulturüberständen	23
2.8.2	Einkonzentrierung der Bakterienkulturüberstände	24
2.8.3	Säure-Behandlung bakterieller Kulturüberstände	24

---

2.9 Analyse von Kulturüberständen unter Verwendung verschiedener Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Systeme	25
2.9.1 Größenausschlußchromatographie	25
2.9.2 Anionenaustauschchromatographie	25
2.10 Semiquantitative RT-PCR	26
2.10.1 RNA-Isolierung	26
2.10.2 cDNA-Synthese und Reverse Transkription	27
2.10.3 Standard-PCR und „Real-Time“-PCR	28
2.11 Darstellung der Ergebnisse	29
2.12 Systematische Differential Display (SDD) RT-PCR	29
2.12.1 Visualisierung von cDNA durch Silberfärbung	33
2.12.2 Eluierung der DNA aus dem Silbergel	34
2.12.3 Reamplifikation der aus dem Silbergel eluierten DNA	34
2.13 Klonierung, Kolonie-PCR und Sequenzierung von reamplifizierten PCR- Produkten	35
2.14 Datenbankrecherche	35
2.15 Microarray	36
2.15.1 Herstellung der Microarrays	36
2.15.2 Reverse Transkription und Markierungsreaktion der RNA	37
2.15.3 Hybridisierung der Microarrays	37
2.15.4 Auswertung der Microarrays	38
2.16 Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)	38
2.16.1 Ligation und Transformation	40
2.16.2 Überführen von Klonen in Mikrotiterplatten ( <i>Picking</i> )	40
2.17 Makroarray	41
2.17.1 Rastern der Klone ( <i>Gridding</i> )	41
2.17.2 Hybridisierung der Makroarrays mit <sup>32</sup> P-markierten Sonden	41
2.17.3. Auswertung der Makroarrays und Sequenzanalyse	42
<b>3 Ergebnisse</b>	
3.1 Die mikrobiell induzierte Genexpression ist abhängig von den Kultivierungsbedingungen der Mikroorganismen	43
3.2 Optimierung der Systematischen Differential Display-PCR	49

---

3.3	Identifizierung differentiell exprimierter Gene mit Hilfe der Systematischen Differential Display-PCR	50
3.3.1	Verifizierung und nähere Untersuchungen zur IFIT4-Genexpression in Keratinozyten	51
3.3.2	Die Regulation von IFIT4 durch mikrobielle Kulturüberstände	53
3.3.2.1	Die Induktion von IFIT4 durch <i>P.aeruginosa</i> –Überstände ist abhängig von den Kultivierungsbedingungen und dem jeweiligen <i>P. aeruginosa</i> -ATCC-Stamm	53
3.3.2.2	IFIT4 und hBD-2 werden durch unterschiedliche <i>P. aeruginosa</i> -Überstandskomponenten reguliert	55
3.3.2.3	IFIT4-Induktoren aus <i>P. aeruginosa</i> -Kulturüberständen besitzen Molekularmassen von mehr als 3 kD	59
3.3.2.4	Kulturüberstände von <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> induzieren kein IFIT4	60
3.3.3	Genregulation von IFIT4 durch Zytokine	60
3.3.3.1	IFIT4 wird durch Interferon $\gamma$ induziert	60
3.3.3.2	Vergleich der Interferon-abhängigen Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10	61
3.3.3.3	Koinkubation mit Interferonen und TNF $\alpha$ führt nicht zu einer Überexpression von IFIT4	64
3.3.3.4	Der Effekt von Glukokortikoiden auf die IFIT4- und IP10-Induktion	65
3.3.4	Der Effekt von Retinolsäure (Vitamin A-Säure) auf die Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10	67
3.3.5	Die Bedeutung der Proteinkinase C für die Interferon-abhängige Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10	69
3.4	Identifizierung differentiell exprimierter Gene mit Hilfe von Microarray-Analysen	70
3.4.1	Verifizierung der anhand der Microarray-Analyse identifizierten differentiellen Genexpression	76
3.5	Identifizierung weiterer differentiell exprimierter Gene anhand der für die Microarray-Analyse verwendeten mRNAs	85
3.6	Identifizierung differentiell exprimierter Gene mit Hilfe der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung	87
3.6.1	Verifizierung der Gene, die nach erfolgter SSH differentiell exprimiert erschienen	92

---

3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	93
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Die Techniken zur Untersuchung differentieller Genexpression	95
4.2	Die Bedeutung der mikrobiellen Kultivierungsbedingungen für die Untersuchung differentieller Genexpression	100
4.3	Die Charakterisierung von IFIT4	101
4.4	Der Einfluss von <i>P. aeruginosa</i> -Kulturüberständen auf die epitheliale Immunabwehr	112
4.4.1	Die Bedeutung von hBD-2, LCN2, Elafin und S100-Proteinen bei der epithelialen Immunabwehr	114
4.4.2	Die Bedeutung von CC-Chemokinen bei der epithelialen Immunabwehr	117
4.4.3	Die Bedeutung von CXC-Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen bei der epithelialen Immunabwehr	123
4.4.4	Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren und damit assoziierten Faktoren bei der epithelialen Immunabwehr	127
4.4.5	Die Bedeutung von PTGS2, RNase7, SELPLG und HSPB1 bei der epithelialen Immunabwehr	129
4.4.6	Zusammenfassende Darstellung der durch <i>P. aeruginosa</i> -Kulturüberstände regulierten Gene	132
4.5	Ausblick	134
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>136</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>140</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>161</b>
8.1	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	161
8.1.1	Für RT- und „Real-Time“-PCR verwendete Oligonukleotide	161
8.1.2	Für die SDD-Analyse verwendete Oligonukleotide	163
8.2	Untersuchungen zur differentiellen Genexpression mit Hilfe der SDD	164
8.3	Übersichtstabelle der auf dem Microarray gebundenen <i>target</i> -Gene	165
	<b>Danksagung</b>	<b>173</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>174</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Haut als physikalische Barriere

Die menschliche Haut steht als äußerste Barriere des Körpers in ständigem Kontakt mit der lebenden Umwelt und ist einer Vielzahl schädlicher Einflüsse ausgesetzt, zu denen eine große Anzahl verschiedenster Mikroorganismen zählen. Doch trotz einer permanenten mikrobiellen Besiedlung kommt es bei gesunden Menschen nur relativ selten zu Hautinfektionen durch pathogene Mikroorganismen wie Pilze, Viren und Bakterien.

Der Grund hierfür liegt zum Teil in der intakten physikalischen Barriere, die die Haut als Schutz gegen Pathogenbefall bildet. So führt die Desquamation des *Stratum Corneum* der Haut bzw. die Schleimabsonderung durch die Schleimhäute zu einer ständigen Erneuerung der Körperoberfläche und somit zu einer Eliminierung der mikrobiellen Besiedlung. Durch das saure Milieu der Haut und durch eine stabile Lipidschicht wird Mikroorganismen die Adhäsion und das Eindringen in die Haut zusätzlich erschwert.

Für eine erfolgreiche Infektionsabwehr reicht eine intakte physikalische Barriere allein jedoch nicht aus (Weinberg und Swartz, 1993), so dass weitere Mechanismen erforderlich sind, um die Integrität der Haut zu bewahren.

## 1.2 Die angeborene und die adaptive Immunität

Neben der epithelialen physikalischen Barriere besitzen Wirbeltiere ein hocheffizientes System zur Abwehr von Infektionen, das auf dem Zusammenspiel mehrerer spezialisierter Effektorzellen basiert. Bei einer drohenden mikrobiellen Infektion erfolgt zunächst eine Abwehr durch die Mechanismen der angeborenen Immunität. In Blut und Geweben beruht diese im wesentlichen auf phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Janeway et al., 2002). Makrophagen reifen kontinuierlich aus zirkulierenden Monozyten, die den Blutkreislauf verlassen und im gesamten Körper in die Gewebe wandern. Neutrophile Granulozyten kommen im Blut in einer hohen Zahl, im gesunden Gewebe jedoch nicht vor. Bei der Phagozytose setzen diese Zellen toxische Produkte wie Wasserstoffperoxid

und Stickstoffoxid frei, die bei der Abtötung der aufgenommenen Mikroorganismen mitwirken. Weitere phagozytierende Zellen sind die unreifen dendritischen Zellen, die im infizierten Gewebe Antigene der pathogenen Organismen aufnehmen, dadurch reifen und weitere Immunzellen aktivieren können. Durch mikrobielle Membranbestandteile wird außerdem das Komplementsystem im Blut aktiviert, welches Mikroorganismen entweder direkt oder durch eine weitere Rekrutierung von Phagozyten abtötet.

Die Erkennung von pathogenen Mikroorganismen durch die Zellen der angeborenen Immunität erfolgt durch Keimbahn-codierte Rezeptoren, sogenannte „Pattern-Recognition-Receptors“ (PRR), die konservierte, pathogen-assoziierte Moleküle wie bakterielle DNA oder Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) erkennen (Übersicht bei Janeway und Medzhitov, 2002). Zu diesen PRRs gehören u.a. die sogenannten Toll-Like-Rezeptoren (TLRs), die homolog zu den ursprünglich bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifizierten Toll-Rezeptoren sind und von denen inzwischen 10 Familienmitglieder beim Menschen beschrieben sind (Übersicht bei Janeway und Medzhitov, 2002).

Durch die Erkennung von Krankheitserregern kommt es zur Auslösung einer Entzündungsreaktion, die drei Funktionen erfüllt (Janeway et al., 2002). Zum einen vergrößern sich die Blutgefäßdurchmesser, wodurch der lokale Blutfluss verstärkt wird. Ferner werden die Endothelzellen dazu aktiviert, Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, welche die Bindung von zirkulierenden Leukozyten am Infektionsort verstärken. Durch eine Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit kann außerdem gewährleistet werden, dass weitere Immunzellen an den Entzündungsfokus gelangen können.

Kann eine Infektion durch die Mechanismen der angeborenen Immunität nicht verhindert werden, so aktivieren Phagozyten durch Freisetzung von „Botenstoffen“ die Zellen der adaptiven Immunität, die Lymphozyten. Bei diesen Botenstoffen handelt es sich um sogenannte Zytokine bzw. Chemokine (= chemotaktische Zytokine), wobei letztere die Rekrutierung weiterer Effektorzellen zum Entzündungsort durch den Aufbau eines chemotaktischen Gradienten fördern können.

Die Chemokingruppe der Zytokine umfasst ca. 40 Proteine. Sie lassen sich anhand der Anordnung N-terminal konservierter Cysteinreste in verschiedene Unterfamilien einteilen (Zlotnik und Yoshie, 2000).

In der CXC-Chemokin-Unterfamilie sind die ersten beiden N-terminalen Cysteinreste durch eine nicht konservierte Aminosäure getrennt. CXC-Chemokine wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten. Zu den neutrophilen Granulozyten chemotaktisch aktivierenden Chemokinen zählt z.B. das Interleukin (IL)-8.

Die CC-Chemokin-Unterfamilie zeichnet sich durch direkte Nachbarschaft der ersten beiden Cysteinreste aus. CC-Chemokine wirken chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten, basophile oder eosinophile Granulozyten, nicht aber auf Neutrophile.

Die C-Chemokine und die CXXXXC-Chemokine stellen bislang kleine Unterfamilien der Chemokine dar.

Bei den Zellen der adaptiven Immunität unterscheidet man die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten. B-Lymphozyten differenzieren nach Kontakt mit einem Antigen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Im Gegensatz zu den Rezeptoren der Zellen des angeborenen Immunsystems können die von B-Lymphozyten synthetisierten Oberflächenmoleküle, die durch eine zufällige Kombination variabler Rezeptorsegmente entstehen, jedoch nicht zwischen körpereigenen und pathogenen Molekülen differenzieren. Naive T-Zellen entwickeln sich zu T-Effektorzellen, die u.a für die Regulation verschiedener Immunantworten eine entscheidende Rolle spielen. Auf der Basis der von T-Zellen sekretierten Zytokine werden zwei funktionelle „Cluster of Differentiation“ (CD) 4+ T-Zellen Phänotypen unterschieden (Mosmann und Coffman, 1989). T-Helfer (Th) 1-Zellen sezernieren Zytokine wie Interleukin (IL)-2, Interferon (IFN)- $\gamma$  und „Tumor Necrosis Factor“ (TNF)- $\alpha$ . Durch die Aktivierung von Makrophagen können Th1-Zellen zellvermittelte Immunantworten induzieren sowie durch die Suppression von Th2-Zellen die Immunantwort regulieren. Th2-Zellen dagegen setzen Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 frei (Romagnani, 1996) und aktivieren B-Lymphozyten, Antikörper herzustellen. Bei allergischen Entzündungen und Parasitenbefall können die Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 die Differenzierung und Rekrutierung von Eosinophilen ins Blut fördern.

Da die Effektorzellen der angeborenen und adaptiven Immunität z.T. nicht in den Epithelien lokalisiert sind sondern im Blut zirkulieren, können sie für die natürliche Resistenz der Epithelien gegen bakterielle Infektionen nicht ausschließlich verantwortlich sein. Neuere Studien zeigten, dass Epithelien wie die menschliche Haut neben ihrer Funktion als physikalische Barriere und den beschriebenen zellulären Abwehrmaßnahmen auch eine „chemische Barriere“ als Abwehrsystem besitzen, die zur Erhaltung der natürlichen Integrität beiträgt (Boman, 2000).

### 1.3 Die chemische Barriere der Haut - Antimikrobielle Proteine als Bestandteil der angeborenen epithelialen Immunität

In zahlreichen Studien der letzten Jahre konnte die Bedeutung eines chemischen Abwehrsystems für den Erhalt der Integrität der Epithelien belegt werden. Es zeigte sich insbesondere, dass antimikrobiell wirksamen Proteinen als phylogenetisch alten Effektormolekülen eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunität der Epithelien zukommen könnte (Schröder, 1999). Die Bedeutung von antimikrobiell wirksamen Substanzen wird besonders am Beispiel wirbelloser Organismen deutlich. Diese verfügen im Unterschied zu den Wirbeltieren nicht über eine adaptive Immunabwehr, können aber ein breites Spektrum an antimikrobiell wirksamen Substanzen synthetisieren.

So wurde z.B. aus der Seeanemone *Actinia equina* ein gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien wirksames Protein, Equinatoxin, isoliert (Pungercar et al., 1997). Muscheln wie *Mytilus galloprovincialis* verfügen über eine Vielzahl verschiedener antimikrobieller Proteine wie Defensine, Mytiline, Myticine und Mytimicine (Mitta et al., 2000). In dem Fettkörper und den Epithelien der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* werden antimikrobielle und antimykotische Peptide aus 7 verschiedenen Familien (Dipericine, Attacine, Drosocine, Cecropine, Defensine, Drosomycine und Metchnikowin) synthetisiert (Übersicht bei Hetru et al., 2003).

Auch Vertebraten verfügen über diesen epithelialen chemischen Schutzschild (Schröder, 1999). Für Frösche wurde gezeigt, dass sie als Schutz gegen eine mikrobielle Besiedlung sogenannte Magainine in ihren Schleimdrüsen synthetisieren (Zasloff, 1987). 1991 konnte zudem aus den Epithelien der Luftröhre von Rindern das erste antimikrobielle Protein aus Säugetieren isoliert werden („Tracheal antimicrobial peptide“ (TAP), Diamond et al., 1991). In neuesten Studien konnte die konstitutive Synthese eines antimikrobiellen Proteins in menschlichen Schweißdrüsen nachgewiesen werden (Dermcidin). Die antimikrobiell aktive Form dieses Peptids, welches gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* aktiv ist, wurde schließlich im menschlichen Schweiß gefunden (Schitteck et al., 2001).

Für Keratinozyten der menschlichen Haut wurde ebenfalls nachgewiesen, dass diese sowohl konstitutiv exprimierte als auch induzierbare antimikrobielle Proteine synthetisieren. Zu den konstitutiv von Keratinozyten exprimierten antimikrobiellen Proteinen gehört das humane  $\beta$ -Defensin (hBD)-1 (Mathews et al., 1999). Für die antimikrobiell wirkende Antileukoprotease ALP (ein Proteaseinhibitor) konnte gezeigt werden, dass diese sowohl

gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien als auch gegen Hefen wirksam ist (Wiedow et al., 1998). Die sekretorische Phospholipase A2 weist eine antimikrobielle Wirkung gegen Gram-positive Bakterien auf (Qu und Lehrer, 1998; Schadow et al., 2001).

Zu den induzierbaren antimikrobiellen Proteinen in Keratinozyten zählen die humanen  $\beta$ -Defensine hBD-2 und hBD-3 (Schröder und Harder, 1999; Harder et al., 2001). Desweiteren wurde aus dem *Stratum Corneum* der Haut eine Ribonuklease, die RNase7, isoliert, die gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen Hefen antimikrobiell wirksam ist (Harder und Schröder, 2002). Zu der Gruppe der Cathelicidine wird das offensichtlich induzierbare antimikrobielle Peptid 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 (Gudmundsson et al., 1996). Untersuchungen an entzündlichen Hauterkrankungen wie z.B. der Psoriasis zeigten jedoch auch eine Expression von LL-37 in Keratinozyten (Frohm et al., 1997).

Studien verschiedener Arbeitsgruppen zur Induktion antimikrobieller Proteine zeigten, dass neben proinflammatorischen Faktoren auch mikrobielle Produkte als Induktoren antimikrobieller Proteine fungieren können. So konnte in unserer Arbeitsgruppe z.B. dargestellt werden, dass hBD-2 nicht nur durch proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzierbar ist, sondern auch durch die Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* (Harder et al., 2000).

#### **1.4 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* als Induktoren der epithelialen Abwehr**

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes Bakterium, welches zu den bedeutendsten opportunistischen Pathogenen des Menschen gehört. Es lebt chemoorganotroph und kann eine Vielzahl organischer Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden (Brock, 2000). Die Stoffwechselenergie wird durch aerobe Atmung gewonnen, unter anaeroben Bedingungen kann *P. aeruginosa* jedoch auch Nitrat veratmen (Denitrifikation). Aufgrund seiner extremen Anpassungsfähigkeit ist *P. aeruginosa* ein ubiquitär lebendes Bakterium, welches im Boden, in der Luft, in destilliertem Wasser und bei Temperaturen von bis zu 42°C leben kann. Den bevorzugten Lebensraum dieses Organismus

stellen jedoch wässrige und schlammige Biotope dar, wo es entweder als planktonisch freischwimmende Zelle oder sessil in einem sogenannten Biofilm leben kann.

In gesunden Organismen löst *P. aeruginosa* nur selten Infektionen aus, obwohl ca. 50% der Menschen Träger dieses Bakteriums sind. Als opportunistisches, fakultativ pathogenes Bakterium kann *P. aeruginosa* aber insbesondere bei immungeschwächten Personen Infektionen auslösen. Neben nosokomial erworbenen Infektionen z.B. der Harnwege (durch Katheter) oder von Brandwunden (Richard et al., 1994) treten auch Infektionen der vorgeschädigten Lunge auf. Dies ist insbesondere bei Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) der Fall. Im Sputum von mehr als 75% aller CF-Patienten kann *P. aeruginosa* nachgewiesen werden (Pier, 2000). 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 (Yu et al., 1996). Die mukoide Form von *P. aeruginosa* ist gekennzeichnet durch die Produktion des extrazellulären Polysaccharids Alginat (May et al., 1991). Eine Behandlung mit Antibiotika vermag die Infektion nur in Ausnahmefällen endgültig zu beseitigen, da *P. aeruginosa* zum einen gegen viele Antibiotika resistent ist und zum anderen, bedingt durch sein geschütztes Wachstum im Biofilm, selten einer therapeutisch wirksamen Dosis ausgesetzt ist (Bauer et al., 2000; Hoiby et al., 1994).

Die hohe Pathogenität von *P. aeruginosa* beruht auf der Synthese zahlreicher Virulenzfaktoren während der verschiedenen Phasen einer Infektion (Übersicht bei Van Delden und Iglewski, 1998). Eine durch *P. aeruginosa* bedingte Infektion verläuft in drei Phasen. In Phase 1 findet eine Adhäsion und Kolonisation von *P. aeruginosa* auf dem Wirtsgewebe statt. Phase 2 ist durch eine lokale Invasion charakterisiert und in Phase 3 kommt es zu einer systemischen Verbreitung des Pathogens im Wirtsorganismus (Sepsis).

Nach der Anheftung an das Wirtsgewebe exprimiert *P. aeruginosa* verstärkt extrazelluläre Virulenzfaktoren, die zu einer Schädigung des Gewebes führen (Übersicht bei Van Delden und Iglewski, 1998). Dazu gehören u.a. Hämolysine wie Phospholipase C und Rhamnolipid, ein Detergens, welche wahrscheinlich synergistisch bei dem Abbau von Lipiden und Lecithin in der Zellmembran wirken. Von *P. aeruginosa* synthetisierte Toxine (z.B. Exotoxin A) und Proteasen (Elastasen, alkalische Protease) tragen ebenfalls zu der Schädigung von Geweben bei. Den wichtigsten Pathogenitätsfaktor stellt aber wahrscheinlich die bereits erwähnte Fähigkeit von *P. aeruginosa* dar, nach erfolgter Kolonisation Biofilme ausbilden zu können. Damit schützt sich das Bakterium nicht nur vor der Wirkung von Antibiotika sondern auch vor der körpereigenen Abwehr durch Phagozyten.

Unter den Gram-positiven Staphylokokken stellt *Staphylococcus aureus* den wichtigsten humanpathogenen Erreger dar. Staphylokokken sind fakultative Anaerobier und wachsen durch aerobe Respiration oder Fermentation (Brock, 2000). *S. aureus* ist ebenso wie *P. aeruginosa* ein sehr anpassungsfähiger Keim, der bei Temperaturen zwischen 15 und 45°C und bei Salzkonzentrationen von bis zu 15% wachsen kann. Viele nosokomial erworbene Infektionen z.B. von Wunden oder Harnwegen, aber auch Infektionen wie Meningitis und Endokarditis, sind auf *S. aureus* als Erreger zurückzuführen (Revathi et al., 1998; Pegues et al., 1994; Jensen et al., 1993). Durch die Freisetzung von Enterotoxinen in Nahrungsmittel kann *S. aureus* das „Toxische Schock-Syndrom“ auslösen und Proteasen wie Toxin A und B sind bei der Bildung von exfoliativer Dermatitis von Bedeutung (Fritsch, 1998; Lowy, 1998).

Ähnlich wie *P. aeruginosa* synthetisiert *S. aureus* bei der Kolonisation von Wirtsgewebe Virulenzfaktoren, die die eukaryotische Zellmembran lysieren (Hämolyse). Eine Erkennung durch das menschliche Immunsystem kann *S. aureus* u.a. durch die Synthese von zellwandgebundenem Protein A, welches IgG-Moleküle bindet und eine schützende Hülle um die Erreger bildet, verhindern. Die Pathogenität von *S. aureus* begründet sich allerdings nicht nur auf der Synthese verschiedener Virulenzfaktoren, sondern auch darauf, dass dieser Erreger sowohl gegen verschiedenste Antibiotika als auch z.B. Desinfektionsmittel resistent ist (Lowy, 1998).

*Candida albicans* stellt als ein Vertreter der Hefepilze einen weiteren wichtigen humanpathogenen Keim dar. Kandidapilze sind ubiquitär verbreitet und Teil der normalen Flora des Pharynx, des Respirations-, des Verdauungs- und des weiblichen Genitaltraktes (Fritsch, 1998). Die Haut besiedelt *C. albicans* bei gesunden Menschen nicht. Durch *C. albicans* verursachte Infektionen verhalten sich wie bei *P. aeruginosa* und *S. aureus* als opportunistische Infektionen, d.h. sie beruhen auf der Störung der lokalen (z.B. chronische Durchfeuchtung der Haut) oder der systemischen Immunabwehr (z.B. nach Chemotherapie, bei Stoffwechselstörungen, Unfallschock) (Fritsch, 1998). Die Pathogenität beruht zum einen auf der Synthese verschiedener Adhäsine (Mannoproteine, Integrin-ähnliche Moleküle), um an Endothel- und Epithelzellen binden zu können (Hostetter, 1994), zum anderen auf der Fähigkeit von *C. albicans*, den Phänotyp von einer Hefe- in eine Hyphenform wechseln zu können (Fritsch, 1998). Ferner synthetisiert die Hefe weitere Virulenzfaktoren wie Proteasen und Phospholipasen, die zur Schädigung des Wirtsgewebes beitragen (De Bernardis et al., 2001; Ghannoum, 2000).

## 1.5 Die Interaktion zwischen Mikroorganismen und humanen Epithelzellen

Nach erfolgter Zerstörung der epithelialen Barriere (Hornhaut, Schleimhäute) geraten die lebenden Keratinozyten in direkten Kontakt mit den Erregern. Um den Körper vor einer drohenden Infektion zu schützen, müssen die Keratinozyten epitheliale Abwehrmechanismen aktivieren. Verschiedene Untersuchungen geben bereits Hinweise auf die molekularen Mechanismen, die bei der epithelialen Abwehr von Bedeutung sein können. So wurde beispielsweise beobachtet, dass das von *P. aeruginosa* synthetisierte Pigment Pyocyanin das proinflammatorische Zytokin IL-8 in Epithelzellen induziert und somit eine Entzündungsreaktion auslösen kann (Denning et al., 1998). Bereits erwähnte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass Inkubationen von humanen Keratinozyten mit *P. aeruginosa* und *S. aureus* zu einer Induktion des antimikrobiellen Proteins hBD-2 führten (Harder et al., 1997). Interessant in diesem Zusammenhang war allerdings, dass Inkubationen von Zellen mit einem mukoiden klinischen Isolat von *P. aeruginosa* bereits bei sehr niedrigen Bakteriendichten ( $10^3$ /ml) zu einer erhöhten hBD-2 mRNA-Expression führten. Im Unterschied dazu kam es bei Inkubationen mit dem Gram-positiven Erreger *S. aureus* nur bei sehr hohen Bakteriendichten ( $>10^8$ /ml) zu einer Erhöhung der hBD-2 mRNA-Expression (Schwichtenberg, 2003).

Weiterführende Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, dass für die *P. aeruginosa*-abhängige hBD-2-Induktion eine mukoide Morphologie des Bakteriums von Bedeutung ist (Schwichtenberg, 2000; Harder et al., 2000). Ferner konnten hBD-2-induzierende Faktoren auch in Kulturüberständen mukoider *P. aeruginosa* nachgewiesen werden.

Für *S. aureus*-Isolate von Patienten mit Atopischer Dermatitis bzw. Psoriasis konnte gezeigt werden, dass von *S. aureus* synthetisierte Toxine und Protein A für die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  aus Keratinozyten verantwortlich ist (Ezpechuk et al., 1996). Neuere Untersuchungen belegen, dass Keratinozyten nach Inkubation mit hitze-abgetötetem *S. aureus* die Zytokine Interleukin (IL)-6 und IL-8 synthetisieren (Sasaki et al., 2003). Anhand von *S. aureus* - Lipoteichonsäure, einem Zellwandbestandteil, und *S. aureus*-Protein A konnte gezeigt werden, dass diese Faktoren die Freisetzung des „Hepatozyten Wachstumsfaktor“ (HGF) aus dermalen Fibroblasten induzieren (Baroni et al., 1998). Im Gegensatz dazu induzierte *P. aeruginosa*-LPS keine HGF-Freisetzung. HGF stellt einen Proliferationsfaktor von Epithelzellen, inklusive Keratinozyten, dar und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Wundheilung von durch bakterielle Infektionen geschädigtem Gewebe.

Bezüglich *Candida*-Infektionen konnte anhand eines Modells der kutanen Candidosis nachgewiesen werden, dass *C. albicans* verschiedene Zytokine wie IL-8, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und „Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor“ (GM-CSF) in Keratinozyten induziert (Schaller et al., 2002).

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zu möglichen Mechanismen der epithelialen Immunabwehr deuten darauf hin, dass Keratinozyten nicht stereotyp auf eine drohende mikrobielle Infektion reagieren. Vielmehr scheinen die Keratinozyten in der Lage zu sein, zwischen verschiedenen Mikroorganismen unterscheiden zu können und dementsprechend unterschiedliche Abwehrmechanismen aktivieren zu können. Diese Abwehrstrategien sind offensichtlich nicht nur auf die Induktion antimikrobieller Proteine beschränkt.

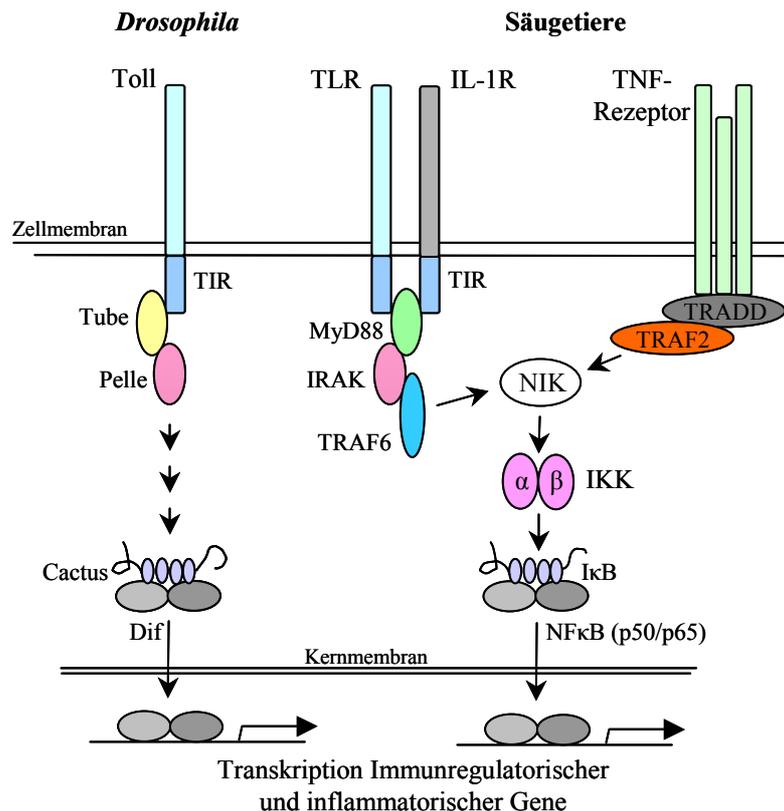
## 1.6 Differentielle Genexpression in *Drosophila*

Hinweise auf eine differentielle Expression von immunrelevanten Proteinen nach einer mikrobiellen Infektion ergeben sich aus Untersuchungen anhand der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Diese zeigten, dass die in dem Fettkörper (einem funktionellem Äquivalent zu der Säugetier-Leber) und den Epithelien von *Drosophila* synthetisierten antimikrobiellen Proteine unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen (Lemaitre et al., 1997; Übersicht bei Meister et al., 2000). So wirken Drosocin und Defensine hauptsächlich gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, während Drosomycin antimykotisch wirkt. Metchnikowin, Cecropine, Diptericine und Attacine können sowohl antibakteriell als auch antimykotisch wirken.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die transkriptionelle Regulation antimikrobieller Proteine in *Drosophila* über zwei unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden erfolgt (Übersicht bei Hetru et al., 2003). Diese Entdeckung wurde mit der Beobachtung in Zusammenhang gebracht, dass *Drosophila* auf verschiedene Mikroorganismen mit der Induktion unterschiedlicher antimikrobieller Proteinen reagieren kann. Es zeigte sich, dass der sogenannte Toll-Signalweg, welchem ursprünglich eine spezifische Funktion bei der dorsoventralen Embryonalentwicklung zugeschrieben wurde, und der Imd („Immune deficiency“)-Signalweg für die Induktion antimikrobieller Proteine entscheidend sind. Die Toll-Rezeptor-abhängige Signaltransduktion wird bei einer fungalen bzw. Gram-positiven bakteriellen Infektion aktiviert, während die Imd-Kaskade bei einer Infektion mit Gram-

negativen Bakterien von Bedeutung ist. Beide Signalwege führen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die der Familie der NF $\kappa$ B („Nuclear Factor of  $\kappa$  Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells“) /Rel-Proteine angehören, zur Induktion antimikrobieller Proteine.  $\kappa$ B-Bindungsstellen in Genpromotoren wurden ursprünglich in Säugetieren gefunden, wo sie in einer Vielzahl von Genen mit immunregulatorischer oder inflammatorischer Funktion vorkommen (Hetru et al., 2003). Bindungsstellen für NF $\kappa$ B finden sich z.B. in den genregulatorischen Bereichen des humanen  $\beta$ -Defensins hBD-2 (Harder et al., 2000) bzw. des bovinen  $\beta$ -Defensins TAP (Diamond et al., 2000) sowie bei verschiedenen Zytokinen und Chemokinen wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  oder MCP-1 (Mukaida et al., 1994; Übersicht bei Ghosh und Karin, 2002). Das Vorhandensein von NF $\kappa$ B-Konsensussequenzen in den Promotoren insbesondere von induzierbaren antimikrobiellen Peptiden bei Insekten und Menschen weist darauf hin, dass die NF $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion Bestandteil eines evolutiv alten Abwehrmechanismus bei Pathogenbefall ist (Hultmark, 1994).

Die Toll-vermittelte Aktivierung antimikrobieller Proteine in *Drosophila* zeigt zahlreiche Parallelen mit der TLR („Toll-Like Receptor“)-abhängigen Induktion immunregulatorischer Gene beim Menschen (Übersicht bei Hoffmann et al., 1999; Imler und Hoffmann, 2000). In Säugetieren ist die Aktivierung von NF $\kappa$ B allerdings nicht ausschließlich von aktivierten TLRs abhängig, sondern kann auch über andere Rezeptoren wie z.B. den TNF („Tumor Necrosis Factor“)-Rezeptor erfolgen (Abb. 1).



**Abb. 1 Die Toll-vermittelte Aktivierung von *Dif* bei *Drosophila* ist homolog zu der TLR-vermittelten NFκB-Aktivierung bei Säugetieren.** Nach Aktivierung des Toll-Rezeptors durch Bindung des prozessierten Polypeptids Spätzle, wird intrazellulär das Signal über die Proteine Tube und Pelle, eine Kinase, an das Ankyrin-Domänen-Protein Cactus weitergeleitet. Dieses dissoziiert nach Phosphorylierung (durch eine bislang unbekannte Kinase) von dem NFκB/Rel-Protein Dif, welches daraufhin in den Zellkern wandern kann und an genregulatorische Sequenzen bindet. TLRs sind homolog zu den Toll-Rezeptoren, da sie über eine leucin-reiche extrazelluläre Domäne und eine intrazelluläre TIR („Toll-IL Rezeptor“-)Domäne verfügen. Nach ihrer Aktivierung (z.B. durch LPS bei TLR4) erfolgt die Signalweiterleitung über MyD88 und IRAK („IL-1R Associated Kinase“), welches homolog zu Pelle ist und TRAF („TNF Receptor-Associated Factor“) 6 aktiviert. Alternativ kann diese Kaskade durch eine Aktivierung des IL (Interleukin)-1-Rezeptors erfolgen, da dieser, ebenso wie TLRs, eine intrazelluläre TIR-Domäne aufweist. TRAF6 aktiviert NIK („NFκB-inducing Kinase“), welches über die Aktivierung der IKK-Proteine zur Phosphorylierung von den IκB-Proteinen führt. Analog zu *Drosophila* wird dadurch der Transkriptionsfaktorkomplex NFκB freigesetzt. Die Homologien zwischen den Signalkaskaden sind gleichfarbig dargestellt (nach Hoffmann et al., 1999; Hetru et al., 2003; Imler und Hoffmann, 2000).

## 1.7 Methoden für die *in vitro*-Untersuchung differentieller Genexpression

Ursprünglich wurde angenommen, dass das menschliche Genom aus ca. 70.000 – 80.000 Genen besteht (Antequera und Bird, 1993). Nach der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms erscheint es wahrscheinlicher, dass dieses für ca. 20.000 Gene codiert,

wobei weitere Analysen für die genaue Bestimmung der Genomgröße nötig sind (Venter et al., 2001). Von dieser Gesamtzahl wird in einer Zelle (in Abhängigkeit vom Zelltyp) nur ein Teil exprimiert.

Reassoziationsstudien mit mRNA zeigten, dass die mRNA-Population bei Säugetieren zu ca. 25% aus abundanten Transkripten (d.h. bestimmte Gene werden häufig transkribiert), zu 25% aus mittel-abundanten und zu ca. 50% aus gering-abundanten Transkripten ( $\leq 13$  Kopien/Zelle) besteht (Sambrook und Russell, 2001).

Mit Hilfe differentieller Genexpressionsanalysen können theoretisch alle Gene, die beispielsweise aufgrund pathologischer Vorgänge (Infektionen, Tumorbildung) differentiell exprimiert sind, identifiziert werden. Anhand der Ergebnisse können somit Rückschlüsse auf die molekularen Grundlagen von der Wirkungsweise von Medikamenten oder von Krankheiten gezogen werden. Ferner ergeben sich aus derartigen Analysen möglicherweise Hinweise auf die Funktion bisher funktionell nicht charakterisierter Gene.

Für eine vergleichende Analyse differentieller Genexpression auf Transkriptebene stehen eine Reihe verschiedener Methoden zur Auswahl. Neben hybridisierungsbasierten Techniken wie Northern Blots, RNase-Protection-Assays, der Subtraktiven Hybridisierung und DNA-Microarrays existieren auch PCR- bzw. sequenzbasierte Techniken wie die Differential Display und die „Representational Difference Analysis“ (RDA).

## 1.8 Ziel der Arbeit

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung war, inwieweit die menschliche Haut in der Lage ist, zwischen verschiedenen pathogenen Mikroorganismen zu differenzieren und unterschiedliche Abwehrmechanismen aktivieren zu können. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die differentielle Genexpression in Hautkeratinozyten nach Kontakt mit mikrobiellen Stimuli auf mRNA-Ebene untersucht werden.

Zunächst sollte mit Hilfe der „Systematischen Differential Display-PCR“ das Genexpressionsmuster von Keratinozyten nach Kontakt mit Kulturüberständen von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *C. albicans* vergleichend analysiert werden. Die Analyse sollte sich allerdings nicht nur auf die Identifikation antimikrobieller Proteine fokussieren, sondern auch Hinweise auf weitere Gene liefern, die direkt oder indirekt an einer epithelialen Abwehr

beteiligt sein können. Wenn möglich, sollte eine nähere Charakterisierung der bei der Analyse als differentiell exprimiert identifizierten Gene erfolgen.

Ferner sollte mit Hilfe weiterer Methoden zur Untersuchung differentiell exprimierter Gene (Microarray-Analysen, Suppressive Subtraktive Hybridisierung) untersucht werden, welchen Einfluss verschiedene Kulturüberstände von *P. aeruginosa* auf die Genexpression in Keratinozyten haben.

Die hier durchgeführten Untersuchungen sollten dazu dienen, das bisher unvollständige Bild von epithelialen Abwehrmechanismen bei Pathogenbefall zu vervollständigen. Vor dem Hintergrund zunehmender bakterieller Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika kann die Kenntnis über die Mechanismen, die einer effizienten Infektionsbekämpfung zugrunde liegen, für die entsprechende Medikamententwicklung von entscheidender Bedeutung sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide und sonstige Materialien

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Jeneil Biosurfactant (Baiersdorf), Unipath LTD. (Hampshire), Biozym (Hessisch Oldendorf) und Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) bezogen.

Es wurden Enzyme von Roche (Mannheim), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Clontech (Heidelberg), Promega (Madison, Madison, WI, USA) und Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) verwendet.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-ARK GmbH (Steinheim) und Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) bezogen (Sequenzen befinden sich im Anhang).

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol) stammte von Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg).

Für Inkubationsexperimente verwendete Zytokine und Substanzen wie Calphostin C, Dexamethason und *all trans* Retinolsäure stammten von Calbiochem (San Diego, USA) bzw. Sigma (Deisenhofen). Rekombinantes IFN $\alpha$ -2a wurde von Roche (Mannheim), rekombinantes IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  von PeproTech (NJ, USA) bezogen.

### 2.2 Nährmedien für Kulturen von Mikroorganismen

YPD-Medium:	20 g/l Pepton, 10 g/l Hefe-Extrakt, 20 g/l D(+)-Glukose
„MG-Medium“ (Magermedium)	30 mM Glukose, 40 mM Dikaliumhydrogenphosphat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 7 mM Ammoniumsulfat, 0,5 mM Magnesiumsulfat



## 2.4 Bakterien- und Hefestämme

Mikroorganismus	ATCC-Nr.	NCTC-Nr.	Besonderes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33354	11146	
	15442	-	Keine Pyocyaninsynthese Resistenz gegen verschiedene Antibiotika
	25668	10662	Sensitiv gegenüber Gentamicin und Carbenicilin
	27853	-	
	33348	11440	
	33358	11450	
<i>Escherichia coli</i>	35218	-	
	25922	-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	Klinisches Isolat 241
<i>Candida albicans</i>	10231	-	

Tabelle 1.1. : Überblick über die verwendeten Bakterienstämme

Zur Stimulation von Keratinozytenkulturen wurden Kulturüberstände der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterienstämme verwendet. Diese wurden von der Medizinischen Mikrobiologie, Kiel und dem Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Kiel bezogen.

## 2.5 HPLC-Säulen

Superdex 75: Gelfiltrationssäule PC 3.2/50, Code No. 17-0771-01,  
an LKB- $\mu$ Separation-Unit und LKB-Precision Pump,  
Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

Mini Q: Anionenaustauscher PC 32/33, Code No. 17-0686-01,  
Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

Resource Q: 6 ml Anionenaustauscher, Code No. 17-1179-01,  
Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

## **2.6 Molekularbiologische Standardmethoden**

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Standardprotokolle nach Sambrook et al. (1989) und Sambrook und Russell (2001) durchgeführt.

## **2.7 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

### **2.7.1 HaCaT – Zelllinie**

Die HaCaT-Zelllinie ist eine humane, immortalisierte, nicht-tumorigene Zelllinie, die spontan durch Kultivierung humaner Keratinozyten bei erhöhter Temperatur und geringer Kalziumkonzentration entstand. Die Differenzierung dieser Zellen ähnelt dabei derer primärer humaner Keratinozyten (Boukamp et al., 1988).

HaCaT- Ursprungskulturen wurden von Prof. Fusenig (DKFZ, Heidelberg) bezogen. 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, hitze-inaktiviertem Kälberserum (FCS; Bioconcept, Umkirch) angezüchtet. Weiterhin enthielt das Nährmedium 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin (beides von Invitrogen, Karlsruhe). Die Kultivierung der HaCaT-Zelllinie erfolgte bei 37°C wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit CO<sub>2</sub>-Begasung in 200 ml-Kulturgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht).

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

Humane Keratinozyten wurden aus frischen Vorhäuten isoliert. Dazu wurde die Haut von Fett- und Bindegewebe befreit, in Streifen (2 x 5 mm) geschnitten und die Epidermis von der Dermis nach Inkubation in 0,25%iger Trypsinlösung (Invitrogen, Karlsruhe) über Nacht bei 4°C mechanisch getrennt. Die basalen Keratinozyten wurden durch vorsichtiges Abschaben von den übrigen Zellschichten gelöst. Die Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges

Auf- und Abpipettieren resuspendiert und konnten nach einer Zentrifugation (600 g, 5 min.) in Zellkulturflaschen mit 10 ml EpiLife-Medium (Sigma, Deisenhofen) ausgesät werden.

### 2.7.3 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 (Lindl und Bauer, 1994). Bei den primären Keratinozyten war der Grad der Ausdifferenzierung entscheidend für den Zeitpunkt der Subkultivierung.

Zum Ablösen der adhärent wachsenden primären Keratinozyten bzw. HaCaT-Zellen vom Kulturgefäßboden wurden die Zellen zweimal mit PBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 0,1% Trypsin-0,02% EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Nach 1-2 min. Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht) vom Kulturgefäßboden abgelöst und durch Zugabe des gleichen Volumens an FCS-haltigem Medium wurde die Trypsin-bedingte enzymatische Proteolyse abgestoppt. Nach Resuspension und Zentrifugation bei 600 g für 10 min wurden die Zellen mit DMEM- bzw. EpiLife-Medium gewaschen und in sterile Kulturflaschen eingesät (Subkultivierung) bzw. für Inkubationsversuche in 6- oder 12-Loch-Kultur-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt.

### 2.7.4 Stimulation der Zellen

Die zu stimulierenden Zellen wurden vor Beginn eines Experimentes in 6-Loch-Kultur- oder 12-Loch-Kultur-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 2 ml Medium (bzw. 1 ml) pro Loch überführt (siehe oben). Um ausschließen zu können, dass im FCS enthaltene, undefinierte Faktoren die Stimulierbarkeit der HaCaT-Zellen beeinflussen, wurde das Zellkulturmedium 24 – 12 Std. vor dem Versuch nach zweimaligem Waschen mit PBS durch FCS-freies Nährmedium ersetzt. Bei primären Keratinozyten war ein derartiger Medienaustausch nicht nötig, da das Nährmedium kein Serum enthielt.

Es wurde darauf geachtet, dass die Zellkonfluenz bei der Stimulierung bei maximal 80% lag, da eine zu hohe Zelldichte keine reproduzierbaren Stimulationseffekte zuließ (eigene Beobachtung). Der Stimulus wurde in der gewünschten Konzentration in serumfreiem, 0,1% BSA (Sigma, Deisenhofen)-DMEM Medium bzw. EpiLife-(Sigma, Deisenhofen)-

Medium aufgenommen und zu vorher nochmals mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Die Zugabe von BSA sollte dabei verhindern, dass durch die sonst mögliche Bindung des Stimulus an die Gefäßwand die effektive Stimuluskonzentration verringert wird. Titrations des Stimulus (z.B. Überstände von Bakterienkulturen; siehe 2.8.1) wurden direkt im serumfreien Medium erstellt.

## **2.8 Anzucht von Mikroorganismen und Aufarbeitung von Kulturüberständen**

Die Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. a.*), *Staphylococcus aureus* (*S. a.*), *Candida albicans* (*C. a.*) und *E. coli* (*E. c.*) erfolgte bei 37°C auf Trypticase-Soy-Broth (TSB)-Agarplatten. Die Stammkulturen lagerten bei -70°C als Flüssigkulturen.

### **2.8.1 Kultivierung der Mikroorganismen zur Gewinnung von Kulturüberständen**

Für die Generierung von mikrobiellen Kulturüberständen wurden jeweils 7-8 µl der eingefrorenen Flüssigstammkultur des jeweiligen Mikroorganismus in 7-8 ml TSB- bzw. YPD-Medium angeimpft und über Nacht unter Schütteln (200 Upm) kultiviert. Die Optische Dichte (OD) der Zellsuspension wurde auf 1,0 bis 1,2 eingestellt und 2 ml dieser verdünnten Flüssigkultur wurden für weitere 24 Std.\* Inkubation (unter Schütteln) in 200 ml Nährmedium (YPD- bzw. TSB-Medium) überführt.

Unter diesen (bezüglich Nährstoffen und Sauerstoff) „optimalen“ Bedingungen erreichten die Bakterien ihre maximale Zelldichte. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Bakteriensuspension für 15 min. bei 6000 g. Das entstandene Bakterienpellet wurde anschließend in 200 ml Medium resuspendiert. Dabei wurden die Bakterien, wenn nicht anders erwähnt, auf 4 grundlegende Arten für 24 Std.\* weiter kultiviert:

- a.) in TSB-Medium bei 200 Upm (Suspensionskultur)
- b.) in TSB-Medium unter statischen Bedingungen (ohne Schütteln)
- c.) in MG-Medium (s. 2.2) bei 200 Upm (Suspensionskultur)
- d.) in MG-Medium unter statischen Bedingungen (ohne Schütteln)

(\* bei der Anzucht von *C. albicans* wurden die Kultivierungszeiten verdoppelt)

Es schloß sich eine Zentrifugation der Bakterienkulturen an. Der Kulturüberstand wurde danach dekantiert und durch Verwendung des Stericup Filtrationssystems (Millipore GmbH, Eschborn) sterilfiltriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese Überstände bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Sollten die Kulturüberstände als Stimuli verwendet werden, wurden diese entsprechend dem jeweiligen Versuchsansatz mit FCS-freiem DMEM- bzw. EpiLife-Medium verdünnt.

Für Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Eigenschaften von *P. aeruginosa* - Kulturüberständen mit Hilfe von Microarray-Analysen (s. 2.15) wurden zwei Überstände verwendet. Ein Überstand (*P. aeruginosa* ATCC 15442) enthielt hBD-2-induzierende Komponenten und induzierte bei Inkubation von HaCaT-Keratinocyten v.a. die Expression von hBD-2-mRNA und in geringem Maße IL-8-, TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -mRNA. Der andere Überstand (*P. aeruginosa* ATCC 33358) enthielt hBD-2-inhibierende Komponenten. Eine Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand führte zu einer Inhibition der hBD-2-mRNA-Expression und zu einer Induktion der IL-8-, TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression.

### **2.8.2 Einkonzentrierung der Bakterienkulturüberstände**

Für einige Versuche wurden sterilfiltrierte Bakterienkulturüberstände in einer Ultrafiltrationskammer (Amicon®-Kammer, Millipore GmbH, Eschborn) unter Verwendung einer YM30-Ultrafiltrationsmembran (Millipore GmbH, Eschborn; Porengröße („Cutoff“): 30 kD) konzentriert. Die Filtrate (<30 kD) wurden anschließend erneut in der Amicon-Kammer mittels eines YM3-Filters (Porengröße: 3 kD) konzentriert. Die so erzeugten drei Fraktionen (>30 kD; 3-30 kD; <3 kD) der Kulturüberstände wurden dann separat auf mögliche induzierende Faktoren untersucht.

### **2.8.3 Säure-Behandlung bakterieller Kulturüberstände**

Im Rahmen der Säurebehandlung wurden einige Kulturüberstände zunächst durch Zugabe von 1 M HCl auf pH 3 eingestellt und anschließend bei 6000 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.

## **2.9 Analyse von Kulturüberständen unter Verwendung verschiedener Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Systeme**

Fraktionierungen von mikrobiellen Kulturüberständen wurden freundlicherweise von Jutta Quitzau, Claudia Mehrens und Lars Schwichtenberg durchgeführt.

### **2.9.1 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 Bakterienkulturüberstände wurden entweder im „Rohzustand“ oder nach Ansäuerung auf pH 3 mit anschließender Neutralisierung (s.2.8.3) auf die Säule gegeben. Als Laufpuffer diente hierbei PBS.

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

### **2.9.2 Anionenaustauschchromatographie**

Um über die Ladungseigenschaften der induzierenden Faktoren eine Aussage treffen zu können, wurden Bakterienkulturüberstände mittels Anionenaustauschchromatographie fraktioniert. Die Proben wurden dabei ohne Vorbehandlung auf die Säulen gegeben.

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

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

**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

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

**Gradient:**

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

Flussrate: 100 µl/min

**2.10 Semiquantitative RT-PCR****2.10.1 RNA-Isolierung**

Soweit nicht anders erwähnt, wurde aus kultivierten Keratinozyten nach Entfernung des Kulturüberstandes die Gesamt-RNA mittels des „TRIzol™“-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Nach Präzipitation mit Isopropanol wurde das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das RNA-Präzipitat wurde in 10-20 µl 25%-Formamid-H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C verwahrt.

In Vorbereitung der Systematischen Differential Display (SDD) -PCR, der Microarray-Hybridisierung und der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des StrataPrep® Total RNA Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gemäß Herstellerangaben aufgearbeitet.

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

### 2.10.2 cDNA-Synthese und Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 0,5 – 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt und zusammen mit 2,5 µl Oligo(dT)-Primer (20 µM) und DEPC-vorbehandeltem Wasser (ad 12,5 µl) zur Aufhebung der Sekundärstruktur für 10 min. auf 70°C erhitzt.

Nach Äquilibrierung der Temperatur auf 42°C und Zugabe von je

4 µl 5 x Reaktionspuffer

2 µl 0,1 M DTT

1 µl dNTPs (10 mM)

1 µl Reverse Transkriptase (Superscript II, Gibco BRL, Eggenstein)

erfolgte die reverse Transkription bei 42°C für 1 Std. Nach 5-minütiger Inaktivierung des Enzyms bei 90°C wurde der Ansatz mit dH<sub>2</sub>O auf ein definiertes Volumen (gemäß der eingesetzten RNA-Menge 50, 100 bzw. 200 µl) gebracht.

### 2.10.3 Standard-PCR und „Real-Time“-PCR

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl mit dem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) oder dem PTC-100™ (MJ Research, Watertown, MA, USA) durchgeführt. Die Zutaten pro Ansatz mit Stammkonzentrationen der Ausgangslösungen waren: 5 µl Puffer (10 x), 5 µl dNTP (2 mM), je 2,5 µl genspezifische Primer (10 µM), je 0,25 µl GAPDH-Primer (10 µM), 19,5 µl dH<sub>2</sub>O und 5 µl cDNA (entsprechend 50 ng cDNA). Die DNA wurde nach einem sogenannten „hot-start“ wie folgt amplifiziert:

- 1 Zyklus                      94°C, 5 min.
- 85°C: Zugabe 0,4 µl *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, 5 U/µl) und 9,6 µl dH<sub>2</sub>O
- X Zyklen                      94°C, 30 s      60°C, 30 s      72°C, 2 min.
- 1 Zyklus                      72°C, 10 min.
- 1 Zyklus                      4°C, ∞

Da Gene unterschiedlich stark transkribiert werden, richtete sich die Zyklenzahl X nach dem jeweiligen zu amplifizierenden Gen und lag in der Regel bei 30-35 Zyklen.

Die Annealingtemperatur wurde hier exemplarisch mit 60°C dargestellt. Die Annealingtemperaturen der einzelnen Primer sind in der Tabelle im Anhang (s. 9.1.1) aufgeführt.

Die Quantifizierung der relativen Expression der spezifischen Gene anhand der jeweiligen GAPDH-Expression erfolgte mit Hilfe des Programmes ScanPack (Biometra, Göttingen).

„Real-Time“ RT-PCR wurde auf einem Fluoreszenz-Temperatur-Cycler gemäß Herstellerangaben durchgeführt (LightCycler, Roche, Mannheim). Die Technik erlaubt eine Beobachtung der zyklenabhängigen Akkumulation Fluoreszenz-markierter DNA. Der 10 µl-PCR-Ansatz (1 µl cDNA (entsprechend 10 ng RNA); 5,8 µl dH<sub>2</sub>O; 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), je 1 µl genspezifische Primer (10 µM), und 1 µl LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Mix 10 x (Roche)) wurde in eine Kapillare pipettiert.

Das Amplifikationsprogramm:

- 1 Zyklus    95°C, 10 min.
- 45 Zyklen    95°C, 10 s    66°C-60°C – 5 s; 1°C/min.    72°C, 15 s
- 1 Zyklus    Schmelzkurve

Es wurde eine sogenannte „Touchdown“-PCR durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen.

Die Auswertung der PCR erfolgte mit der LightCycler Software (Roche, Mannheim). Mit Hilfe von zuvor für die jeweiligen Primer erstellten Standardkurven konnten die spezifischen Transkriptmengen gegen die jeweiligen GAPDH-Transkriptmengen abgeglichen und so die

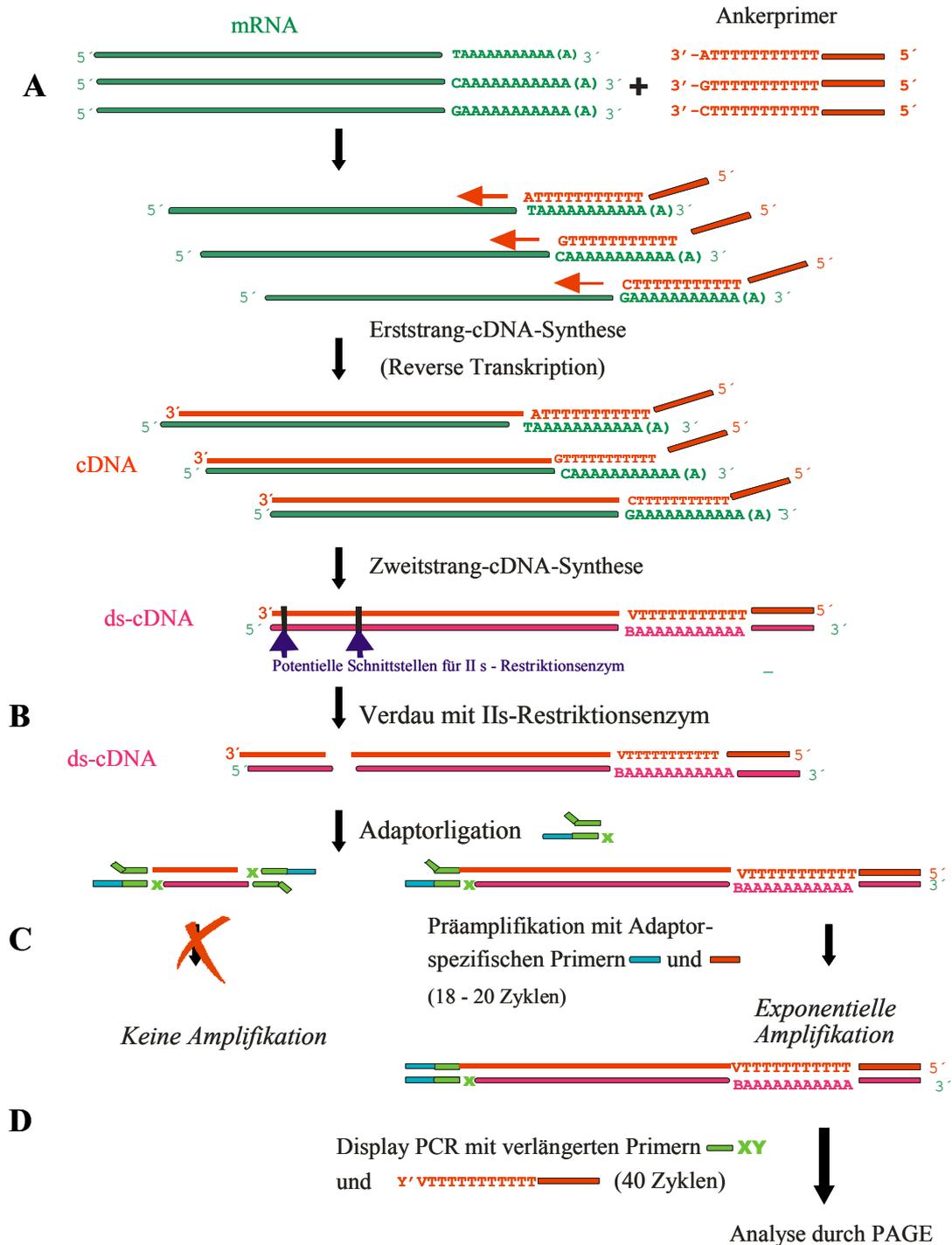
relative mRNA-Expression bestimmt werden. Die Spezifität der Amplifikate wurde durch Elektrophorese auf einem 2%-Agarosegel bzw. durch Sequenzierung bestätigt.

## **2.11 Darstellung der Ergebnisse**

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit abgebildeten Diagramme zu den Inkubationsexperimenten von Keratinozyten und HaCaT-Zellen stellen, soweit nicht anders erwähnt, repräsentative Beispiele für mehrfach durchgeführte unabhängige Versuche dar, die vergleichbare Resultate aufwiesen. Versuchsansätze hingegen, die in Wiederholungen abweichende bzw. keine eindeutigen Resultate lieferten, fanden in dieser Arbeit keine Berücksichtigung.

## **2.12 Systematische Differential Display (SDD) RT-PCR**

Die SDD-Methode wurde von Ke et al. (1999) entwickelt und basiert auf der von Liang und Pardee entwickelten Differential-Display-PCR-Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene (Liang und Pardee, 1992). Eine schematische Übersicht über die SDD-Methode ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2 Darstellung des methodischen Ablaufes der DDRT-PCR.** **A** Generierung von cDNA mit definierten 3'-Enden. **B** Synthese von ds-DNA mit definierten 5'-Enden durch den Verdau mit MboII und Ligation von Adaptoren. **C** Selektive Prä-Amplifikation der 3'-Enden von cDNA Fragmenten (mit Primern, die die Anker- und Adaptorsequenzen enthalten). **D** Differential Display PCR: Unter Verwendung von Primern, die sich aus den Adaptor-Sequenzen A1 und den cDNA-Primersequenzen herleiten, sich aber jeweils am 3'-Ende durch 2 zusätzliche, die Spezifität bestimmende Nukleotide unterscheiden. Der Gesamt-cDNA-Pool wird mittels SDD durch Verwendung von 12 x 16 verschiedener Primer-Kombinationen in 192 nicht überlappende Untergruppen aufgeteilt. Mittels Amplifikation wird durch jedes individuelle Primerpaar ein charakteristisches Banden-Muster, auch *Display* genannt, erzeugt, welches unterschiedlichen Gruppen differentiell regulierter Gene entspricht. Die Display-PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch mittels denaturierendem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Durch Vergleich der Bandenintensitäten können differentiell exprimierte Gene systematisch identifiziert werden (weitere Details s. nächste Seite).

Der Ablauf der hier durchgeführten SDD sah im Einzelnen wie folgt aus:

- Primäre Keratinozyten (2. Passage, Fibroblastenanteil <5%) wurden für 6 Std. mit Überständen von Mikroorganismen inkubiert. Um ausreichende Mengen an RNA zu erhalten, wurde je Stimulus eine 6-Loch-Kultur-Platte primärer Keratinozyten verwendet.

- Die RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des StrataPrep® Total RNA Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gemäß Herstellerangaben.

- Die Erststrang-cDNA wurde in 3 unterschiedlichen Reaktionen synthetisiert, wobei 3 unterschiedliche Ankerprimer verwendet wurden (ANK11A, ANK11C, ANK11G, s. 9.1.2), die an das 3'-Ende der mRNA binden und sich an ihrem 3'-Ende in den Basen Adenin (A), Guanin (G) und Cytosin (C) unterscheiden. Jeder Einzelansatz, bestehend aus 10 µg RNA (gelöst in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O), 0,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 0,5 µl Anker-RT-Primer (200 µM), wurde für 10 min. auf 70°C erhitzt, anschließend mit dem RT-Gemisch (1 µl dNTP (10 mM); 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl), 1 µl RNase-Inhibitor 25 U/µl) und Puffer (5 x)) versetzt und bei 42°C 1 Std. inkubiert.

- Für die cDNA-Zweitstrang-Synthese wurden je 10 µl der 3 Erststrang-Reaktionen pro Probe vermengt und mit 210 µl eines Reaktionsgemisches (48 µl Puffer (5 x); 1 µl RNase H (2 U/µl); 6 µl DNA-Polymerase I (10 U/µl), 0,7 µl DNA-Ligase (10 U/µl) und 154 µl H<sub>2</sub>O) vermengt. Die Inkubation erfolgte für 2 Std. bei 16°C und weitere 10 min. bei 65°C zur Inaktivierung des Enzyms.

Durch Zugabe von 32 µl T4 DNA Polymerase (1 U/µl) und Inkubation bei 16°C (5 min.) erfolgte eine Umwandlung der cDNA in eine "blunt-end" Form. Die Reaktion wurde durch EDTA (pH 8) gestoppt, die cDNA mit Phenol-Chloroform extrahiert, mit EtOH gefällt und in TE/2 Puffer resuspendiert.

- Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym MboII (Erkennungssequenz 5'-GAAGA-3') in einem 20 µl-Standardansatz mit 2,5 U Enzym für 1 Std. bei 37°C verdaut, mit EtOH präzipitiert und in einem kleinen Volumen TE/2-Puffer resuspendiert. MboII hat eine 5 bp-Erkennungssequenz und schneidet somit eine cDNA im Durchschnitt alle 1024 (=4<sup>5</sup>) bp. Das Enzym schneidet außerhalb seiner Erkennungssequenz und generiert einen zufälligen 1 bp-Überhang.

- Je Ausgangs-cDNA wurden mit je 2 verschiedenen Adaptoren 2 Ligationen durchgeführt. Zur Herstellung der doppelsträngigen Adaptoren wurden je 200 pmol des „oberen“ Primers (NA1UA, NA1UT, NA1UG bzw. NA1UC; s. 9.1.2) mit 200 pmol des „unteren“ Primers (NA1L) vermengt und mit TE/2 auf ein Volumen von 40 µl gebracht. Nach Inkubation bei 65°C für 5 min. im Wasserbad kühlte das Reagiergefäß in einem Glas mit

65°C warmem Wasser langsam auf Raumtemperatur ab, wobei ein sogenanntes „touch-down-annealing“ der Adaptoren erfolgte. Die Adaptoren unterscheiden sich jeweils im 1 bp-Überhang (A, T, C, G) am 3'-Ende des doppelsträngigen Adaptorendes und komplementieren so jedes auftretende, durch Restriktionsverdau geschaffene cDNA-Ende (s. Abb. 2B). Die Adaptoren weisen nicht-komplementäre Bereiche auf, um sicherzustellen, dass in einer anschließenden PCR nur Fragmente amplifiziert werden, die das 3'-Ende enthalten.

Der Ligationsansatz (5 µl cDNA, je 0,4 µl der Adaptoren A und C bzw. T und G (je 5 µM); 1 µl Ligase-Puffer (10 x); 0,5 µl T4-Ligase (400 U/µl)) wurde mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und inkubiert über Nacht bei 16°C.

- Um die optimale Template-Menge für die SDD-PCR zu bestimmen und um eine Vorstellung von der Größe der generierten cDNA-Fragmente zu gewinnen, wurden in einer Kontroll-PCR unterschiedliche cDNA-Mengen (1; 2; 4 und 10 µl Template) maximal (d.h. 40 Zyklen) amplifiziert.

Die Amplifikation erfolgte nach dem Prinzip der Suppressions-PCR, d.h. nur „erwünschte“ 3'-cDNA-Fragmente wurden amplifiziert. Der 50 µl-PCR-Ansatz bestand bei 2 µl cDNA zusätzlich aus 0,75 µl Adaptorprimer ANK (20 µM); 0,75 µl A1 „äußerer“ Primer NA10 (20 µM); 5 µl PCR-Puffer (10 x); 5 µl dNTP (2 mM); 36,1 µl dH<sub>2</sub>O und 0,4 µl Expand-Polymerase (Roche, Mannheim, 3,5 U/µl).

Das Amplifikationsprogramm:

- 1 Zyklus                    95°C, 5 min.
- 85°C    Zugabe des Enzyms („hot-start“ PCR)
- 40 Zyklen                94°C, 30 s    75°C, 1 s        66°C, 30 s    72°C, 1min. 30s
- 1 Zyklus                72°C, 10 min.
- 1 Zyklus                4°C, ∞

Es wurde eine sogenannte „Touchdown“-PCR durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen.

- Für die cDNA-Präamplifikation wurden die Ligationsansätze (je 1 µl, entspricht den im vorherigen Schritt ermittelten optimalen cDNA-Mengen) vereinigt und mit dem bereits beschriebenen Amplifikationsprogramm amplifiziert. Die Zyklenzahl beschränkte sich dabei allerdings auf 19. Der 50 µl-PCR-Ansatz bestand zusätzlich zu den 2 µl Template (als Ergebnis der Kontroll-PCR) aus 0,5 µl ANK Adaptorprimer (20 µM); 0,5 µl NA10 A1 „äußerer“ Primer (20 µM); 5 µl PCR-Puffer (10 x); 5 µl dNTP (2 mM); 36,6 µl H<sub>2</sub>O; 0,4 µl Expand-Polymerase (3,5 U/µl).

• Die präamplifizierte cDNA wurde für die SDD 1:10 verdünnt und in folgendem 20 µl-PCR-Ansatz verwendet: 1 µl Template; 1 µl 3'-DPT11-Primer (20 µM; Sequenzen s. 9.1.2); 2 µl 5'-A1-DP-Primer (8 µM); 2 µl dNTP (200 µM); 2 µl-PCR-Puffer (10 x); 10,9 µl dH<sub>2</sub>O und 1 µl displayTAQ<sup>TM</sup>FL DNA-Polymerase (5 U/µl; Display Systems Biotech, Vista, CA, USA).

Das Amplifikationsprogramm:

- 1 Zyklus                    95°C, 5 min.
- 85°C Zugabe des Enzyms („hot-start“ PCR)
- 40 Zyklen                94°C, 30 s    70°C, 1 s    62°C, 30 s    72°C, 1min. 30s
- 1 Zyklus                72°C, 10 min.
- 1 Zyklus                4°C, ∞

2 µl des PCR-Produktes wurden mit 5 µl Auftragspuffer (100% deionisiertes Formamid, 5 mg/ml Dextranblau 2000; Amersham Pharmacia Biotech, USA) vermengt und bei 95°C denaturiert. Davon wurden 5 µl auf ein denaturierendes 8%iges Polayacrylamid (PAA)-Gel aufgetragen und 3 Std. 15 min. auf dem ALFwin<sup>TM</sup> Sequence Analyser 2.00 (Amersham Pharmacia Biotech, USA) bei 800 Volt, 60 mA, 25 Watt und 55°C elektrophoretisch aufgetrennt. Das PAA-Gel wurde auf der hydrophilen Seite einer PA-GelBond<sup>®</sup> PAG – Folie (BMA, Rockland, ME, USA) gegossen, um es für die anschließende Silberfärbung zu fixieren.

### 2.12.1 Visualisierung von cDNA durch Silberfärbung

Für die Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurde folgendes Protokoll der Firma ETC Elektrophorese-Technik (Kirchentellinsfurt) verwendet:

- Fixierung                30 min.            10% Essigsäure
- Waschen:                3 x 5min.        aqua. bidest., 50°C
- Färben:                30 min.            0,1% AgNO<sub>3</sub> und 0,037% Formaldehyd
- Spülen:                20 s.                aqua bidest.
- Entwickeln:            4-6 min.            2,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,037% Formaldehyd;  
0,002% Glycine
- Stop:                    20 min.            2% Glycine; 0,5% EDTA-DiNatrium
- Imprägnieren:        10 min.            5% Glycerol

### 2.12.2 Eluierung der DNA aus dem Silbergel

Für die Eluierung der DNA aus dem Gel zwecks darauffolgender Reamplifikation wurden verschiedene Methoden angewendet:

1. Die Eluierung und Reamplifikation erfolgten direkt, indem eine Pipettenspitze erst in die zu amplifizierende Bande im Gel gestochen und anschließend in den PCR-Mastermix getaucht wurde.

2. Gemäß einem Protokoll nach Bockelmann et al. (1999) wurde die DNA aus dem feuchten Silbergel eluiert. Die DNA aus der ausgeschnittenen Bande wurde in 300 µl 0,5 M Ammoniumacetat/ 1 mM EDTA (pH 8) über Nacht bei 37°C und 400 rpm gelöst. Nach Zentrifugation wurde der Überstand filtriert (0,45 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel), um übriggebliebene Polyacrylamidpartikel zu entfernen. Die DNA wurde präzipitiert, in 100 µl Tris/EDTA Puffer (pH 7,5) mit 10% Natriumacetat gelöst und erneut präzipitiert. Das resultierende DNA-Pellet wurde in 10 µl dH<sub>2</sub>O gelöst.

3. Aus einem getrockneten Silbergel wurde mit Hilfe eines Skalpell die gewünschte Bande ausgeschnitten, in ein 0,5 ml Reagiergefäß überführt und mit 50 µl 0,5 x Tricine-Puffer (10 mM Tricine (pH 9,5), 0,2 mM EDTA) versetzt. Das Gelstück wurde dabei mit der Pipettenspitze zerkleinert und das Gemisch für 10 min. bei 100°C gekocht. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Gemisch 5 min. zentrifugiert. Der Überstand enthielt die eluierte DNA.

### 2.12.3 Reamplifikation der aus dem Silbergel eluierten DNA

Die Reamplifikation (40 Zyklen; Amplifikationsprogramm: s. SDD S. 33) erfolgte mit den in der ursprünglichen SDD-PCR verwendeten Primern. Der 50 µl-Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 5 µl DNA, je 1,25 µl spezifische Primer (20 µM), 5 µl Puffer (10 x), 5 µl dNTP (2 mM), 32,1 µl H<sub>2</sub>O (bzw. 37,1 µl bei direkter Amplifikation aus PAA-Gel s. 2.12.2.1) und 0,4 µl *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, 5 U/µl). Für eine eventuell anschließende Klonierung war es sinnvoll, an dieser Stelle die Reamplifikation mit Hilfe der *Taq*-Polymerase durchzuführen, da diese einen A'-Überhang generiert, der die Ligation in einen TA-TOPO-Vektor ermöglicht.

## 2.13 Klonierung, Kolonie-PCR und Sequenzierung von reamplifizierten PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Zur Klonierung wurde der pCR2.1 TOPO -Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) und für die Transformation kompetente TOP10-*E.coli*-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) gemäß Herstellerangaben verwendet. Der verwendete Vektor erlaubt aufgrund des *lacZ*-Genes eine Selektion von Klonen mit Insert (weiß) und Klonen ohne Insert (blau). Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte auf LB-Platten mit 100 mg/l Ampicillin (Sigma-ARK, Steinheim). Weiße Klone wurden mittels Kolonie-PCR daraufhin untersucht, ob das Fragment der gewünschten Größe in dem Vektor enthalten war. Positive Klone wurden in je 4 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Unter Verwendung des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) wurde aus den Kulturen die Plasmid-DNA isoliert. Die Sequenzierung wurde gemäß Herstellerangaben mit dem SequiTherm EXCEL<sup>™</sup> DNA Sequencing Kit (Epicentre Technologies, Madison, USA) durchgeführt. Die Detektion der Fragmente erfolgte fluorimetrisch im ALFwin<sup>™</sup> Sequence Analyser 2.00 unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen.

## 2.14 Datenbankrecherche

Die Analyse von Sequenzen erfolgte mit dem BLAST Search von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die für die Synthetisierung von genspezifischen Primern benötigten mRNA-Sequenzen stammten ebenfalls von NCBI.

Die in dieser Arbeit verwendeten Genbezeichnungen beziehen sich auf die „Human Gene Nomenclature“ (<http://www.gene.ucl.ac.uk/cgi-bin/nomenclature/searchgenes.pl>).

Für die Vorhersage von Signalsequenzen und Transmembrandomänen in Aminosäuresequenzen wurden die Datenbanken SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) und TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) des „Center for Biological Sequences“ (University of Denmark, Kopenhagen) verwendet.

Potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen in Promotorbereichen wurden mit Hilfe der „TRANSFAC“-Datenbank (<http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch/matsearch.pl>) erfasst.

## 2.15 Microarray

Die Microarray-Analyse stellt wie die SDD eine Methode zum Nachweis differentieller Genexpression dar.

Ein Microarray besteht aus kleinen Mengen Nukleinsäuren (hier als *target* bezeichnet), normalerweise cDNA oder Oligonukleotide, die in einem regelmäßigen Muster auf einem Träger (Glas oder Nylon) aufgebracht und fixiert werden. Bei der vergleichenden Microarray-Analyse werden die Microarrays mit zwei cDNA-Proben hybridisiert, die bezüglich ihrer differentiellen Genexpression untersucht werden sollen und die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Mithilfe von Computerprogrammen lassen sich nach erfolgter Hybridisierung die durch die Farbstoffe emittierten Lichtsignale einem Expressionsmuster zuordnen.

### 2.15.1 Herstellung der Microarrays

Es wurden entzündungsspezifische Microarrays verwendet, die im Rahmen des Teilprojekts Z1 des SFB 415 („Mucosa Research“) der Uniklinik Kiel in Zusammenarbeit mit der Firma Scienion (Berlin) entwickelt und hergestellt wurden. Zur Herstellung der cDNA-Microarrays wurden mittels Blast-basierten Algorithmen genspezifische Sequenzen ausgewählt (Scienion, Berlin), die mittels spezifischer Primer (Metabion, Berlin) amplifiziert und auf einen superaminbeschichteten Träger (Telechem, England) aufgedruckt wurden. Die Qualitätsüberprüfung der eingesetzten PCR-Produkte erfolgte durch Längenkontrolle auf einem Agarosegel sowie durch massenspektrometrisches Sequenzieren von 3-4 Basen an beiden Enden der PCR-Produkte (Scienion, Berlin). Die verwendeten PCR-Produkte hatten eine Länge zwischen 200 und 300 bp.

Auf dem Array „Entzündung und Infektion“ sind 376 bekannte Gene jeweils im Duplikat repräsentiert (Auflistung der gebundenen Gene s. Anhang). Auf den Array aufgebracht/gebundene Sequenzen werden in dieser Arbeit als *target* definiert.

### 2.15.2 Reverse Transkription und Markierungsreaktion der RNA

Pro Microarray wurden jeweils 2 Proben von je 20 µg Gesamt-RNA markiert (20 µg RNA für die Cy3-Markierung und 20 µg für die Cy5-Markierung). Im ersten Schritt der Markierungsreaktion wurden zu 8 µl RNA-Probe (2,5 µg/µl) 2 µl eines sog. „Spot-Report 10-Mix“ (Stratagene, La Jolla, CA, USA), 1 µl nonamere Zufallsprimer (1 µg/µl, Amersham Pharmacia, Freiburg) und 1 µl Oligo dT-Primer (1 µg/µl, Amersham Pharmacia) zugegeben und durch Pipettieren leicht gemischt. Der „Spot-Report 10-Mix“ besteht aus 10 verschiedenen *A. thaliana*-PCR-Produkten (je 5 pg/µl). Diese PCR-Produkte stellen für die Normalisierung der nach der Hybridisierung ermittelten Fluoreszenzintensitäten wichtige externe Kontrollen dar. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst für 5 min. bei 70°C denaturiert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Gemisch für die folgenden Arbeitsschritte auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 4 µl 5 x CyScript Buffer (Amersham Pharmacia, Freiburg), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dUTP Nukleotidgemisch (Amersham Pharmacia, Freiburg), 1 µl dUTP CyDye-markiertes Nukleotid (Amersham Pharmacia, Freiburg), und 1 µl CyScript Reverser Transkriptase (100 U/µl, Amersham Pharmacia, Freiburg) wurde die Reaktion für 30 s gemischt und anschließend für 1,5 Std. bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 2,5 M NaOH gestoppt, für 15 min. bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 10 µl 2 M HEPES neutralisiert. Eine Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide sowie von RNA-Fragmenten erfolgte mit Qiagen Mini-Elute nach Angaben des Herstellers (Endvolumen 10 µl).

### 2.15.3 Hybridisierung der Microarrays

Nach Vereinigung der beiden Markierungsreaktionen (Cy3 und Cy5, Endvolumen 20 µl) wurden 20 µl Hybridisierungspuffer (Amersham Pharmacia, Freiburg) und 40 µl Formamid zugegeben. Diese Hybridisierungsmischung wurde auf den Microarray aufgebracht und mittels eines Hybridisierungsrahmens abgedichtet (Scienion, Berlin). Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 16 Std. unter Lichtausschluss. Nach Ende der Hybridisierung wurde der Microarray zunächst 1 min unter leichtem Schwenken mit einer 1 x SSC; 0,03 % SDS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde der Microarray 1 min in einer 0,2 x SSC-Lösung und 1 min. mit einer 0,05 x SSC-Lösung gewaschen. Zum Trocknen wurde der Microarray kurz mit ölfreier Druckluft abgesprüht.

#### 2.15.4 Auswertung der Microarrays

Das Auslesen der Signalintensitäten erfolgte mit einem GeneTAC LS IV Laserscanner (Genomic Solutions Inc., Ann Arbor, MI, USA), wobei die Intensität des Lasers für jeden Kanal einzeln justiert wurde, um eine maximale dynamische Bandbreite (von Hintergrund bis Sättigung) zu erreichen. Um die Bilddaten in Absolutwerte zu übertragen, wurde das Computerprogramm AIDA Array Matrix (Raytest, Straubenhardt) eingesetzt. Die Normalisierung erfolgte anhand der externen Kontrollen und mittels nicht-linearer Kurvenanpassung (Lu et al., Publikation im Druck). Die anschließende Auswertung wurde mit dem Computerprogramm „Spotfire For Functional Genomics 7.1“ durchgeführt.

#### 2.16 Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)

Die Suppressive Subtraktive Hybridisierung ist, wie die SDD-PCR, eine Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter cDNAs. Das Prinzip der SSH beruht darauf, dass zwei Proben miteinander verglichen werden, indem ihre mRNAs in Form von cDNA miteinander hybridisiert werden. Dabei übrigbleibende nicht-hybridisierte cDNAs repräsentieren differentiell exprimierte Gene, die nur in einer der beiden Proben vorkommen. Die Subtraktive Hybridisierung wurde mit Hilfe des „PCR-Select Differential Screening Kit“ (Clontech, Heidelberg) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente hier Gesamt-RNA aus HaCaT-Zellen, die nach dem Protokoll des StrataPrep® Total RNA Miniprep Kits (Stratagene, La Jolla, CA, USA) präpariert wurde. Die cDNA-Synthese erfolgte anhand des Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Heidelberg). Als *tester* diente RNA aus mit *P. aeruginosa* - Kulturüberstand inkubierten HaCaT-Zellen (PA), die mit der *driver* RNA aus unstimulierten HaCaT-Zellen (LW) in Bezug auf differentielle Genexpression verglichen werden sollte. Sowohl die *tester* als auch die *driver* cDNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Rsa* I geschnitten, um Fragmentpopulationen mittlerer Größe zu erhalten. In getrennten Ansätzen wurden zwei verschiedene Adaptoren an die *tester* cDNA ligiert (s. Abb. 3, 1). Die ligierten *tester* cDNAs wurden denaturiert und in 2 Ansätzen jeweils mit einem Überschuss an *driver* cDNA hybridisiert. Hierbei kommt es zu einer Anreicherung differentiell exprimierter Sequenzen, da nicht differentiell exprimierte Sequenzen an entsprechende *driver*-Sequenzen binden und Typ C-Moleküle bilden (s. Abb. 3, 2).

Diese beiden ersten Hybridisierungsansätze wurden für eine 2. Hybridisierung vermengt und erneut mit einem Überschuß an denaturierter *driver* cDNA versetzt. Dadurch konnten weitere Sequenzen, die in beiden cDNA-Populationen vorkommen, weggebunden werden. Übrigbleibende komplementäre Einzelstränge, die an den Enden verschiedene Adaptoren aufwiesen, stellten differentiell exprimierte cDNAs dar. Diese wurden in einer finalen PCR angereichert und repräsentierten somit die „subtrahierte cDNA Bibliothek“ (s. Abb. 3, 3). Die amplifizierten PCR-Fragmente hatten eine Größe zwischen 100 und 1000 bp. Als Kontrolle im Rahmen der Subtraktion wird nicht nur eine *Forward-Subtraction* (*tester* minus *driver*, Probenbezeichnung: PA), sondern auch eine *Reverse-Subtraction* (*driver* minus *tester*, Probenbezeichnung LW) durchgeführt.

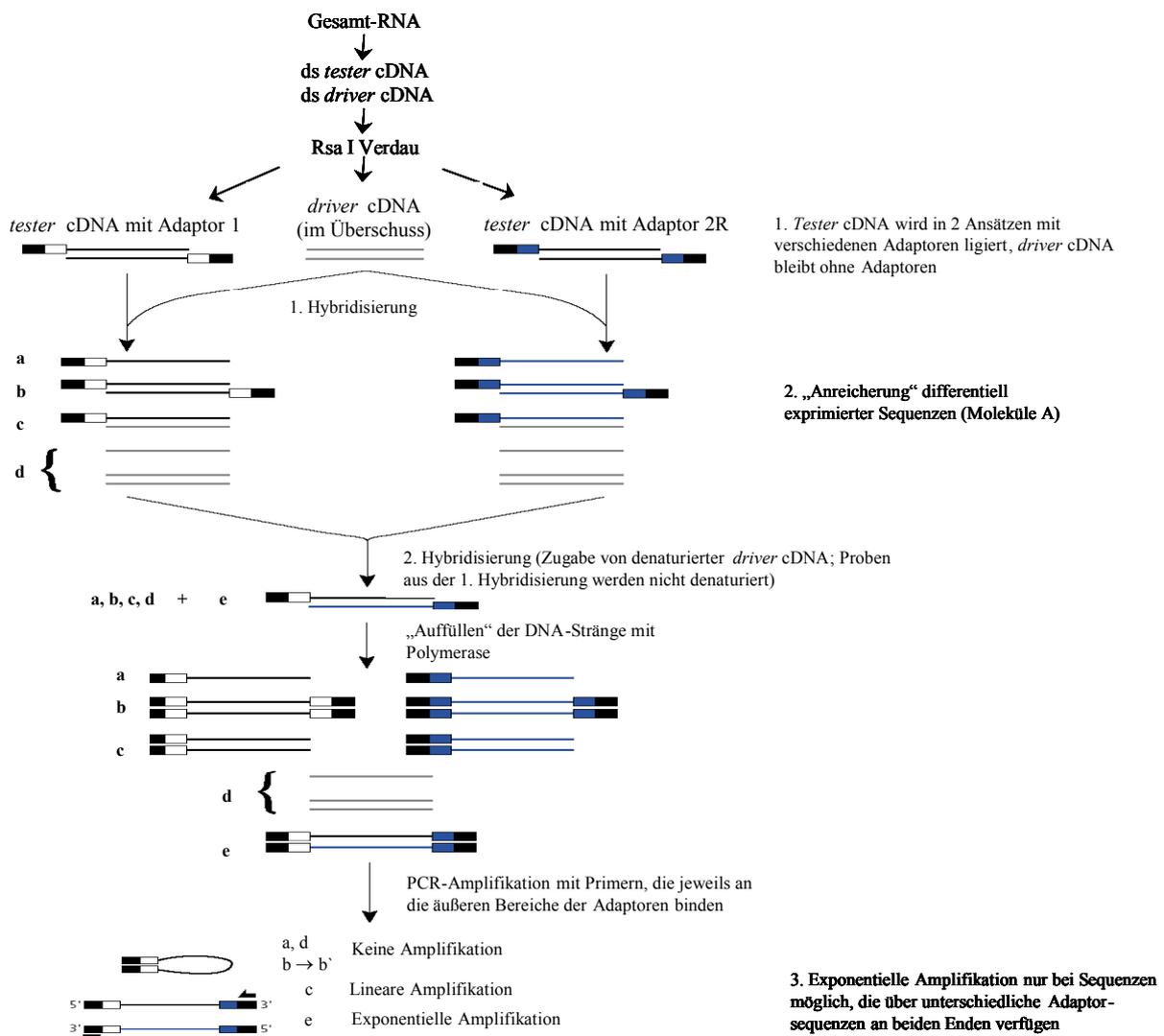


Abb. 3 Prinzip der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (nach Diatchenko et al., 1996).

### 2.16.1 Ligation und Transformation

Für das Durchsuchen („Screening“) der „subtrahierten cDNA Bibliothek“ und die Verifizierung der differentiell regulierten Gene wurden 3 µl der *forward-subtracted* Bibliothek gemäß Herstellerangaben in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) ligiert und in TOP10F<sup>+</sup> *E.coli* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert. Auf je zwei Q-Tray (20 x 20cm) Platten mit LB- Ampicillin-Medium wurden die Transformanden ausgestrichen. Das Anwachsen auf den Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 2.16.2 Überführen von Klonen in Mikrotiterplatten (*Picking*)

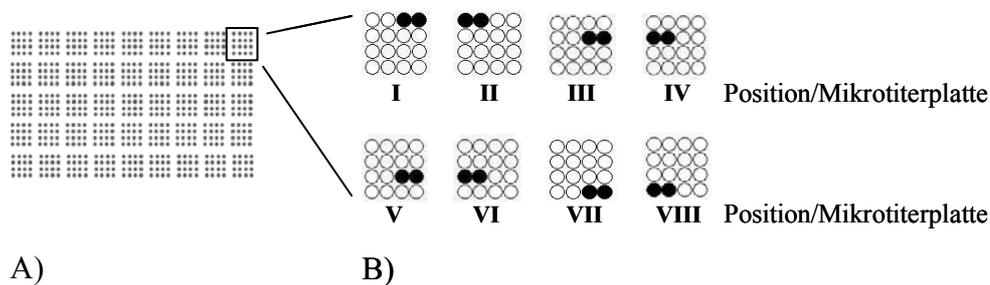
Für das Auflesen und Überführen (*Picking*) der Kolonien von einer Q-Tray-Platte in eine 384er Mikrotiterplatte wurde der Q Pix-Pickroboter (Genetix, Hampshire, UK) verwendet. Die Mikrotiterplatte wurde vor dem Animpfen mit je 50 µl LB-„Freezing“-Medium pro Well befüllt. Es wurden insgesamt 2304 Klone gepickt und in sechs 384er Mikrotiterplatten (Plattenbezeichnung II-VII) überführt. Die Platten wurden nach dem Picking bei 37°C über Nacht inkubiert und konnten anschließend bei –70°C gelagert werden.

Als Positivkontrolle für die folgende Hybridisierung wurde ein hBD-2-Plasmid (hBD-2-ex NcoI/ ex-XhoI) aus einer bestehenden Glycerinkultur in LB-Ampicillin-Medium abgeimpft und über Nacht kultiviert. Die Kultur wurde 1:4 mit LB-Medium verdünnt und zu je 50 µl auf eine 384er Mikrotiterplatte verteilt (Plattenbezeichnung I). Nach Aufzucht der Klone über Nacht wurde die Platte bei –70°C gelagert.

## 2.17 Makroarray

### 2.17.1 Rastern der Klone (*Gridding*)

Bakterien der Klone aus den Mikrotiterplatten wurden mit dem QPix auf eine Nylon-Filter-Membran (HybondN, Amersham Biosciences, UK) übertragen. Die Bakterien-Proben wurden in einem 4 x 4 Raster auf den Membranen abgelegt (Makroarray). Zur genauen Identifikation wurde jede Bakterien-Probe zweimal abgelegt (s. Abb. 4).



**Abb. 4 Spottingmuster.** Die Nylonmembran hat eine Größe von ca. 20 x 20 cm. Die Klone wurden in 16 x 24 Quadraten ((A) zeigt einen Ausschnitt) in einem 4 x 4 Muster abgelegt. In jedem Feld wurden die Klone der insgesamt 7 Mikrotiterplatten nach der wie in B gezeigten Anordnung abgelegt. Position I gibt jeweils die Lage der Positivkontrolle an. An den Positionen II bis VII wurden die Klone der subtrahierten cDNA Bibliothek abgelegt. Position VIII blieb leer.

Die angeimpfte Membran wurde über Nacht auf einer LB-Agar-Platte (mit 50 µg/ml Ampicillin) bei 37°C inkubiert. Nach Abnahme der Filtermembran von der Platte wurde die DNA alkalisch lysiert und fixiert. Dazu wurde die Membran auf Whatmanpapier gelegt und für 5 min. mit Denaturierungslösung, 10 min. mit Neutralisierungslösung und weitere 10 min. mit 2 x SSC inkubiert. Nach Lufttrocknen der Membranen wurden diese bei 80°C für 1 Std. gebacken und luftdicht in Folie eingeschweißt. Die Größe eines solchen Filters betrug ca. 12 x 8 cm. Insgesamt wurden auf diese Art 2 Filter hergestellt.

### 2.17.2 Hybridisierung der Makroarrays mit <sup>32</sup>P-markierten Sonden

Die Hybridisierung der beiden Membranen erfolgte gemäß den Angaben nach Sambrook und Russell (2001) für Hybridisierungen unter Verwendung von Formamid-haltigem Puffer bei 42°C. Vor der eigentlichen Hybridisierung erfolgte eine 24-stündige Prähybridisierung. Als Sonden für die Hybridisierung wurden die PCR-Produkte der *Forward*-(PA) und *Reverse*-

*Subtraction* (LW) verwendet. Als Positivkontrolle wurde das Gen hBD-2 mit den Primern hBD-2 ex NcoI und hBD-2 ex-XhoI amplifiziert und das PCR-Produkt als Sonde verwendet. Jeweils 80 ng der cDNA (bzw. 40 ng der Positivkontrolle) wurden mit TE-Puffer auf 45 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und für 5 min. bei 94°C auf dem ThermoCycler erhitzt. Zur Markierung wurden die Sonden mit je einem *labelling bead* (*HotScribe*<sup>TM</sup> First Strand cDNA Labelling Kit, Amersham Biosciences, Freiburg) und 5 µl [ $\alpha$ <sup>32</sup>P] dCTP (Amersham Biosciences) bei 37°C 15 min. inkubiert. Vor der Aufreinigung der Sonden mittels einer Polymermatrix (Sephadex) wurde je 1 µl der Probe für eine Cerenkov-Messung abgenommen ( $\alpha$ -Probe). Die Sonde wurde zusammen mit 45 µl TE-Puffer auf eine Sephadex G-50 Säule (Amersham Biosciences) in einer 1,0 ml Spritze gegeben und bei 1500 rpm für 2 min. zentrifugiert. Von dem Durchfluß wurden ebenfalls je 1 µl für eine „Cerenkov“-Messung mit dem Gerät Wallac WinSpectral abgenommen ( $\omega$ -Probe). Die Messung diente zur Bestimmung der Aktivität der Probe, d.h., ob ausreichend radioaktiv markiertes Nukleotid in die Sonden-DNA eingebaut wurde. Je ca. 60 µl des Durchflusses der Sonden PA und LW wurden zu dem 5 ml-Hybridisierungsansatz gegeben, womit die Gesamtaktivität dieser Sonden bei jeweils ca. 2.000.000 Counts/min. pro Hybridisierungsansatz lag. Von der hBD-2-Positivkontrolle wurde zu beiden Hybridisierungsansätzen jeweils eine Gesamtaktivität von 50.000 Counts/min. gegeben, so dass im Verhältnis zu den Sonden PA und LW die Positivkontrolle 1:40 verdünnt in dem Hybridisierungsansatz vorlag. Nach dem Waschen der Membran für zweimal 10 min. mit 2 x SSC / 0,1% SDS bei 42°C und für zweimal 20 min. mit 0,2 x SSC/0,1% SDS bei 60 °C wurde der Filter eingeschweißt.

### 2.17.3 Auswertung der Makroarrays und Sequenzanalyse

Zur Auswertung wurden die hybridisierten Filter für 16 bis 24 Std. auf Phosphor-Imager-Platten aufgelegt und konnten anschließend am Phosphor-Imager (FLA3000, Fuji) ausgewertet werden. Für eine vergleichende Analyse des Kontrollfilters mit dem Probenfilter wurden die Programme Aida Image Analyzer und Aida Image Compare (Fa. Raytest) genutzt. Nach der Identifizierung von positiven Klonen auf den Makroarrays wurden die entsprechenden Klone aus der cDNA Bibliothek in 3 ml LBamp-Medium abgeimpft, über Nacht kultiviert und die Plasmid-DNA anschließend präpariert (s. 2.13). Die Größe des jeweiligen Inserts wurde mittels Kolonie-PCR überprüft und die Insert-Sequenz durch Sequenzierung bestimmt (s. 2.13).

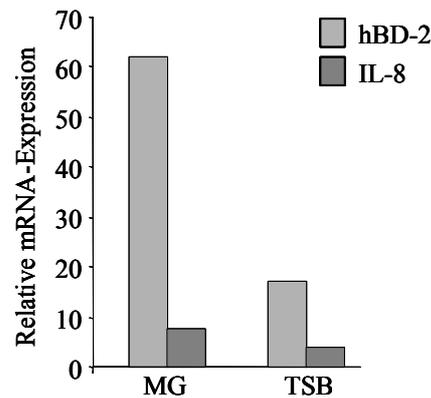
### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, über die Identifizierung differentiell exprimierter Gene in Hautkeratinozyten nach Kontakt mit mikrobiellen Kulturüberständen Hinweise auf Abwehrstrategien der Haut gegenüber Mikroorganismen zu gewinnen. Für die Untersuchung der mikrobiell induzierten Genexpression wurden drei verschiedene Techniken, die Systematische Differential Display (SDD)-PCR, die Hybridisierung von Microarrays und die Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH) angewendet.

#### 3.1 Die mikrobiell induzierte Genexpression ist abhängig von den Kultivierungsbedingungen der Mikroorganismen

Eine grundlegende Frage zu Beginn der Untersuchungen war es, Kultivierungsbedingungen für Mikroorganismen zu definieren, die zu einer mikrobiellen Expression und Freisetzung von möglichen Induktoren der epithelialen Abwehr in Hautkeratinozyten führten. Als Indikator für eine Abwehrreaktion diente dabei die veränderte Expression von humanem  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2)- bzw. Interleukin 8 (IL-8) in Keratinozyten nach Kontakt mit mikrobiellen Kulturüberständen. HBD-2 ist ein induzierbares antimikrobielles Protein und Bestandteil des angeborenen Immunsystems, während IL-8 als proinflammatorisches Zytokin einen Entzündungsmediator darstellt.

Während einer 24-stündigen Kultivierung des Gram-negativen Bakteriums *P. aeruginosa* (ATCC 33348) in einer nährstofflimitierten (MG)-Medium-Suspensionskultur kommt es zur Freisetzung von hBD-2- und IL-8-induzierenden Faktoren. Wie Abb. 5 zeigt, wird durch die MG-Suspensionskulturüberstände im Vergleich zu *P. aeruginosa*-Kulturüberständen, die in nährstoffreichen TSB-Medium (s. 2.2) kultiviert worden waren, die hBD-2- und IL-8-mRNA-Expression in Hautkeratinozyten stärker induziert.



**Abb. 5 Induktion der hBD-2- und IL-8-mRNA Expression in HaCaT-Keratinozyten durch *P. aeruginosa*-Überstände aus Suspensionskulturen.** HaCaT-Keratinozyten wurden für 6 Std. mit jeweils 10  $\mu$ l/ml der Kulturüberstände (ATCC 33348) inkubiert und die hBD-2- und IL-8-mRNA-Expression mittels „Real-Time“-PCR bestimmt. *P. aeruginosa* wurde als Suspension in MG- bzw. TSB-Medium kultiviert. Das dargestellte Ergebnis ist das typische Resultat von vier unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen.<sup>1,2</sup>

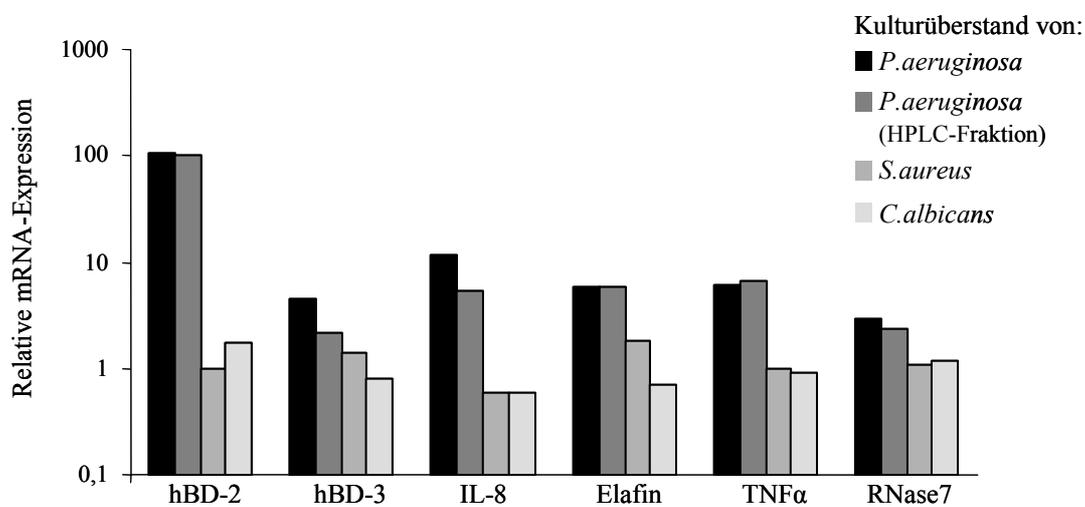
Da bei den SDD-Analysen der Einfluss von drei verschiedenen Mikroorganismen auf Hautkeratinozyten verglichen werden sollte, wurde untersucht, ob auch für die Hefe *C. albicans* und das Gram-positive Bakterium *S. aureus* Kultivierungsbedingungen identifiziert werden können, die zu einer erhöhten Freisetzung hBD-2- und IL-8-induzierender Faktoren führen. Für *C. albicans* (ATCC 10231) und das klinische Isolat 241 von *S. aureus* konnten jedoch in verschiedenen Versuchsansätzen keine Kultivierungsbedingungen definiert werden, die die Genexpression der Mikroorganismen dahingehend veränderten, dass eine Induktion von hBD-2 und IL-8 in Hautkeratinozyten erfolgte. Derartige Versuchsansätze beinhalteten Untersuchungen zum Einfluss einer Änderung des pH-Wertes, Zugabe von Antibiotika oder Sauerstoff-Entzug im Kulturmedium (Daten nicht gezeigt).

1 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 weiteren untersuchten Genen. Die relative mRNA Expression bezieht sich dabei stets auf den entsprechenden unstimulierten Kontrollansatz.

2 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.

Für die SDD-Analysen wurden *C. albicans* und *S. aureus* deshalb in MG-Medium wie unter 2.8.1 beschrieben kultiviert. Als zusätzlicher Stimulus bei der SDD-Analyse diente eine Fraktion eines über eine MiniQ-Säule (s. 2.9.2) aufgereinigten *P. aeruginosa* –Überstandes (ATCC 33348; in MG-Medium als Suspension kultiviert), die nach 23 min. bei einem Salzgehalt von 300 mM NaCl eluiert worden war.

Für die Durchführung der SDD wurden primäre Keratinozyten mit den beschriebenen Kulturüberständen von *P. aeruginosa* (bzw. der HPLC-Fraktion), *S. aureus* und *C. albicans* inkubiert und anschließend die isolierte RNA auf die Expression definierter Gene hin überprüft (Abb. 6).

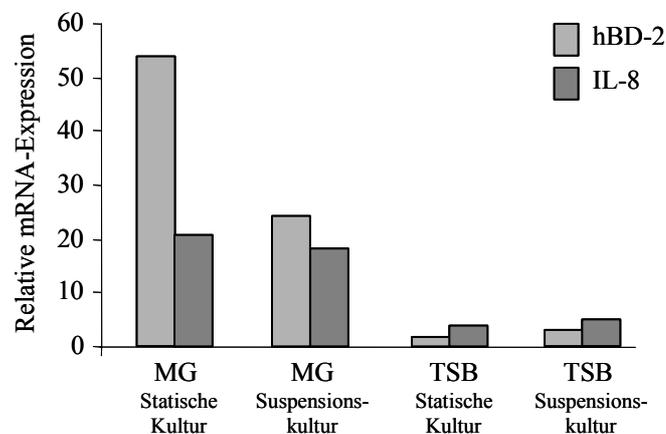


**Abb. 6 Relative mRNA-Expression definierter Gene in Keratinozyten nach Inkubation mit Überständen verschiedener Mikroorganismen.** Primäre Keratinozyten wurden für 6 Std. mit Kulturüberständen von *P. aeruginosa* (ATCC 33348; 10  $\mu$ l/ml) bzw. einer HPLC-Fraktion (nach Anionenaustauschchromatographie) dieses Kulturüberstandes (30  $\mu$ l/ml) und mit Kulturüberständen von *S. aureus* (klin. Isolat 241; 100  $\mu$ l/ml) und *C. albicans* (ATCC 10231; 100  $\mu$ l/ml) inkubiert. Die Mikroorganismen stammten aus Suspensionskulturen (MG-Medium, s. Abschnitt 2.8.1). Die mRNA-Expression von hBD-2, hBD-3, IL-8, Elafin, TNF $\alpha$  und RNase7 wurde mittels „Real-Time“-PCR ermittelt und ist in logarithmierter Form dargestellt. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von 4 unabhängigen Versuchen dar.

Aus Abb. 6 geht hervor, dass eine Inkubation mit *P. aeruginosa*-Kulturüberständen in HaCaT-Keratinozyten eine Induktion von hBD-2 (max. 105-fach) und IL-8 (max. 12-fach) bewirkte. Eine Inkubation mit der HPLC-Fraktion führte ebenfalls zu einer Induktion dieser beiden Gene. Die antimikrobiell wirkenden Proteine hBD-3, Elafin und RNase7 wurden durch den *P. aeruginosa*-Überstand bzw. die entsprechende HPLC-Fraktion maximal 4,5-fach (hBD-3), 5,7-fach (Elafin) und 2,9-fach (RNase7) induziert. Das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  wurde sowohl durch den *P. aeruginosa*-Kulturüberstand als auch die HPLC-

Fraktion (6,7-fach) induziert. Durch Überstände von *S. aureus* und *C. albicans* wurden keine der genannten Gene in ihrer Expression beeinflusst.

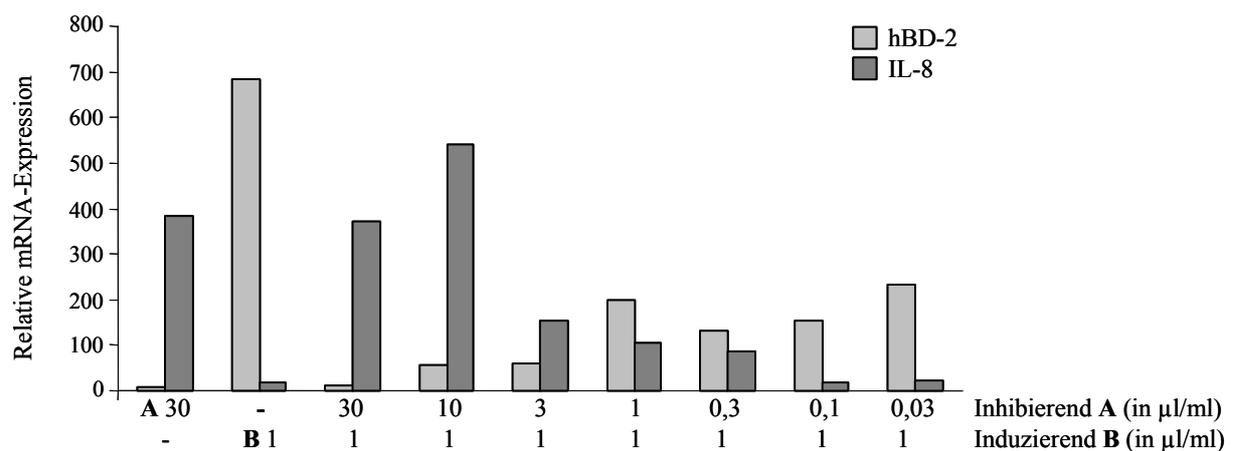
Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Kultivierungsbedingungen von *P. aeruginosa* dahingehend optimiert, einen Faktor von *P. aeruginosa* zu isolieren, der primär zu einer Induktion von hBD-2, aber nicht von IL-8 führt. Ein wichtiges Ergebnis der diesbezüglich durchgeführten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (siehe Dissertation Schwichtenberg, 2003) war, dass die Morphologie von *P. aeruginosa* von den Kulturbedingungen beeinflusst wird. Unterschiedliche Morphologien korrelierten dabei mit der Freisetzung von bakteriellen Faktoren, die eine unterschiedliche Induktion antimikrobieller Proteine wie hBD-2 und proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-8 in Keratinozyten verursachten. Überstände von mukoiden, adhärenen *P. aeruginosa*-Formen (s. Abb. 7), die sich in MG-Medium unter statischen Kulturbedingungen ausbilden, wiesen dabei die stärkste Induktion von hBD-2 (54-fach) und IL-8 (21-fach) auf. Sowohl in MG-Suspensions-, als auch in den TSB-Kulturen behielt *P. aeruginosa* eine nicht-mukoide Form bei. Verglichen mit der hBD-2- und IL-8-Induktion durch Kulturüberstände von *P. aeruginosa* aus MG-Suspensionskulturen (23-fach für hBD-2 und 18-fach für IL-8), bewirkten Überstände aus TSB-Suspensionskulturen nur eine geringe Induktion von hBD-2 (max. 2-fach) und IL-8 (max. 4-fach).



**Abb. 7 hBD-2 und IL-8-Induktion in HaCaT-Keratinozyten durch Überstände statischer Kulturen und Suspensionskulturen von *P. aeruginosa*:** HaCaT-Keratinozyten wurden für 6 Std. mit je 10 µl/ml der Kulturüberstände (ATCC 33348) inkubiert und die hBD-2- und IL-8-mRNA-Expression mittels „Real-Time“-PCR bestimmt. *P. aeruginosa* wurde in MG- und TSB-Medium als Suspensionskultur bzw. statische Kultur kultiviert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

Weitere Untersuchungen (Dissertation Schwichtenberg, 2003) hatten gezeigt, dass Kulturüberstände von *P. aeruginosa*, die keine hBD-2-Induktion in Keratinozyten bewirkten, nach Ansäuerung auf pH 3 und anschließender Neutralisierung die hBD-2-mRNA Expression

in Epithelzellen induzierten. Der daraus gezogene Schluss, dass in den Kulturüberständen einiger *P. aeruginosa*-Überstände ein säurelabiler Inhibitor vorhanden sein könnte, der eine Induktion von hBD-2 verhindert, wurde überprüft. In dem in Abb. 8 dargestellten Versuch wurden Überstände, für die keine hBD-2-Induktion in Inkubationsversuchen nachweisbar war (A), mit unterschiedlichen Konzentrationen von Überständen versetzt, die hBD-2- und IL-8-induzierende Faktoren enthielten (B). Eine Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden Überstand (A) allein bewirkte eine 5,8-fache hBD-2-Induktion gegenüber dem hBD-2-induzierenden Überstand (B), der hBD-2 680-fach induzierte. Durch Zugabe von 30  $\mu\text{l/ml}$  bzw. 10  $\mu\text{l/ml}$  des inhibierenden Überstandes zu dem induzierenden Überstand (je 1  $\mu\text{l}$ ) konnte die hBD-2-Induktion inhibiert werden, während die IL-8-Induktion auf maximal 540-fach anstieg. Eine minimale hBD-2-Induktion (11,3-fach) ergab sich bei einem Mischungsverhältnis von 30  $\mu\text{l}$  Überstand A zu 1  $\mu\text{l}$  von Überstand B. Eine weitere Dosisreduktion des inhibierenden Überstandes führte zu einer Steigerung der hBD-2-Expression.

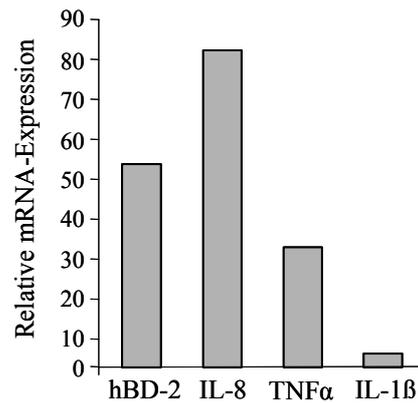


**Abb. 8 Inhibition der hBD-2-Induktion in Keratinozyten durch Kulturüberstände von *P. aeruginosa*.** Kulturen primärer Keratinozyten wurden für 6 Std. mit 30  $\mu\text{l/ml}$  eines Kulturüberstandes (A), der keine hBD-2-Induktion bewirkte, inkubiert bzw. mit 1  $\mu\text{l/ml}$  eines hBD-2-induzierenden Überstandes (B). Des weiteren wurden die Zellen mit Gemischen aus 1  $\mu\text{l/ml}$  Überstand B und verschiedenen Konzentrationen (30  $\mu\text{l/ml}$  – 0,03  $\mu\text{l/ml}$ ) des Überstandes A inkubiert. Überstand A stammte von *P. aeruginosa* ATCC 33358 Kulturen, Überstand B von *P. aeruginosa* ATCC 15442 Kulturen (jeweils MG-Medium; statische Bedingungen). Die relative hBD-2- und IL-8-mRNA-Expression wurde durch „Real-Time“-PCR bestimmt und ist exemplarisch für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche dargestellt.

Eine nähere Charakterisierung der hBD-2-induzierenden- und inhibierenden Faktoren dieser Überstände sollte mit Hilfe der Microarray-Analyse durchgeführt werden. Anhand dieser Methode wurde das Genexpressionsprofil von HaCaT-Keratinozyten, die mit einem hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Überstand inkubiert worden waren, mit dem

Genexpressionsmuster aus Zellen, die mit einem hBD-2-inhibierenden Überstand (30 µl/ml) inkubiert worden waren, verglichen. Durch Zusatz von 1 µl/ml hBD-2-induzierendem Überstand zu diesem Überstand enthielt der hBD-2-inhibierende Überstand auch hBD-2-induzierende Komponenten. Dieser Versuchsansatz sollte der Identifizierung von Genen dienen, deren Expression durch hBD-2-induzierende Überstandskomponenten induzierbar und durch hBD-2-inhibierende Überstandskomponenten reprimierbar ist.

In weiteren Untersuchungen zur näheren Charakterisierung hBD-2-induzierender und hBD-2-inhibierender Komponenten wurden *P. aeruginosa*-Überstände, die in Inkubationsexperimenten keine hBD-2-Induktion gezeigt hatten, in ihrem Rohzustand bzw. nach Ansäuerung auf pH 3 und anschließender Neutralisierung über eine Superdex 75-Säule (Größenausschlusschromatographie) aufgetrennt. Die Ansäuerung diente dabei der Ausfällung und Inaktivierung hBD-2-inhibierender Komponenten, wohingegen hBD-2-induzierende Faktoren aufgrund ihrer Säurestabilität erhalten blieben. Die hBD-2-induzierenden Fraktionen beider Überstände (Elutionszeit: 10-14 min.) wurden kombiniert und mit 0,5 µl/ml Rhamnolipid (Jeneil Biosurfactant) versetzt. Die Zugabe von Rhamnolipid erfolgte, da Rhamnolipid, ein von *P. aeruginosa* gebildeter Virulenzfaktor, die Induktion der hBD-2-Expression verstärkt (Dissertation Schwichtenberg, 2003). Inkubationen mit Rhamnolipid allein führten allerdings zu keiner hBD-2-Induktion (Dissertation Schwichtenberg, 2003). Mit diesem Gemisch inkubierte HaCaT-Keratinocyten wurden zur Untersuchung der differentiellen Genexpression mittels der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierungs (SSH)-Methode verwendet. Als Referenzprobe (*Driver*, s. 2.16 ) bei der SSH dienten Zellen, die nicht mit einem Stimulus inkubiert worden waren. Abb. 9 zeigt die relativen Expressionswerte einiger Gene in der *Tester* Probe (s. 2.16, PA), die anschließend für die SSH verwendet wurde. Die IL-8-Induktion lag mit 82-fach höher als die hBD-2-Induktion (53-fach). TNF $\alpha$  wurde 31-fach und IL-1 $\beta$  3,1-fach induziert.



**Abb. 9 Die Expression definierter Gene in der für die SSH verwendeten Probe.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 6 Std. mit Fraktionen (je 8  $\mu$ l/ml) von Superdex-75-Auftrennungen von hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen („Rohüberstand“ und angesäuertes Überstand) inkubiert. Insgesamt wurden 9 Fraktionen beider Auftrennungen kombiniert und mit 0,5  $\mu$ l/ml Rhamnolipid versetzt. Die relative mRNA-Expression von hBD-2, IL-8, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde mittels „Real-Time“-PCR ermittelt. Dargestellt ist exemplarisch das repräsentative Ergebnis von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

### 3.2 Optimierung der Systematischen Differential Display-PCR

Da die Methode der SDD in unserer Arbeitsgruppe erst etabliert werden sollte, waren im Vorfeld der Untersuchungen einige methodische Optimierungen notwendig.

Bezüglich der SDD-PCR wurden Voruntersuchungen zu der einzusetzenden cDNA-Menge, der optimalen Annealingtemperatur sowie zu den Konzentrationen weiterer PCR-Reagenzien wie Primer, dNTP und MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Ferner wurden verschiedene Polymerasen, darunter die HotStar-Polymerase (Qiagen) und die DisplayTaq-Polymerase (Display Systems Biotech, Vista, CA, USA) bezüglich ihrer Effizienz getestet.

Da Harnstoff u.U. einen inhibierenden Effekt auf eine anschließende PCR-Reaktion haben kann, wurde überprüft, ob eine Auftrennung der PCR-Produkte auch über ein nicht-denaturierendes PAA-Gel erfolgen kann. Um eine bestmögliche Auftrennung der PCR-Produkte zu erhalten, wurden unterschiedlich konzentrierte PAA-Gele (5-8% PAA) ausprobiert sowie bestimmt, welche Menge an PCR-Produkt mit welchem Auftragspuffer aufgetragen werden sollte. Um die Anzahl an Silberfärbungs-Experimenten möglichst gering zu halten, wurde die SDD-PCR-Analyse mit Fluoreszenz-markierten Primern durchgeführt, um so eine Detektion differentieller Banden nach erfolgter Elektrophorese am Bildschirm durchzuführen. Dabei als differentiell identifizierte Banden ließen sich allerdings bei einer

anschließenden Silberfärbung nicht an der gleichen Position im Gel wiederfinden. Für die Silberfärbung musste das Gel fixiert werden. Die Verwendung von Bindsilan (Merck, Darmstadt) zur Fixierung des PAA-Gels auf der Sequenzierglasplatte erwies sich allerdings als ungünstig, so dass das Gel wie unter 2.12 beschrieben auf der Glasplatte fixiert wurde.

Für die Silberfärbung der aufgetrennten Produkte wurden verschiedene Protokolle ausprobiert. Dazu gehörten zwei Protokolle der Firma ETC Elektrophorese-Technik, ein Protokoll nach Cairns und Murray (1994) sowie eines nach Bassam et al. (1991).

Zusätzlich zu den in 2.12.2 aufgeführten Methoden zur Eluierung der gefärbten DNA aus dem Gel wurde eine Rückgewinnung der DNA aus dem PAA-Gel mittels Elektroelution (Siembieda und Lakatua, 1998) getestet.

Für die Verifizierung einer differentiellen Genexpression wurde außerdem versucht, die reamplifizierten PCR-Produkte auf eine Nylonmembran zu binden und mit Dioxigenin-markierten (Roche, Mannheim) Produkten der SDD zu hybridisieren.

Als Resultat dieser Voruntersuchungen wurde die cDNA-Synthese mit der sich anschließenden SDD und Identifizierung differentiell exprimierter Gene wie unter 2.12 beschrieben durchgeführt.

### **3.3 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mit Hilfe der Systematischen Differential Display-PCR**

Insgesamt konnten 81 differentiell exprimiert erscheinende Fragmente aus den silbergefärbten SDD-Gelen ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert werden. Die Tabelle im Anhang (s. 9.2) stellt eine Auswahl an Fragmenten dar, die mindestens einmal sequenziert wurden. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der NCBI-Datenbank (s. 2.14) identifiziert. Anhand der Sequenzen und Datenbankinformationen wurden für jede Sequenz intron-überspannende Primer entwickelt, um in „Real-Time“-Experimenten (s. 2.10.3) die so identifizierten Gene bezüglich ihrer differentiellen Expression zu überprüfen. Diese Verifizierung wurde ausgehend von cDNA durchgeführt, die zwar unabhängig von den für die SDD verwendeten cDNAs, aber aus der gleichen RNA-Präparation synthetisiert worden war. Die Bestätigung der auf dem Silbergel sichtbaren differentiellen Genexpression mit Hilfe von „Real-Time“-PCR gelang bei einem Fragment von ca. 250 bp Größe (s. Abb. 10), das mit den Primern A1DP-TA und 3-DPT-CC (s. 9.1.2) amplifiziert worden war.



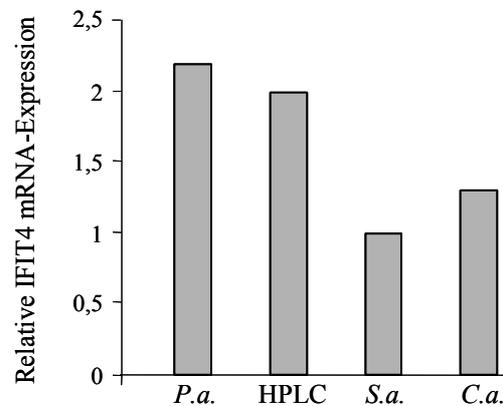
**Abb. 10** Ausschnitt aus einem silbergefärbten PAA-Gel mit elektrophoretisch aufgetrennten Produkten der Systematischen Differential Display-PCR-Analyse. Dargestellt sind RT-PCR-Produkte nach Amplifikation mit 4 verschiedenen 5'- und 3'- Primerkombinationen. Als *Template* diente Gesamt-RNA, die aus mit *P. aeruginosa*- (*P.a.*; ATCC 33348), bzw. seiner HPLC-Fraktion (*H*), *S. aureus*- (*S.a.*; klin. Isolat 241) und *C. albicans* (*C.a.*; ATCC 10231) – Kulturüberständen (aus MG-Suspensionskulturen) inkubierten sowie aus unstimulierten (LW) primären Keratinozyten isoliert worden war. Die differentiell erscheinende Bande, die das Gen IFIT4 repräsentiert, ist durch Pfeile markiert. Die SDD-PCR wurde in der Regel einmal pro *Template* und Primerkombination durchgeführt

Eine NCBI-Datenbankanalyse ergab, dass es sich bei dem Fragment um das Interferon-induced Protein 4 (IFIT4; NCBI Accession-No. NM\_001549) handelt.

### 3.3.1 Verifizierung und nähere Untersuchungen zur IFIT4-Genexpression in Keratinozyten

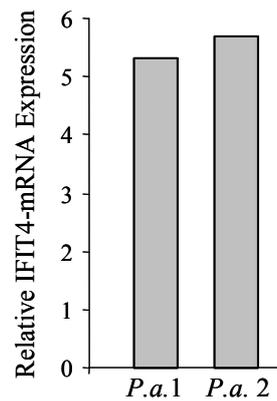
Für die Überprüfung der differentiellen Genexpression von IFIT4 wurden Primer entworfen, die nicht an weitere Mitglieder der IFIT- Gen-Familie (bestehend aus mindestens 4 Mitgliedern) binden. Die damit generierten PCR-Produkte wurden mittels Sequenzierung überprüft, um sicherzustellen, dass ausschließlich IFIT4 amplifiziert wurde. „Real-Time“-PCR-Experimente bestätigten die differentielle Expression von IFIT4 (Abb. 11). Durch die *P. aeruginosa*-Überstände wurde IFIT4 2,2-fach und durch die HPLC-Fraktion 2-fach

induziert. Eine Inkubation mit *S. aureus*-Überständen führte zu keiner Induktion von IFIT4 in primären Keratinozyten, bei einer Inkubation mit Überständen von *C. albicans* lag der Wert der IFIT4 mRNA-Expression bei 1,3-fach.



**Abb. 11 Verifizierung der IFIT4-Induktion in primären Keratinozyten.** Aus den für die SDD verwendeten mRNAs wurden in einem unabhängigen Ansatz cDNAs synthetisiert, die mittels „Real-Time“-PCR auf die mRNA-Expression von IFIT4 überprüft wurden. Dargestellt sind die quantitativen IFIT4 mRNA-Expressionswerte für die über 6 Std. mit Kulturüberständen (aus MG-Suspensionskulturen) von *P. aeruginosa* (ATCC 33348)-, *S. aureus* (klin. Isolat 241)- und *C. albicans* (ATCC 10231) und der *P. aeruginosa*-HPLC-Fraktion inkubierten primären Keratinozyten. Das Ergebnis ist charakteristisch für drei unabhängig voneinander durchgeführte PCR-Analysen.

Zur unabhängigen Überprüfung der IFIT4-Induktion durch *P. aeruginosa*-Überstände wurden HaCaT-Keratinozyten für 6 Std. mit dem oben verwendeten *P. aeruginosa*-Kulturüberstand inkubiert. Zusätzlich wurde ein *P. aeruginosa*-Kulturüberstand verwendet, der unter denselben Bedingungen kultiviert worden war aber aus einem unabhängigen Kultivierungsansatz stammte. Mit diesem Versuchsansatz sollte außerdem gezeigt werden, ob IFIT4 neben primären Keratinozyten auch in HaCaT-Keratinozyten induzierbar ist. Abb. 12 zeigt, dass eine Inkubation mit beiden Überständen zu einer über 5-fachen Induktion von IFIT4 in HaCaT-Keratinozyten führte.



**Abb. 12 Der Einfluss von *P. aeruginosa*-Kulturüberständen auf die IFIT4 mRNA-Expression.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 6 Std. mit Kulturüberständen von *P. aeruginosa* (ATCC 33348) inkubiert, die als Suspensionskultur in MG-Medium kultiviert worden waren. Bei Überstand *P.a. 1* handelt es sich um den für die SDD verwendeten-, bei *P.a. 2* um einen unter identischen Bedingungen, aber unabhängig generierten Überstand. Die eingesetzte Stimulusmenge betrug jeweils 10 µl/ml. Die IFIT4 mRNA-Expression wurde in 3 unabhängigen Versuchen mittels „Real-Time“-PCR ermittelt und ist hier exemplarisch dargestellt.

### 3.3.2 Die Regulation von IFIT4 durch mikrobielle Kulturüberstände

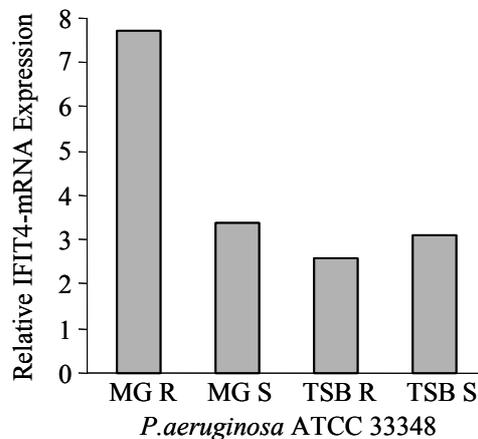
Da über die Funktionsweise von IFIT4 wenig bekannt ist und das Protein nicht direkt untersucht werden konnte, wurde im Folgenden die Genregulation von IFIT4 näher charakterisiert, um so Hinweise über mögliche Funktionsweisen von IFIT4 zu erhalten.

Die erste sich dabei stellende Frage war, ob die IFIT4-Genexpression von den für die Inkubationsexperimente verwendeten *P. aeruginosa*-ATCC-Stämmen und den für die Kultivierung gewählten Bedingungen abhängig ist. Dazu sollte untersucht werden, welchen Einfluss Überstände von mukoiden *P. aeruginosa*-Formen (MG-Medium, statische Bedingungen) auf die IFIT4-Induktion haben.

#### 3.3.2.1 Die Induktion von IFIT4 durch *P.aeruginosa* –Überstände ist abhängig von den Kultivierungsbedingungen und dem jeweiligen *P. aeruginosa*-ATCC-Stamm

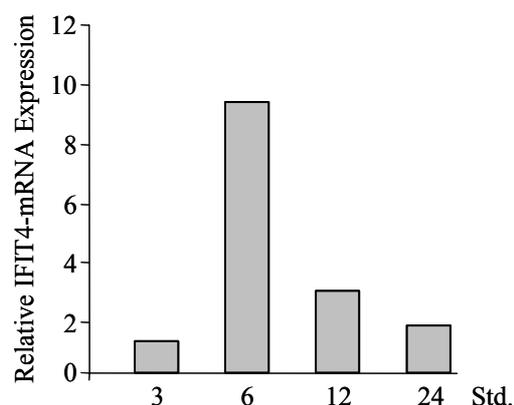
Abb. 13 zeigt, dass Kulturüberstände mukoider *P. aeruginosa* (MG-Medium, statische Bedingungen, MG R) IFIT4 in primären Keratinocyten fast doppelt so stark (7,8-fach) induzieren wie Überstände nicht-mukoider *P. aeruginosa*-Kulturen. Durch letztgenannte *P. aeruginosa*-Kulturüberstände wurde IFIT4 3,4-fach (MG S), 3,1-fach (TSB S) bzw. 2,8-fach (TSB R) induziert. Da die Verwendung von *P. aeruginosa*-Überständen aus

statischen MG-Medium-Kulturen zu der höchsten IFIT4-Induktion führte (Vgl. s. Abb. 11), erfolgte die Durchführung aller nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich unter Verwendung von Überständen aus statischen MG-Medium-Kulturen.



**Abb. 13 IFIT4- Induktion durch Kulturüberstände von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen der Bakterien.** Primäre Keratinozyten wurden 6 Std. mit je 100  $\mu$ l der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* ATCC 33348 inkubiert und die IFIT4 mRNA-Expression mittels „Real-Time“-PCR ermittelt. Die Kultivierungsbedingungen für die Bakterien wurden wie folgt gewählt: MG R: 24 Std. MG-Medium unter statischen Bedingungen; MG S: 24 Std. MG-Medium in Schüttelkultur; TSB R: 24 Std. TSB-Medium unter statischen Bedingungen; TSB S: 24 Std. TSB-Medium in Schüttelkultur. Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

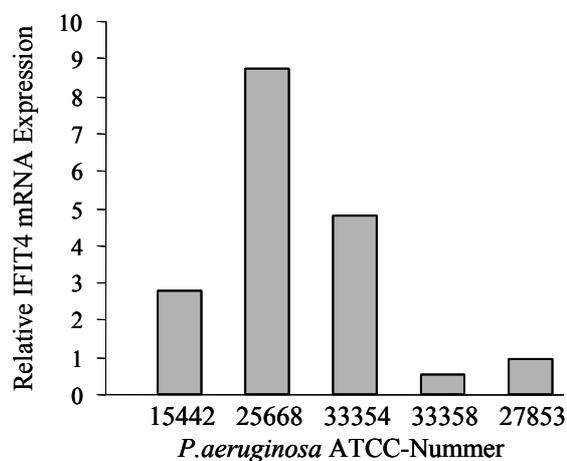
Um zu überprüfen, nach welcher Inkubationsdauer IFIT4 maximal induzierbar ist, wurden HaCaT-Keratinozyten über unterschiedlich lange Zeitspannen mit Überständen mukoider *P. aeruginosa*-Kulturen (ATCC 33348) inkubiert (s. Abb. 14).



**Abb. 14 Die IFIT4-Induktion in HaCaT-Keratinozyten durch *P. aeruginosa*-Kulturüberstände ist abhängig von der Inkubationsdauer.** HaCaT-Keratinozyten wurden für 3, 6, 12 und 24 Std. mit je 20  $\mu$ l/ml von *P. aeruginosa*-Überständen inkubiert. *P. aeruginosa* (ATCC 33348) wurde in MG-Medium unter statischen Bedingungen kultiviert. Die IFIT4 mRNA-Expression wurde in 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen mittels „Real-Time“-PCR bestimmt.

Es zeigte sich, dass IFIT4 nach einer 6-stündigen Inkubation maximal 9,5-fach induziert wurde (s. Abb. 14). Nach einer 24-stündigen Inkubation war kaum noch eine IFIT4-Induktion nachweisbar (ca. 2-fach).

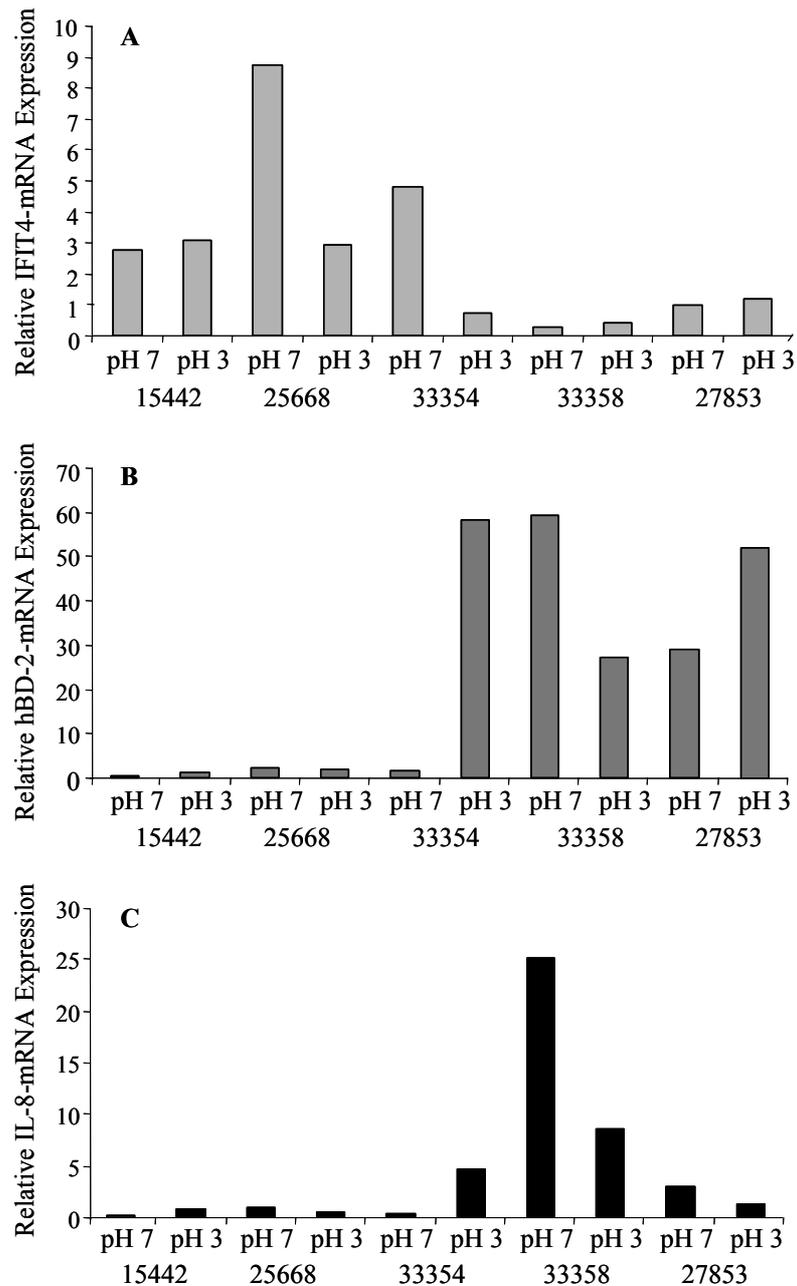
Ein weiterer Versuch (Abb. 15) verdeutlichte, dass nicht nur Kulturüberstände von *P. aeruginosa*-ATCC 33348, sondern auch Kulturüberstände von anderen *P. aeruginosa*-ATCC-Stämmen IFIT4 in Hautkeratinozyten induzieren. Die Behandlung mit den Kulturüberständen von *P. aeruginosa*-ATCC 25668, ATCC 33354 und ATCC 15442 führte zu einer Induktion von IFIT4 (maximal 8,8-fach bei ATCC 25668). Überstände von *P. aeruginosa*-ATCC 33358 und 27853 dagegen induzierten interessanter Weise kein IFIT4.



**Abb. 15 Variable Induktion von IFIT4 durch Kulturüberstände verschiedener *P. aeruginosa*-ATCC-Stämme.** Kulturen primärer Keratinozyten wurden für 6 Std. mit je 30 µl/ml Kulturüberständen verschiedener *P. aeruginosa* ATCC-Stämme inkubiert und die mRNA-Expression von IFIT4 durch „Real-Time“-PCR 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 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

### 3.3.2.2 IFIT4 und hBD-2 werden durch unterschiedliche *P. aeruginosa*-Überstandskomponenten reguliert

Im Folgenden wurde untersucht, ob die IFIT4-Induktion, ähnlich wie bei hBD-2, durch einen Inhibitor im Überstand beeinträchtigt sein könnte. Dazu wurde Inkubationsexperimente mit *P. aeruginosa*-Kulturüberständen durchgeführt, die auf pH 3 angesäuert und vor der Inkubation mit primären Keratinozyten wieder neutralisiert wurden (s. 2.8.3).



**Abb. 16 Die IFIT4-Expression wird unabhängig von hBD-2 und IL-8 reguliert.** Kulturen primärer Keratinozyten wurden für 6 Std. mit Säure-behandelten (pH 3) bzw. unbehandelten (pH 7) 30 µl-Aliquots von Überständen verschiedener *P. aeruginosa* ATCC-Stämmen (ATCC 15442; 25668; 33354; 33358 und 27853) inkubiert. Die Bakterien stammen aus statischen MG-Medium-Kulturen. Die mRNA-Expression von IFIT4 (A), hBD-2 (B) und IL-8 (C) wurde mittels „Real-Time“-PCR bestimmt. Die Darstellung zeigt ein typisches Ergebnis von 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

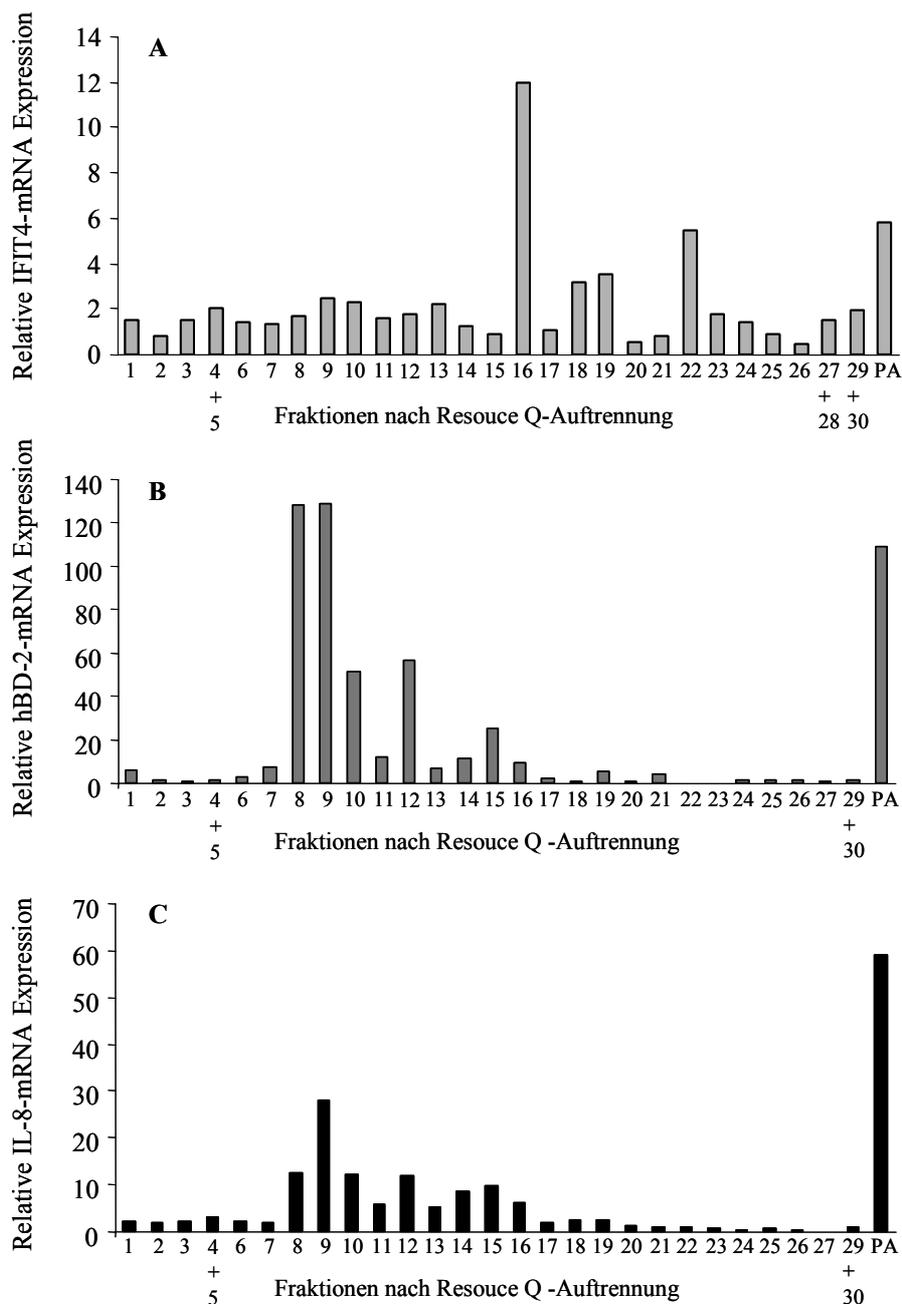
Aus Abb. 16 geht hervor, dass Überstände der *P. aeruginosa* ATCC-Stämme 15442, 25668 und 33354 IFIT4 induzieren. Durch Ansäuerung der Kulturüberstände verminderte sich die Induktion (bei *P. aeruginosa* ATCC 25668 und ATCC 33354) bzw. blieb nahezu unverändert (bei *P. aeruginosa* ATCC 15442).

Die Kulturüberstände von *P. aeruginosa* ATCC 15442 und 25668 bewirkten weder im „Rohzustand“ noch nach Ansäuerung eine Induktion von hBD-2 und IL-8 in Keratinozyten. Durch eine Inkubation mit Überständen von *P. aeruginosa* ATCC 33354 steigerte sich die hBD-2-Induktion durch Ansäuerung von 1,6-fach auf 58-fach, durch Verwendung von *P. aeruginosa* ATCC 27853-Überständen verdoppelte sich dadurch die hBD-2-Induktion nahezu. Bei Verwendung von *P. aeruginosa* 33358-Kulturüberständen verminderte sich die hBD-2-Induktion durch die Ansäuerung um die Hälfte.

IL-8 wurde im Prinzip ähnlich wie hBD-2 reguliert. Bei Verwendung des Kulturüberstandes ATCC 27853 jedoch verminderte sich die IL-8-Induktion durch Ansäuerung geringfügig und war damit gegenläufig zu der entsprechenden hBD-2-Induktion.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zum einen, dass IFIT4 offensichtlich durch andere *P. aeruginosa*-Kulturüberstände induziert wird als hBD-2 und IL-8. Zum anderen kommt es durch Ansäuerung des Kulturüberstandes eher zu einer Verminderung der IFIT4-Induktion. Demgegenüber konnte zumindest für hBD-2 gezeigt werden, dass eine Ansäuerung der Kulturüberstände von *P. aeruginosa* ATCC 33354 und 27853 zu einer Steigerung der hBD-2-Induktion führt.

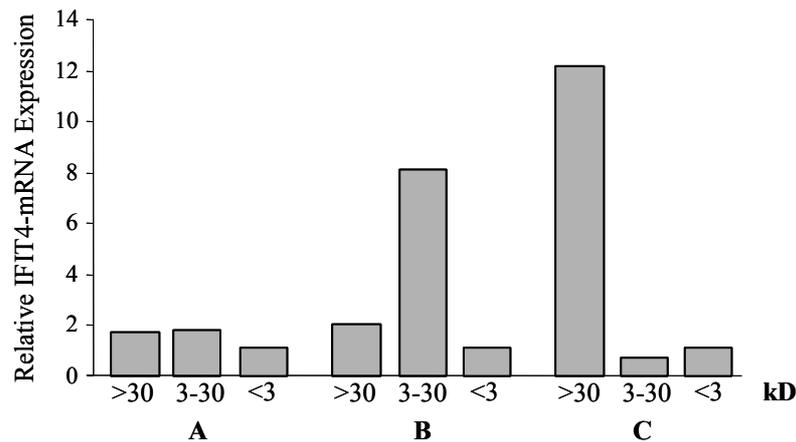
Der folgende Versuch diente einer näheren Analyse der molekularen Eigenschaften der IFIT4-Induktoren und stellt einen weiteren Anhaltspunkt dafür dar, dass IFIT4 anders als hBD-2 und IL-8 reguliert wird. Der Überstand von *P. aeruginosa*-Kulturen wurde mittels Ionenaustauschchromatographie (Resource Q) fraktioniert und sowohl der „unfraktionierte“ Gesamtüberstand (PA) als auch die einzelnen Fraktionen in Inkubationsexperimenten eingesetzt. Aus Abb. 17 geht hervor, dass IFIT4 (A), hBD-2 (B) und IL-8 (C) durch den Gesamtüberstand induziert wurden. Ferner zeigte sich, dass eine hBD-2- und IL-8-Induktion hauptsächlich nach einer Inkubation mit den Fraktionen 8 bis 15 erfolgte, während IFIT4 nach einer Inkubation mit den Fraktionen 16 (12-fach) und 22 (5,5-fach) induziert wurde.



**Abb. 17** IFIT4-, HBD-2- und IL-8-Induktion in Keratinozyten durch Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen: HaCaT-Keratinozyten wurden für 6 Std. mit den Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie inkubiert und die IFIT4 (A)-, hBD-2(B)- und IL-8 (C) mRNA-Expression quantitativ bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellen mit den Gesamtüberständen (PA) inkubiert. Die Kulturüberstände stammten von ATCC 33348 (MG-Medium, statische Bedingungen). Dargestellt ist das typische Ergebnis von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

### 3.3.2.3 IFIT4-Induktoren aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen besitzen Molekularmassen von mehr als 3 kD

Zur Bestimmung der Molekülgröße IFIT4-induzierender Faktoren wurden MG-Überstände statisch kultivierter *P. aeruginosa* über Filter mit einer unterschiedlichen Ausschlussgrenze („Cutoff“) separiert (s. 2.8.2). Die Überstände wurden unter Verwendung eines 30 kD Filters konzentriert und das Filtrat anschließend mittels eines 3 kD Filters weiter fraktioniert.



**Abb. 18 Die IFIT4-Induktion in HaCaT-Keratinocyten durch Fraktionen aus Größenfiltrationen von *P. aeruginosa*-Kulturüberständen.** HaCaT-Kulturen wurden für 6 Std. mit Überständen von *P. aeruginosa* (ATCC 33348) inkubiert, deren Kultivierung (MG-Medium, statische Bedingungen) unabhängig voneinander erfolgt war (A-C). Die relative IFIT4 mRNA-Expression wurde mittels „Real-Time“-PCR ermittelt. Die Fraktionierung der Überstände erfolgte in einer Amicon-Kammer unter Verwendung von Filtern mit einer Ausschlussgrenze von 30 kD bzw. 3 kD. Die Abbildung stellt das typische Ergebnis von 3 voneinander unabhängigen Versuchen dar.

Abb. 18 zeigt, dass Kulturüberstände von *P. aeruginosa*, die unter identischen Bedingungen aber unabhängig voneinander kultiviert worden waren, IFIT4 mRNA unterschiedlich induzierten. *P. aeruginosa*-Überstände aus der Kultivierung A induzierten kein IFIT4, während bei einer Inkubation mit *P. aeruginosa*-Überständen aus Kultivierung B die Induktion durch die 3-30 kD Fraktion erfolgte. Bei Verwendung des *P. aeruginosa*-Überstandes aus Kultivierung C ließ sich eine IFIT4-Induktion durch die Fraktion >30kD feststellen.

Da der IFIT4-Induktor offensichtlich größer als 3 kD ist, wurden zur weiteren Charakterisierung des Induktors HaCaT-Keratinocyten mit Faktoren > 3 kD inkubiert, die von *P. aeruginosa* sezerniert werden und für die eine Interaktion mit Epithelzellen beschrieben ist. Dazu gehörten Versuchsansätze mit Lipopolysaccharid (LPS; 10 µg/ml), welches z.B. hBD-2 in HaCaT-Keratinocyten induziert (Seo et al., 2001) und einem Homoserinlaktone (30 ng/ml), welches eine Vielzahl von Zytokin- und Chemokinen (z.B. IL-6 und MIP-1β) induziert

(Smith et al., 2002). Rhamnolipide (Jerneil Biosurfactants 515; 0,1 µl/ml) induzieren IL-8 in Keratinozyten (eigene Beobachtung) und Exotoxin A (100 ng/ml) induziert Gene verschiedener Zytokine (wie z.B. TNF $\alpha$ ) und Chemokine (wie z.B. MIP-1 $\alpha$ ) in Lungenepithel (Wieland et al, 2002). Keiner der genannten Stimuli induzierte oder inhibierte IFIT4 in HaCaT-Keratinozyten nach einer 6- bzw. 24-stündigen Inkubation (Daten nicht gezeigt).

#### **3.3.2.4 Kulturüberstände von *E. coli* und *S. aureus* induzieren kein IFIT4**

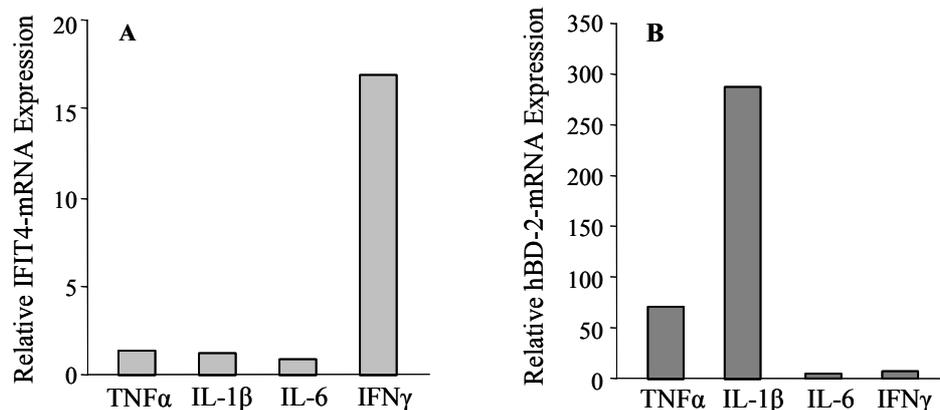
Die für die SDD-Analyse verwendeten Kulturüberstände von *E. coli* und *S. aureus* hatten keine Induktion von IFIT4 gezeigt, so dass dieses Ergebnis mit unabhängigen Inkubationsversuchen überprüft wurde. Dazu wurde *E. coli* (ATCC 35218 und 25922) in MG-Medium unter Schütteln und als statische Kultur kultiviert. *S. aureus* (klinisches Isolat 241) wurde in TSB-Medium mit verschiedenen Antibiotika (Penicillin, Oxacillin) kultiviert. Kulturüberstände von derart kultivierten *E. coli* und *S. aureus* wurden für Inkubationsversuche mit HaCaT-Zellen verwendet, führten jedoch zu keiner IFIT4-Induktion (Daten nicht gezeigt).

### **3.3.3 Genregulation von IFIT4 durch Zytokine**

#### **3.3.3.1 IFIT4 wird durch Interferon $\gamma$ induziert**

Im Folgenden wurde untersucht, ob Zytokine an der transkriptionellen Regulation der IFIT4-Expression beteiligt sein könnten. Diesbezüglich durchgeführte Versuche ergaben, dass eine Inkubation primärer Keratinozyten für 6 bzw. 20 Std. mit den Zytokinen IL-2 (10 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-4 (30 ng/ml), IL-5 (10 ng/ml), GM-CSF („Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor“; 30 ng/ml) und IL 6 zu keiner Induktion der IFIT4-mRNA Expression (Daten bis auf IL-6 (Abb. 19) nicht gezeigt) führten. Ebenso verhielt es sich bei einer Inkubation mit TNF $\alpha$  (30 ng/ml; s. Abb. 19) und weiteren Zytokinen wie IL-12 (20 ng/ml), IL-1 $\alpha$  (3 ng/ml), IL-18 (25 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (3 ng/ml; s. Abb. 19). Das Chemokin RANTES (100 ng/ml) zeigte ebenfalls keine erkennbare Wirkung auf die IFIT4 mRNA-Expression.

Abb. 19 verdeutlicht jedoch, dass die Inkubation von primären Keratinozyten mit IFN $\gamma$  zu einer 17-fachen Induktion von IFIT4 führte, wohingegen durch eine Inkubation mit TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 IFIT4 nicht induziert wurde. Im Gegensatz dazu wurde hBD-2 durch IFN $\gamma$  ca. 7-fach, durch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  71- bzw. 287-fach induziert. Ebenso wie IFIT4 ist hBD-2 allerdings nicht durch IL-6 induzierbar.

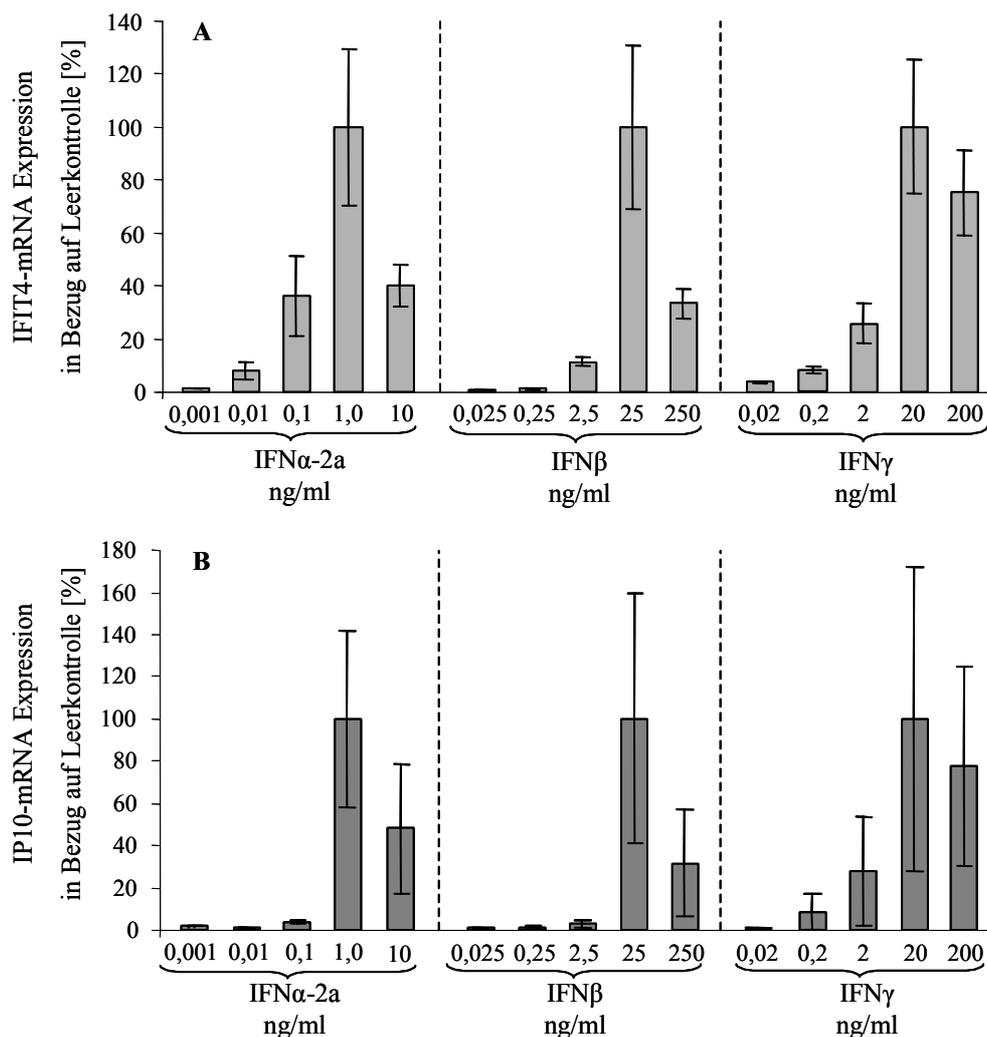


**Abb. 19** Der Einfluss verschiedener Zytokin-Stimuli auf die IFIT4 und hBD-2 mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 6 Std. mit TNF $\alpha$  (30 ng/ml), IL-1 $\beta$  (3 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) und IFN $\gamma$  (20 ng/ml) inkubiert. Die relative IFIT4 (A) und hBD-2 (B) mRNA-Expression wurde mittels „Real-Time“-PCR ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten.

### 3.3.3.2 Vergleich der Interferon-abhängigen Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10

Die bisherigen Untersuchungen hatten gezeigt, dass IFIT4 durch das Typ II-Interferon IFN $\gamma$  in primären Keratinozyten induzierbar ist. Im Folgenden wurde daher die Interferon-abhängige Induzierbarkeit von IFIT4 in HaCaT-Keratinozyten näher untersucht. Vergleichend wurde dazu die Interferon-abhängige Induktion des Chemokins IP10 analysiert, um mögliche Gemeinsamkeiten in der Regulation von IFIT4 zu IP10 zu detektieren.

Anhand einer Dosis-Wirkungskurve und Zeitkinetik konzentrierten sich die Untersuchungen dabei zunächst auf mögliche Unterschiede in der Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10 durch Typ I-Interferone (IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ ) und Typ II-Interferon (IFN $\gamma$ ). Bei IFN $\alpha$  handelt es sich um eine Familie nahe verwandter Proteine, wobei für diese Experimente das rekombinante IFN $\alpha$ -2a verwendet wurde.



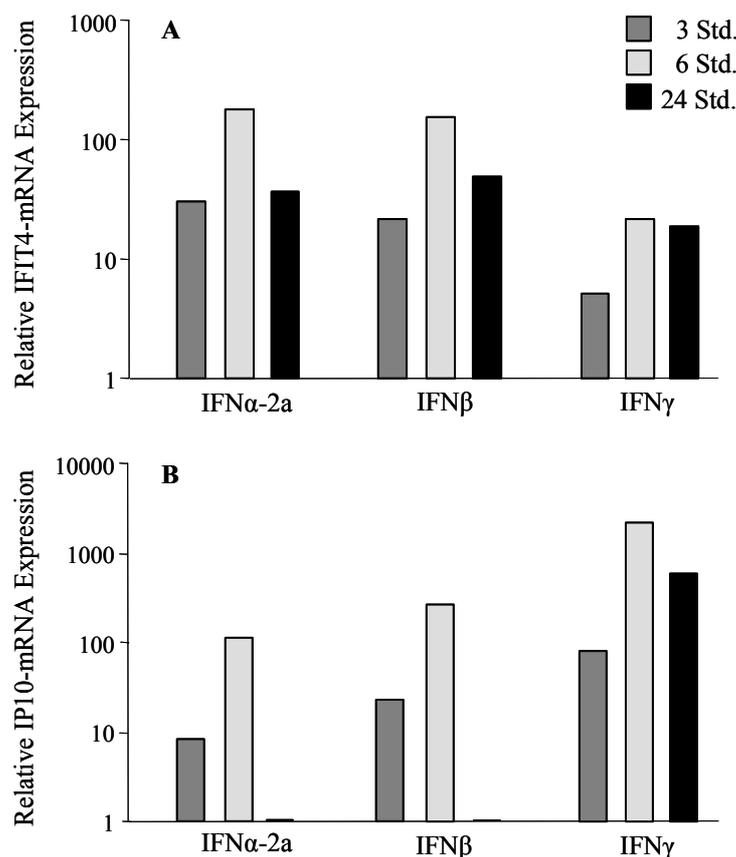
**Abb. 20 Dosisabhängige Gen-Induktion von IFIT4 und IP10 durch Interferone.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 6 Std. mit verschiedenen Konzentrationen von IFN $\alpha$ -2a, IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  inkubiert. Die relative IFIT4 (A) und IP10 (B) mRNA-Expression wurde mittels „Real-Time“-PCR ermittelt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis aus 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Die relativen Expressionswerte der einzelnen Versuche wurden jeweils gemittelt und mit dem Standardfehler dargestellt. Dabei wurden die absoluten mRNA-Maxima gleich 100% gesetzt. In Relation dazu sind die mRNA-Expressionen nach Inkubationen mit geringeren und höheren IFN-Konzentrationen dargestellt. Die einzelnen Maxima setzen sich aus folgenden Einzelwerten (aus den verschiedenen Inkubationsansätzen) zusammen. IFIT4 (A) wurde durch 1 ng/ml IFN $\alpha$ -2a 135-, 67- bzw. 192-fach, durch 25 ng/ml IFN $\beta$  181-, 73- bzw. 224-fach und durch 20 ng/ml IFN $\gamma$  43-, 29- bzw. 70-fach induziert. IP10 (B) wurde durch 1 ng/ml IFN $\alpha$ -2a 40-, 160- bzw. 63-fach, durch 25 ng/ml IFN $\beta$  59-, 411- bzw. 95-fach und durch 20 ng/ml IFN $\gamma$  608-, 5985- bzw. 769-fach induziert.

Wie aus Abb. 20 hervorgeht, sind sowohl IFIT4 als auch IP10 durch die Interferone  $\alpha$ -2a,  $\beta$  und  $\gamma$  in HaCaT-Keratinocyten induzierbar. IFIT4 wird am stärksten bei Verwendung von 1 ng/ml IFN $\alpha$ -2a (im Mittel 131-fach) und 25 ng/ml IFN $\beta$  (im Mittel 160-fach) induziert. Selbst bei einer Konzentration von 0,01 ng/ml induziert IFN $\alpha$ -2a noch IFIT4 (ca. 9,6-fach im Mittel), während bei einer Konzentration von  $\leq 0,25$  ng/ml IFN $\beta$  bzw.  $< 0,2$  ng/ml IFN $\gamma$  IFIT4

nicht oder kaum mehr induziert wird. Nach einer Inkubation mit IFN $\gamma$  ist die relative IFIT4-Expression im Mittel geringer als nach einer Inkubation mit IFN $\alpha$ -2a und IFN $\beta$  (s. Legende Abb. 20).

Im Gegensatz zu IFIT4 wurde IP10 durch IFN $\gamma$  am höchsten induziert (im Mittel 2450-fach bei 20 ng/ml). Nach Inkubation mit IFN $\alpha$ -2a war eine IP10-Induktion erst bei einer Konzentration von  $\geq 1$  ng/ml (im Mittel 90-fach) festzustellen. Eine IP10-mRNA-Induktion nach Inkubation mit IFN $\beta$  war ab einer Konzentration von  $\geq 25$  ng/ml nachweisbar.

Ergänzend zu den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10 von der verwendeten Interferon-Dosis wurde die Abhängigkeit von der Inkubationsdauer überprüft. Dazu wurden HaCaT-Keratinocyten mit den vorher ermittelten optimalen Interferonkonzentrationen (1 ng/ml IFN $\alpha$ -2a, 25 ng/ml IFN $\beta$ , 20 ng/ml IFN $\gamma$ ) über unterschiedlich lange Zeitspannen inkubiert (s. Abb. 21).



**Abb. 21** Zeitabhängige Gen-Induktion von IFIT4 und IP10 durch Interferone. HaCaT-Keratinocyten wurden für 3, 6 und 24 Std. mit IFN $\alpha$ -2a (300 U/ml = 1,0 ng/ml), IFN $\beta$  (25 ng/ml) und IFN $\gamma$  (20 ng/ml) inkubiert. Die relative IFIT4 (A) und IP10 (B) mRNA-Expression wurde mittels „Real-Time“-PCR in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten ermittelt und exemplarisch dargestellt.

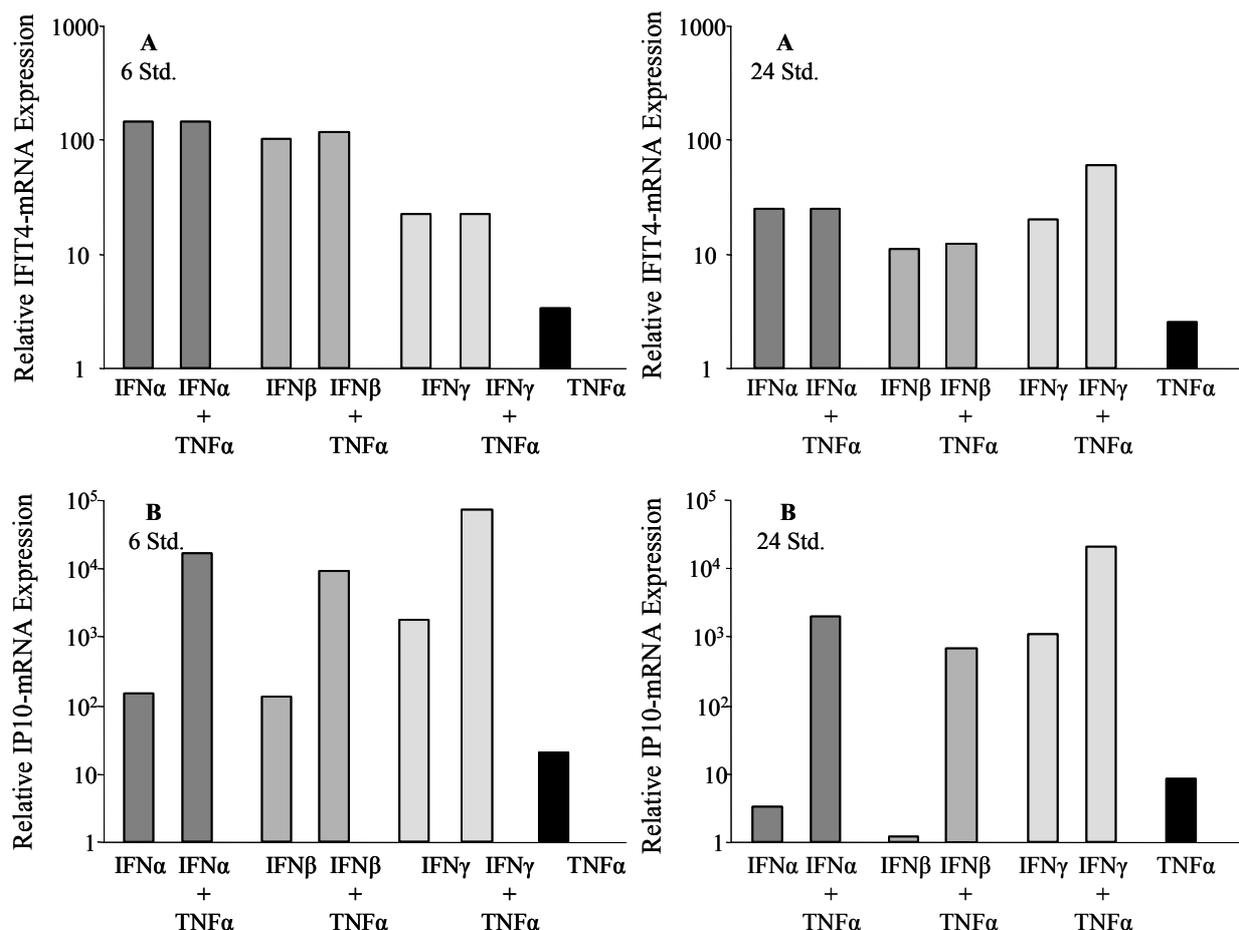
Nach einer 6-stündigen Inkubation mit IFN $\alpha$ -2a, IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  wurde IFIT4 maximal induziert. Nach einer 3- bzw. 24-stündigen Interferoninkubation war die IFIT4-Expression jeweils geringer als nach einer 6-stündigen Inkubation, aber durch jedes der drei Interferone war eine IFIT4-Induktion zu diesen Zeitpunkten nachweisbar. Im Gegensatz dazu war nach einer 24-stündigen Inkubation mit IFN $\alpha$ -2a und IFN $\beta$  eine Induktion der relativen IP10-Expression nicht zu beobachten. Für eine Interferon-abhängige IP10-Induktion ist eine 6-stündige Inkubationsdauer offensichtlich optimal, da zu diesem Zeitpunkt die maximalen IP10-Expressionswerte, besonders auffällig nach Inkubation mit IFN $\gamma$ , festgestellt wurden.

### **3.3.3.3 Koinkubation mit Interferonen und TNF $\alpha$ führt nicht zu einer Überexpression von IFIT4**

Literaturangaben (Boorsma et al., 1998) zufolge sollte IP10 in Vorhautkeratinozyten nicht durch TNF $\alpha$  induzierbar sein, aber durch Koinkubation mit IFN $\gamma$  überexprimiert werden. In den folgenden Versuchen wurde daher untersucht, ob die IFIT4-Genexpression diesbezüglich ähnlich wie IP10 regulierbar ist. Dazu wurden HaCaT-Keratinozyten, neben IFN $\gamma$ , auch mit IFN $\alpha$ -2a und IFN $\beta$  inkubiert bzw. mit TNF $\alpha$  koinkubiert.

Wie Abb. 22A zeigt, wird IFIT4 durch TNF $\alpha$  alleine nur geringfügig induziert (Vergleich s. Abb. 19). Im Vergleich zu der IFIT4-Expression nach Inkubation mit Interferonen alleine blieb die IFIT4-Expression bei Koinkubation mit Interferonen und TNF $\alpha$  fast konstant. Eine Ausnahme stellt die IFIT4-Induktion durch IFN $\gamma$  dar, die sich nach einer 24-stündigen Koinkubation mit TNF $\alpha$  nahezu verdreifachte.

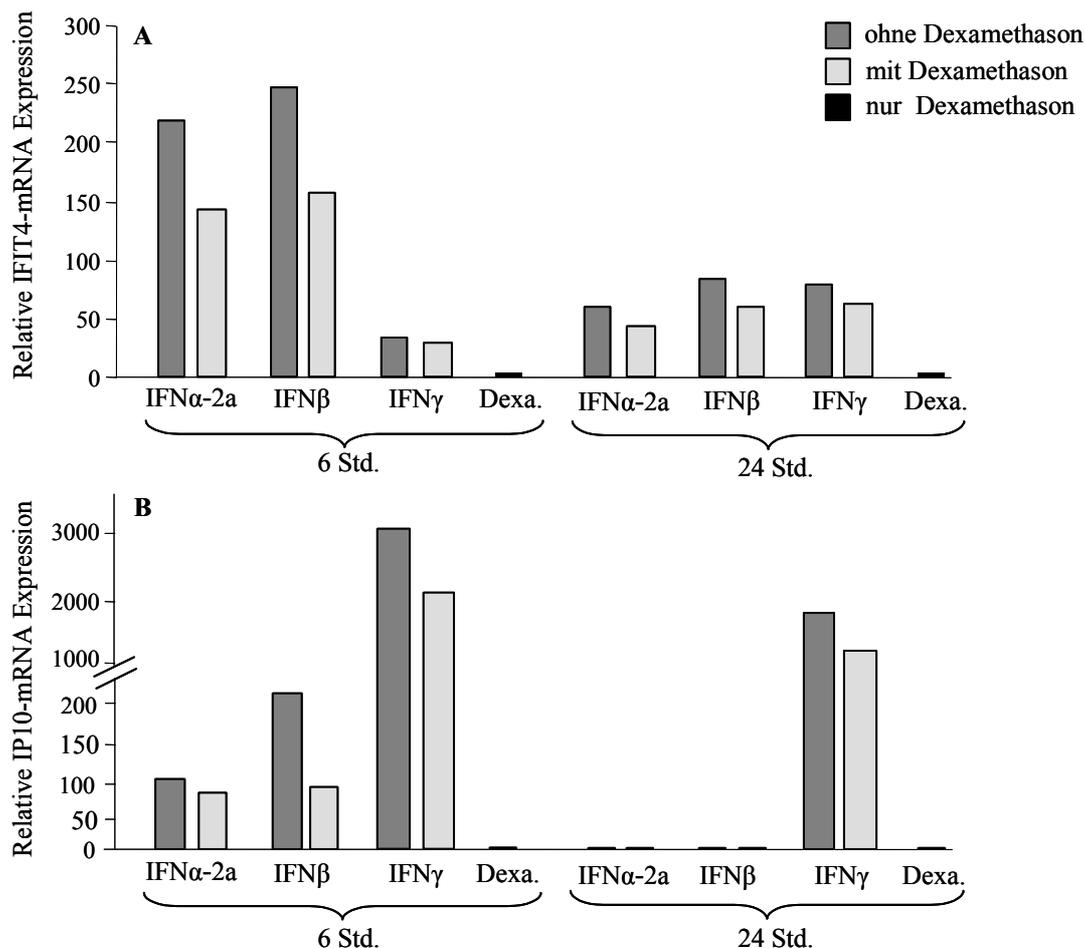
Im Unterschied zu IFIT4 wurde IP10 durch TNF $\alpha$  alleine ca. 20-fach induziert (Abb. 22B). Verglichen mit der IP10-Expression nach einer Inkubation mit den Interferonen allein, führte eine Koinkubation der HaCaT-Keratinozyten mit Interferonen und TNF $\alpha$  zu einer ausgeprägten Steigerung der IP10-Expression, die teilweise zwei Zehnerpotenzen umfasste.



**Abb. 22 IFIT4 und IP10 zeigen bei gleichzeitiger Koinkubation mit Interferonen und TNF $\alpha$  unterschiedliches Verhalten.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 6 (links) und 24 Std. (rechts) mit IFN $\alpha$  (1 ng/ml), IFN $\beta$  (25 ng/ml), IFN $\gamma$  (20 ng/ml), TNF $\alpha$  (30 ng/ml) bzw. mit einer Kombination der Interferone mit TNF $\alpha$  inkubiert. Die IFIT4 (A) und IP10 (B) mRNA-Expression wurde durch „Real-Time“-PCR bestimmt. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis dreier unabhängiger Versuche in logarithmierter Form.

### 3.3.3.4 Der Effekt von Glukokortikoiden auf die IFIT4- und IP10-Induktion

Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur (de Veer et al., 1998), die darstellten, dass Glukokortikoid-Hormone eine Änderung der IFIT4-Expression hervorrufen können, wurde in den folgenden Versuchen der Einfluss dieses Hormons auf die Interferon-abhängige IFIT4-Induktion überprüft. Dexamethason diente dabei als „synthetischer“ Glukokortikoid-Agonist. HaCaT-Keratinocyten wurden mit den Interferonen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  allein bzw. nach einer Präinkubationsphase zusammen mit Dexamethason inkubiert.



**Abb. 23 Dexamethason vermindert die Wirkung von Interferonen auf die Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10 in HaCaT-Keratinocyten.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 6 und 24 Std. entweder direkt mit IFN $\alpha$ -2a (1 ng/ml), IFN $\beta$  (25 ng/ml) und IFN $\gamma$  (20 ng/ml) inkubiert (dunkle Balken) oder nach 3-stündiger Präinkubation zusammen mit 2,5  $\mu$ M Dexamethason (helle Balken). Die relative IFIT4 (A) und IP10 (B) mRNA-Expression wurde mittels „Real-Time“-PCR ermittelt. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 4 voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.

Wie Abb. 23 zeigt, verminderte sich durch Präinkubation mit Dexamethason die durch eine Interferon-Inkubation hervorgerufene induzierte Expression von IFIT4 und IP10. Bezüglich der IFIT4-Expression ist dieser Unterschied bei einer 6-stündigen Inkubation mit IFN $\beta$  am ausgeprägtesten. Durch Dexamethason verminderte sich die relative Expression von 250-fach (IFN $\beta$  allein) auf 160-fach (bei Dexamethason-Präinkubation). Der Einfluss von Dexamethason auf die durch IFN $\gamma$  hervorgerufene IFIT4-Expression war dagegen vergleichsweise gering. Nach einer 24-stündigen Inkubation verminderten sich die IFIT4-Expressionswerte insgesamt (wie schon in Abb. 21 gezeigt).

Nach einer 6-stündigen IFN $\gamma$ -Inkubation lag die IP10-Expression bei 3100-fach und verminderte sich nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason auf ca. 2100-fach.

Die Präinkubation mit Dexamethason verringerte ebenso die IFN $\alpha$ -2a- und IFN $\beta$ -abhängige IP10-Induktion. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit IFN $\alpha$ -2a und IFN $\beta$  war, wie schon in Abb. 21 gezeigt, keine IP10-Induktion mehr nachweisbar. Die IFN $\gamma$ -abhängige IP10-Induktion war gegenüber dem entsprechenden 6 Stunden-Wert deutlich geringer und wurde durch Dexamethasonbehandlung verringert.

Eine Inkubation mit Dexamethason allein führte weder zu einer IFIT4- noch zu einer IP10-Induktion in HaCaT-Keratinocyten. Bei gleichzeitiger Koinkubation der Zellen mit Dexamethason und den verschiedenen Interferonen ohne eine Präinkubation war der hemmende Einfluss des Kortikoids geringer (Daten nicht gezeigt).

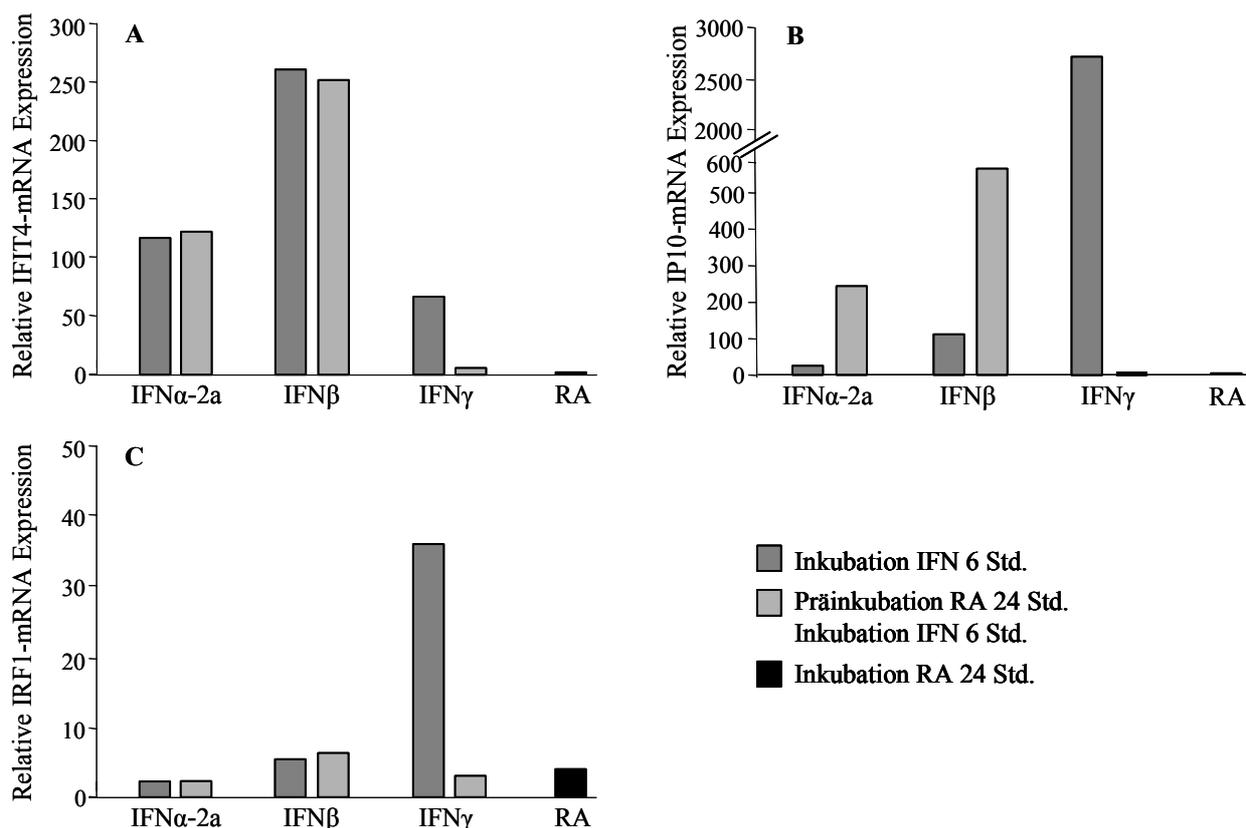
### **3.3.4 Der Effekt von Retinolsäure (Vitamin A-Säure) auf die Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10**

Für Retinolsäure (RA) wurde von der Arbeitsgruppe um Luis Pelicano (Pelicano et al., 1997) beschrieben, dass dieses Vitamin A-Derivat in HL-60- (humane promyelozytische Leukämie)-Zellen und WISH-Zellen (aus Fruchtblasenepithel) eine Induktion verschiedener Interferon-induzierbarer Gene verursacht. Eine Erklärung hierfür war z.B., dass RA über eine direkte Stimulierung des Transkriptionsfaktors IRF1 („Interferon Regulatory Factor 1“) eine Induktion und Sekretion von IFN $\alpha$  verursacht.

Es erschien daher naheliegend, den Einfluss von Retinolsäure auf die Induzierbarkeit von IFIT4 und die mögliche Rolle von IRF1 dabei zu untersuchen. Dazu wurden HaCaT-Keratinocyten entweder direkt oder nach einer 24-stündigen Präinkubation mit RA mit den verschiedenen Interferonen inkubiert.

Bezüglich der IFIT4-Expression zeigte sich (Abb. 24A), dass durch die Präinkubation mit RA die IFN $\alpha$ -2a- und IFN $\beta$ -bedingte IFIT4-Induktion nur wenig verändert wurde. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch bei Inkubation mit IFN $\gamma$ . Durch die RA-Präinkubation verminderte sich die IP10-Expression von 67-fach auf 5-fach.

Bei der entsprechenden IP10-Expression (s. Abb. 24B) fiel der Einfluss von RA noch deutlicher auf. Durch RA verringerte sich die IFN $\gamma$ -bedingte, 2480-fache IP10-Induktion auf einen Expressionswert von 2-fach. Bei einer Inkubation mit IFN $\alpha$ -2a und IFN $\beta$  drehte sich dieses Verhältnis um. Eine RA-Zugabe resultierte hier in einer deutlichen Steigerung der IP10-Expression.



**Abb. 24 Der Einfluss von Retinolsäure auf die Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10 durch Interferone.** HaCaT-Keratinozyten wurden entweder nach 24-stündiger Präinkubation mit  $10^{-7}$ M *all trans* Retinolsäure (RA) für 6 Std. mit IFN $\alpha$ -2a (1 ng/ml), IFN $\beta$  (25 ng/ml) und IFN $\gamma$  (20 ng/ml) oder ohne Präinkubation mit den Interferonen inkubiert. Inkubationen mit RA allein erfolgten über 24 Std.. Die relative IFIT4 (A), IP10 (B) und IRF1 (C) mRNA-Expression wurde quantitativ durch „Real-Time“-PCR ermittelt. Die Darstellung spiegelt das charakteristische Ergebnis von 3 voneinander unabhängigen Versuchen wider.

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit RA allein war weder eine IFIT4- noch eine IP10-Induktion zu beobachten, allerdings wurde IRF1 in geringem Maße induziert (4,4-fach; s. Abb. 24C).

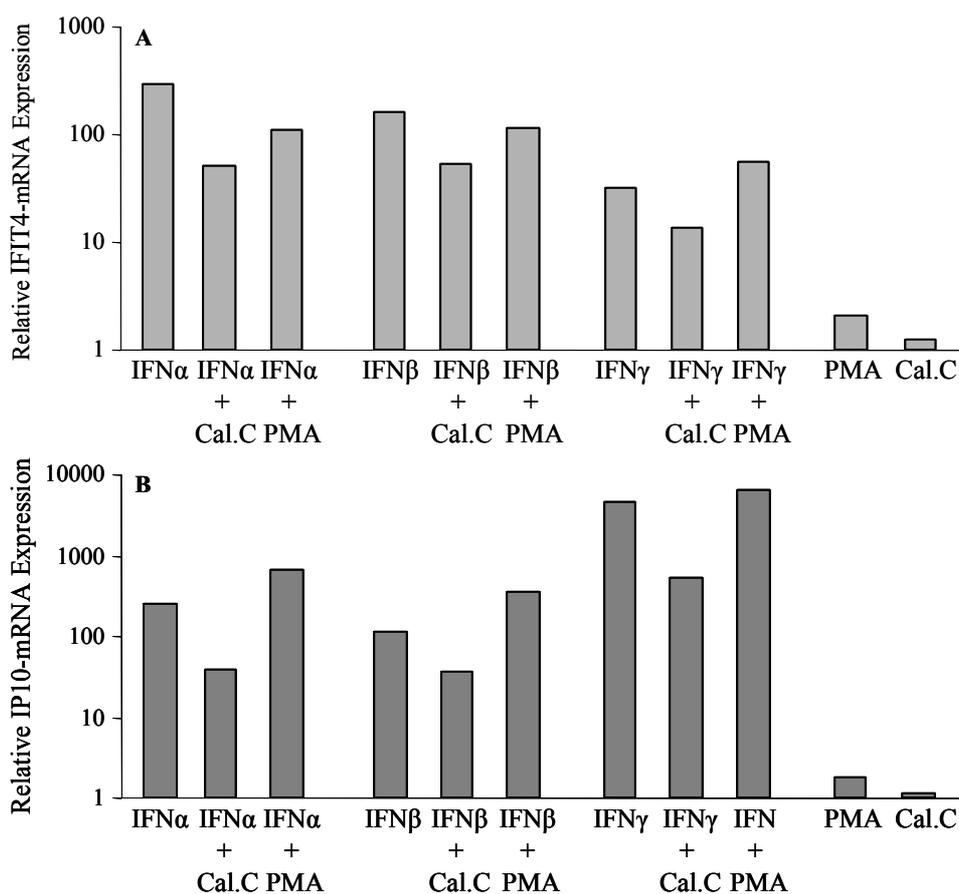
Die Inkubation mit IFN $\alpha$ -2a allein oder nach RA-Behandlung führten zu keiner IRF1-Induktion (2,1 bis 2,2-fach). Bei einer Inkubation mit IFN $\beta$  steigerte sich die IRF1-Genexpression durch eine RA-Behandlung nur geringfügig. Auffällig war jedoch, dass IRF1 durch Inkubation mit IFN $\gamma$  induziert wurde (35,9-fach), wobei die Expression durch Präinkubation mit RA deutlich vermindert wurde (auf 3,4-fach). Durch eine Inkubation mit RA allein wurde IRF1 ca. 4-fach induziert.

Aufgrund der hier durchgeführten Versuche wurden die Proben der Inkubationsexperimente, die für die SDD-PCR-Analyse verwendet wurden (Vergleich s. Abb. 6) bzw. die Proben der sich anschließenden Inkubationsexperimente zum Einfluss verschiedener *P. aeruginosa*-Überstände auf die IFIT4-Induktion (Vergleich s. Abb. 13 und

Abb. 15) dahingehend untersucht, ob IRF1 durch einen der Stimuli induziert wird. Es zeigte sich, dass IRF1 durch keinen der verwendeten *P. aeruginosa*-Kulturüberstände induziert wurde (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.5 Die Bedeutung der Proteinkinase C für die Interferon-abhängige Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10

Um Hinweise auf die Signaltransduktionskaskaden zu erhalten, die an der IFIT4-Genregulation beteiligt sein könnten, wurde die Bedeutung der Proteinkinase C für die Regulation von IFIT4 und IP10 untersucht. Dazu wurden HaCaT-Keratinocyten mit Calphostin C, einem Proteinkinase (PK) C-Inhibitor, bzw. Phorbolmyristatacetat (PMA), einem PKC-Aktivator, und den verschiedenen Interferonen inkubiert.



**Abb. 25 Der Einfluss von Calphostin C und PMA auf die Induzierbarkeit von IFIT4 und IP10 durch Interferone.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 6 Std. mit IFN $\alpha$ -2a (1 ng/ml), IFN $\beta$  (25 ng/ml) und IFN $\gamma$  (20 ng/ml) allein, in Kombination mit Calphostin C (Cal.C; 1  $\mu$ M) oder PMA (50 ng/ml) (nach 6-stündiger Präinkubation) bzw. mit Calphostin C und PMA allein inkubiert. Die IFIT4 (A) und IP10 (B) mRNA-Expression wurde mittels „Real-Time“-PCR bestimmt und ist exemplarisch für das Ergebnis von 4 voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt.

Wie Abb. 25 zeigt, verringerte sich durch eine Koinkubation mit Calphostin C die IFN $\alpha$ -2a- und IFN $\beta$ -bedingte IFIT4-Induktion, wobei diese Verringerung der Expression auch bei Koinkubation mit PMA festzustellen war. Die IFN $\gamma$ -bedingte IFIT4-Induktion reduzierte sich durch Koinkubation mit Calphostin C um mehr als die Hälfte (von 31-fach auf 13-fach), verdoppelte sich aber bei einer Koinkubation mit PMA nahezu (auf 54-fach). Eine Inkubation mit Calphostin C bzw. PMA allein führten weder zu einer IFIT4- noch zu einer IP10-Induktion. Bezüglich der IP10-Expression konnte für alle drei Interferone gezeigt werden, dass die IFN-abhängige IP10-Induktion durch Zugabe von Calphostin C vermindert und durch Zugabe von PMA gesteigert wurde.

### 3.4 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mit Hilfe von Microarray-Analysen

Mit den beiden in Abschnitt 3.1 beschriebenen *P. aeruginosa*-Kulturüberständen wurden HaCaT-Keratinocyten für 20 Std. inkubiert, ihre mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit dem Farbstoff Cy3 oder Cy5 markiert. Für den Leerwert (Referenzwert) wurde mRNA aus unbehandelten HaCaT-Keratinocyten isoliert und die cDNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Für die differentielle Genexpressionsanalyse wurde ein spezieller Array mit entzündungs- und infektionsspezifischen Genen (Custom Microarray der Firma Scienion) eingesetzt. Die auf dem Chip gebundene einzelsträngige cDNA (*Target*) wurde mit einem Gemisch aus Cy3- und Cy5-markierter cDNA (*Probe*) hybridisiert. Zwei Arrays wurden je Hybridisierungsexperiment eingesetzt, so dass jeweils zwei Replikate pro Hybridisierung vorhanden waren:

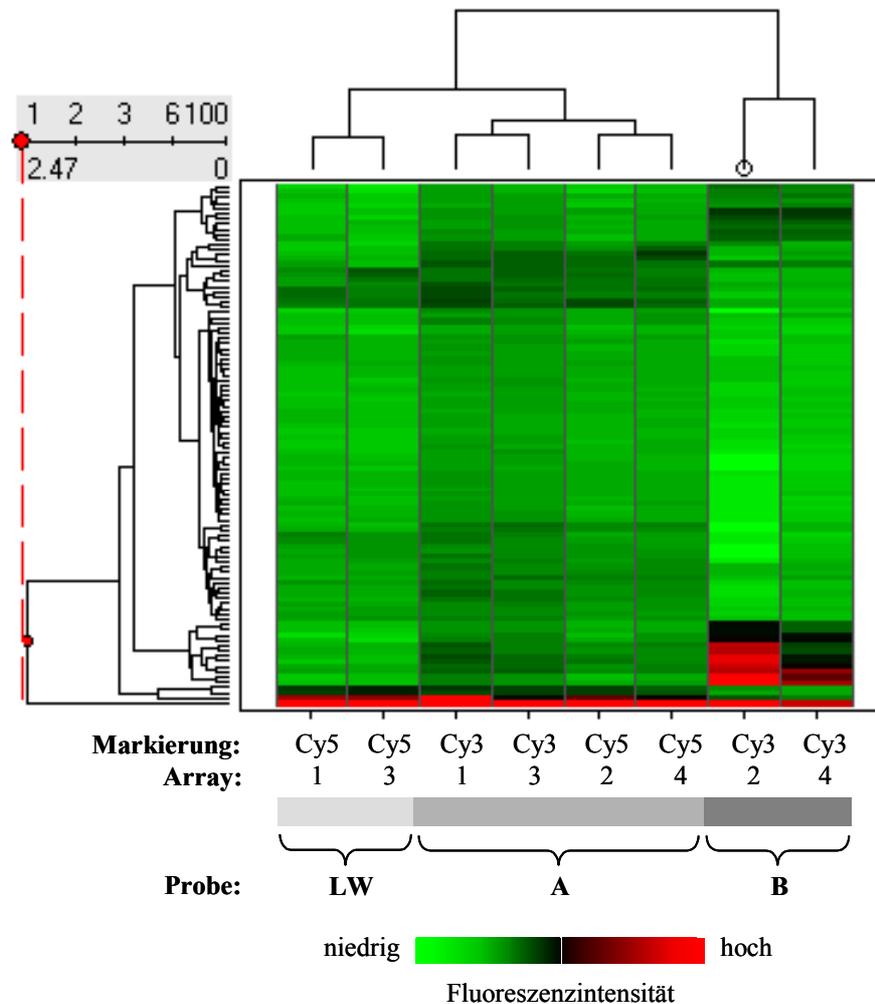
**Replikate Array 1 und 3:** Die Hybridisierungsproben wurden aus Zellen präpariert, die mit 1  $\mu$ l/ml hBD-2-induzierendem *P. aeruginosa*-Kulturüberstand (Probe A, Cy3-markiert) bzw. mit Kontrollmedium (= Referenz; Probe LW, Cy5-markiert) inkubiert worden waren.

**Replikate Array 2 und 4:** Die Hybridisierungsproben wurden aus Zellen präpariert, die mit einem hBD-2-inhibierenden (30  $\mu$ l/ml + zusätzliche hBD-2-induzierende Komponenten) *P. aeruginosa*-Kulturüberstand (Probe B, Cy3-markiert) bzw. mit 1  $\mu$ l/ml hBD-2-induzierendem *P. aeruginosa*-Kulturüberstand (Probe A, Cy5-markiert) inkubiert worden waren.

Abb. 26 zeigt ein hierarchisches Clustering normalisierter Fluoreszenzintensitätswerte der auf dem Microarray gebundenen Cy3- und Cy5-markierten Proben. Die Fluoreszenzintensitätswerte sind getrennt nach Cy3- und Cy5- Messwert dargestellt und farblich kodiert, wobei schwächer exprimierte Gene mit grünen und stärker exprimierte Gene mit roten Farbtönen dargestellt sind. In das hierarchische Clustering wurden nur 100 der 376 auf dem Chip repräsentierten Gene aufgenommen. Für die Cluster-Analyse wurden nur Gene verwendet, die mindestens 1,5-fach reguliert erschienen. Da die Cy3- und Cy5-markierten Proben um die gleichen *Target*-Bindungsstellen auf dem Chip konkurrieren, handelt es sich nicht um absolute, sondern um relativ zueinander gemessene Fluoreszenzintensitäten. Mittels computergestütztem hierarchischem Clustering wurden Gene aufgrund ihres Expressionsmusters in verwandtschaftliche Beziehung gesetzt. Dabei wurden die paarweisen euklidischen Distanzen der Expressionswerte aller Gene zueinander berechnet, in einer Matrix zusammengestellt und mittels der UPGMA-Methode („Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean“) ein Phenogramm konstruiert. Gene mit ähnlichen Expressionsmustern über verschiedene Experimente werden dabei „zusammengeclustert“ und haben im Phenogramm eine kurze Distanz zueinander (die Distanz errechnet sich nur aus den horizontalen Linien des Phenogramms). Bei UPGMA handelt es sich um eine sequentielle Methode, was bedeutet, dass von Runde zu Runde immer größere „Subcluster“ gebildet werden, deren euklidische Distanz zueinander jeweils von neuem berechnet wird. Es ist ein zweidimensionales „Clustering“ gezeigt, d.h. es wurden zunächst vertikal die Gene wie beschrieben und anschließend horizontal die einzelnen Hybridisierungsexperimente nach Ähnlichkeit bezüglich der Expressionsmuster über die analysierten Gene „geclustert“.

Wie Abb. 26 verdeutlicht, besteht bei der Expression der meisten Gene nur ein geringer Unterschied zwischen den einzelnen Hybridisierungsexperimenten einschliesslich deren Replikate. Im Vergleich zu wenigen stärker exprimierten Genen (rot) sind die meisten Gene schwach exprimiert (grün).

Durch das hierarchische „Clustering“ wird eindeutig ein dominantes „Cluster“ identifiziert, das Gene enthält, die durch Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand transkriptionell hochreguliert wurden, während die Expression dieser Gene durch den hBD-2-induzierenden Überstand im Vergleich zum Leerwert nicht oder nur leicht induziert wurde.



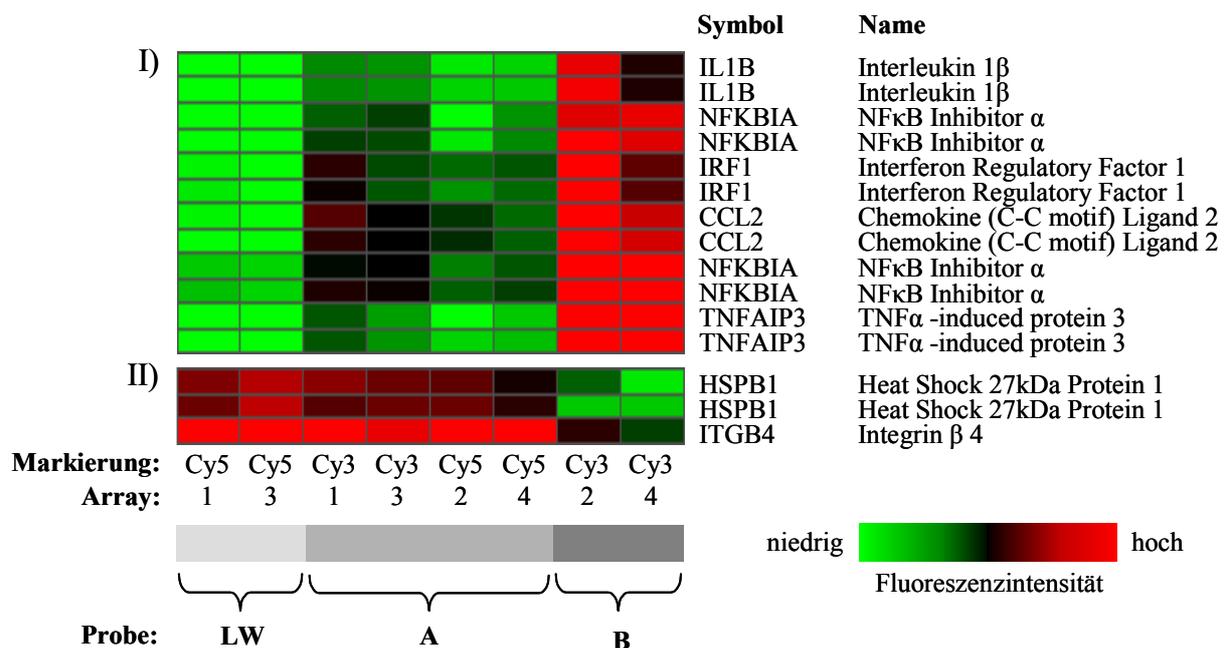
**Abb. 26** Hierarchisches „Clustering“ der normalisierten Fluoreszenzintensitätswerte. Die für die Hybridisierung mit dem „Entzündungs- und Infektionsarray“ verwendeten Proben entstammten HaCaT-Keratinocyten, die für 20 Std. mit je 1  $\mu$ l/ml eines *P. aeruginosa*-Überstandes mit hBD-2-induzierenden Komponenten (Probe A) bzw. mit 30  $\mu$ l/ml eines *P. aeruginosa*-Kulturüberstandes mit hBD-2-inhibierenden Komponenten (Probe B) inkubiert worden waren. Als Referenz wurde RNA aus Zellen verwendet, die nicht mit einem stimulierenden Kulturüberstand inkubiert worden waren (Probe LW). Es wurden insgesamt 4 Arrays mit folgenden Proben hybridisiert: Replikate Array 1 und 3: Probe A (Cy3-markiert) und Probe LW (Cy5-markiert); Replikate Array 2 und 4: Probe B (Cy3-markiert) und Probe A (Cy5-markiert). Zur Übersicht wurden 100 der 376 Messwerte in dieses „Clustering“ einbezogen. Die restlichen 276 Messwerte zeigten keine Regulation.

Ein Teil dieses „Clusters“ ist in Abb. 27 vergrößert dargestellt. Es enthält die Gene IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ), NF $\kappa$ BIA („Nuclear Factor of  $\kappa$  Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells Inhibitor  $\alpha$ “), IRF1 („Interferon Regulatory Factor“), CCL2 (Chemokine (C-C motif) Ligand 2) und TNFAIP3 („Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Induced Protein 3“).

Dazu ist auch das komplementäre „Cluster“ bestehend aus den zwei Genen HSPB1 („Heat Shock Protein B1“) und ITGB4 („Intergrin  $\beta$ 4“) aufgeführt. Diese Gene wurden in HaCaT-Keratinocyten durch Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-

Kulturüberstand (Probe B) im Vergleich zur Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand (Probe A) und dem Leerwert transkriptionell herunterreguliert.

Zur Ermittlung eines robusten Expressionswertes für die Berechnung der Expressionsänderung (= *fold change*) wurden zwei Replikate angefertigt. Einige Gene sind zusätzlich durch mehrere cDNAs auf dem Array repräsentiert. Zum einen diente dies dazu, verschiedene Splicevarianten des entsprechenden Gens berücksichtigen zu können, zum anderen wurden bei einigen Genen verschiedene Bereiche des Gens auf dem Array gebunden, um eine Spezifität bei der Hybridisierung garantieren zu können. So wurde beispielsweise die cDNA des Gens NFκBIA an vier verschiedenen Arraykoordinaten aufgebracht (s. Abb. 27). Der Intensitätsmesswert ist deshalb auch viermal (insgesamt auf beiden Replikaten also achtmal) vorhanden, während die Werte der anderen in Abb. 27 gezeigten Gene je zweimal und in einem Falle einmal vorhanden sind. Die Tatsache, dass die vier Messwerte von NFκBIA zwar in einem „Cluster“, aber im Phenogramm nicht direkt benachbart sind, deutet die Varianz im Datensatz an.



**Abb. 27 Cluster ko-regulierter Gene mit den entsprechenden normalisierten Fluoreszenzintensitätswerten; Ausschnitt aus Abb. 26.** Im „Cluster I“ sind die Gene zusammengefasst, die durch Probe B und nicht oder nur sehr wenig durch Probe A im Vergleich zum Referenzwert LW transkriptionell hochreguliert erschienen. „Cluster II“ enthält die beiden Gene, die durch Probe B im Vergleich zu Probe A und Probe LW transkriptionell herunterreguliert erschienen.

In den Tabellen 3.1 und 3.3 sind die Gene aufgeführt, die mindestens eine 2-fache Änderung des Expressionswertes (= *2-fold change*) zwischen zwei verschiedenen Hybridisierungen aufwiesen. Tabelle 3.2. stellt die Gene dar, die durch Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden (inh.) Überstand gegenüber unstimulierten Zellen herunterreguliert erschienen („Cluster II“ s. Abb. 27).

Dadurch wird die Liste der hundert hypothetisch regulierten Gene auf 36 eingengt. Bei der durchgeführten Array-basierten Expressionsanalyse wurden aus Kostengründen nur zwei unabhängige Replikate angefertigt, weshalb keine statistische Signifikanz errechnet werden kann. Für die Errechnung der Expressionsänderung wurden die jeweiligen „Ratios“ (= Verhältnis aus den normalisierten Einzelintensitäten der Cy3- und Cy5-markierten Proben) der *Target* Gene gemittelt und die gemittelten „Ratios“  $>2$  bzw.  $<0,5$  in den Tabellen 3.1. bis 3.3. dargestellt. Eine „Ratio“ von  $+2$  bedeutet, dass das entsprechende Gen 2-fach transkriptionell induziert wird (= *fold-change* von 2), eine „Ratio“ von  $0,5$ , dass die Expression eines Gens zweifach herunterreguliert wird. Da keine Array-Hybridisierung mit den Proben B und LW erfolgte, wurden die „Ratios“ für Gene, die durch den inhibierenden *P. aeruginosa*-Überstand anders reguliert wurden als in unstimulierten Zellen, mathematisch durch Multiplikation ermittelt (s. Tabelle 3.1-3.4.).

In Tabelle 3.1. sind alle Gene des „Clusters I“ dargestellt, welches zuvor durch das hierarchische „Clustering“ (Abb. 26) identifiziert wurde. Die Werte der Expressionsänderung sind in absteigender Reihenfolge nach den Genen sortiert, die v.a. durch Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand induziert wurden. Vergleicht man die Spalten C und E, so fällt auf, dass die aufgelisteten Gene durch den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Überstand hoch induziert wurden, während der hBD-induzierende *P. aeruginosa*-Überstand nur einen sehr geringen Effekt hat. In Tabelle 3.2. sind die Gene des „Clusters II“ dargestellt, deren Expression durch den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Überstand reprimiert wurden.

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
Symbol	Genbezeichnung und Synonyme	Mittelwerte der „Ratios“ Array 1 und Array 3 <b><u>hBD-2 ind.</u></b> <b>LW</b>	Mittelwerte der „Ratios“ Array 2 und Array 4 <b><u>hBD-2-inh.</u></b> <b>hBD-2-ind.</b>	Multiplikation der „Ratios“ von Spalte C und D <b><u>hBD-2-inh.</u></b> <b>I.W</b>
TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ Induced Protein 3; A20	1,60	7,46	11,91
CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2; MCP-1	2,50	3,57	8,92
NFKBIA	NF $\kappa$ B Inhibitor $\alpha$	1,96	4,12	8,09
IRF1	Interferon Regulatory Factor 1	1,89	3,36	6,35
CCL4	Chemokine (C-C motif) Ligand 4; MIP-1 $\beta$	1,53	2,78	4,24
TIMP4	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4	1,39	3,05	4,24
CCR7	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 7	1,46	2,82	4,13
GRO1	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 1	1,51	2,66	4,01
CCL11	Chemokine (C-C motif) Ligand 11, Eotaxin	1,52	2,43	3,69
IL1B	Interleukin 1 $\beta$	1,42	2,34	3,32
SELPLG	Selectin P Ligand; PSGL-1	1,27	2,38	3,01
GRO2	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 2, MIP2A	1,51	1,92	2,89
IL-8	Interleukin 8	1,40	1,99	2,78
ARHC	hypothetical Protein MGC19531	1,44	1,83	2,64
MAP4K5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 5	1,70	1,53	2,61
CSF3	Colony Stimulating Factor 3	1,42	1,80	2,55
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	1,86	1,36	2,54
TFAP2A	Transcription Factor AP-2 $\alpha$	1,33	1,80	2,41
TLR4	Toll-Like Rezeptor 4	1,50	1,60	2,39
PAK1	p21/Cdc42/Rac1-Activated Kinase 1	1,43	1,65	2,35
DUSP1	Dual Specificity Phosphatase 1	1,47	1,54	2,27
MAP3K2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2	1,56	1,43	2,23
HLA-C	Major Histocompatibility Complex, Class I, C	1,86	1,19	2,22
MAPK8IP3	Mitogen Activated Protein Kinase 8 Interacting Protein 3	1,64	1,33	2,18
NCAM1	Neural Cell Adhesion Molecule 1	1,45	1,48	2,15
SPRR2E	Small Proline-Rich Protein 2E	1,53	1,38	2,11
DUSP8	Dual Specificity Phosphatase 8	1,28	1,58	2,02
HLA-DPA1	Major Histocompatibility Complex, class II, DP $\alpha$ 1	1,35	1,49	2,02
MAP2K5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 5	1,51	1,33	2,01

**Tabelle 3.1.** „Cluster I“: Darstellung der Gene, die durch Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden (inh.) Überstand gegenüber der unstimulierten Kontrolle (LW) mindestens 2-fach in HaCaT-Keratinocyten induziert erschienen.

A	B	C	D	E
Symbol	Genbezeichnung und Synonyme	Mittelwerte der „Ratios“ Array 1 und Array 3 <b><u>hBD-2 ind.</u></b> LW	Mittelwerte der „Ratios“ Array 2 und Array 4 <b><u>hBD-2-inh.</u></b> <b><u>hBD-2-ind.</u></b>	Multiplikation der „Ratios“ von Spalte C und D <b><u>hBD-2-inh.</u></b> LW
HSPB1	Heat Shock 27kDa Protein 1, HSP27	0,86	0,48	0,41
ITGB4	Integrin $\beta$ 4	1,01	0,41	0,41

**Tabelle 3.2.** „Cluster II“: Darstellung der Gene, die in HaCaT-Keratinocyten durch Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden (inh.) Überstand gegenüber unstimulierten Zellen herunterreguliert erscheinen.

Tabelle 3.3. zeigt eine dritte Gruppe von Genen, „Cluster III“, deren Expression durch den hBD-induzierenden (ind.) *P. aeruginosa*-Überstand stärker induziert wurde als durch den hBD-2-inhibierenden (inh.) Überstand. Der Unterschied ist aber sehr gering und am auffälligsten für das Gen S100A8 (S100 Calcium Binding Protein A8).

Eine transkriptionelle Herunterregulation von Genen durch Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden Überstand konnte nicht festgestellt werden.

A	B	C	D	E
Symbol	Genbezeichnung und Synonyme	Mittelwerte der „Ratios“ Array 1 und Array 3 <b><u>hBD-2 ind.</u></b> LW	Mittelwerte der „Ratios“ Array 2 und Array 4 <b><u>hBD-2-inh.</u></b> <b><u>hBD-2-ind.</u></b>	Multiplikation der „Ratios“ von Spalte C und D <b><u>hBD-2-inh.</u></b> LW
RPL5	Ribosomal Protein L5	2,39	0,89	2,12
DDIT3	DNA-damage-inducible Transcript 3	2,29	0,91	2,07
S100A8	S100 Calcium Binding Protein A8 , Calgranulin A	2,25	0,45	1,01
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	2,08	0,80	1,66
S100A7	S100 Calcium Binding Protein A7, Psoriasin 1	2,04	0,78	1,59

**Tabelle 3.3.** „Cluster III“: Darstellung der Gene, die durch Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden (ind.) Überstand gegenüber der unstimulierten Kontrolle (LW) mindestens 2-fach in HaCaT-Keratinocyten induziert wurden.

### 3.4.1 Verifizierung der anhand der Microarray-Analyse identifizierten differentiellen Genexpression

Die in den Tabellen 3.1.-3.3. grau unterlegten Gene wurden ausgewählt, um ihre durch die Microarray-Hybridisierung gezeigte differentielle, transkriptionelle Regulation durch die

beiden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände mit einer unabhängigen Methode, der „Real-Time“-PCR, zu verifizieren.

Die Auswahl der zu verifizierenden Gene erfolgte aufgrund von 3 Kriterien. Zum einen wurden Gene verifiziert, die mindestens 2-fach induziert erschienen (s. Tabelle 3.1. und 3.3.) und wo ein deutlicher Unterschied in den Expressionswerten zwischen den Spalten C (hBD-2-ind./LW) und E (hBD-2-inh./LW) bestand. Zum anderen wurden Gene ausgewählt, deren Verifizierung für eine spätere Charakterisierung der hBD-2-induzierenden bzw. hBD-2-inhibierenden Komponenten der verwendeten *P. aeruginosa*-Kulturüberstände am interessantesten erschien, die aber nach der Normalisierung keine 2-fache Expressionsänderung gezeigt hatten. Diese Gene sind in Tabelle 3.4. zusammengefasst.

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
Symbol	Genbezeichnung und Synonyme	Mittelwerte der „Ratios“ Array 1 und Array 3  <b><u>hBD-2 ind.</u></b> <b>LW</b>	Mittelwerte der „Ratios“ Array 2 und Array 4  <b><u>hBD-2-inh.</u></b> <b><u>hBD-2-ind.</u></b>	Multiplikation der „Ratios“ von Spalte C und D  <b><u>hBD-2-inh.</u></b> <b>LW</b>
PI3	Protease Inhibitor 3, skin-derived; Elafin	1,81	0,68	1,23
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, Cox-2	1,48	1,04	1,54
RNase7	RNase7; skin-derived antimicrobial protein 2	1,44	0,78	1,12
S100A9	S100 Calcium Binding Protein A9, Calgranulin B	1,82	0,49	0,90
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$	1,37	1,12	1,53

**Tabelle 3.4. Darstellung der Gene**, die anhand der normalisierten Fluoreszenzintensitäten nur eine geringe Induktion oder Repression durch einen der beiden verwendeten *P. aeruginosa*-Kulturüberstände (hBD-2-ind.; hBD-2-inh.) zeigten.

Zudem wurde die Expression der beiden transkriptionell herunterregulierten Gene, HSPB1 und ITGB4 (s. Tabelle 3.3.), überprüft.

Für die Verifizierung wurden HaCaT-Keratinocyten aus unterschiedlichen Passagen in 2 unabhängigen Ansätzen mit den für die Microarray-Analyse verwendeten *P. aeruginosa*-Überständen erneut für 20 Std. inkubiert. Die Daten aus der Microarray-Hybridisierung wurden außerdem anhand von cDNAs überprüft, die aus derselben RNA-Präparation stammten, die für die Array-Hybridisierung verwendet wurde (s. Abb. 28, RT1.1 und 2.1.). Zusätzliche Experimente mit 6-stündiger Inkubationsdauer sollten Hinweise auf die Zeitkinetik der transkriptionellen Regulation der entsprechenden Gene geben. Um die mittels „Real-Time“-PCR ermittelten Expressionswerte besser darstellen zu können, wurden diese, ebenso wie die „Ratio“-Werte der Microarray-Hybridisierung, zur Basis 2 logarithmiert. Ein  $\log_2$ -Wert von 1 entspricht dabei einer 2-fachen Induktion der Expression (= 2-fold change) und dementsprechend ein  $\log_2$ -Wert von 2 einer 4-fachen Induktion der Expression.

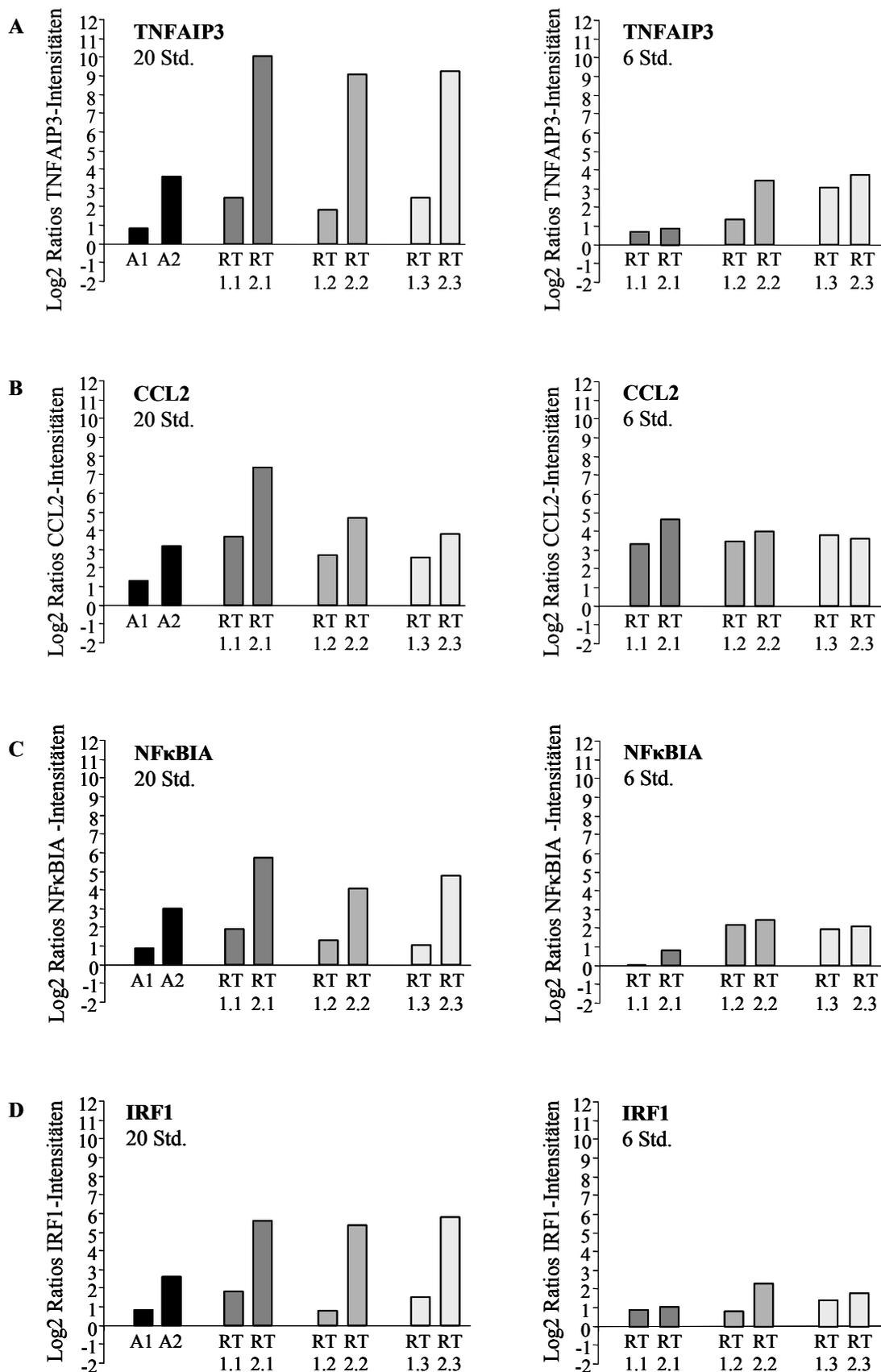


Abb. 28 Verifizierung der anhand der Microarray-Analyse identifizierten differentiellen Genexpression. A-D Vollständige Legende s. S. 81.

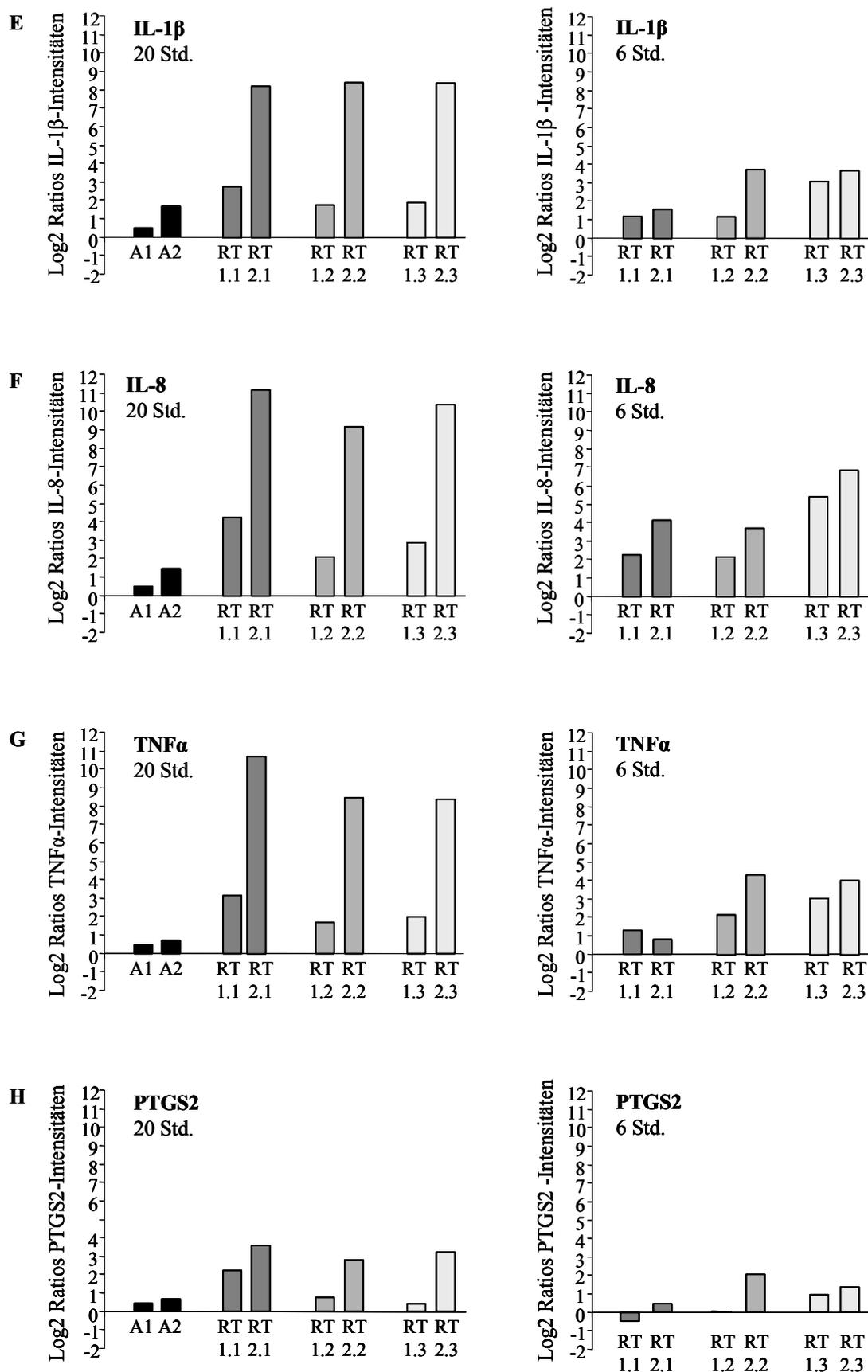


Abb. 28 Fortsetzung: Verifizierung der anhand der Microarray-Analyse identifizierten differentiellen Genexpression, E-H Vollständige Legende s. S. 81.

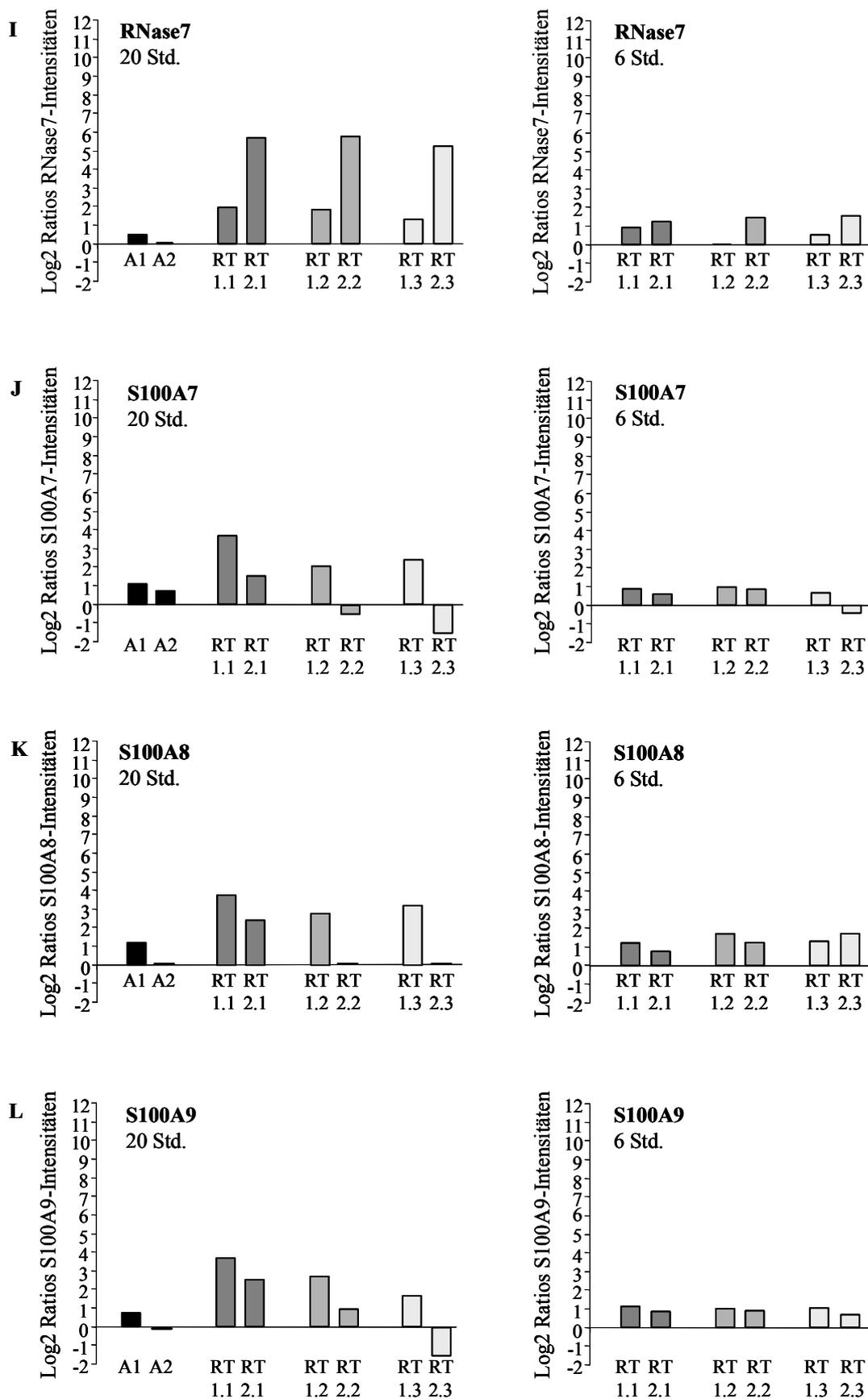
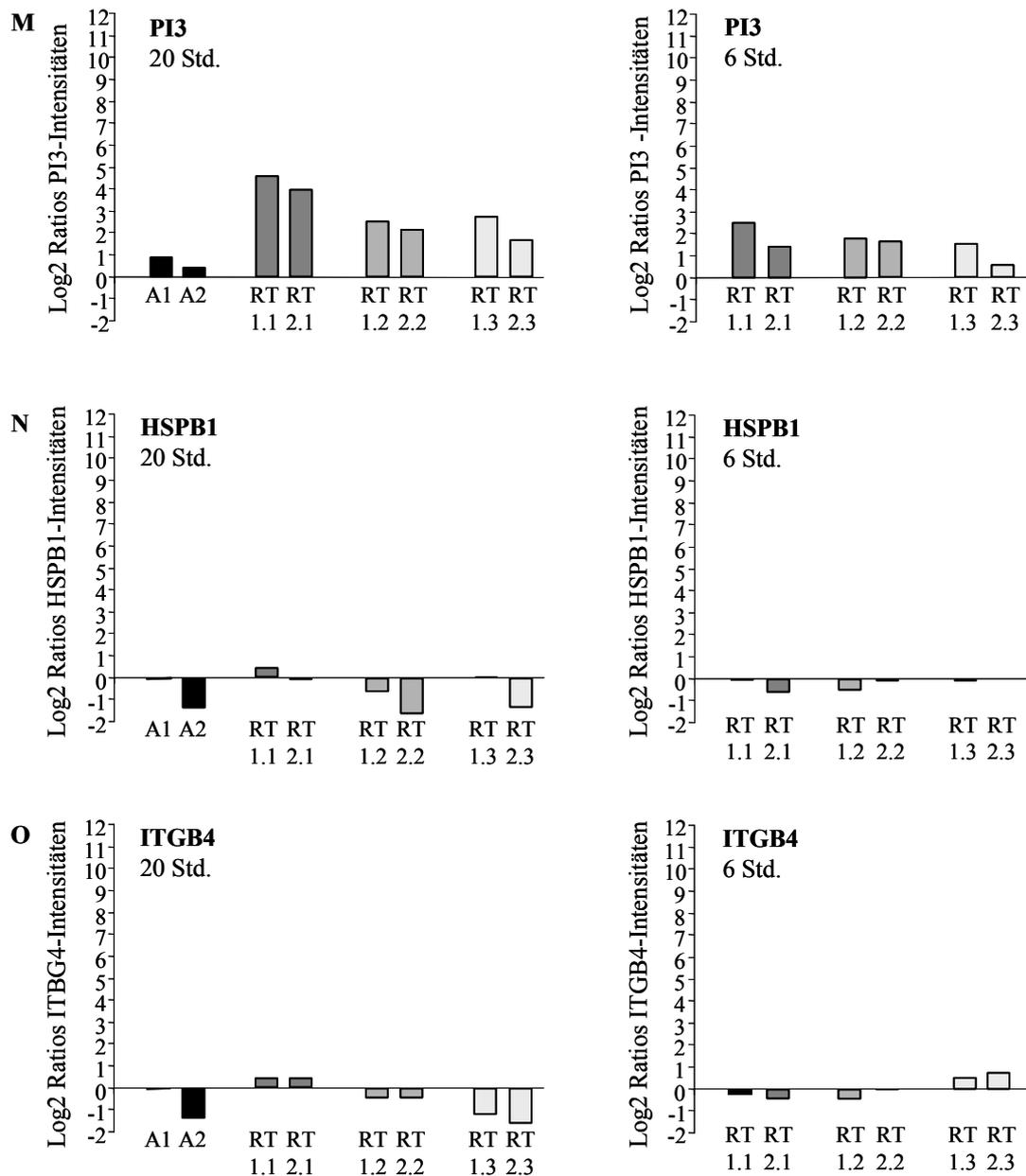


Abb. 28 Fortsetzung: Verifizierung der anhand der Microarray-Analyse identifizierten differentiellen Genexpression, I-L Vollständige Legende s. S. 81.



**Abb. 28 Verifizierung der anhand der Microarray-Analyse identifizierten differentiellen Genexpression.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 20 Std. bzw. 6 Std. mit den beschriebenen *P. aeruginosa*-Kulturüberständen inkubiert und die jeweilige Genexpression mittels „Real-Time“-PCR quantifiziert. In der Abbildung vergleichend dargestellt sind die logarithmierten Intensitätswerte ( $\log_2$  Ratio) der Array-Hybridisierungen (A1 und A2) und die logarithmierten ( $\log_2$ )-Expressionswerte aus der „Real-Time“-PCR (RT). Die Probenbezeichnung im Einzelnen: **A1**: Mittelwert der „Ratios“ der Arrays 1 und 3 (entspricht hBD-2-induzierend gegen LW). **A2**: Mittelwert der „Ratios“ von Array 2 und 4 multipliziert mit dem Mittelwert der „Ratios“ von Array 1 und 3 (entspricht hBD-2-inhibierend gegen LW). **RT1.1**: Inkubation HaCaT, 1.Passage, mit hBD-2-induzierendem *P. aeruginosa*-Überstand; **RT2.1**: Inkubation HaCaT, 1.Passage, mit hBD-2-inhibierendem *P. aeruginosa*-Überstand **RT1.2**: Inkubation HaCaT, 2.Passage, mit hBD-2-induzierendem *P. aeruginosa*-Überstand, **RT2.2**: Inkubation HaCaT, 2.Passage, mit hBD-2-inhibierendem *P. aeruginosa*-Überstand, **RT1.3**: Inkubation HaCaT, 3.Passage, mit hBD-2-induzierendem *P. aeruginosa*-Überstand, **RT2.3**: Inkubation HaCaT, 3.Passage, mit hBD-2-inhibierendem *P. aeruginosa*-Überstand. Die Bezeichnungen 1.1 bis 2.3 gelten sowohl für die 20-stündigen, als auch die 6-stündigen Inkubationen, da die Zellen für die beiden Inkubationsansätze jeweils aus einer gemeinsamen Vorläuferpassage stammten.

Wie aus Abb. 28 hervorgeht, konnte bei den meisten Genen die durch die Microarray-Hybridisierung gezeigte Regulation durch einen der beiden verwendeten Stimuli mittels „Real-Time“-PCR bestätigt werden. Wie die Arraydatenanalyse auch ergeben hatte, wurden TNFAIP3 (A), CCL2 (B), NF $\kappa$ BIA (C), IRF1 (D), IL-1 $\beta$  (E), IL-8 (F), TNF $\alpha$  (G), und PTGS2 (H) durch Inkubation mit dem hBD-2 inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand stärker induziert als bei einer Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden Überstand. TNFAIP3 (A), IL-8 (F), und TNF $\alpha$  (G) wurden insbesondere durch den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand induziert, wobei dieses Ergebnis für TNF $\alpha$  aufgrund der Microarray-Analyse nicht zu erwarten gewesen wäre (Vergleich Tabelle 3.4.). Bei der Regulation von S100A8 (K), S100A7 (J), S100A9 (L) und PI3 (M) verhielt es sich, gemäß den anhand der Array-Hybridisierung ermittelten Daten, entgegengesetzt. Durch Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand war die Expression der entsprechenden Gene höher als bei Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden Kulturüberstand.

Eine Ausnahme zur bisher gezeigten Übereinstimmung der Microarray-Hybridisierungsergebnisse und der „Real-Time“-PCR Ergebnisse stellt die Expression von RNase7 (I) dar. Die Analyse der Array-Daten ergab für eine Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand eine stärkere RNase7-Induktion als bei einer Inkubation mit dem hBD-2- inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand. Dieses Verhältnis stellte sich anhand der „Real-Time“-PCR-Ergebnisse andersherum dar.

Gemäß Tabelle 3.2. sollte die Expression von HSPB1 (N) und ITGB4 (O) durch Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden Überstand noch weiter reprimiert werden als durch Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand. Dies konnte zumindest für HSPB1 für die 20-stündigen Inkubationsansätze bestätigt werden. Für ITGB4 kann diesbezüglich keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Ferner wird aus Abb. 28 deutlich, dass bei einer 6-stündigen Inkubation die Expressionswerte der meisten Gene niedriger liegen als bei einer 20-stündigen Inkubation und die durch Verwendung der beiden Stimuli hervorgerufenen Unterschiede in der Regulation meist eindeutiger bei einer 20-stündigen Inkubation hervortreten. Die Abbildung zeigt außerdem am Beispiel von CCL2 (B), dass es trotz gleich gewählter Bedingungen in verschiedenen Inkubationsansätzen zu einer unterschiedlich starken Regulation kommen kann. Durch eine Inkubation mit dem hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand lag die „Ratio“ in dem ersten, 20-stündigen Inkubationsexperiment (Vgl. Abb. 22, CCL2 (B), Probe RT2.1) bei 7,3, was im nicht-logarithmierten Zustand einer 156-fachen Induktion

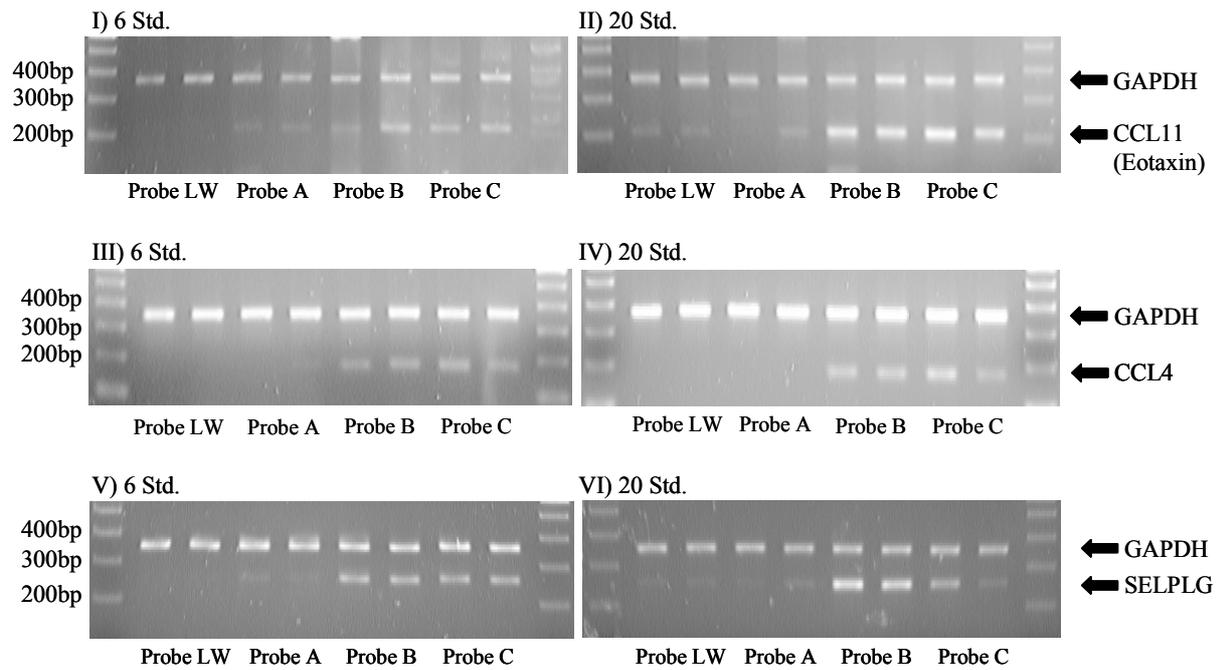
entspricht. Im Folgeexperiment (RT2.2) lag die vergleichbare „Ratio“ bei 4,8, was einer 29,8-fachen Induktion entspricht.

Auffallend in Abb. 28 ist außerdem, dass die aus der „Real-Time“-PCR resultierenden Expressionswerte für jedes Gen größer (bzw. kleiner wie z.B. bei S100A7 (J)) sind als die anhand der Microarray-Hybridisierung ermittelten Werte.

Die in Tabelle 3.1. gezeigte Induktion von TIMP4 („Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4“) und CCR7 durch den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand konnte anhand von „Real-Time“-PCR-Experimenten nicht verifiziert werden. Die „Real-Time“-PCR-Experimente zeigten keine eindeutige Regulation von TIMP4 und CCR7 durch einen der beiden Überstände (Daten nicht gezeigt).

Da CCL11 (Eotaxin) und CCL4 in unstimulierten HaCaT-Keratinocyten nicht exprimiert werden, ließ sich die Expression dieser Gene (s. Tabelle 3.1.) mittels „Real-Time“-PCR nicht quantifizieren. Daher wurde die in Tabelle 3.1. gezeigte Induktion von CCL11 und CCL4 durch den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand mittels RT-PCR bestätigt (s. Abb. 29, I-IV). Die anhand der Micorarray-Analyse gezeigte Induktion von SELPLG durch den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand wurde ebenfalls mittels RT-PCR überprüft und bestätigt (s. Abb. 29, V und VI).

Zusätzlich wurde die Expression der drei letztgenannten Gene nach Inkubation mit einem weiteren hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand, der keine hBD-2-induzierenden Komponenten enthielt, überprüft. Sowohl CCL11 als auch CCL4 und SELPLG wurden durch beide inhibitorischen Überstände induziert.



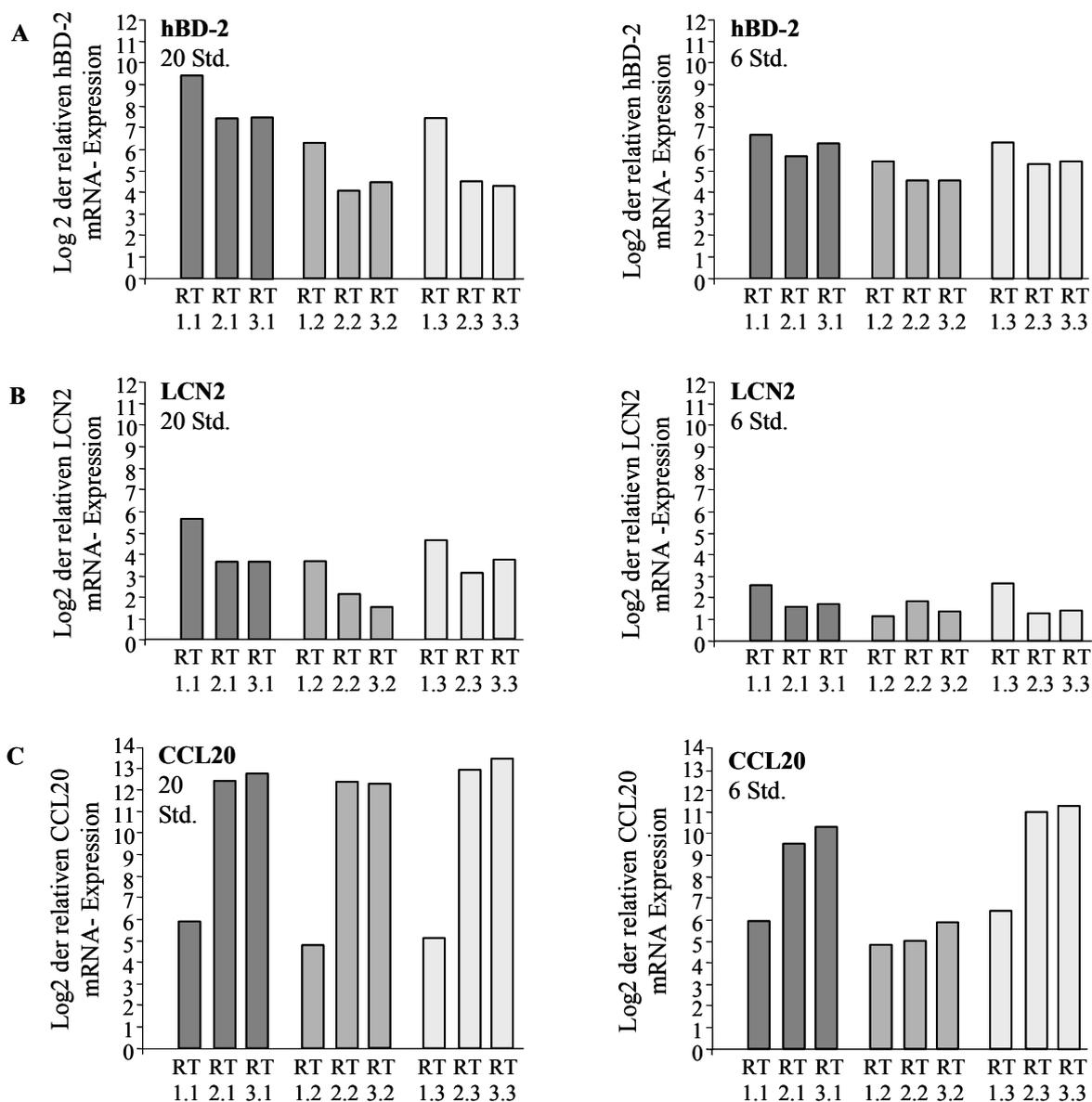
**Abb. 29** Verifizierung der anhand der Microarray-Analyse ermittelten Induktion von CCL11, CCL4 und SELPLG. HaCaT-Keratinocyten wurden jeweils in Doppelansätzen für 6 Std. (I; III; V) und 20 Std. (II; IV; VI) mit den bereits beschriebenen hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen (Probe A), mit hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen (mit hBD-2-induzierenden Komponenten, Probe B) bzw. mit hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen (ohne hBD-2-induzierende Komponenten, Probe C) inkubiert. Die relative Expression von CCL11 (36 Zyklen; I und II), CCL4 (33 Zyklen; III und IV) und SELPLG (35 Zyklen; V und VI) wurde mittels RT-PCR ermittelt. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Inkubationsexperimenten.

### 3.5 Identifizierung weiterer differentiell exprimierter Gene anhand der für die Microarray-Analyse verwendeten mRNAs

Die mittels Microarray-Analyse bereits analysierten mRNA-Proben wurden im Hinblick auf 2 Fragestellungen weiter analysiert. Zum einen wurde überprüft, ob sich die bisher gezeigte Regulation von hBD-2 (Vergleich s. Abschnitt 3.1) durch die hBD-2-induzierenden und -inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände bestätigen ließ. Zum anderen wurde im Hinblick auf eine weitere Charakterisierung der Eigenschaften der verwendeten *P. aeruginosa*-Kulturüberstände untersucht, welchen Einfluß eine Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit den hBD-2-induzierenden und -inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen (mit und ohne hBD-2-induzierende Komponenten) auf die Expression von CCL20 (Chemokine (C-C motif) Ligand 4) und LCN2 (Lipocalin 2) haben. Bei CCL20 handelt es sich um ein CC-Chemokin, welchem zum einen eine wichtige Funktion bei der Initiierung der adaptiven Immunantwort zukommt und welches zum anderen antimikrobielle Eigenschaften aufweist (Starner et al., 2003; Yang et al., 2003; Hoover et al., 2002). LCN2 stellt ein Akute-Phase (*acute phase response*)-Protein im Rahmen der Inflammation dar und hat eine antibakterielle Wirkung (Liu und Nilsen-Hamilton, 1995; Goetz et al., 2002).

Bezüglich der Regulation von hBD-2 (s. Abb. 30A) bestätigten sich die vorher gemachten Beobachtungen nur teilweise. Durch Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand kommt es zu einer höheren hBD-2-Induktion als bei einer Inkubation mit den hBD-2-inhibierenden Überständen, allerdings führen auch Inkubationen mit den hBD-2-inhibierenden Überständen zu einer hBD-2-Induktion. Am Beispiel von RT1.1 (hBD-2-induzierend), RT2.1. (hBD-2-induzierend/inhibierend) und RT3.1. (hBD-2-inhibierend) entsprechen die in Abb. 30 dargestellten Expressionswerte (nicht-logarithmiert) einer maximalen hBD-2-Expression von ca. 740-fach (RT1.1) bzw. ca. 140-fach (RT2.1. und RT3.1.).

LCN2 (s. Abb. 30B) wird wie hBD-2 durch den hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand stärker induziert als durch die hBD-2-inhibierenden Überstände, jedoch sind die Expressionswerte sowohl bei 20- als auch 6-stündiger Inkubation geringer. CCL20 (s. Abb. 30C) dagegen wird bei 20-stündiger Inkubation durch die inhibitorischen Überstände deutlich stärker induziert als bei Inkubation mit dem hBD-2-induzierenden Überstand, wobei dieser Unterschied bei 6-stündiger Inkubation geringer ist .

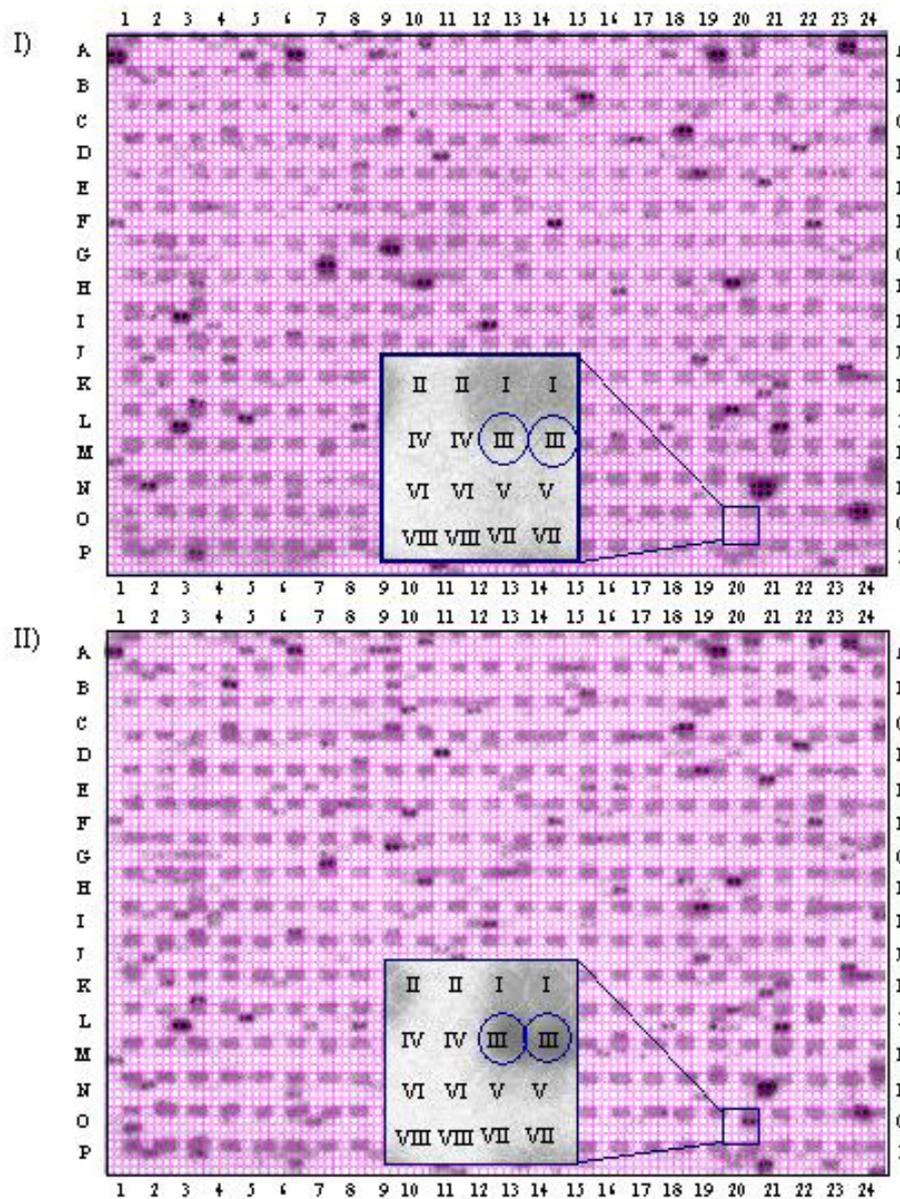


**Abb. 30** **Differentielle Genexpression von hBD-2, LCN2 und CCL20.** HaCaT-Keratinocyten aus verschiedenen Passagen wurden in 3 Inkubationsexperimenten (RT1.1-3.1; RT1.2-3.2; RT1.3-3.3) für 20 Std. bzw. 6 Std. mit den beschriebenen *P. aeruginosa*-Kulturüberständen inkubiert und die jeweilige Genexpression mittels „Real-Time“-PCR quantifiziert. In Anlehnung an Abb. 28 sind in dieser Abbildung die logarithmierten Expressionswerte (log<sub>2</sub>) aus den „Real-Time“-PCR (RT)-Untersuchungen vergleichend dargestellt. Die Probenbezeichnung im Einzelnen: **RT1.1; RT1.2.; RT1.3:** Inkubation HaCaT mit hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Überständen, Passage 1, 2 und 3. **RT2.1; RT2.2; RT2.3:** Inkubation HaCaT mit hBD-2-inhibierendem *P. aeruginosa*-Überstand (mit hBD-2-induzierenden Komponenten), Passage 1, 2 und 3. **RT3.1, RT3.2.; RT3.3.:** Inkubation HaCaT mit hBD-2-inhibierendem *P. aeruginosa*-Überstand (ohne hBD-2-induzierende Komponenten), Passage 1, 2 und 3. Die Bezeichnungen 1.1 bis 3.3 gelten sowohl für die 20-stündigen, als auch die 6-stündigen Inkubationen, da die Zellen für die beiden Inkubationsansätze jeweils aus einer gemeinsamen Vorläuferpassage stammten.

### 3.6 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mit Hilfe der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung

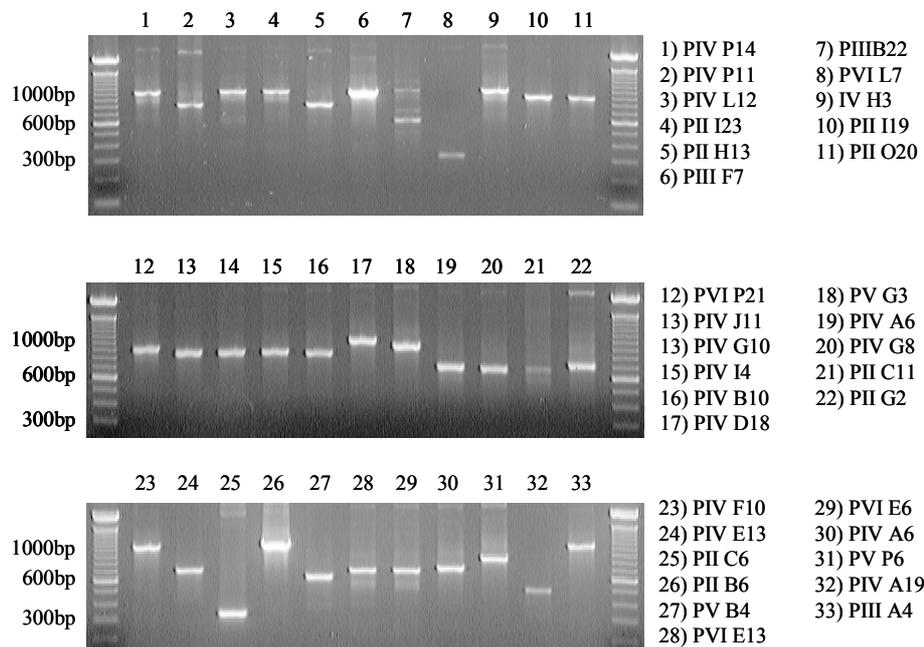
Mit den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Proben wurde die Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH) mit anschließendem „Screening“ nach differentiell exprimierten Genen (mittels Makroarrayanalyse) wie in Abschnitt 2.17.2 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden durch die Filterhybridisierung 33 cDNA-Fragmente identifiziert (s. Tabelle 3.5.), die in HaCaT-Keratinocyten nach einer 6-stündigen Inkubation mit den fraktionierten, hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen gegenüber der Referenzprobe differentiell exprimiert erschienen.

Abb. 31 zeigt den Kontrollfilter LW (I) und den Probenfilter PA (II) mit aufgelegter Koordinatenmaske im Anschluß an die Hybridisierung. Um zu veranschaulichen, wie die Identifizierung von differentiell exprimierten cDNA-Fragmenten erfolgte, zeigt Abb. 31 beispielhaft eine Vergrößerung des Feldes mit der Koordinate O20. Auf dem Kontrollfilter an der Position III dieser Koordinate ist kein Hybridisierungssignal zu erkennen, während auf dem Probenfilter die Replikate dieses Klons mit der Sonde hybridisierten. Die auf diese Weise als „positiv“ identifizierten Klone wurde im Folgenden gemäß der Mikrotiterplatte, auf der sie sich befinden und der entsprechenden Koordinate auf dem Filter gekennzeichnet (hier: PIII O20).



**Abb. 31 Identifikation differentieller Genexpression in HaCaT-Zellen nach SSH: Gegenüberstellung von Kontrollfilter LW (I) und Probenfilter PA (II).** Auf die Filter wurden zusätzlich zu der Positivkontrolle jeweils 2034 Klone aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek aufgebracht. Die Filter wurden mit einem Gemisch bestehend aus der Sonde LW (Kontrolle, I) und der Positivkontrolle bzw. mit einem Gemisch bestehend aus der Probensonde PA (II) und der Positivkontrolle hybridisiert. Das vergrößert dargestellte Feld mit der Koordinate O20 (Mikrotiterplatte III, s. 2.17.1 „Rastermuster“ der auf die Nylonmembran aufgetragenen Klone) enthält einen Klon, der differentiell hybridisierte. Die Positivkontrolle hat in allen Feldern an Position I (s. 2.17.1 „Rastermuster“) gebunden.

Die Größe des jeweiligen Inserts „positiv“ erscheinender Klone wurde mittels Kolonie-PCR (s. 2.13) bestimmt (s. Abb. 32).



**Abb. 32 Überprüfung der jeweiligen Insertgröße mittels Kolonie-PCR.** Die Plasmid-DNA der Klone wurde mit PUC-Primern amplifiziert. Mit diesen Primern wird mittels DNA-Amplifikation und dem Vektor (ohne Insert) als *Template* ein 300 bp großes DNA-Fragment generiert. Von der Größe der in der Abbildung dargestellten Fragmente müssen dementsprechend jeweils 300 bp abgezogen werden, um die richtige Länge des Inserts zu erhalten. Dementsprechend enthalten die Klone PVI L7 und PII C6 (siehe Bahn 8 und 25) als einzige Fragmente, die kleiner als 100bp sind. Dargestellt sind PCR-Produkte nach 30 Zyklen Amplifikation. Die Fragmente wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und für eine Sequenzierung eingesetzt.

Wie Abb. 32 zeigt, haben die meisten Fragmente eine Länge zwischen 500 und 1000 bp (was einer Insertgröße von 200 bis 700 bp entspricht) und liegen somit in dem Größenbereich, der gemäß Protokoll nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym *RsaI* zu erwarten ist.

Die ermittelten Sequenzen der einzelnen PCR-Produkte sind in Tabelle 3.5. zusammenfassend dargestellt. Die auf diese Weise identifizierten Gene wurden gemäß der Funktion der Genprodukte in Gruppen eingeteilt.

Probe/ Klon	Gensymbol (gemäß "Human Gene Nomenclature")	Genbezeichnung/ Alternativbezeichnung	Acc.-No. gemäß NCBI	cDNA- Länge gemäß NCBI	RsaI- Schnitt- stellen	Besonderheiten/ Funktion des Proteins
<b>Gruppe 1: Zytokine/Chemokine</b>						
PIV P14 PIV P11 PIV L12 PII I23 PII H13 PIII F7 PIIIB22 PVI L7 PIV H3	IL-8	Interleukin-8	NM 000584	1666	4	CXC-Chemokin, chemotaktische Wirkung auf Neutrophile (Schröder, 1987)
PII I19 PII O20 PVI P21	CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (CCL2); Small inducible Cytokine A2, Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1)	NM 002982	757	2	CC-Chemokin. Chemotaktischer Faktor für Monozyten, Gedächtnis-T- Zellen und NK-Zellen (Carr et al., 1994; Allavena et al., 1994)
<b>Gruppe 2: Zellzyklus</b>						
PIV J11 PIV G10 PIV I4	BUB3	Budding Uninhibited by Benzimidazoles 3 Homolog	NM 004725	2619	7	Kinetochorprotein, Lokalisation: Mitose- Kontrollpunkt enthält 4 WD40-Repeats (Taylor et al., 1998)
<b>Gruppe 3: DNA-Synthese, Replikation, Organisation, Mutation</b>						
PIV B10	PRIM I	Primase I	NM 000946	1399	3	RNA- Polymerase, die während DNA-Replikation RNA-Primer für die Okazaki Fragmente synthetisiert (Alberts et al., 2001)
PIV D18	HELLS	Proliferation-associated SNF2-like Protein; Actin-dependent Regulator of Chromatin	NM 018063	3156	6	DNA-Replikation, Reparatur, Rekombination (Eisen et al., 1995); 2 Splicevarianten bekannt
PV G3	GMNN	Geminin	NM 015895	1224	4	Inhibitor der DNA- Replikation (McGarry und Kirschner, 1998)
PIV G8	APOBEC 3A	Apolipoprotein B Editing Enzyme; Phorbolin I	NM 145699	1349	3	Cytidin und Deoxycytidylat Deaminase Familie (DNA- Mutations-Aktivität); Zn <sup>2+</sup> - bindende Region ; gelusterte Genfamilie auf Chr. 22; APOBEC 3A: vermutlich ein Pseuogen (Jarmuz et al, 2002)
<b>Gruppe 4: Ribosomale Proteine</b>						
PIV A6	RPS18	Ribosomal Protein S18	NM 022551	549	2	Initiierung der Translation; Pseudogene über das gesamte Genom verteilt
PVI J8	RPLP0	Ribosomal Protein, large, P0; Ribosomal Phosphoprotein, acidic	NM 053275	1145	2	Gehört zu L10P Familie ribosomaler Proteine (Rich und Steitz, 1987); 2 alternative Splicevarianten bekannt
PII C11	RPS27A	Ribosomal Protein S27a Ubiquitin Carboxyl Extension Protein 1	NM 002954	541	1	c-terminales Extensionsprotein von Ubiquitin (Lund et al., 1985)
PII G2	RPL5	Ribosomal Protein L5	NM 000969	1033	2	nucleocytoplasmatischer Transport von 5S RNA (Rudt und Pieler, 2001)

**Tabelle 3.5. Übersicht über die sequenzierten Klone.** Vollständige Legende s. nächste Seite

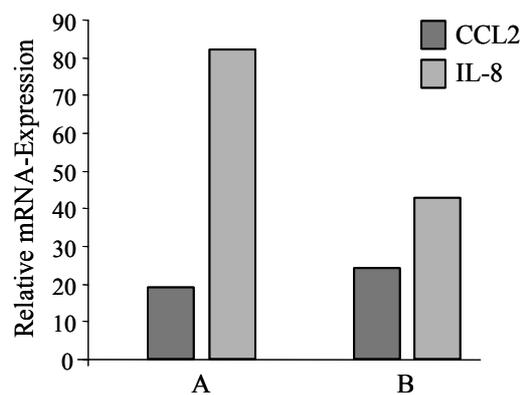
Probe/ Klon	Gensymbol (gemäß "Human Gene Nomenclature")	Genbezeichnung/ Alternativbezeichnung	Acc.-No. gemäß NCBI	cDNA- Länge gemäß NCBI	RsaI- Schnitt- stellen	Besonderheiten/ Funktion des Proteins
Gruppe 5: RNA-Bindung						
PIV F10	RNUXA	RNA U small nuclear RNA export adaptor; Likely ortholog of mouse phosphorylated adaptor for RNA export	AW732607	2904 (vorl.)	3	Neue RNA- Bindungsdomäne, die für den Export von U snRNA aus dem Nukleus zuständig ist (Ohno et al., 2000)
Gruppe 6: Weitestgehend unbekannte Funktion						
PIV E13	Gemäß NCBI: HSPC 154 (noch nicht in „Human Gene Nomenclature“ aufgenommen)	CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells	AF 161503	1347	4	benannt nach 1 von 300 cDNAs, die aus hämatopoetischen Stammzellenzellen identifiziert wurden (Zhang, et al., 2000)
PII B6 PV B4	Gemäß NCBI: SMAP (noch nicht in Human Gene Nomenclature aufgenommen)	Small Acidic Protein; Thyroid Hormone Receptor Coactivating Protein	NM 014267	1637	3	Funktion unbekannt
PVI E13 PVI E6	NCOA7	Nuclear Receptor Coactivator 7 ; ERAP140 (Estrogen Receptor associated Protein)	XM 059748	5441	16	Nukleärer Rezeptor- Koaktivator (Shao et al., 2002)
PIV A19	EPLIN (noch nicht in Human Gene Nomenclature aufgenommen)	Epithelial Protein Lost In Neoplasm beta; Sterol Regulatory Element Binding Protein 3	NM 016357 (vorläufige Sequenz)	3655	6	Verfügt über LIM-Domäne (Protein-Protein- Interaktion); bindet an Actinstressfasern; 2 Isoformen (Chen et al., 2000)
PV P6	Hypothetical protein FLJ20487	-	NM 017841	1250	3	Keine Übereinstimmung mit bekannten menschlichen Proteinen
Gruppe 7: Klonsequenzen						
PIII A4	Klon RP11- 2337C18 Chr.1	-	gi1356001 2	202955 bp DNA		sequenzierter Bereich liegt in ORF*; codiert für kein bekanntes Protein
PII C6	Klon RP11-173P16; Chr. 13	-	gi1356112 3	113850 bp DNA		Sequenzierter Bereich liegt nicht in ORF

**Tabelle 3.5.: Übersicht über die sequenzierten Klone.** Aufgeführt sind die Klone, die nach der Hybridisierung als differentiell exprimiert auf den Filtern erschienen (Vgl. s. Abb. 31) mit der jeweiligen Genbezeichnung, die sich nach einem Datenbankvergleich („Alignment“) mit dem humanen Genom ergab. Soweit vorhanden, sind weitere Informationen zu den sequenzierten Genen dargestellt. In der Tabelle wurden die ermittelten Sequenzen, soweit möglich, ihrer Funktion nach aufgeführt. \* ORF:=Bereich der RNA, der für Protein codiert

Auffällig in Tabelle 3.5. ist, dass einige Gene in mehreren Klonen vorhanden waren. So wurde IL-8 insgesamt 9 mal, und CCL2 und BUB3 jeweils 3 mal sequenziert. SMAP und ERAP wurden je 2 mal sequenziert. Zusammenfassend ergeben sich somit 19 differentiell exprimiert erscheinende Gene.

### 3.6.1 Verifizierung der Gene, die nach erfolgter SSH differentiell exprimiert erschienen

Mit Ausnahme der Klonsequenzen und dem Ribosomalen Protein S18 wurden für jedes in Tabelle 3.5. aufgeführte Gen, soweit möglich, intron-überspannende Primer synthetisiert und die Expression dieses Gens mittels „Real-Time“-PCR überprüft. Dazu wurden in 2 unabhängigen Ansätzen A und B (s. Abb. 33) HaCaT-Keratinocyten mit den für die SSH verwendeten fraktionierten hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen (Vgl. s. 3.1) für 6 Std. inkubiert und die Genexpression mit der in Zellen verglichen, die nicht mit diesem Stimulus inkubiert worden waren. Von den in Tabelle 3.5. dargestellten differentiell exprimierten Genen ließen sich mittels „Real-Time“-PCR zwei Gene, IL-8 und CCL2, verifizieren. Beide wurden durch Inkubation mit den hBD-2-induzierenden, fraktionierten *P. aeruginosa*-Kulturüberständen induziert.



**Abb. 33**      **Differentielle Genexpression von IL-8 und CCL2.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 6 Std. mit Fraktionen (je 8 µl/ml) von Superdex-75-Auftrennungen von hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen („Rohüberstand“ und angesäuertes Überstand) inkubiert. Insgesamt wurden 9 Fraktionen beider Auftrennungen kombiniert und mit 0,5µl/ml Rhamnolipid versetzt. Die Inkubationsexperimente wurden in 2 unabhängigen Ansätzen, A und B, durchgeführt. Mittels „Real-Time“-PCR wurde die relative CCL2 und IL-8 mRNA-Expression bestimmt.

Wie Abb. 33 zeigt, werden CCL2 mit maximal 24-fach (Ansatz B) und IL-8 mit maximal 80-fach (Ansatz A) in HaCaT-Keratinocyten induziert.

### 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das differentielle Genexpressionsmuster in Keratinozyten nach Kontakt mit mikrobiellen Stimuli mit Hilfe von Systematischen Differential Display (SDD)-Analysen, Microarray-Hybridisierungen und Suppressiver Subtraktiver Hybridisierung (SSH) untersucht.

Zunächst wurde anhand von SDD-Analysen das Genexpressionsmuster in primären Keratinozyten nach einer 6-stündigen Inkubation mit Kulturüberständen (MG-Medium, Suspensionskultur) von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *C. albicans* sowie einer HPLC-Fraktion (Anionenaustauscher) von *P. aeruginosa*-Kulturüberständen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Kulturüberstände von *P. aeruginosa* sowie die HPLC-Fraktion die mRNA-Expression von IFIT4, einem funktionell bisher kaum charakterisierten Gen, in Keratinozyten induzieren. Im Gegensatz dazu resultierte die Inkubation mit Kulturüberständen von *S. aureus* und *C. albicans* in keiner IFIT4-Induktion. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Kulturüberstände mukoider *P. aeruginosa* aus statischen MG-Medium-Kulturen IFIT4 höher induzieren als Kulturüberstände nicht-mukoider *P. aeruginosa* aus MG-Suspensionskulturen. Durch Kulturüberstände mukoider *P. aeruginosa*-Überstände ist IFIT4 auch in HaCaT-Keratinozyten induzierbar, wobei eine maximale IFIT4-Induktion nach einer 6-stündigen Inkubation nachweisbar war.

Nähere Analysen der IFIT4-Induktoren aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen zeigten, dass diese sich von hBD-2- und IL-8-Induktoren unterscheiden. Mittels Anionenaustauschchromatographie säurebehandelter *P. aeruginosa*-Kulturüberstände wurde nachgewiesen, dass die IFIT4-Induktoren bei einer höheren Ionenstärke eluieren als die hBD-2- und IL-8-Induktoren. Desweiteren ging aus Inkubationsexperimenten mit Überständen verschiedener *P. aeruginosa*-ATCC-Stämme hervor, dass IFIT4-induzierende Faktoren von anderen ATCC-Stämmen synthetisiert werden als hBD-2- und IL-8-induzierende Faktoren.

Untersuchungen zur Charakterisierung der IFIT4-Regulation ergaben, dass IFIT4 durch Typ I- und Typ II-Interferone induzierbar ist, während andere Zytokine wie TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  IFIT4 nicht induzieren. Dosis-Wirkungsexperimente mit Interferonen zeigten, dass IFIT4 auch bei sehr geringen Dosen (0,01 ng/ml) insbesondere durch IFN $\alpha$ -2a induzierbar ist.

Vergleichende Analysen zur transkriptionellen Regulation von IFIT4 und IP10 belegten, dass beide Gene nach Präinkubation mit Glukokortikoiden durch Interferone vermindert induziert werden. Im Gegensatz zu IP10 wird IFIT4 allerdings nicht durch Koinkubation mit Interferonen und TNF $\alpha$  überexprimiert. Anders als bei IP10 zeigte eine

Retinolsäurebehandlung keinen Einfluss auf die IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -abhängige IFIT4-Induktion, während sich die IFN $\gamma$ -abhängige IFIT4-Induktion durch eine Retinolsäure-Präinkubation verminderte. Mit Hilfe von Inhibitoren und Aktivatoren der Proteinkinase C wurde eine Beteiligung der PKC an der transkriptionellen Regulation von IFIT4 und IP10 nachgewiesen. Untersuchungen zu möglichen Transkriptionsfaktoren, die an der transkriptionellen Regulation Interferon-regulierter Gene wie IFIT4 und IP10 von Bedeutung sein können, zeigten eine Induktion des Transkriptionsfaktors IRF1 durch IFN $\gamma$ , nicht aber durch IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ .

Eine nähere Charakterisierung des Einflusses der von *P. aeruginosa* synthetisierten hBD-2-induzierenden und hBD-2-inhibierenden Faktoren auf die Genregulation in HaCaT-Keratinocyten erfolgte mit Hilfe von Microarray-Analysen. Die „Real-Time“-PCR-Verifizierung der anhand der Microarray-Analyse ermittelten Ergebnisse zeigte, dass *P. aeruginosa*-Kulturüberstände mit hBD-2-induzierenden Komponenten nach einer 20-stündigen Inkubation zu einer verstärkten Induktion von hBD-2, den S100-Proteinen A7, A8 und A9 sowie von PI3 und LCN2 in HaCaT-Keratinocyten führen. Durch Überstände mit hBD-2-inhibierenden Komponenten wurden verschiedene CC-Chemokine (CCL20, CCL11, CCL4 und CCL2), das CXC-Chemokin IL-8 und die proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert. Weitere durch hBD-2-inhibierende Kulturüberstände induzierte Gene waren der Transkriptionsfaktor IRF1, Inhibitoren wie NF $\kappa$ BIA und TNFAIP3 sowie die Prostaglandin-Endoperoxid Synthase (PTGS) 2, der Selektin-P-Ligand SELPLG und die Ribonuklease RNase7. Das Hitzeschockprotein HSPB1 stellt ein Gen dar, welches durch hBD-2-inhibierende Kulturüberstände transkriptionell herunterreguliert wurde.

In einer SSH-Analyse wurde anhand von säurebehandelten und der Molekülgröße nach fraktionierten *P. aeruginosa*-Kulturüberständen vor allem der Einfluss hBD-2-induzierender Faktoren auf die Genexpression von HaCaT-Keratinocyten untersucht. Mittels „Real-Time“-PCR-Experimenten konnte die differentielle Expression der Chemokine CCL2 und IL-8 bestätigt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Techniken zur Untersuchung differentieller Genexpression

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Techniken, die PCR-basierte Systematische Differential Display (SDD), die Microarray-Analyse und die Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH), zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene angewendet. Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile dieser Techniken kurz diskutiert.

Bei der Differential Display (DD) PCR handelt es sich um eine von Liang und Pardee 1992 entwickelte Methode. Das Grundprinzip dieser Methode besteht in der Amplifikation der gesamten mRNA einer Zelle mittels einer begrenzten Anzahl an RT-PCR-Reaktionen. Unter Verwendung einer begrenzten Anzahl an Primer-Paaren sollen dabei nach Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung alle exprimierten Gene identifizierbar und voneinander unterscheidbar sein. Dabei wurde angenommen, dass in einer durchschnittlichen Zelle ca. 15.000 Gene exprimiert werden.

Die Nachteile dieser Ursprungsmethode sind aber v.a. eine geringe Spezifität und damit eine geringe Reproduzierbarkeit. Eine Verbesserung der DD stellt die in dieser Arbeit angewandte Systematische Differential Display (SDD)-PCR gemäß Ke et al. (1999) dar. Die Arbeitsgruppe um Ke et al. (1999) erhöhte die Spezifität der SDD durch Einführung insbesondere von zwei Neuerungen (s. Tabelle 4.1.).

DD gemäß Liang und Pardee (1992)	SDD gemäß Ke et al. (1999)
<b>1). Generierung des DNA-3'-Endes:</b> Verwendung von 12 verschiedenen Oligo (dT)-Primern, die an ihrem 3'-Ende über 2 zusätzliche Basen verfügen, z.B. 5'-T <sub>11</sub> XY-3' (wobei X = A, C, G und Y = A, C, G).	<b>1). Generierung des DNA-3'-Endes:</b> Verwendung von 3 verschiedenen Oligo (dT)-Primern, deren Sequenz eine GC-reiche Region beinhaltet. In dieser Arbeit wurde z.B. verwendet: 5'-CCTGTGCGCCTGGAGCCT <sub>11</sub> X-3' (wobei X = A, C, G).
<b>2). Generierung des DNA-5'-Endes:</b> Verwendung von kurzen (6-7 bp), zufälligen Primersequenzen.	<b>2). Generierung des DNA-5'-Endes:</b> Durch Restriktionsverdau wird eine Schnittstelle für die Adaptorligation geschaffen. An die Adaptoren können lange, GC-reiche Primersequenzen binden, die zudem in ihrer Sequenz in den letzten beiden Basenpaaren variieren und somit die Spezifität der PCR-Reaktionen erhöhen und die Redundanz verringern.
→ geringe Spezifität, hohe Redundanz	→ hohe Spezifität, geringe Redundanz

**Tabelle 4.1.:** Darstellung der Vorteile der SDD-PCR nach Ke et al. (1999) gegenüber der ursprünglichen, von Liang und Pardee (1992) entwickelten DD-PCR.

Zum einen konnten Ke et al. (1999) durch die Verwendung von Oligo (dT)-Primern, deren Sequenz am 3'-Ende nur in einer Base variiert, die Transkription aller verschiedenen mRNAs einer Zelle mit nur 3 Reaktionen durchführen (s. Tabelle 4.1.). Zum anderen verwendeten Ke et al. (1999) für die RT Oligo(dT)-Primer, die in 5'-Richtung um eine GC-reiche Region verlängert waren. Die GC-reiche Region ermöglicht die Durchführung der nachfolgenden PCR-Analysen bei hohen Annealingtemperaturen (hier: 66°C), was die Spezifität der Reaktion erhöht. Eine weitere Neuerung der SDD (Ke et al., 1999) stellte der Verdau der doppelsträngigen cDNA mit einem Klasse IIS Restriktionsenzym dar, um eine Ligationstelle für spezifische Adaptorsequenzen zu synthetisieren, die eine Bindungsstelle für die PCR-Primer darstellen. Damit entfiel die Verwendung von den in der ursprünglichen DD eingesetzten, kurzen (Länge: 6-7 bp) Zufallsprimern (Liang und Pardee, 1992), die nur eine Amplifikation bei geringen Annealingtemperaturen (40°C) erlaubten. Der Vorteil des hier verwendeten Restriktionsenzym MboII ist, dass dieses außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet und dadurch zufällige, 1 bp-Überhänge als Bindungsstelle für die Adaptoren generiert. An die ligierten Adaptorsequenzen können lange (hier: 22 bp), GC-reiche Primer binden, die durch die Variation der letzten beiden Basenpaare an ihrem 3'-Ende zusätzlich zu einer Verminderung der Redundanz dieser Methode führen sollen. Da möglicherweise nicht alle cDNAs über eine MboII-Erkennungssequenz verfügen, sollte ein Verdau mit mindestens einem weiteren Klasse IIS Restriktionsenzym erfolgen, was aufgrund des hohen Aufwands im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht erfolgte.

Obwohl es bei der Durchführung der SDD aufgrund der durch Ke et al. (1999) eingeführten Neuerungen kaum zu der Bildung sogenannter Falsch-Positiver kommen sollte, ließ sich in dieser Arbeit die mit Hilfe der SDD beobachtete differentielle Expression einiger Gene nicht verifizieren (Vergleich s. Tabelle im Anhang, 9.2). Das Auftreten von Falsch-Positiven kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann die RNA-Präparation mit genomischer DNA kontaminiert sein, so dass durch PCR-Reaktionen möglicherweise nicht nur die DNA der Exons sondern auch die der Introns amplifiziert wird. In dieser Arbeit wurde eine derartige Kontamination durch Anwendung einer RNA-Präparation, die eine DNase-Behandlung einschließt, und einer anschließenden Überprüfung der RNA-Reinheit (mittels eines RNA-Kontrollgeles und PCR-Experimenten) ausgeschlossen. Zum anderen entstehen falsch-positive Signale, wenn verschiedene DNA-Sequenzen in einer Bande auf dem SDD-Gel wandern. Die Tabelle im Anhang (s. 9.2) belegt, dass bei der Klonierung der DNA einer Bande teilweise mehrere Klone auftraten, was ein Hinweis auf die Heterogenität der jeweiligen Bande darstellt und mehrfache Sequenzierungen erforderlich machte.

Die Identifizierung falsch-positiver Signale könnte dadurch ermöglicht werden, dass sowohl die RNA-Präparation als auch die reverse Transkription und PCR-Reaktionen in drei voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt werden. Die Anzahl von jeweils 192 PCR-Reaktionen, die pro Probe für eine vollständige Erfassung aller differentiell exprimierter Sequenzen aus der mRNA-Gesamtheit nötig sind, macht die Durchführung von drei unabhängigen Experimenten sehr aufwendig. Aufgründessen wurde hier die SDD auch nur einmal durchgeführt. Zur Detektion Falsch-Positiver bleibt demnach nur die Überprüfung differentieller Genexpression mit Hilfe unabhängiger Methoden.

Die Vorteile der SDD gegenüber anderen Methoden zur Untersuchung differentieller Genexpression sind zum einen, dass sich mehr als zwei Proben vergleichend analysieren lassen. Bei dem in dieser Arbeit gewählten Versuchsansatz, in dem die differentielle Genexpression in HaCaT-Keratinocyten nach Inkubation mit Kulturüberständen von verschiedenen Mikroorganismen analysiert werden sollte, ist somit die Anwendung der SDD vorteilhaft. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die SDD in einem Experiment sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene identifiziert werden können. Dies ist zumindest bei der SSH nicht möglich. Eine in der Literatur umstrittene Frage ist, ob mit Hilfe der SDD auch gering-transkribierte Gene nachweisbar sind oder ob der Nachweis auf mittel- bis hoch-transkribierte Gene beschränkt ist (Übersicht bei Stein und Liang, 2002; Bertioli et al., 1995).

Mit Hilfe von Microarray-Analysen können gering-transkribierte Gene meist nur dann detektiert und von unspezifischen Kreuzhybridisierungen unterschieden werden, wenn mit ausreichend vielen experimentellen Replikaten gearbeitet wird. In der vorliegenden Arbeit wurden 8 individuelle Microarray-Datensätze untersucht. Bei Microarrays der hier verwendeten Größenordnung (ca. 400 gebundene Sequenzen) sollte die untere Nachweisgrenze bei rechnerisch ca. 0,1–10 fg mRNA pro Sequenz liegen (Robert Häsler, persönliche Mitteilung), wobei diese Nachweisgrenze allerdings sequenzabhängig schwankt. Ferner können anhand von Microarray-Hybridisierungen meist nur qualitative Aussagen zur differentiellen Expression von Genen gemacht werden, so dass Microarray-Hybridisierungen nur als „Screening“-Methode angewendet werden sollten. Um die Transkription eines entsprechenden Genes quantitativ bestimmen zu können, ist eine unabhängige Verifizierung der Genexpression z.B. mit Hilfe von „Real-Time“-PCR-Experimenten notwendig. Dieser Unterschied in der Aussagefähigkeit von Microarray-Hybridisierungen und „Real-Time“-PCR-Experimenten wird anhand der hier gezeigten Daten (s. Abb. 28) deutlich. Die mit Hilfe der Microarray-Analyse ermittelten Werte der Genexpressionsänderung („Ratio“) lagen z.B. für TNF $\alpha$  bei 1,37 ( $\log_2=0,45$ ) (für den hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand

gegenüber Kontrollwert) bzw. 1,53 ( $\log_2=0,61$ ; für den hBD-2- inhibierenden Überstand gegenüber Kontrollwert, s. Tabelle 3.4). Mittels „Real-Time“-PCR wurden entsprechende Genexpressionsänderungen von einer „Ratio“ von maximal 3-fach ( $\log_2$ ; s. Abb. 28G) und 10,7-fach ( $\log_2$ ; s. Abb. 28G) festgestellt. Für die meisten der in Abb. 28 dargestellten Gene besteht ein ähnlich deutlicher Unterschied zwischen den anhand der Microarray-Analyse und den anhand von „Real-Time“-Experimenten ermittelten Genexpressionswerten.

Ein weiteres potentiell Problem insbesondere von Microarray-Analysen ist, dass möglicherweise nicht alle möglichen Splicevarianten eines Genes auf dem Array gebunden sind (Michaut et al., 2003). Somit kann die Expression eines Genes u.U. nicht nachgewiesen werden. Bei den hier verwendeten Arrays wurde bei der Herstellung allerdings darauf geachtet, dass von Genen, für die differentielles Splicing beschrieben wurde, die differentiellen Splicevarianten bzw. ubiquitäre Exons auf die Arrays aufgebracht wurden.

Im Gegensatz zu der SDD und SSH ist der Nachweis differentieller Genexpression von unbekanntem Genen mit den hier verwendeten Arrays nicht möglich. Allerdings erlaubte die Anordnung von ca. 400 gut-charakterisierten, entzündungsrelevanten Genen auf den hier verwendeten Arrays indirekt (d.h. durch die Identifikation zahlreicher differentiell exprimierter Gene) eine nähere Charakterisierung der Eigenschaften der untersuchten *P. aeruginosa*-Kulturüberstände. Eine statistisch robuste Auswertung der hier durchgeführten Array-Analysen konnte nicht durchgeführt werden, da die Arrays nur jeweils im Duplikat hybridisiert wurden. Dennoch ließen sich die anhand der Array-Hybridisierung ermittelten Ergebnisse für die meisten der untersuchten Gene verifizieren. Für nur zwei der insgesamt 20 untersuchten Gene, „CC Chemokin Rezeptor (CCR) 7“ und „Tissue Inhibitor of Metalloproteinase“ (TIMP) 4, konnte eine differentielle Genexpression mittels „Real-Time“-PCR-Experimenten nicht bestätigt werden (s. 3.4.1). In der Literatur gibt es bisher allerdings auch keine Hinweise auf eine Expression von CCR7 und TIMP4 in HaCaT-Keratinocyten oder auf unterschiedliche Splicevarianten, die gewebeabhängig exprimiert werden könnten. Die Tatsache, dass mit Hilfe der Microarray-Hybridisierung dennoch eine Induktion von CCR7 und TIMP4 durch hBD-2-inhibierende Kulturüberstände beobachtet wurde (s. Tabelle 3.1.), weist nochmals darauf hin, dass die Microarray-Hybridisierung nur als „Screening“-Methode genutzt werden sollte und eine unabhängige Verifizierung der Ergebnisse notwendig ist.

Die Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH) stellt eine Weiterentwicklung der normalen subtraktiven Hybridisierung durch Diatchenko et al. (1996) dar. Nach der physikalischen Subtraktion nicht-differentieller cDNAs von differentiellen cDNAs ermöglicht

die Methode die selektive Amplifikation von differentiell exprimierten cDNAs, wobei die unerwünschte Amplifikation noch vorhandener nicht-differentieller Gene unterdrückt wird.

Durch die anschließende Hybridisierung kommt es zu einer Normalisierung von gering- und hoch-transkribierten Genen, so dass der Nachweis von gering-transkribierten Genen theoretisch möglich ist (Diatchenko et al., 1996). Dabei können in einem Versuchsansatz, wie auch bei der Microarray-Analyse, nur 2 Proben miteinander verglichen werden. Gemäß Diatchenko et al. (1996) und Untersuchungen z.B. von Kuang et al. (1998) ist die Anzahl sogenannter „Falsch-Positiver“ bei der SSH verhältnismäßig gering. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte allerdings die differentielle Genexpression, die mittels SSH für 19 Gene identifiziert wurde (s. Tabelle 3.5.), für nur zwei Gene, IL-8 und „CC Chemokin Ligand (CCL) 2“ (Abb. 33), mit Hilfe von „Real-Time“-Experimenten verifiziert werden. Die insgesamt geringe Anzahl der differentiell exprimierten Gene mag damit zusammenhängen, dass die für diesen Versuchsansatz gewählte Inkubationsdauer von 6 Std. nicht optimal ist. Eine 6-stündige Inkubationsdauer wurde allerdings gewählt, um direkt durch den Stimulus induzierte Gene identifizieren zu können. Eigene Voruntersuchungen hatten bereits gezeigt, dass nach einer 6-stündigen Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit *P. aeruginosa*-Kulturüberständen Gene wie TNF $\alpha$  oder hBD-2, deren Expression im Zusammenhang mit einer inflammatorischen Immunantwort steht, induziert werden. Für die Detektion weiterer differentiell-exprimierter Gene hätten womöglich mehr als die 2034 bisherigen Klone untersucht werden müssen. Ferner hätte eine längere Exposition der hybridisierten Filter auf dem Phospho-Imager-Film u.U. zu einer besseren Detektion schwach exprimierter Gene führen können (von Stein et al., 1997).

Die mögliche Bedeutung der hier mit Hilfe der SSH und „Real-Time“-Experimenten gesehenen differentiellen Expression von IL-8 und CCL2 im Rahmen einer epithelialen Immunantwort wird in folgenden Kapiteln (s. 4.4.2; 4.4.3) diskutiert.

Für zukünftige Untersuchungen zur differentiellen Genexpression könnte möglicherweise eine Kombination mehrerer Methoden optimal sein. So führten z.B. Yang et al. (1999) eine SSH durch und brachten die als differentiell-exprimiert identifizierten Gene zur Verifizierung auf einen Microarray auf. Dadurch konnten langwierige Verifizierungsexperimente mittels „Real-Time“-PCR-Untersuchungen oder Northern Blot-Analysen vermieden werden.

## 4.2 Die Bedeutung der mikrobiellen Kultivierungsbedingungen für die Untersuchung differentieller Genexpression

Mit Hilfe der SDD konnten nach Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit Kulturüberständen von *S. aureus* bzw. *C. albicans* keine differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, was vermutlich mit den gewählten Kultivierungsbedingungen im Zusammenhang steht. In einer zukünftigen SDD-Analyse müssten demnach die Kultivierungsbedingungen für *S. aureus* und *C. albicans* dahingehend optimiert werden, dass eine Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit *S. aureus*- und *C. albicans*-Kulturüberständen in einer Induktion von inflammatorischen Genen resultiert. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass eine Kultivierung von *S. aureus* in TSB-Medium unter statischen Bedingungen zur Bildung von Faktoren führt, die in HaCaT-Keratinocyten eine Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8 und TNF $\alpha$  bzw. antimikrobiellen Proteinen wie hBD-2 und RNase7 bewirken (Karin Haisch, persönliche Mitteilung). Für *C. albicans* wurde beschrieben, dass eine Inkubation dendritischer Zellen (DZ) mit lebenden *C. albicans* in einer Reifung der DZ und über eine Expression von Zytokinen in der Aktivierung einer Th1-Immunantwort resultierte (Romagnoli et al., 2003). Dazu wurde *C. albicans* in dem sogenannten Lee's Medium bei verschiedenen Temperaturen kultiviert, um die Hefe sowohl in der Hefe- als auch der Hyphenform vorliegen zu haben (Romagnoli et al., 2003).

Die hier diskutierten Arbeiten von Karin Haisch und Romagnoli et al. (2003) weisen darauf hin, dass die Kultivierungsbedingungen, unter denen *C. albicans* und *S. aureus* Induktoren für antimikrobielle Proteine und proinflammatorische Zytokine synthetisieren, von den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen abweichen. Bei einer erneuten vergleichenden Analyse differentieller Genexpression mit Hilfe der SDD würde sich aufgrund der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der verschiedenen Mikroorganismen die Zahl der erforderlichen unstimulierten Kontrollen erhöhen. Dadurch würde die Durchführung dieser Methodik zu aufwendig.

### 4.3 Die Charakterisierung von IFIT4

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass IFIT4 („Interferon-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats“) durch Kulturüberstände von *P. aeruginosa* in Hautkeratinozyten induzierbar ist.

Bei IFIT4 handelt es sich um ein erstmals 1997 beschriebenes Gen (Yu et al., 1997), welches ursprünglich als RIG-G („Retinoic Acid Induced Gene G“) bezeichnet wurde, da es in promyelozytischen Leukämiezellen durch Retinolsäurebehandlung transkriptionell induziert wurde. Später stellte sich heraus, dass RIG-G identisch zu dem später von de Veer et al. (1998) beschriebenen IFIT4 ist. Die Arbeitsgruppe um de Veer et al. (1998) zeigte, dass IFIT4-mRNA in der WISH (Epithelzellen aus der Fruchtblase)- und der HeLa (Humanes Cervixkarzinom)-Zelllinie durch IFN $\alpha$ -2a und IFN $\beta$  induzierbar ist. Durch *in vitro* Transkription und Translation von IFIT4-cDNA ergab sich eine Größe von ca. 60 kD für das IFIT4-Protein (de Veer et al., 1998). Gemäß der „Human Gene Nomenclature“ stellt IFIT4 inzwischen die offizielle Bezeichnung dieses Gens dar. IFIT4 gehört zu einer als „IFI 54-Proteine“ bezeichneten Familie, die aus den 4 Mitgliedern IFIT1 (IFI56), IFIT2 (IFI54), IFIT3 (IFI49) und IFIT4 (IFI60) besteht, deren Funktion bisher allerdings weitestgehend unbekannt ist. Eine mögliche Funktion der IFIT-Proteine bei der viralen Abwehr wird später diskutiert. Charakteristisch für diese Proteinfamilie ist das Vorhandensein von konservierten „Interferon-Stimulated Response Elements“ (ISREs) in den Promotoren und mehreren konservierten „Tetratricopeptide Repeats“ (TPR)-Motiven in den Aminosäuresequenzen. TPR-Motive stellen vermutlich evolutiv alte Aminosäuresequenzen dar, da sie in Eukaryota, Bakterien und Archaea auftreten (Ponting et al., 1999). Einzelne TPR-Domänen bestehen aus ca. 34 Aminosäuren, die zwei miteinander interagierende, amphipatische  $\alpha$ -Helices bilden (Sikorski et al., 1990; Lamb et al., 1995). Mehrere TPR-Domänen können eine rechtsdrehende Superhelix bilden, die die Bindung von Liganden ermöglichen und somit einen neuen Mechanismus für die Proteinerkennung darstellen könnten (Das et al., 1998). TPR-Proteine können offensichtlich verschiedene Funktionen erfüllen, da TPR-Motive z.B. in der Serin/Threonin Phosphatase PP5 (Das et al., 1998), in Mitose-assoziierten Genen wie *cdc23* (Sikorski et al., 1990) sowie in TPR1, einem Protein, welches als Adaptor für Ras- und G-Proteine in der G-Protein vermittelten Signaltransduktion beteiligt sein könnte (Marty et al., 2003), vorkommen.

Yu et al. (1997) transfizierten IFIT4-Expressionsvektoren in Hamsteroovazellen und stellten eine zytoplasmatische Verteilung des IFIT4-Proteins fest. IFIT4 ist somit, ebenso wie

IFIT1 bis 3 (Smith und Herschmann, 1996), ein intrazelluläres Protein. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Datenbankanalysen, durch die ermittelt wurde, dass die IFIT4-Aminosäuresequenz keine Signalsequenzen und Transmembran-Domänen aufweist (Nielsen et al., 1997; Sonnhammer et al., 1998). Yu et al. (1997) fanden in der IFIT4-Aminosäuresequenz potentielle Phosphorylierungsstellen z.B. für die Proteinkinase C (PKC) oder die Kasein Kinase II. Aufgründdessen gehen Yu et al. (1997) davon aus, dass IFIT4 an Kinase-Signaltransduktionswegen beteiligt ist.

Velculescu et al. (1999) zeigten im Rahmen von Expressionsstudien zum Humanen Genom, dass IFIT4 ein ubiquitär vorkommendes Gen ist, welches je nach Zelltyp in 453 bis 1302 Kopien pro Zelle vorliegt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IFIT4-mRNA selektiv durch Kulturüberstände einiger *P. aeruginosa*-Stämme (ATCC 15442, 25668, 33354 und 33348) induzierbar ist, während andere ATCC-Stämme (ATCC 33358 und 27853) zu keiner Induktion von IFIT4 führen (s. Abschnitt 3.3.2). Dies könnte darauf hinweisen, dass nicht alle *P. aeruginosa*-ATCC-Stämme Faktoren synthetisieren, die die IFIT4-Expression induzieren können. Die Induktion von IFIT4 durch die verwendeten *P. aeruginosa*-Kulturüberstände scheint dabei direkt zu erfolgen, da eine maximale Induktion der IFIT4-Expression schon nach 6 Std. festgestellt wurde (s. Abb. 14). Anhand der eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es sich bei den IFIT4-induzierenden Faktoren vermutlich nicht um LPS, Homoserinlaktone, Rhamnolipid oder Exotoxin A handelt. Die genannten Moleküle stellen Faktoren dar, die von *P. aeruginosa* synthetisiert werden und für die eine Induktion von Genen, die an der Regulation der Immunabwehr beteiligt sind (wie z.B. hBD-2 und TNF $\alpha$ ), beschrieben wurde (s. auch Abschnitt 3.3.2.3). Allerdings wurden bei den hier durchgeführten Inkubationsexperimenten käuflich erworbene Substanzen verwendet, deren Reinheitsgrad womöglich nicht ausreichend ist. Bezüglich LPS wurde außerdem beschrieben, dass es in verschiedenen Formen vorliegen kann. Mithilfe von Massenspektrometrie konnten Ernst et al. (1999) aus dem Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose verschiedene Varianten von LPS isolieren. Die LPS-Formen variierten in ihrem Gehalt an Palmitat, Aminoarabinose und dem Grad der Acetylierung des LPS-Bestandteils Lipid A (Ernst et al., 1999). Die Arbeitsgruppe um Ernst (1999) stellte ferner fest, dass eine Inkubation von Endothelzellen mit frisch isoliertem LPS zu einer höheren IL-8-Induktion führt als eine Inkubation mit LPS von klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten. Dies wird von Ernst et al. (1999) als Hinweis darauf gesehen, dass *P. aeruginosa* seine Virulenz u.a. über die Struktur des synthetisierten LPS steuern kann. Um eine mögliche Beteiligung von LPS an der Induktion von IFIT4 zu

untersuchen, wäre es somit sinnvoll, zukünftige Inkubationsexperimente mit frisch isoliertem LPS aus den Überständen der hier verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme durchzuführen. Ähnliches gilt auch für die Verwendung von Rhamnolipiden. Mithilfe von Chromatographie und Massenspektrometrie identifizierten Deziel et al. (1999) 28 verschiedene Rhamnolipide aus Flüssigkulturen von *P. aeruginosa*.

Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich der IFIT4-Induktor von Induktoren für antimikrobielle Proteine wie hBD-2 und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  unterscheidet. So ist der IFIT4-Induktor, anders als der säurestabile hBD-2-Induktor, nicht säurestabil (s. Abb. 16). Ferner werden IFIT4-induzierende Faktoren offensichtlich von anderen *P. aeruginosa*-ATCC-Stämmen (v.a. ATCC 15442, 25668, 33354) synthetisiert als hBD-2- und IL-8-induzierende Faktoren (v.a. ATCC 33354, 33358 und, bei hBD-2, 27853, s. Abb. 16). Der IFIT4-Induktor wird außerdem bei höherer Ionenstärke vom Anionenaustauscher eluiert als der hBD-2- und IL-8-Induktor (s. Abb. 17). Die bisherigen Hinweise reichen jedoch nicht für eine nähere Charakterisierung des IFIT4-Induktors, so dass weitere Untersuchungen nötig sind.

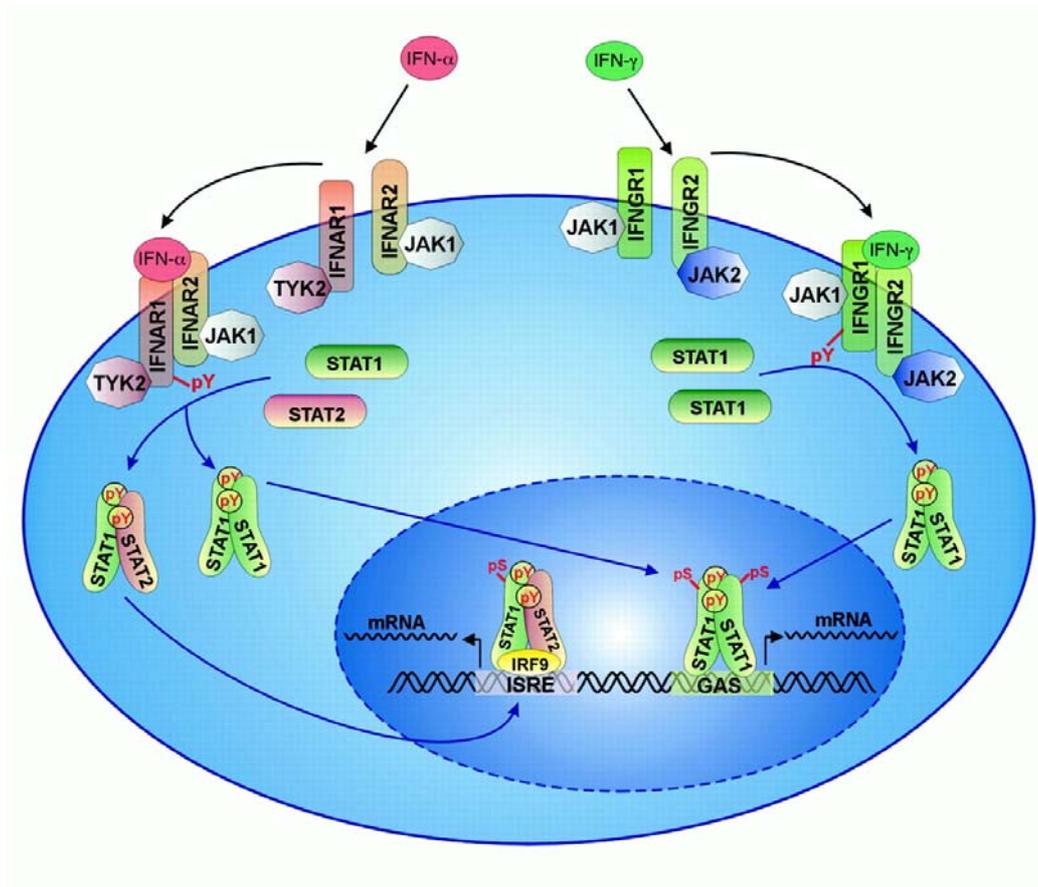
Eine Regulation von IFIT4 durch mikrobielle Faktoren ist in der Literatur nicht beschrieben. Für IFIT1 zeigte allerdings die Arbeitsgruppe um Kato et al. (2003), dass dieses Gen in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) durch synthetische Oligodeoxynukleotide mit unmethylierten CpG-Motiven induziert werden kann. Unmethylierte CG-Dinukleotide, die von bestimmten Basensequenzen flankiert werden (sog. CpG-Motive) kommen im Unterschied zu Vertebraten häufig im Genom von Bakterien vor, so dass die angeborene, humane Immunabwehr im Laufe der Evolution vermutlich gelernt hat, CpG-Motive als „pathogenassoziiert“ zu erkennen (Krieg et al., 1995). Die Erkennung von CpG-Motiven erfolgt über TLR („Toll-Like Receptor“) 9, der von B-Zellen und bestimmten dendritischen Zellen (DZ), sog. plasmazytoiden DZ, exprimiert wird (Hemmi et al., 2000; Kadowaki et al., 2001; Hornung et al., 2002). Die Arbeitsgruppe um Kato geht davon aus, dass die CpG-abhängige IFIT1-Induktion zum Teil auf einen IFN-Rezeptor abhängigen autokrinen und parakrinen Mechanismus der IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -Synthese zurückzuführen ist (Kato et al., 2003).

Für alle Mitglieder der IFI54-Proteinfamilie wurde jedoch beschrieben, dass sie durch Viren induzierbar sind. Mithilfe von Northern Blot- und Differential Display Experimenten zeigten Zhu et al. (1997), dass IFIT2 und IFIT4 in mit HCMV (Humaner Cytomegalovirus) infizierten, humanen Vorhautfibroblasten induziert werden. Nachfolgende Arbeiten von Boyle et al. (1999) zeigten, dass das Glykoprotein B, welches für HCMV einen essentiellen

Replikationsfaktor darstellt und bei dem Kontakt des Virus mit der Wirtszelle von Bedeutung ist, IFIT2 in Fibroblasten induziert. Auch für andere Viren wie den Herpes Simplex Virus Type I (HSV-1) wurde demonstriert, dass sie die Expression von IFIT-Genen induzieren. So zeigten Nicholl et al. (2000), dass der HSV-1 IFIT1 und 2 in Fibroblasten induziert. In Mäusen, die mit dem Japanischen Enzephalitisvirus infiziert wurden, konnte mit Hilfe von Northern Blots in den Gehirnzellen eine Induktion von IFIT3 festgestellt werden (Saha und Rangarajan, 2003).

IFIT4 gehört, ebenso wie IFIT1 bis 3, zu den „Interferon-Stimulated Genes“ (ISGs) (de Veer et al. 1998), so dass dies einen offensichtlichen Zusammenhang zu der virenabhängigen Induzierbarkeit darstellt. Neben ihrer Funktion in der angeborenen Immunabwehr gegen Bakterien und Protozoen, sind Interferone v.a. in der Lage, die Replikation von Viren in der Wirtszelle zu inhibieren (Übersicht bei Decker et al., 2002).

Bei den Interferonen (IFNs) werden 2 Typen unterschieden. Die Typ I-Interferone umfassen verschiedene IFN $\alpha$ -Subtypen sowie IFN $\beta$  und IFN $\omega$ . Typ I-Interferone können bei entsprechender Stimulation beispielsweise durch Viren oder Glukokortikoid-Hormone im Prinzip von jedem Zelltyp gebildet werden (Übersicht bei Decker et al., 2002). IFN $\gamma$  dagegen ist ein Typ II-Interferon und wird nur von bestimmten Zellen (aktivierte Natürliche Killerzellen, aktivierte Th1-Zellen, aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen) gebildet (Übersicht bei Decker et al., 2002). IFN $\gamma$  wirkt nicht nur antiviral, sondern aktiviert im Rahmen der angeborenen Immunabwehr auch Makrophagen (Murray, 1992). Die Signaltransduktion von Interferonen ist in vereinfachter Form in Abb. 34 dargestellt.



**Abb. 34 JAK-STAT-Signaltransduktion nach Stimulation mit Typ I- und Typ II-Interferonen.** Typ I-Interferone binden an einen Rezeptor, der aus dem IFN $\alpha$  Rezeptor I (IFNAR1) und IFNAR2 besteht und mit den Janus Kinasen (JAKs) JAK1 und Tyrosinkinase (TYK) 2 assoziiert ist. Nach der Ligandenbindung bindet der Rezeptorkomplex STAT 1 und 2 („Signal Transducers and Activators of Transcription“) durch deren SH (src homology) 2-Domänen, wodurch diese phosphoryliert werden und somit die Bildung von zwei Transkriptionsfaktorkomplexen initiieren. „Interferon-stimulated Transcription Factor (ISGF) 3“ ist ein heteromerer Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF9 („Interferon Regulatory Factor 9“), welcher Gene mit sogenannten „Interferon-Stimulated Response Elements“ (ISRE) in der Promotorregion aktiviert. Der andere Komplex ist ein STAT1-Homodimer, der an verschiedene DNA-Sequenzen, als „IFN $\gamma$ -Activated Sites“ (GAS)-Elemente bezeichnet, bindet. Der IFN $\gamma$ -Rezeptor ist dem Typ I-Interferonrezeptor strukturell ähnlich und besteht aus den IFN $\gamma$ -Rezeptor 1 (IFNGR1)- und IFNGR2-Ketten, die mit JAK1- und JAK2-Kinasen assoziiert sind. Durch die Ligandenbindung kommt es nach Tyrosinphosphorylierung zur Bindung von STAT1. Es formieren sich STAT1-Homodimere, die die Transkription von Promotoren regulieren, die GAS-Elemente enthalten (nach Decker et al., 2002).

Außer dem ISGF3-Komplex aus STAT-Proteinen und IRF9 (s. Abb. 34) können auch andere Proteine an das ISRE-Element binden. Dazu gehören u.a. IRF („Interferon Regulatory Factor“) 1, 2, 3 und 7 (Wong et al., 2002). Tabelle 4.2. gibt eine Übersicht über einige mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen im IFIT4-Promotor, der Bindungsstellen für IRF1, STAT1 und ISREs enthält.

Transkriptionsfaktor	Konsensussequenz der Bindungsstelle	Lokalisation (Relativ zum Transkriptionsstart)	Referenzen
AP-1	NTGASTTCAG	-214; -207; -81	*
CAAT-Box	NNRRCCAATSA	-303; -183	Bucher, 1990; *
CEBPB	RNRTKDNMGMAAKNN	-398; -83	Akira et al., 1990; *
IRF1	SAAAAGYGAAACC	-428	Tanaka et al, 1993 ; *
IRF2	GAAAAGYGAAASY	-155; -121	Tanaka et al, 1993 ; *
ISRE	CAGTTTCWCTTTYCC	-156; -122; -109	Levy et al., 1988 ;*
NFAT	NNNWGGAAAANN	-426; -391; -150	Kel et al., 1999 ; *
STAT1	TTCCCRKAA	-95	Horvath et al., 1995;*
USF1	NNRYCACGTGRYNN	-297	Bendall und Molloy, 1994;*

**Tabelle 4.2. Darstellung einiger möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Promotorbereich von IFIT4.** Der Promotorbereich von IFIT4 (Accession-No. gemäß NCBI: AF083471; Länge: 501 bp vor Transkriptionsstart) wurde mit Hilfe der \*TRANSFAC-Datenbank auf potentielle Bindungsstellen hin analysiert. Die Analyse bezieht sich sowohl auf den + (codierenden)-Strang als auch den – (nicht-codierenden)- Strang der DNA. Basencode: K = G oder T; N = A oder C; R = A oder G; S = G oder C; W = A oder T; Y = C oder T (wobei A = Adenin; C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin).

Durch andere Arbeitsgruppen wurde bereits eine IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -Induktion von IFIT4 beschrieben, wohingegen eine IFN $\gamma$ -abhängige IFIT4-Induktion, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bisher erst einmal beschrieben wurde. Der et al. (1998) zeigten anhand von Microarray-Analysen, dass IFIT4 in HT1080-Zellen (= Zelllinie aus hochmalignem Fibrosarkom) sowohl durch IFN $\alpha$  als auch IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  (je 1000 IU/ml) induzierbar ist. Durch Yu und Mitarbeiter (Yu et al., 1997) wurde demonstriert, dass die IFIT4 mRNA-Expression in der promyelozytischen Zelllinie NB4 innerhalb von 30 Minuten durch rekombinantes IFN $\alpha$  (500 U/ml) induzierbar ist. Wie bereits erwähnt (s.o.), fanden de Veer et al. (1998), dass die IFIT4 mRNA-Expression in der HeLa (Humanes Cervixkarzinom)-Zelllinie und der WISH (Humanes Fruchtblasenepithel)-Zelllinie innerhalb von 6 Std. durch IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  induzierbar ist. Die Arbeitsgruppe um de Veer verwendete offensichtlich dasselbe wie in dieser Arbeit verwendete IFN $\alpha$ -2a der Fa. Roche, allerdings in einer wesentlich höheren Konzentration (100 IU/ml). Die geringste in dieser Arbeit verwendete IFN $\alpha$ -2a-Konzentration, die noch zu einer IFIT4-Induktion führte (s. Abb. 20), lag bei 0,3 IU/ml (entsprechend 0,01 ng/ml). Somit würde IFN $\alpha$ -2a einen äußerst potenten Stimulus für IFIT4 darstellen, der um das ca. 250-fache potenter wäre als das hier verwendete IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  (Vergleich s. Abb. 20). Auch Zhu et al. (1997) haben eine IFN $\alpha$ -abhängige Induktion (500 IU/ml) von IFIT4 in humanen Vorhautfibroblasten beschrieben. Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern gegen HCMV bzw. IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  konnten Zhu et al. (1997) in Northern Blot-Analysen jedoch auch zeigen, dass eine HCMV-vermittelte Induktion von IFIT4 vermutlich nicht über in der Zelle synthetisierte Interferone, sondern direkt durch

Virenpartikel erfolgt. Auch bei Zugabe von Cycloheximid, welches die Proteinsynthese in der Zelle blockiert, induzierte HCMV die IFIT4 mRNA-Expression (Zhu et al., 1997). Für IFIT2 wurde ein Faktor beschrieben, der für eine derartige proteinunabhängige Induktion von IFIT2 nach einer HCMV-Infektion verantwortlich sein könnte (Navarro et al., 1998). Navarro et al. (1998) beschrieben, dass in HCMV-infizierten Vorhautzellen die IFIT2-Transkription durch einen bis dahin unbekanntem ISRE-Komplex erfolgt, der u.a. aus IRF3 („Interferon-Regulatory Factor 3“) und CBP („Transcriptional Coactivator CREB Binding Protein“) besteht. Die Arbeitsgruppe um Navarro geht davon aus, dass eine Aktivierung von ISGs („Interferon-Stimulated Genes“), die unabhängig von der *de novo*-Synthese von Interferonen erfolgt, eine schnellere Aktivierung der antiviralen Abwehr ermöglichen könnte.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -abhängige Induktion von IFIT4 durch Präinkubation mit Dexamethason, einem Glukokortikoid, vermindert werden konnte (s. Abb. 23). Bei Inkubation mit IFN $\gamma$  führte eine Präinkubation mit Dexamethason nicht zu einer Verringerung der IFIT4-Expression (s. Abb. 23), was u.U. darin begründet sein könnte, dass IFN $\gamma$  an andere Zelloberflächenrezeptoren bindet (s. Abb. 34). Eine Dexamethason-abhängige Verringerung der IFIT4-Expression bei Stimulation von HeLa (Humanes Cervixkarzinom)- und WISH (Epithelzellen aus der Fruchtblase) -Zelllinien mit IFN $\alpha$ , jedoch nicht mit IFN $\beta$ , wurde bereits von de Veer et al. (1998, s.o.) beschrieben. Glukokortikoid-Hormone werden in der Nebennierenrinde gebildet und wirken anti-inflammatorisch, indem sie die Expression von Genen, die an einer Entzündungsreaktion beteiligt sind, regulieren. So inhibieren Glukokortikoide die Induktion von iNOS („Inducible Nitric Oxide Synthase“), TNF $\alpha$ , IL-8, Cox-2 („Cyclooxygenase-2“, PTGS2) und anderen Genen und verhindern so eine unkontrollierte Aktivierung inflammatorischer Mediatoren (Smith et al., 2002; Übersicht bei Sapolsky et al., 2000). Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse und der Ergebnisse von de Veer et al. (1998) kann IFIT4 vermutlich der Gruppe der sogenannten GARGs („Glucocorticoid-attenuated Response Genes“) zugeordnet werden. Zu den GARGs gehören neben den oben genannten (iNOS, TNF $\alpha$ , IL-8, Cox-2) auch IFIT1 bis IFIT3, sowie IRF1, IP10 („Interferon  $\gamma$ -Inducible Protein 10), MCP-1 („Monocyte Chemoattractant Protein“), MIG („Monokine Induced by IFN $\gamma$ “) und SELPLG („Selectin P-Ligand“) (Smith et al., 2002; Smith und Herschman, 1995; Smith und Herschman, 1996).

Untersuchungen von Pelicano et al. (1997) in HepG2-Zellen (Hepatomzelllinie) hatten gezeigt, dass Retinolsäure (RA) den Transkriptionsfaktor IRF1 durch ein GAS-Element in dessen Promotor induziert und darüber vermutlich die Induktion und Sekretion von IFN $\alpha$

erfolgt. IRF1 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, welches u.a. im Zusammenhang mit der antiviralen Funktionsweise von Interferonen gesehen wird (Kimura et al., 1994).

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass in HaCaT-Zellen RA nach 24-stündiger Inkubation IRF1 kaum induziert (Abb. 24C). Eine Inkubation mit IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  führt ebenfalls zu keiner IRF1-Induktion, wohingegen IFN $\gamma$  IRF1 in HaCaT-Zellen induziert (Abb. 24C). Von Der et al. (1998) durchgeführte Microarray-Analysen belegten, dass IRF1 in HT1080-Zellen (= Zelllinie aus hochmalignem Fibrosarkom) hauptsächlich durch IFN $\gamma$ , und weniger durch IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  induzierbar ist. Dies und die eigenen Ergebnisse könnten möglicherweise als ein Hinweis darauf gesehen werden, dass die gezeigte IFIT4-Induktion durch Typ I- und Typ II-Interferone durch unterschiedliche Mechanismen erfolgt. Demnach wäre möglich, dass eine IFN $\gamma$ -abhängige IFIT4-Induktion über den Transkriptionsfaktor IRF1 erfolgt, wohingegen eine IFN $\alpha$ - bzw. IFN $\beta$ -abhängige Induktion vermutlich nicht über IRF1 erfolgt. Eine IFN $\alpha$  - und IFN $\beta$  - abhängige IFIT4-Induktion könnte entweder über den Transkriptionsfaktorkomplex ISGF3, der an ISRE bindet, (s. Abb. 34) oder über IRF („Interferon Regulatory Factor“) 3 bzw. 7 erfolgen. Bei IRF3 handelt es sich um einen konstitutiv exprimierten, ubiquitär vorkommenden Faktor (Au, 1995), der an ISREs binden kann. Durch Interaktion mit weiteren Proteinen, die durch eine virale Infektion oder IFNs aktiviert werden, könnte IRF3 die Transkription von Zielgenen steuern (Au, 1995). Über mögliche Interaktionspartner von IRF3 ist bisher jedoch wenig bekannt. Wie bereits erwähnt, bildet IRF3 möglicherweise mit CBP („Transcriptional Coactivator CREB Binding Protein“) einen Komplex, der an ISRE im IFIT2-Promotor bindet (Navarro et al., 1998). Navarro und David (1999) beschrieben eine LPS-abhängige IRF3-Aktivierung, die zur Bindung von IRF3 an ISRE führt. Yamamoto et al. (2003) zeigten *in vivo*, dass eine Aktivierung von TLR4 durch LPS zu einer Induktion von IFN-induzierbaren Genen wie IFIT2 und IP10 führt. Die Arbeitsgruppe um Yamamoto (2003) beobachtete, dass diese Aktivierung unabhängig von MyD88, einem Adaptorprotein von TLR4, über eine bisher nicht beschriebene Signalkaskade erfolgt. In dieser Signaltransduktion ist TIRP („Toll/IL-1 Receptor Domain Containing Protein“, auch bezeichnet als TRAM) involviert, ein kürzlich als weiteres Adaptorprotein von TLR4 identifiziertes Protein, welches IRF3 aktiviert und somit die Transkription IFN-induzierbarer Gene kontrollieren kann (Yamamoto et al., 2003). Sollte sich in weiteren Untersuchungen zeigen, dass IFIT4, ebenso wie IFIT2, durch LPS induzierbar ist, dann wäre eine Bedeutung von IRF3 bei der Signaltransduktion möglich, zumal die Expression von TLR4 für Keratinozyten beschrieben wurde (Pivarcsi et al., 2003).

Im Gegensatz zu IRF3 ist IRF7 ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich bei der autokrinen und parakrinen Aktivierung von ISGs eine Rolle spielt (Marie et al., 1998). IRF7 wird erst aktiviert, wenn intrazellulär IFN gebildet wurde, welches nach der Sezernierung wieder die IFN-Signaltransduktion aktiviert. Das daraufhin gebildete IRF7 könnte theoretisch über das ISRE-Element des IFIT4-Promotors (s. Tabelle 4.2.) die Transkription von IFIT4 aktivieren.

Ferner war auffällig, dass RA allein keine Induktion von IFIT4 bewirkte (s. Abb. 24). In promyelozytischen Leukämiezellen wurde IFIT4 mRNA durch RA innerhalb von 6 Std. induziert (Yu et al., 1997). Es besteht also offensichtlich ein Unterschied in der RA-abhängigen Induzierbarkeit von Genen in verschiedenen Zelltypen. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass eine Präinkubation mit RA zu keiner Änderung der IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -abhängigen IFIT4-Induktion führte, während die RA-Präinkubation die IFN $\gamma$ -abhängige IFIT4-Induktion verminderte (Abb. 24). Dies würde bedeuten, dass RA die IFN $\gamma$ -vermittelte Signaltransduktion, die zur Aktivierung des IFIT4-Promotors führt, blockieren kann. Eine direkte Inhibition von GAS-Elementen oder ISRE-Elementen durch RA ist bisher nicht beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass RA in Keratinozyten den Transkriptionsfaktor AP-1, wie er auch im IFIT4-Promotor vorkommt (s. Tabelle 4.2.), inhibiert (Goyette, 2000). Für IFI16 („Interferon  $\gamma$ -Inducible Protein 16“), einen transkriptionellen Regulator, der Zellwachstum inhibiert, wurde gezeigt, dass IFN $\gamma$  zusammen mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 IFI16 aktiviert. Somit wäre es u.U. möglich, dass eine IFN $\gamma$ -vermittelte IFIT4-Aktivierung durch eine RA-abhängige AP-1-Inhibition verhindert würde. Cippitelli et al. (1996) konnten anhand ihrer Ergebnisse darstellen, dass in Jurkat-Zellen (humane CD4+-T-Zelllinie) die Transkription von IFN $\gamma$  durch RA inhibiert wird. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass der Transkriptionsfaktor „Upstream Stimulatory Factor (USF) 1“ bei der RA-abhängigen Inhibition des IFN $\gamma$ -Promotors involviert sein muß. Wie Tabelle 4.2. zeigt, verfügt der IFIT4-Promotor über ein potentielle USF1-Bindungsstelle, so dass die hier gesehene RA-abhängige Inhibition von IFIT4 nach Inkubation mit IFN $\gamma$  möglicherweise mit USF1 in Zusammenhang stehen könnte.

Bezüglich IRF1 ist interessant zu erwähnen, dass eine Inkubation von A549-Zellen (Zelllinie von humanem Lungenkarzinom) mit Wildtyp-*P. aeruginosa* (Stamm PAK) zu einer Induktion von IRF1 führt, wie Ichikawa et al. (2000) anhand von Microarray-Analysen belegten. Wie die Arbeitsgruppe um Ichikawa (2000) vermutet, resultiert die IRF1-Induktion hierbei aus einer direkten Interaktion der Bakterien mit den Lungenzellen. Eigene Untersuchungen (s. 3.3.4) hatten ergeben, dass Inkubationen mit *P. aeruginosa*-

Kulturüberständen nicht zu einer IRF1-Induktion führten, was möglicherweise darin begründet ist, dass hier Kulturüberstände und keine Bakterienzellen verwendet wurden.

Ein weiterer Hinweis für die mögliche Regulation der IFIT4-Induktion ist der Einfluss der Proteinkinase C (PKC) auf die transkriptionelle IFIT4-Regulation. Aus Abb. 25 geht hervor, dass die IFN-abhängige IFIT4-Induktion bei Koinkubation mit Calphostin C, einem PKC-Inhibitor, vermindert wird. Bei Koinkubation mit PMA, einem PKC-Aktivator, wird die IFN $\gamma$ -abhängige IFIT4-Induktion wieder gesteigert, bei IFN $\alpha$ -2a und IFN $\beta$  ist die IFIT4-mRNA-Expression bei Koinkubation mit PMA geringer als bei der IFN $\alpha$ -2a- und IFN $\beta$ -Inkubation allein. Calphostin C und PMA wirken dabei auf fast alle bisher bekannten PKC-Proteine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ). Sowohl für Typ I- als auch Typ II-Interferone wurde beschrieben, dass sie ein Mitglied der PKC-Proteinfamilie, PKC  $\delta$ , aktivieren (Uddin et al., 2002; Deb et al., 2003). Uddin et al. (2002) zeigten, dass eine Aktivierung des Typ I-Interferonrezeptors zu einer Aktivierung von PKC  $\delta$  führt, wobei diese Aktivierung offensichtlich für die Phosphorylierung von STAT1 (an Serin 727) von Bedeutung ist. Eine Inhibition von PKC  $\delta$  resultierte in einer verminderten Transkription von ISGs („Interferon-Stimulated Genes“) durch ISRE- und GAS-Elemente (Uddin et al., 2002). Ebenso führt eine Aktivierung des Typ II-Interferonrezeptors durch IFN $\gamma$  zu einer Aktivierung von PKC  $\delta$ , welche direkt STAT1 phosphoryliert (Deb et al., 2003). Der PKC kommt demnach bei der IFN-Rezeptor-vermittelten Aktivierung von ISGs eine Bedeutung zu, was im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen steht (s. Abb. 25).

Um durch mögliche Ähnlichkeiten in der Regulation weitere Hinweise auf die Funktion von IFIT4 zu bekommen, wurde ein Vergleich der transkriptionellen Regulation von IFIT4 und IP10 durchgeführt (s. Abb. 20 bis Abb. 25).

IP10 stellt ein CXC-Chemokin dar, welches u.a. in Keratinozyten synthetisiert wird (Boorsma et al., 1998). Untersuchungen von Cole et al. (2001) demonstrierten, dass IP10 Defensin-ähnliche antimikrobielle Aktivitäten gegen *E. coli* und *Listeria monocytogenes* aufweist. IP10 ist durch virale dsRNA z.B. in Fibroblasten induzierbar (Proost et al., 2003) und zeigt eine chemoattraktive Wirkung auf humane Monozyten, T-Lymphozyten und Natürliche Killer (NK)-Zellen (Taub et al., 1993; Loetscher et al., 1996). Ferner ist IP10 bei verschiedenen Th1-abhängigen Erkrankungen wie z.B. der Psoriasis involviert (Gottlieb et al., 1988; Flier et al., 2001).

Im Gegensatz zu IFIT4, welches v.a. durch Inkubation mit IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  induziert wurde, lässt sich IP10 insbesondere durch IFN $\gamma$  induzieren (s. Abb. 20). Letzteres geht mit

der Tatsache einher, das IP10 ursprünglich in IFN $\gamma$ -aktivierten Monozyten identifiziert wurde und als „Interferon  $\gamma$ -Inducible Protein 10“ bezeichnet wurde (Luster et al., 1985).

Die IFN-abhängige Induktion beider Gene verringert sich allerdings durch Präinkubation mit Dexamethason (s. Abb. 23), so dass beide Gene den sogenannten GARGs zugeordnet werden können. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen von Smith und Herschman (1995), die IP10 in einer Fibroblastenzelllinie als ein GARG identifizierten.

Eine TNF $\alpha$ -abhängige Induktion von IFIT4 konnte in den hier durchgeführten Arbeiten nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 19). Ebenso konnte eine Überexpression von IFIT4 nach Koinkubation mit IFNs und TNF $\alpha$ , wie sie für IP10 beschrieben (Boorsma et al., 1998) und in dieser Arbeit dargestellt wurde (Abb. 22), nicht gezeigt werden. TNF $\alpha$  ist ein pleiotrop wirkendes proinflammatorisches Zytokin, welches von einer Vielzahl von Zellen, darunter Makrophagen, Lymphozyten und Keratinozyten synthetisiert werden kann (Übersicht bei Tracey und Cerami, 1994). TNF $\alpha$  aktiviert eine Immunantwort, indem es die Produktion verschiedener Proteine wie TGF $\alpha$  („Transforming Growth Factor  $\alpha$ “), IL-1 $\alpha$ , IL-8, MCP-1 („Monocyte Chemoattractant Protein 1“) und ICAM-1 („Intercellular Adhesion Molecule 1“) induziert (Valyi-Nagy et al., 1992; Kutsch et al., 1993; Middleton und Norris, 1995; Carpenter et al., 2002). TNF $\alpha$  kann außerdem Neutrophile aktivieren und B-Zellen stimulieren sowie unreife dendritische Zellen zur Synthese von „Major Histocompatibility Complex (MHC) II“ aktivieren (van Deventer, 1997; Bell et al., 1999). Boorsma et al. (1998) gehen davon aus, dass die in der Psoriasis gezeigte Hochregulation von IP10 (Gottlieb et al., 1988) damit zusammenhängt, dass durch die Entzündung rekrutierte Lymphozyten und Monozyten IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  synthetisieren, welche die Expression von IP10 induzieren. Da IFIT4 weder durch TNF $\alpha$  noch andere Zytokine wie GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-18 oder IL-6 induziert wird (s. 3.3.3.1), scheint eine direkte Beteiligung von IFIT4 an der Immunabwehr eher unwahrscheinlich. Interessanterweise verfügt der IFIT4-Promotor aber über mehrere CEBPB („CAAT/Enhancer Binding Protein B“)-Bindungsstellen (s. Tabelle 4.1.). CEBPB wird auch als NF-IL6 bezeichnet und ist bei der IL-6-vermittelten Signaltransduktion von Bedeutung. Für hBD-2 wurde durch Harder et al. (2000) beschrieben, dass hBD-2 ebenfalls zwar über eine NF-IL6-Bindungsstelle im Promotor verfügt, aber die hBD-2-Transkription nicht durch IL-6 induzierbar ist (s. auch Abb. 19B). Die Funktion von IL-6 bei inflammatorischen Prozessen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Obwohl IL-6 häufig als ein Induktor inflammatorischer Gene gesehen wurde, wiesen Untersuchungen an IL-6-defizienten Mäusen darauf hin, dass IL-6 durch eine Kontrolle proinflammatorischer Zytokine auch antiinflammatorisch wirken kann (Xing et al., 1998). Die hier gezeigten Ergebnisse, dass die

Expression von IFIT4 durch anti-inflammatorisch wirkende Glukokortikoide inhibiert wird und durch IL-6 nicht reguliert wird, weisen auf eine mögliche Funktion von IFIT4 bei entzündlichen Prozessen hin. Da IFIT4 außerdem durch Kulturüberstände von *P. aeruginosa* induzierbar ist, erscheint eine ausschließliche Funktion von IFIT4 bei antiviralen Prozessen eher unwahrscheinlich.

#### **4.4 Der Einfluss von *P. aeruginosa*-Kulturüberständen auf die epitheliale Immunabwehr**

Im Rahmen der epithelialen Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen kommt der Expression und Freisetzung von antimikrobiellen Proteinen wie z.B. hBD-2 eine wichtige Funktion zu, da diese als phylogenetisch alte Effektormoleküle vermutlich eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunität einnehmen (Schröder, 1999). Vorherige Arbeiten (Dissertation Schwichtenberg, 2003) sowie die hier vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass *P. aeruginosa* in der Lage ist, einen Inhibitor der hBD-2-Expression zu synthetisieren und somit befähigt sein könnte, die Effektorfunktionen des epithelialen Abwehrsystems zumindest einzuschränken. Somit würde sich die Frage stellen, ob und, wenn ja, welche epithelialen Abwehrmechanismen stattdessen aktiviert würden, um die Haut vor bakteriellen Infektionen zu schützen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Microarray-Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 4.3. (nächste Seite) kurz zusammenfassend dargestellt sind.

Wie die Abbildungen 28, 29 und 30 (s. 3.4.1 und 3.5) zeigen, sind die untersuchten Gene nach einer 20-stündigen Inkubation mit den *P. aeruginosa*-Kulturüberständen transkriptionell stärker induziert als nach einer 6-stündigen Inkubation. Interessant ist außerdem, dass offensichtlich durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände wesentlich mehr Gene reguliert werden als durch hBD-2-induzierende Überstände (s. Tabelle 4.3.), was u.U. auf eine komplexere Zusammensetzung der hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände schließen lassen könnte. Dies könnte aber auch als erster Hinweis dafür gewertet werden, dass eine mögliche Einschränkung der angeborenen Immunabwehr die Aktivierung anderer Abwehrmechanismen zur Folge hat.

Gen	Synonym	Funktion
<b>A) Transkriptionelle Hochregulation durch hBD-2-induzierende <i>P. aeruginosa</i>-Kulturüberstände</b>		
hBD-2	-	Aus psoriatischer Haut isoliertes antimikrobielles Peptid; antimikrobielle Wirkung gegen <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> und <i>C. albicans</i> (Harder et al., 1997)
S100A7	Psoriasin	Aus psoriatischen Keratinozyten isoliertes Protein, welches antimikrobielle Aktivität gegen <i>E. coli</i> ausweist (Celis et al., 1990; Gläser et al., persönliche Mitteilung).
S100A8	Calgranulin A	Ca <sup>2+</sup> -bindendes EF-Hand-Protein; Expression hauptsächlich in myeloiden Zellen; Chemoattraktant für Neutrophile (Übersicht bei Nacken et al., 2003; Ryckmann et al., 2003).
S100A9	Calgranulin B	Ca <sup>2+</sup> -bindendes EF-Hand-Protein; Expression hauptsächlich in myeloiden Zellen; Chemoattraktant für Neutrophile (Übersicht bei Nacken et al., 2003; Ryckmann et al., 2003)
PI3	Elafin	Elastase-spezifischer Inhibitor aus der Haut. Verhindert Elastase vermittelte Gewebeproteolyse (Wiedow et al., 1990).
LCN2	NGAL	Ursprünglich aus Neutrophilengranula isoliertes Lipocalin (Kjeldsen et al., 1993). Akute-Phase-Protein mit antibakterieller Wirkung (Liu und Nilsen-Hamilton, 1995; Goetz et al., 2002).
<b>B) Transkriptionelle Hochregulation durch hBD-2- inhibierende <i>P. aeruginosa</i>-Kulturüberstände</b>		
CCL20	MIP3 $\alpha$	CC-Chemokin. Chemotaktischer Faktor für dendritische und T-Zellen (Campbell et al., 1998; Dieu et al., 1998). Antimikrobielle Wirkung (Yang et al., 2003; Hoover et al., 2002).
CCL11	Eotaxin	CC-Chemokin. Selektive Chemotaktische Aktivität für Eosinophile (Ponath et al., 1996).
CCL4	MIP-1 $\beta$	CC-Chemokin. Chemotaktischer Faktor für Monozyten und T-Zellen (Taub et al., 1993).
CCL2	MCP-1	CC-Chemokin. Chemotaktischer Faktor für Monozyten <i>in vivo</i> und T-Zellen und NK-Zellen <i>in vitro</i> (Lu et al., 1998; Allavena et al., 1994; Carr et al., 1994).
IL-8	NAP1 CXCL8	CXC-Chemokin, chemotaktische Wirkung auf Neutrophile (Schröder, 1987).
TNF $\alpha$	-	Proinflammatorisches Zytokin mit pleiotropher Wirkweise (Übersicht bei Tracey und Cerami, 1994).
IL-1 $\beta$	-	Proinflammatorisches Zytokin mit pleiotropher Wirkweise (Kupper und Groves, 1995).
IRF1		„ursprüngliche“ Funktion: Transkriptioneller Aktivator von Typ I Interferonen (Harada et al., 1990).
NF $\kappa$ BIA	I $\kappa$ B $\alpha$	Eines von drei Proteinen, welches durch Komplexbildung NF $\kappa$ B inhibiert (aus: Hoffmann et al., 2002).
TNFAIP3	A20	Cytoplasmatisches Zinkfingerprotein, welches TNF-vermittelten programmierten Zelltod und NF $\kappa$ B-vermittelte Endothelzellaktivierung inhibiert (Opipari et al., 1992; Cooper et al., 1996).
PTGS2	Cox-2	Regulatorische Funktion bei der Prostaglandinsynthese (Übersicht bei Needleman et al., 1986).
RNase7	-	RNase-Aktivität. Antimikrobielle Aktivität gegen diverse pathogene Mikroorganismen (Harder und Schröder, 2002).
SELPLG	PSGL1	Vermittelt durch hohe Affinität zu P-Selektin das Binden von Neutrophilen und T-Lymphozyten auf Endothelzellen (Übersicht bei Zimmerman, 2001).
<b>C) Transkriptionelle Herunterregulation durch hBD-2- inhibierende <i>P. aeruginosa</i>-Kulturüberstände</b>		
HSPB1	HSP27	In Keratinozyten exprimiertes Hitzeschockprotein, welches in Stressresistenz und Aktinorganisation involviert ist (McClaren und Isseroff, 1994).

**Tabelle 4.3.: Übersicht über die Gene**, deren transkriptionelle Regulation in HaCaT-Keratinozyten nach Inkubation mit hBD-2-induzierenden und -inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen mit Hilfe der Microarray-Analyse und „Real-Time“-PCR bestätigt wurde (s. Abschnitt 3.4.1 und 3.5). Die Tabelle umfasst drei Gruppen von Genen. Gruppe A) bezeichnet die Gene, die besonders durch Inkubation mit den hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen transkriptionell induziert wurden, Gruppe B) umfasst die Gene, die insbesondere durch Inkubation mit hBD-2- inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen transkriptionell induziert wurden und Gruppe C) zeigt das Gen, dessen transkriptionelle Herunterregulation durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände verifiziert wurde.

#### 4.4.1 Die Bedeutung von hBD-2, LCN2, Elafin und S100-Proteinen bei der epithelialen Immunabwehr

Durch Inkubationen mit den hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen wurden insbesondere hBD-2, die S100-Proteine A7, A8 und A9 sowie PI3 (Proteaseinhibitor 3, Elafin) und LCN2 (Lipocalin 2, NGAL) transkriptionell hochreguliert (s. Abb. 28, Abb. 30, Tabelle 4.3.).

HBD-2 wurde 1997 als das erste induzierbare antimikrobielle Peptid des Menschen aus läsionalen Hautschuppen identifiziert und strukturell charakterisiert (Harder et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, daß hBD-2 besonders nach Kontakt mit Gram-negativen Bakterien und proinflammatorischen Stimuli wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Epithelzellen induziert wird (Harder et al., 2000). Die Induktion von hBD-2 wurde auch in kultivierten Epithelzellen der Bronchien, der Lunge, der Nase, des Magens und des Darmes nachgewiesen (Schröder und Harder, 1999). hBD-2 hat eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien wie *E. coli* und vor allem *P. aeruginosa* sowie gegen die Hefe *C. albicans*. Gegenüber dem Gram-positiven Erreger *S. aureus* zeigt hBD-2 erst eine bakteriostatische Wirkung bei Konzentrationen von über 100  $\mu\text{g/ml}$  (Schröder und Harder, 1999).

Harder et al. (2000) zeigten, dass der hBD-2-Genpromotor über mindestens drei Konsensussequenzen zur Bindung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B verfügt. Für zwei dieser drei möglichen Bindungsstellen wurde bereits gezeigt, dass sie an der *P. aeruginosa*-abhängigen Induktion von hBD-2 beteiligt sind (Harder, persönliche Mitteilung). Von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ist ebenfalls bekannt, dass sie die Expression von Genen, die wie hBD-2 an der angeborenen Immunabwehr beteiligt sind, über NF $\kappa$ B-regulatorische Elemente kontrollieren (Baeuerle et al., 1994). Die Rolle von NF $\kappa$ B bei der Induktion antimikrobieller Peptide bei Verletzung oder bakterieller Infektion ist z.B. auch bei Insekten beschrieben (Hultmark, 1993; Ip et al., 1993). Das Vorhandensein von NF $\kappa$ B-Konsensussequenzen in induzierbaren antimikrobiellen Peptiden bei Insekten (Hultmark, 1993), Rindern (Diamond et al., 1993) und Menschen weist darauf hin, dass NF $\kappa$ B einen Bestandteil eines evolutiv alten Abwehrmechanismus bei Pathogenbefall darstellt (Hultmark, 1994).

Als Modell, welches den Wirkmechanismus der meisten antimikrobiellen Proteine erklärt, gilt das Shai-Matsuzaki-Huang-Modell (Übersicht bei Zasloff, 2002). Amphipathische antimikrobielle Peptide bilden dabei in der negativ geladenen Bakterienplasmamembran eine Pore, die für Anionen und Wasser durchgängig ist, wodurch die Bakterien abgetötet werden.

Die S100-Proteine A7, A8 und A9, die wie hBD-2 v.a. durch die hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Überstände transkriptionell hochreguliert wurden (s. Abb. 28 J-L), gehören zu einer Familie Kalzium-bindender EF-Hand-Proteine. S100-Proteine sind in verschiedenen intrazellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Schutz vor oxidativem Zellschaden und entzündlichen Prozessen beteiligt (Übersicht bei Donato, 1999). Psoriasin (S100A7) wurde ursprünglich aus psoriatischen Keratinozyten isoliert (Celis et al., 1990). Psoriasin ist ebenso wie S100A8 und S100A9 in Psoriasisläsionen auf Proteinebene hochreguliert (Madsen et al., 1992; Hardas et al., 1996; Bowcock, 2001). Während für rekombinantes Psoriasin durch Jinquan et al. (1996) eine chemotaktische Aktivität für T-Lymphozyten und Neutrophile nachgewiesen wurde, zeigte natives Psoriasin in Versuchen unserer Arbeitsgruppe diese Eigenschaft nicht (Schröder, persönliche Mitteilung). Durch Gläser et al. (persönliche Mitteilung) wurde zum einen gezeigt, dass die mRNA-Expression von Psoriasin in der Haut fokal unterschiedlich hoch ist, zum anderen, dass Psoriasin eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* und eine schwächer ausgeprägte gegen *P. aeruginosa* besitzt. Demnach könnte die in dieser Arbeit gesehene transkriptionelle Hochregulation von Psoriasin durch den hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstand mit der antimikrobiellen Wirkung von Psoriasin im Zusammenhang stehen. Die Mechanismen, die in Abhängigkeit von mikrobiellen Stimuli zu einer Induktion von Psoriasin führen, sind bisher allerdings nicht bekannt (Gläser, persönliche Mitteilung).

S100A8 und S100A9 werden fast ausschließlich in myeloiden Zellen wie z.B. Neutrophilen oder Monozyten synthetisiert (Hessian et al., 1993). Erhöhte Serumkonzentrationen wurden u.a. bei HIV-Infektionen, Cystischer Fibrose und chronischer Bronchitis festgestellt (Strasser et al., 1997; Barthe et al., 1991; Roth et al., 1992). In normaler Haut sind S100A8- und S100A9-Proteine kaum nachweisbar, jedoch sind beide Proteine in psoriatischer Haut hochreguliert (Madsen et al., 1992). Neueren Untersuchungen zufolge sollen S100A8 und S100A9 proinflammatorische Fähigkeiten besitzen. So zeigten Ryckman et al. (2003), dass rekombinantes S100A8, S100A9 sowie der heterodimere Komplex aus S100A8 und A9 (auch als Calprotectin bezeichnet) *in vitro* chemotaktisch auf humane Neutrophile wirken und vermutlich die Neutrophilenadhäsion an das Endothelgewebe induzieren kann. Anhand von Mausmodellen demonstrierte die Arbeitsgruppe um Ryckman et al. (2003) auch, dass die Injektion von S100A8, S100A9 und Calprotectin (in sterile Luftblasen auf dem Rücken der Tiere) zu einer Neutrophilenakkumulation führte. Eine antimikrobielle Aktivität des Heterodimers Calprotectin v.a. gegen *C. albicans*, aber nicht gegen *P. aeruginosa* wurde durch Steinbakk et al. (1990) beschrieben.

Der Protease Inhibitor 3, auch Elafin genannt, wurde durch hBD-2-induzierende *P. aeruginosa*-Überstände ebenfalls transkriptionell stärker induziert als durch hBD-2-inhibierende Überstände (s. Abb. 28 M). Elafin stellt einen von Wiedow et al. aus psoriatischer Haut isolierten Inhibitor der Leukozyten-Elastase dar (Wiedow et al., 1990). Die humane Elastase ist ein proteolytisches Enzym, welches in den azurophilen Neutrophilengranula gespeichert wird (Reilly und Travis, 1980). Nach ihrer Freisetzung am Entzündungsort hydrolysiert die Elastase Gewebekomponenten wie Elastin (Reilly und Travis, 1980) und Kollagen (Gadek et al., 1980), wodurch es zu Gewebeschäden kommt, die u.a. zur Bildung von Lungenemphysemen führen können (Powers und Bengali, 1986).

Somit könnte Elafin eine Schutzfunktion z.B. bei Hauterkrankungen, die mit einer Neutrophileninfiltration einhergehen, zukommen. Dazu gehören neben der Psoriasis z.B. *Vasculitis allergica*, eine entzündliche Gefäßerkrankung. Untersuchungen zu diesen Krankheiten von Tanaka et al. (2000) zeigten *in vitro*, dass Elafin vermutlich durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , welche z.B. von den rekrutierten Neutrophilen freigesetzt werden könnten, induziert wird. Gemäß Bingle et al. (2001) erfolgt die IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -abhängige Elafin-Induktion in Lungenepithelzellen über NF $\kappa$ B.

Neben dieser Schutzfunktion ist Elafin auch antimikrobiell wirksam. Simpson et al. (1999) zufolge zeigt Elafin eine antimikrobielle Wirkung sowohl gegen *P. aeruginosa* als auch gegen *S. aureus*. Die Arbeitsgruppe um Meyer-Hoffert et al. (2003) fand, dass Elafin das Wachstum verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme hemmen kann, und geht aufgrund ihrer Ergebnisse davon aus, dass Elafin einen durch *P. aeruginosa*-induzierbaren Bestandteil der angeborenen Immunität darstellt.

Lipocalin 2 (LCN2), ein weiteres Gen, das durch hBD-2-induzierende Überstände induziert wurde (s. Abb. 30 B), konnte zunächst als ein spezifisch in Granula von humanen Neutrophilen vorkommendes Protein identifiziert werden (Kjeldsen et al., 1993; Triebel et al., 1992). LCN2 zeichnet sich u.a. dadurch aus, dass es lipophile Substanzen wie beispielsweise bakterielle Formylpeptide und LPS bindet, weswegen eine Funktion als Immunmodulator angenommen wurde (Sengelov et al., 1994; Bratt et al., 1999). Inzwischen ist bekannt, dass LCN2 u.a. auch in Keratinozyten und bei entzündlichen Hauterkrankungen wie der Psoriasis exprimiert wird (Mallbris et al., 2002) und in Keratinozyten nach 12-stündiger Inkubation durch IL-1 $\beta$  induziert wird (Sorensen et al., 2003).

Cowland et al. (1997) fanden, dass der LCN2-Promotor u.a. über eine Bindungsstelle für NF $\kappa$ B verfügt.

Mikroorganismen sind bei Eisenmangel in der Lage, durch die Ausbildung sogenannter Siderophore dreiwertiges Eisen aus ihrer Umgebung zu binden und aufzunehmen (Übersicht bei Vasil und Ochsner, 1999). Die Arbeitsgruppe um Goetz (Goetz et al., 2002) zeigte, dass LCN2 offensichtlich durch spezifische Bindung von in Siderophoren gebundenem Eisen verhindern kann, dass die Mikroorganismen das Eisen verwerten können. LCN2 wäre somit antibakteriell wirksam.

Sorensen et al. (2003) gründeten ihre Untersuchungen zur Wundheilung auf der Annahme, dass es in Folge einer Hautverletzung zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems kommen muß, um eine mikrobielle Besiedlung des verletzten Gewebes zu verhindern. Da nach Verletzung der Haut Wachstumsfaktoren produziert werden, die eine Regeneration der Haut unterstützen (Singer und Clark, 1999), untersuchte die Arbeitsgruppe um Sorensen die Induktion antimikrobieller Peptide durch die Wachstumsfaktoren IGF-1 („Insulin-Like Growth Factor 1“) und TGF $\alpha$  („Transforming Growth Factor  $\alpha$ “). Beide Faktoren kommen im Speichel vor (Costigan et al., 1988; Mogi et al., 1995) und es wurde lange angenommen, dass sie die Proliferation von Zellen im Wundbereich fördern, wenn Tiere ihre Wunden lecken. Sorensen et al. (2003) zeigten, dass IGF-1 und TGF- $\alpha$  neben hBD-3, SLPI („Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“) und hCAP-18 („Cationic Antimicrobial Protein, 18kD“) auch LCN2 in Keratinozyten induzieren, womit den Wachstumsfaktoren eine zusätzliche Funktion bei der Vermeidung von Infektionen bei Hautverletzungen zukäme.

#### 4.4.2 Die Bedeutung von CC-Chemokinen bei der epithelialen Immunabwehr

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich Hinweise auf eine mögliche Rolle der CC-Chemokine CCL20 („Chemokin C-C Ligand 20“) und CCL11 (Eotaxin) bei der epithelialen Abwehr. Das Chemokin-Gen CCL20 wird insbesondere durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände transkriptionell reguliert (Abb. 30 C). Das Besondere an CCL20, auch bezeichnet als MIP-3 $\alpha$  („Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$ “), ist, dass es nur in 20-28% der Aminosäuresequenz mit anderen Chemokinen übereinstimmt und das Gen nicht zusammen mit dem CC-Chemokin Cluster, bestehend aus den Genen für CCL23, 15, 14, 16 und RANTES, auf Chromosom 17 lokalisiert ist, sondern stattdessen auf Chromosom 2 (Hieshima, 1997; Nomiyama, 1999). Eine wichtige Funktion von MIP-3 $\alpha$  könnte darin bestehen, bei einer Entzündung eine adaptive Immunantwort einzuleiten, indem es unreife DZ, die den MIP-3 $\alpha$ -Rezeptor CCR6 exprimieren, an den Ort der Entzündung rekrutiert. Dort

nehmen die DZ ein fremdes Antigen auf und reifen (Campbell et al., 1998; Dieu et al., 1998). Nach Bindung von MIP-3 $\alpha$  wird die Expression von CCR6 (CC Chemokin Rezeptor 6) herunterreguliert, wodurch die DZ in die Lymphknoten wandern, über CCR7 MIP-3 $\beta$ , ein weiteres CC-Chemokin, binden und somit das Antigen CD8 $^+$  T-Zellen präsentieren können (Caux, 2002). CCR6 ist der spezifische Rezeptor von MIP-3 $\alpha$ , d.h. andere Chemokine interagieren nicht mit CCR6 (Perez-Canadillas et al., 2001; Baba et al., 1997). Diese „Sonderrolle“ korreliert auch damit, dass CCR6 nicht, wie CCR1 bis CCR5 und CCR8, auf Chromosom 3 lokalisiert ist, sondern stattdessen auf Chromosom 6 (Liao et al., 1997). Die Arbeitsgruppe um Liao (1999) zeigte, dass CCR6 nicht nur auf DZ, sondern auch auf Gedächtnis-T-Zellen und B-Zellen exprimiert wird. Aufgrund ihrer Ergebnisse geht die Arbeitsgruppe um Liao (1999) davon aus, dass die Expression von CCR6 eine Aggregation und Kommunikation von Gedächtniszellen, dendritischen Zellen und B-Zellen fördert. Somit könnte MIP-3 $\alpha$  eine verbindende Funktion zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität zukommen. Diese Annahme wird unterstützt durch Ergebnisse von Yang et al. (1999) und Hoover et al. (2002), die zeigten, dass CCR6 auch als Rezeptor für die humanen Defensine hBD-1 und hBD-2 dient. Somit können hBD-1- und 2 über Rekrutierung von dendritischen und T-Zellen zum Ort einer bakteriellen Infektion ebenfalls eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems bewirken. Diese Gemeinsamkeit zwischen MIP-3 $\alpha$  und hBD-1- und -2 äußert sich auch in einer strukturellen Ähnlichkeit in der dreidimensionalen Struktur dieser Proteine (Perez-Candillas et al., 2001) sowie darin, dass MIP-3 $\alpha$  sowohl gegen *E. coli* und *S. aureus* (Hoover et al., 2002) als auch gegen *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *E. faecium* und *C. albicans* (Yang et al., 2003) antimikrobiell wirksam ist. Dies geht einher mit den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen, die eine durch mikrobielle Stimuli induzierbare Expression von MIP-3 $\alpha$  nachwiesen. Lin et al. (2003) zeigten, dass MIP-3 $\alpha$  in humanen Mastzellen durch *P. aeruginosa* induzierbar ist, während Akahoshi et al. (2003) dies für Neutrophile bei Kontakt mit verschiedenen Staphylokokken und Gram-negativen Bakterien wie bsw. *E. coli* feststellte. Die hier genannten Arbeiten belegen, dass es unter Einfluß von LPS oder Exotoxin A (ein von Gram-negativen Organismen synthetisierter Translationsinhibitor) bzw. durch die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-8 im Entzündungsbereich zu einer NF $\kappa$ B-abhängigen Induktion von MIP-3 $\alpha$  kommt. Dies ist insofern interessant, als dass die hier durchgeführten Arbeiten zeigen (s. Abb. 28), dass durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände in HaCaT-Keratinocyten sowohl NF $\kappa$ BIA, welches NF $\kappa$ B inhibiert, als auch TNFAIP3, welchem eine ähnliche Rolle zukommt, verstärkt induziert werden. Das könnte bedeuten, dass NF $\kappa$ BIA/TNFAIP3 und

MIP-3 $\alpha$  zu verschiedenen Zeitpunkten synthetisiert werden. Eine spätere translationale Aktivierung der NF $\kappa$ BIA/TNFAIP3-Expression würde dann eine frühere, durch NF $\kappa$ B vermittelte MIP-3 $\alpha$ -Aktivierung nicht beeinträchtigen können. Möglicherweise befinden sich in den verwendeten Überständen auch Komponenten, die NF $\kappa$ B-vermittelte Entzündungsprozesse inhibieren können. Eine weitere Möglichkeit ist, dass MIP-3 $\alpha$  in HaCaT-Keratinocyten nicht ausschließlich über NF $\kappa$ B transkriptionell reguliert wird. Über eine transkriptionelle Regulation von MIP-3 $\alpha$  durch andere Faktoren als NF $\kappa$ B ist bisher jedoch nichts bekannt.

Neben einer Expression u.a. in Makrophagen, Eosinophilen (Sullivan et al., 1999), Mastzellen und DZ wird MIP-3 $\alpha$ , wie auch diese Arbeit zeigte, in Keratinocyten exprimiert. In chronischen, entzündlichen Hauterkrankungen kommt MIP-3 $\alpha$  offensichtlich eine wichtige Funktion zu. Im Zusammenhang mit Psoriasis-erkrankungen wird angenommen, dass MIP-3 $\alpha$  für die Rekrutierung von T-Zellen in die betroffenen Hautbereiche verantwortlich ist (Homey et al., 2000). Ferner wurde gezeigt, dass MIP-3 $\alpha$  in der Haut chemotaktisch auf Langerhans-Zellen, eine besondere Form dendritischer Zellen in den Epithelien, wirkt (Dieu-Nosjean et al., 2000). Nakayama et al. (2001) bestätigten die Rekrutierung von Langerhans-Zellen durch MIP-3 $\alpha$  bei Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis (AD).

Zusammenfassend kann man MIP-3 $\alpha$  als ein in der Immunabwehr bifunktionales Peptid betrachten. MIP-3 $\alpha$  ist durch inflammatorische Stimuli induzierbar und ist in physiologisch relevanten Dosen antimikrobiell wirksam und unterstützt somit die angeborene Immunität. Außerdem kann MIP-3 $\alpha$  B-Zellen, T-Zellen und DZ rekrutieren und die adaptive Immunität einleiten.

Bei Eotaxin (CCL11) handelt es sich um ein weiteres CC-Chemokin, welches wie MIP-3 $\alpha$  besonders durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände transkriptionell induziert werden kann (s. Abb. 29). Aufgrund der Tatsache, dass es bei Infektionen mit Parasiten und bei Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis (AD) zu einer selektiven Akkumulation von eosinophilen Leukozyten in den entzündeten Bereichen kommt, identifizierte Ponath et al. (1996) Eotaxin als das Chemokin, welches eine spezifische chemotaktische Wirkung auf Eosinophile zeigt. Untersuchungen zur genomischen Struktur und transkriptionellen Regulation von Eotaxin ergaben, dass der Eotaxin-Promotorbereich über Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-IL6, AP-1 und NF $\kappa$ B sowie über IFN $\gamma$ - und Glukokortikoid-Erkennungssequenzen verfügt (Hein et al., 1997).

Ursprünglich wurde angenommen, dass Eotaxin nur mit dem Rezeptor CCR3, einem 7-Transmembranrezeptor, welcher auf Eosinophilen, Basophilen und Th2-Lymphozyten

exprimiert wird, interagiert (Ponath et al., 1996; Ugucioni et al., 1997; Sallusto et al., 1997). Ogilvie et al. (2001) fanden aber, dass Eotaxin nicht nur an CCR3, sondern auch an die Rezeptoren CCR2 und CCR5 bindet und darüber eine Monozyten-, NK-Zellen und Basophilenrekrutierung beeinflusst. Die Studien von Ogilvie et al. zeigten, dass Eotaxin die Bindung von MCP („Monocyte Chemoattractant Protein“-1, -2, -3 und -4 an CCR2 inhibiert. Dadurch wird die Freisetzung von inflammatorischen Enzymen durch Monozyten und die Freisetzung von Histamin und Leukotrienen, welche u.a. für eine lokale Gefäßerweiterung und erhöhte Gefäßdurchlässigkeit verantwortlich sind, durch Basophile verhindert (Ogilvie et al., 2001). Eotaxin käme in diesem Zusammenhang eine anti-inflammatorische Funktion zu.

Die Induktion von Eotaxin durch die verwendeten *P. aeruginosa*-Überstände ist aus zwei Gründen besonders interessant. Zum einen erfolgte die Induktion in HaCaT-Keratinocyten, also Zellen der Epidermis. Eine Induktion von Eotaxin konnte durch unsere Arbeitsgruppe sowohl in HaCaT- als auch primären Keratinocyten nach Inkubation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  nicht nachgewiesen werden (Hein et al., 1997). Auffallend ist in diesem Zusammenhang, dass Hautkeratinocyten aber offensichtlich den Eotaxin-Rezeptor CCR3 exprimieren (Petering et al., 2001). Zum anderen wurde eine verstärkte Eotaxin-Expression bisher eher im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen, AD und Parasiteninfektionen (s.o.) und nicht mit bakteriellen Infektionen gesehen. Allergische Hauterkrankungen wie z.B. der chronische Nesselausschlag aber auch die entzündliche AD sind dadurch gekennzeichnet, dass es zu einer Häufung von Eosinophilen und Th2-Lymphozyten in der Dermis der betroffenen Hautbereiche kommt (Peters et al., 1983; Leiferman et al., 1995). Mochizuki et al. (1998) fanden bei Untersuchungen zur AD, dass Eotaxin in Fibroblasten, den häufigsten Zellen der Dermis, durch IL-4 und eine Kombination von IL-4 und  $\text{TNF}\alpha$  induzierbar ist. IL-4 und  $\text{TNF}\alpha$  kommen in Mastzellen und Basophilen in präformierter Form vor und werden aufgrund eines IgE-Rezeptor-vermittelten Signales freigesetzt. Der Grund für das gehäufte Auftreten von Eosinophilen in der AD könnte also darin liegen, dass es nach IgE-vermittelter Aktivierung von Mastzellen über die Freisetzung von IL-4/ $\text{TNF}\alpha$  zu einer Eotaxin-Induktion in Fibroblasten kommt, woraufhin Eosinophile chemotaktisch in das Gewebe rekrutiert werden (Mochizuki et al., 1998).

Interessant ist, dass eine spezifische epidermale Expression von Eotaxin und eine damit verbundene Gewebeeosinophilie im Zusammenhang mit einigen Erkrankungen zu stehen scheinen. Jean-Baptiste et al. (2002) beschrieben für die Erkrankung *Incontinentia pigmenti* (IP), die im ersten Stadium u.a. durch eine epidermale Eosinophilen-Akkumulation mit Pustelbildung gekennzeichnet ist, eine Eotaxin-Expression in der basalen Epidermis.

Die Arbeitsgruppe zeigte, dass Eotaxin auf mRNA- und Proteinebene in Keratinozyten durch IL-1 $\alpha$  und durch Kombinationen von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  bzw. TNF $\alpha$  und IL-4 induzierbar ist, was im Widerspruch zu den vorher diskutierte Ergebnissen von der Arbeitsgruppe um Hein (Hein et al., 1997) steht. Jean-Baptiste et al. (2002) gehen davon aus, dass die epidermale Eosinophilen-Akkumulation bei der IP nicht nur auf Eotaxin, sondern auch auf die eosinophilen-chemotaktische Aktivität von RANTES zurückzuführen ist. Eine genetisch bedingte Besonderheit von IP ist eine fehlende NF $\kappa$ B-Aktivierung bei 85% der Patienten (Smahi et al., 2000). Der Grund hierfür ist eine Deletion mehrerer Exons im NEMO („NF $\kappa$ B Essential Modulator“)-Gen, so dass in NEMO-negativen Zellen eine TNF $\alpha$ -, IL-1- oder LPS-bedingte Aktivierung der NF $\kappa$ B-Signaltransduktion vermutlich nicht erfolgen kann (Smahi et al., 2002). Im IP-Maus-Modell konnte jedoch gezeigt werden, dass maximal ca. 50% der Keratinozyten NEMO-negativ sind (Jean-Baptiste et al., 2002). In diesen Zellen können sonst durch NF $\kappa$ B regulierte Gene der Immunantwort, zu denen auch Eotaxin gehört (s.u.), nicht mehr reguliert werden, wodurch die zentrale Bedeutung von NF $\kappa$ B deutlich wird.

Die transkriptionelle Regulation von Eotaxin erfolgt jedoch nicht ausschließlich über NF $\kappa$ B-Bindungsstellen. So konnte in Fibroblasten gezeigt werden, dass für die TNF $\alpha$ - und IL-4-abhängige Eotaxin-Induktion das synergistische Zusammenwirken der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und STAT6 („Signal Transducers and Activators of Transcription 6“) erforderlich ist (Hoeck und Woisetschläger, 2001). Ähnliches konnte von Matsukara et al. (1999) für die transkriptionelle Eotaxin-Regulation in bronchialen Epithelzellen dargestellt werden.

Parasiteninfektionen zeichnen sich ebenso wie allergische Erkrankungen durch einen Anstieg der Bluteosinophile und Serum-IgE aus (Mochizuki, et al. 1998). Als ein Beispiel einer parasitären Infektion ist hier die Ancylostomiasis, durch den Hakenwurm *Necator americanus* verursacht, genannt, die durch eine allergische Lungenreaktion und Eosinophilie gekennzeichnet ist. Durch Anwesenheit der Wurmlarven in der Lunge kommt es zu einer gesteigerten Eotaxin- und MIP-1 $\alpha$ -Produktion, welche u.a. die Rekrutierung von Eosinophilen begünstigen. Ferner wird die IL-5-Synthese angeregt, welche wiederum im Knochenmark die weitere Bildung von Eosinophilen begünstigt (Culley et al., 2002).

Über die Frage, warum *P. aeruginosa* eine Induktion von Eotaxin in Hautkeratinozyten bewirkt, lassen sich nur Vermutungen anstellen. Auffällig ist, dass die Eotaxin-Induktion nur nach Inkubation mit hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen erfolgte (s. Abb. 29). Möglich wäre, dass hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa* Überstände in der Lage sind, eine Aktivierung der angeborenen Immunität sowie eine gegen Bakterien gerichtete erworbene

Immunantwort zu verhindern. Stattdessen könnte über eine Induktion und Synthese von Eotaxin eine Eosinophilenrekrutierung in die Haut stattfinden. Eosinophile sind jedoch auf eine Parasitenabwehr spezialisiert und könnten eine durch *P. aeruginosa* ausgelöste Entzündung somit nicht verhindern.

CCL2 (MCP-1) und CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) stellen 2 weitere CC-Chemokine dar, die durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Überstände transkriptionell induziert werden können (s. Abb. 28B, Abb. 29).

Eine gesteigerte CCL2- und CCL4-Synthese ist in atopischer Dermatitis nachweisbar (Giustizieri et al., 2001; Kaburagi et al., 2001) und CCL2 übernimmt bei der Leukozytenrekrutierung in Psoriasis-erkrankungen eine wichtige Funktion (Giustizieri et al., 2001). Beide Chemokine sind außerdem sowohl bei *Pseudomonas*-Infektionen (Epelman et al., 2000; Smith et al., 2002) als auch bei parasitären Erkrankungen wie bsw. der durch die Raubwanze *Trypanosoma cruzi* ausgelösten Chagaskrankheit (Aliberti et al., 1999) involviert. Anhand von mononukleären Blutzellen zeigten Epelman (Epelman et al., 2000), dass das von *P. aeruginosa* synthetisierte Exoenzym S die Transkription von CCL4-mRNA nach 5 Std. und CCL2-mRNA nach 24 Std. induzierte. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang sind Ergebnisse von Smith (Smith et al., 2002), die anhand von RNase Protection Assays demonstrieren, dass N-(3-oxododecanoyl) Homoserinlaktone (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL), ein Virulenzfaktor von *P. aeruginosa*, in Mausehaut CCL4 und CCL2 induziert. 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL stellt ein Signalmolekül eines Quorum-sensing Systems von *P. aeruginosa* dar. Quorum-sensing-Systeme dienen der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation und spielen bei einem Phänotypwechsel von planktonischen Einzelzellen zu mukoiden, adhärenen Zellen von Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Dieser Phänotypwechsel ist das Resultat einer Änderung des Genexpressionsprofils und wird im Rahmen der Quorum-Sensing-Systeme über die Konzentration löslicher „Autoinducer“ (Acyllhomoserinlaktone) wie 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL kontrolliert (Übersicht bei Whitehead et al., 2001). Dieses System ermöglicht es Bakterien, Änderungen ihrer Umwelt wahrzunehmen und darauf als „Gemeinschaft“ zu reagieren, was sich u.a. in der Synthese zahlreicher Virulenzfaktoren äußert. Damit steigern die Bakterien ihre Möglichkeiten, die Immunabwehr des Wirtes zu überwinden und versuchen so letztlich, ihr Überleben zu sichern. Die Arbeitsgruppe um Smith (Smith et al., 2002) zeigte ferner, dass die 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL-abhängige CCL2- und CCL4-Induktion in Mauskeratinozyten über NF $\kappa$ B erfolgt.

Die in den eigenen Experimenten verwendeten hBD-2-induzierenden- und inhibierenden *P. aeruginosa*-Überstände stammten von mukoiden, adhärenen *P. aeruginosa*-Kulturen.

Sollte die hier beobachtete Induktion von CCL2 und CCL4 auf den Einfluss von 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL zurückzuführen sein, wäre somit eher zu erwarten gewesen, dass die Inkubation mit hBD-2-induzierenden- und inhibierenden *P. aeruginosa*-Überständen zu einer ähnlich hohen CCL2- und CCL4-Induktion führen würden.

Für CCL2 und CCL4 wurde beschrieben, dass diese Chemokine, ähnlich wie MIP-3 $\alpha$ , eine Bedeutung sowohl in der angeborenen als auch der adaptiven Immunität haben können. Anhand von CCL2-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass ausschließlich CCL2 bei der Abwehr von *Schistosoma mansoni*- bzw. *Mycobacterium tuberculosis*-Infektionen für die Rekrutierung von Monozyten zuständig ist (Lu et al., 1998). CCL4 wirkt ebenfalls chemotaktisch auf Monozyten, jedoch ist die chemotaktische Aktivität geringer als bei CCL2 (Ugucioni et al., 1995). Von der Arbeitsgruppe um Gu (Gu et al., 2000) wurde, ebenfalls an CCL2-defizienten Mäusen, gezeigt, dass CCL2 die Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-10 aus T-Helfer-Zellen induziert und damit die Th2-Antwort kontrollieren könnte. Ferner wirkt CCL2, ebenso wie CCL4 (Taub et al., 1993; Bystry et al., 2001), chemotaktisch auf T-Lymphozyten, wie Carr (Carr et al., 1994) anhand von transendothelialen Chemotaxis Assays zeigten (Übersicht bei Schröder, 1995).

#### **4.4.3 Die Bedeutung von CXC-Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen bei der epithelialen Immunabwehr**

Aus den Microarray-Analysen ging hervor, dass sowohl das proinflammatorische CXC-Chemokin IL-8 als auch die proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  insbesondere durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände transkriptionell induziert wurden (s. Abb. 28E-G).

Das Chemokin IL-8 wurde ursprünglich aus den Überständen von LPS-stimulierten Monozyten isoliert und als „Neutrophil Activating/Attracting Peptide 1“ (NAP-1) bezeichnet (Schröder et al., 1987). Später konnte IL-8 dann aus Psoriasisläsionen isoliert werden (Schröder et al., 1992). IL-8 wird in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, darunter Monozyten (s.o.), Endothelzellen und Fibroblasten, nach Stimulation mit LPS, IL-1 oder TNF $\alpha$  synthetisiert (Strieter et al., 1989; Larsen et al., 1989). In Keratinozyten wird die IL-8-Synthese durch Stimuli wie TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und PMA gesteigert (Larsen et al., 1989; Barker et al., 1990). Die biologischen Eigenschaften von IL-8 sind vielfältig (Übersicht bei Schröder, 1993). Neben einer chemotaktischen Aktivität für polymorphkernige neutrophile

Granulozyten (PMN) induziert IL-8 u.a. die Histamin-Freisetzung aus Basophilen, aktiviert in PMN die Freisetzung von „reaktiven Sauerstoffspezies“ (ROS) und die Exozytose von azurophilen und spezifischen Granula aus PMN.

Neben LPS wird IL-8 auch durch andere Moleküle Gram-negativer Bakterien induziert. So konnte u.a. gezeigt werden, dass IL-8 in alveolären Epithelzellen durch *P. aeruginosa* Nitritreduktase (Mori et al., 1999), *Pseudomonas* Elastase (Azghani et al., 2002) und das Pigment Pyocyanin (Denning et al., 1998) auf Transkriptions- bzw. Translationsebene induzierbar ist. Das *P. aeruginosa* Exoenzym S, welches bei Patienten mit Cystischer Fibrose, einer durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen Lungenkrankheit, offensichtlich für eine Zellschädigung der Lunge mitverantwortlich ist, induziert in PBMCs („Peripheral Blood Mononuclear Cell“) ebenfalls IL-8 (Epelman et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um Smith (Smith et al., 2001) zeigte in Lungenfibroblasten und Vorhautfibroblasten eine durch den Autoinducer 3Oxo-C<sub>12</sub>-HSL (Vgl. s. CCL2 und CCL4) gesteigerte IL-8-Expression. Dabei kommt dem Transkriptionsfaktor NFκB offensichtlich eine zentrale Bedeutung zu, wie auch die Arbeitsgruppe um Mukaida 1994 schon gezeigt hat (Mukaida et al., 1994).

Die Bedeutung von IL-8 bei Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis und der Psoriasis wurde von Nomura et al. (2003) dargestellt. Die Immunantwort der AD ist aufgrund der charakteristischen hohen IgE-Serumkonzentration und der Eosinophilie einer Th2-Immunantwort zuzuordnen (Leung, 2000), während die Psoriasis, aufgrund der lokalen Neutrophileninfiltration, durch eine Th1-Immunantwort charakterisiert ist (Nickoloff, 2001). AD-Patienten leiden im Gegensatz zu Psoriasis-Patienten häufig an Hautinfektionen (Christophers und Henseler, 1987). Nomura et al. (2003) zeigten, dass in der AD Gene wie hBD-2, hBD-3, iNOS sowie IL-8 herunterreguliert sind, wobei dies vermutlich auf eine verminderte TNFα- und IFNγ-Synthese zurückzuführen ist. Die Synthese von TNFα und IFNγ wird in der AD-Haut durch Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-13 blockiert, wie Nomura et al. (2003) vermuten. TNFα und IFNγ können dementsprechend nicht über die NFκB-Signaltransduktion bzw. andere Signalkaskaden Gene wie hBD-2, hBD-3 und IL-8 aktivieren. Somit kann in AD-Haut keine Synthese von antimikrobiellen Peptiden und keine IL-8-vermittelte Rekrutierung von Neutrophilen erfolgen, was erklären könnte, warum AD-Haut, im Gegensatz zu psoriatischer Haut, häufig durch *S. aureus* kolonisiert wird (Nomura et al., 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten eigene und die Beobachtungen von Schwichtenberg (Dissertation 2003), dass IL-8-mRNA durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände stärker induziert wird als durch hBD-2-induzierende

*P. aeruginosa*-Kulturüberstände (s. auch Abb. 8). Möglicherweise wird durch eine verstärkte IL-8-Synthese eine Neutrophilenrekutierung in die Haut angeregt, wobei die chemotaktischen Eigenschaften von IL-8 alleine für eine Neutrophilenrekutierung nicht ausreichen (Schröder, persönliche Mitteilung). Für Gro- $\alpha$  („Growth Related Oncogene  $\alpha$ “, auch als Gro1 bezeichnet), ein Neutrophil-chemotaktisches Zytokin, wurde anhand von *In Situ*-Hybridisierung gezeigt, dass Gro- $\alpha$ -mRNA in psoriatischer Haut zusammen mit IL-8-mRNA in der oberen Epidermis nachweisbar ist (Gillitzer et al., 1996). Zwar wurde eine Induktion von Gro- $\alpha$  durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Kulturüberständen nicht verifiziert, jedoch weisen die Ergebnisse der Microarray-Analyse darauf hin (s. Tabelle 3.1.), so dass eine mögliche Synthese von Gro- $\alpha$  die Neutrophilen-rekrutierende Wirkung von IL-8 unterstützen könnte.

Das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$ , dessen Bedeutung teilweise schon im Zusammenhang mit IL-8 diskutiert wurde, zeigt ebenso wie IL-1 $\beta$  ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten. Es wird von einer Vielzahl von Zellen, u.a. von Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophilen und Langerhans-Zellen, durch Stimuli wie bakterielle Toxine, Viren, Hefen und andere Zytokine (z.B. IL-2, „Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor“ (GM-CSF) und Interferone) freigesetzt (Übersicht bei Tracey und Cerami, 1994).

Eine Besonderheit in Bezug auf TNF $\alpha$  ist, dass es offensichtlich eine Schlüsselrolle in der Resistenz gegen Lungeninfektionen einnimmt, in denen *P. aeruginosa* involviert ist (Gosselin et al., 1995). Anhand von resistenten Mausmodellen zeigten Gosselin et al. (1995), dass TNF $\alpha$ -Protein innerhalb von 6 Std. nach Infektionsbeginn vermehrt von der Lunge synthetisiert wird. Aufgrund ihrer Ergebnisse nimmt die Arbeitsgruppe um Gosselin (1995) an, dass TNF $\alpha$  die Rekrutierung von Makrophagen und PMNs beeinflusst, die dann durch Sekretion von Stickstoffoxid (NO) die Bakterien abtöten könnten. TNF $\alpha$  selber wirkt zwar nicht chemotaktisch, kann aber durch Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothel- und Epithelzellen die gerichtete Wanderung von Makrophagen und PMNs zum Infektionsort unterstützen (Mulligan et al., 1993; Tosi et al., 1992). Ferner kann TNF $\alpha$  in Endothelzellen die Synthese von IL-8 induzieren, welches eine chemotaktische Wirkung auf PMNs hat (Smart und Casale, 1994). Neuere Untersuchungen belegen, dass TNF $\alpha$  in Endothelzellen MCP („Monocyte Chemoattractant Protein“)-1 induziert, wodurch es zur chemotaktischen Rekrutierung von Monozyten kommt (Goebeler et al., 2001).

Als ein äußerst potenter Stimulus von TNF $\alpha$  zumindest in Monozyten gilt das extrazelluläre, „schleimige“ Glykolipoprotein (GLP), welches von mukoiden und nicht-mukoiden *P. aeruginosa* synthetisiert wird (Lagoumintzis et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um

Lagoumintzis zeigte, dass GLP ein stärkerer TNF $\alpha$ -Stimulus ist als LPS. Dafür verantwortlich ist vermutlich eine direkte Aktivierung von NF $\kappa$ B durch GLP. Ein struktureller Unterschied zwischen LPS und GLP ist das Vorhandensein von Mannose in GLP, welches vermutlich an den Makrophagen-Mannose-Rezeptor bindet. Der Makrophagen-Mannose-Rezeptor stellt einen sogenannten „Pattern Recognition Receptor“ (PRR) dar, der Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMs) wie LPS oder Glykokonjugate als „Fremd“ erkennt (Übersicht bei Gordon, 2002). PRRs werden meist auf Antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, die durch die Prozessierung potentieller Antigene und eine Aktivierung von T- und B-Zellen die angeborene mit der erworbenen Immunität verbinden können (Übersicht bei Gordon, 2002). Für Keratinozyten wurde ebenfalls die Expression eines Mannose-Rezeptors beschrieben, der gemäß Szolnoky et al. (2001) bei der Abtötung von *C. albicans* involviert sein soll.

Einige Funktionen von IL-1 $\beta$  wurden schon im Zusammenhang mit Elafin, hBD-2 und IL-8 diskutiert. Auffällig ist, dass die mRNA-Induktion von IL-1 $\beta$ , einem Induktor von hBD-2 (Harder et al., 2000), bei Inkubation mit den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen offensichtlich nicht zu einer weiteren Induktion der hBD-2-Expression führt. Dies könnte darin begründet liegen, dass Hautkeratinozyten unter nicht-pathologischen Bedingungen zunächst ein 31 kD-IL-1 $\beta$ -Vorläuferprotein synthetisieren, welches biologisch inaktiv ist (Mizutani et al., 1991). Für die posttranslationale Prozessierung dieser Vorläuferform in die 17,5 kD-aktive Form ist u.a. die Protease „IL-1 $\beta$  Converting Enzyme“ (ICE), auch als Kaspase-1 bezeichnet, von Bedeutung (Zepter et al., 1997). Zepter et al. (1997) zeigten, dass ICE in Keratinozyten durch immunologische und inflammatorische Stimuli wie Haptene und PMA induzierbar ist. Möglich ist, dass es bei den in dieser Arbeit vorliegenden Bedingungen nicht zu einer Aktivierung von ICE kommt, so dass das inaktive IL-1 $\beta$ -Vorläuferprotein nicht prozessiert wird und somit hBD-2 nicht durch IL-1 $\beta$  induziert werden kann. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Überstände NF $\kappa$ BIA und TNFAIP3 transkriptionell hochreguliert werden und somit eine Aktivierung von NF $\kappa$ B und eine NF $\kappa$ B –abhängige hBD-2-Induktion durch IL-1 $\beta$  verhindert werden könnte.

#### 4.4.4 Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren und damit assoziierten Faktoren bei der epithelialen Immunabwehr

Durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände wurde der Transkriptionsfaktor IRF1 („Interferon Regulatory Factor-1“), aber auch einige mit der Transkription assoziierte Gene wie TNFAIP3 („Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Inhibitory Protein 3“) und I $\kappa$ B $\alpha$  („Inhibitor of Kappa Light Chain Gene Enhancer in B Cells  $\alpha$ “; NF $\kappa$ BIA) transkriptionell induziert (s. Abb. 28 A, C, D).

Einige Eigenschaften von IRF1, wie z.B. die Funktion bei der viralen Abwehr (Kimura et al., 1994) wurden bereits im Zusammenhang mit IFIT4 (s. 4.3) diskutiert. Die mögliche Funktionsweise von IRF1 ist jedoch komplexer, wie u.a. Untersuchungen an IRF1-defizienten Mäusen zeigten. So war in IRF1-„Knockout“-Mäusen die Zahl von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen um 90% reduziert (Kamijo et al. 1994) und Untersuchungen von Taki (Taki et al., 1997) und Lohoff (Lohoff et al., 1997) demonstrierten, dass IRF1-defiziente Mäuse eine defekte IL-12 und IFN $\gamma$ -Produktion aufweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Beteiligung von IRF1 bei der Steuerung der Th1-Immunantwort vermutet. Tatsächlich kann IRF1 die Expression von IL-12 und IL-15 (Übersicht bei Kröger et al., 2002) regulieren. In Makrophagen reguliert IRF1 die Expression von iNOS, welches die Synthese von NO katalysiert, wodurch Makrophagen zytotoxisch auf Bakterien und Hefen wirken können (Nathan und Hibbs, 1991). Wieland et al. (2002) belegten in Untersuchungen an Patienten mit zystischer Fibrose, dass IRF1 durch LPS und Exotoxin A, welche von *P. aeruginosa* synthetisiert werden, induzierbar ist und somit eine Th1-Immunantwort zumindest begünstigt werden könnte. Anhand von Microarray-Analysen zeigten Ichikawa et al. (2000), dass IRF1 in A549-Zellen (Zelllinie aus humanem Lungenkarzinom) nach Adhäsion von *P. aeruginosa* innerhalb von 3 Std. transkriptionell induziert wurde (Vergleich s. Diskussion IFIT4, 4.3). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich anhand der hier durchgeführten Microarray-Analyse bestätigte, dass hBD-2-induzierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände, wie sie für die Untersuchungen zu IFIT4 verwendet wurden, kein oder kaum IRF1 induzieren (s. Abb. 28D). Eine Induktion von IRF1 erfolgte erst durch Inkubation mit den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Überständen.

IRF1 ist, außer durch IFN $\gamma$ , u.a. auch durch IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  induzierbar (Übersicht bei Kröger et al., 2002 und Abb. 24). Die in dieser Arbeit beobachtete Induktion von IRF1 durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Überstände könnte darauf hindeuten, dass als Reaktion auf bakterielle Stimuli wie LPS oder Exotoxin A eine Immunabwehrreaktion in Form einer Th1-Anwort, an der IRF1 beteiligt ist, eingeleitet wird. Das würde aber nicht

erklären, warum hBD-2-induzierende *P. aeruginosa*-Überstände IRF1 nicht induzieren, es sei denn, in den hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Überständen kommen Komponenten vor, die eine IRF1-Induktion inhibieren. Die durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Überstände gezeigte transkriptionelle Induktion von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  ist nach einer 6-stündigen Inkubation verglichen mit einer 20-stündigen Inkubation gering, so dass eine Aktivierung von IRF1 durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  unwahrscheinlich ist.

Die zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B wurde bereits vorher diskutiert. NF $\kappa$ B stellt ein Dimer der Proteine RelA/p65, cRel, RelB, p50 und p52 dar, wobei die vorherrschende Form von NF $\kappa$ B in den meisten Zelltypen ein Heterodimer aus p65:p50 ist (Übersicht bei Messer und Rupec, 2001; Hoffmann et al., 2002). Die Aktivität von NF $\kappa$ B wird durch inhibitorische Proteine der I $\kappa$ B (NF $\kappa$ BI)-Familie, darunter I $\kappa$ B $\alpha$  (NF $\kappa$ BIA), I $\kappa$ B $\beta$  (NF $\kappa$ BIB) und I $\kappa$ B $\epsilon$  (NF $\kappa$ BIE), reguliert, die an NF $\kappa$ B binden und somit eine Translokation in den Nukleus und eine Interaktion von NF $\kappa$ B mit Genpromotoren verhindern (Messer und Rupec, 2001; Hoffmann et al., 2002; s. auch Abb. 1).

Verschiedene Stimuli wie z.B. inflammatorische Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ , IL-1) und durch LPS ausgelöste Signale führen zu einer Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplexes, wodurch I $\kappa$ B phosphoryliert wird und letztlich degradiert wird (Messer und Rupec, 2001). Durch den Abbau von I $\kappa$ B kann NF $\kappa$ B in den Zellkern wandern und an seine Zielsequenz in Genpromotoren binden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  (NF $\kappa$ BIA) durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände induziert werden kann (s. Abb. 28C). Eine transkriptionelle Aktivierung von NF $\kappa$ BIA ist aus der Literatur nur im Zusammenhang mit Glukokortikoiden bekannt. Die Arbeiten von Scheinman et al. (1995) und Auphan et al. (1995) zeigen, dass die Glukokortikoid (GC)-vermittelte Immunsuppression vermutlich damit zusammenhängt, dass durch GC NF $\kappa$ BIA transkriptionell und translationell aktiviert wird, wodurch die Aktivität von NF $\kappa$ B vermindert wird. Eine fehlende NF $\kappa$ B-Aktivität kann zu einer verringerten Zytokinsekretion führen, wodurch die Aktivierung einer Immunantwort verhindert wird.

TNFAIP3, auch als A20 bezeichnet, ist ein Zinkfingerprotein, dessen ursprünglich beschriebene Funktion die Inhibition der TNF-induzierten Apoptose in Fibroblasten und B-Lymphozyten darstellte (Opipari et al., 1992). Untersuchungen von Cooper et al. (1996) zeigten jedoch, dass A20 auch in der Lage ist, durch Inhibition des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B die TNF-induzierte Endothelzellaktivierung zu inhibieren. Die TNF-vermittelte NF $\kappa$ B-Aktivierung erfolgt unabhängig voneinander durch 2 Zelloberflächenrezeptoren TNFR

(„Tumor Necrosis Factor Receptor“)1 und TNFR2 (Kruppa et al., 1992; Rothe et al., 1994). Im Rahmen der Signaltransduktion interagiert der TNFR-assoziierte Faktor TRADD („TNFR1-Associated Death Domain Protein“) mit TNFR1 (Hsu et al., 1995) und TRAF („TNF Receptor-Associated Factor“)1 und TRAF2 assoziieren mit TNFR2 (Rothe et al., 1994). Die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch TNFR1 und TNFR2 ist ein TRAF-abhängiger Prozess, der zur Induktion der A20-Expression führt. Das gebildete A20 interagiert mit dem TRAF2-TRAF1-Komplex und inhibiert damit die NF $\kappa$ B-Aktivierung und seine eigene Synthese (Song et al., 1996). A20 käme somit eine analoge Funktion zu dem bereits erwähnten I $\kappa$ B zu (Song et al., 1996). Es wird angenommen, dass A20 mit seiner Fähigkeit zur Kontrolle der Endothelzellaktivierung insgesamt eine zellschützende Funktion zukommt (Cooper et al., 1996), indem es eine unkontrollierte und anhaltende Aktivierung verhindert. In diesem Zusammenhang betrachtet könnte die in den eigenen Untersuchungen gezeigte Induktion von A20 (TNFAIP3) durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände als Schutzmechanismus gegen eine dauerhafte, durch *P. aeruginosa*-hervorgerufene Zellaktivierung gesehen werden.

#### **4.4.5 Die Bedeutung von PTGS2, RNase7, SELPLG und HSPB1 bei der epithelialen Immunabwehr**

Mit Hilfe der verifizierten Microarray-Ergebnisse wurde gezeigt, dass PTGS2 („Prostaglandin-Endoperoxide Synthase“), RNase7 sowie SELPLG („Selektin P-Ligand“) durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Überstände vermehrt transkriptionell induziert wurden (s. Abb. 28 I und N; Abb. 29). Das Hitzeschockprotein HSPB1 dagegen stellte das einzige Gen dar, welches durch die hBD-2-inhibierenden Überstände transkriptionell herunterreguliert wurde (s. Abb. 28N).

Cyclooxygenasen wie PTGS2 (Cox-2) katalysieren den ersten Schritt bei der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine und Thromboxane. Prostaglandine sind Eikosanoidhormone und als solche beispielsweise an der Auslösung von Entzündungen und an der Regulation der Blutzirkulation in bestimmten Organen beteiligt. Die entzündungshemmende und fiebersenkende Wirkung des Aspirin (Acetylsalicylsäure) beruht auf seiner Hemmung der Prostaglandinsynthese (Übersicht bei Dubois et al., 1998). Im Gegensatz zu Cox-1, welches konstitutiv in verschiedenen Geweben exprimiert wird, stellt Cox-2 ein durch inflammatorische Stimuli (wie z.B. LPS und IL-1 $\alpha$ ) induzierbares Gen in

Endothelzellen dar (Inoue et al., 1995; Ristimäki et al., 1994). Von der Arbeitsgruppe um Matsuura (Matsuura et al., 1999) wurde gezeigt, dass Cox-2 in Keratinozyten durch IFN $\gamma$ , welches von aktivierten T-Lymphozyten und Natürlichen Killer (NK)-Zellen synthetisiert wird, und TGF $\alpha$  induziert wird. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang sind Ergebnisse von Smith et al. (2002), die demonstrieren, dass 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL im Mausmodell Cox-2 induziert (Vgl. s. CCL2 und CCL4). Die durch eine gesteigerte Cox-2-Synthese vermittelte Prostaglandinsynthese ermöglicht es *P. aeruginosa*, wie Hahn et al. (1999) und Shoup et al. (1998) zeigten, sich über die Entzündungsstelle hinaus im Wirtskörper zu verteilen und damit eine septische Infektion auszulösen. Die für diese Arbeit verwendeten *P. aeruginosa*-Überstände stammten ebenfalls von mukoiden, adhärenen *P. aeruginosa*-Formen ab. Somit wäre es möglich, dass die beobachtete Cox-2-Induktion durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Überständen durch 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL erfolgte, welches möglicherweise in den Überständen enthalten ist. Dadurch ließe sich allerdings nicht erklären, warum die hBD-2-induzierenden Überstände, die auch von mukoiden, adhärenen *P. aeruginosa* abstammen, keine Cox-2-Expression in den Zellen induzierten. Cox-2 wird allerdings, in Abhängigkeit von IFN $\gamma$ , durch IRF1 reguliert, wie Blanco et al. (2000) für Mausmakrophagen zeigten. In Osteoblasten und Pankreas-Insel-Zellen wurden zwei weitere Induktoren der Cox-2-Expression, IL-1 und TNF $\alpha$ , beschrieben, die die Cox-2-Expression über NF $\kappa$ B und NF-IL6 regulieren (Sorli et al., 1998; Yamamoto et al., 1995). Die Cox-2-Induktion durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Überstände erfolgt jedoch vermutlich nicht über IRF1 oder durch IL-1- bzw. TNF $\alpha$ -vermittelte Signale, da deren Transkriptionsrate nach einer 6-stündigen Inkubation relativ gering ist, so dass eine ausreichende Proteinsynthese erst später erfolgen könnte.

Bei der RNase7 handelt es sich um eine erstmals von Harder und Schröder (Harder und Schröder, 2002) aus dem *Stratum Corneum* isolierte antimikrobielle Ribonuklease. Die RNase7 stellt das erste Mitglied der RNaseA-Superfamilie dar, von dem bekannt ist, dass es durch mikrobielle Stimuli induzierbar ist (Harder und Schröder, 2002). Die RNase7 weist eine antimikrobielle Aktivität sowohl gegen Gram-positive Bakterien (z.B. *S. aureus* und *Propionibacterium acnes*) als auch gegen Gram-negative Bakterien (z.B. *P. aeruginosa* und *E. coli*) und gegen die Hefe *C. albicans* auf. Eine besonders hohe antimikrobielle Aktivität zeigt RNase7 gegen das Vancomycin-resistente Bakterium *E. faecium*, was die RNase7 zu einem interessanten Therapeutikum zur Bekämpfung von Infektionen, die von Antibiotika-resistenten Bakterien verursacht werden, machen könnte (Harder und Schröder, 2002). Im Gegensatz zu anderen antimikrobiellen Proteinen wie z.B. hBD-2 ist die konstitutive mRNA-

Expression von RNase7 in Keratinozyten vergleichsweise hoch (Harder, persönliche Mitteilung). Neben der Expression in Keratinozyten wurde eine RNase7-Expression sowohl in den Epithelien des Respirations- und Urogenitaltraktes (Harder und Schröder, 2002) als auch in der Leber, der Niere, der Skelettmuskulatur und dem Herzen (Zhang et al., 2003) nachgewiesen. Harder und Schröder (2002) zeigten, dass RNase7 in Keratinozyten durch TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  induzierbar ist.

Ähnlich wie hBD-2 könnte der RNase7 aufgrund der gezeigten antimikrobiellen Aktivität eine wichtige Bedeutung in der angeborenen Immunabwehr zukommen. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die RNase7, anders als hBD-2, vermehrt durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände induziert werden kann. Das könnte darauf hindeuten, dass an der Regulation von RNase7 und hBD-2 unterschiedliche Faktoren beteiligt sein können, obwohl beide durch Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B regulierbar sind.

SELPLG wird auf der Plasmamembran von Neutrophilen und Monozyten exprimiert. Es bindet an P-Selektin, welches ein Mitglied der Selektin-Familie von Adhäsionsproteinen darstellt, und auf Endothelzellen exprimiert wird. Durch diese Bindung wird der gerichtete Transport von zirkulierenden Leukozyten zu entzündeten oder verletzten Bereichen ermöglicht (Übersicht bei Zimmerman, 2001). Über eine Expression von SELPLG-mRNA bzw. einer Proteinsynthese in Keratinozyten ist in der Literatur nichts bekannt. Die hier gezeigte SELPLG-Induktion durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände lassen jedoch vermuten, dass die Funktionsweise von SELPLG vielfältiger sein könnte als die bisher beschriebene Funktion bei der Leukozytenrekrutierung.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass das für das Hitzeschockprotein HSPB1 kodierende Gen durch hBD-2-inhibierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände transkriptionell herunterreguliert wurde, während eine Regulation durch hBD-2-induzierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände nicht eindeutig zu beobachten war. Hitzeschockproteine (HSPs) sind phylogenetisch hoch konservierte Proteine und werden sowohl von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen exprimiert (Übersicht bei Kaufmann, 1990). Sie wurden ursprünglich als „Molekulare Chaperone“ bezeichnet, da sie vielfach an Proteinfaltungsprozessen beteiligt sind. Sie werden auch als Stressproteine bezeichnet, da viele der HSPs in Stresssituationen (wie Hitze, oxidativer Stress, UV-Licht) induziert werden (Kaufmann, 1990). HSPB1 wird sowohl in HaCaT-Zellen als auch in primären Keratinozyten exprimiert (McClaren und Isserhoff, 1994). Curry et al. (2003) zeigten, dass HSPB1 in psoriatischer Haut nachweisbar ist und in dendritischen Zellen die Synthese von IL-12 induziert, so dass Curry et al. (2003)

eine mögliche Funktion von HSPB1 bei der Th1-Immunantwort bei Psoriasis-erkrankungen vermuten. Über eine genauere, mögliche Funktion von HSPB1 in der Haut ist derzeit allerdings nichts bekannt. Für das Bronchienepithel von Asthmatikern allerdings wurde beschrieben, dass HSPB1 dort in hohem Maße exprimiert wird, vermutlich, um die Zellen vor einer durch oxidativen Stress vermittelten Apoptose zu schützen (Merendino et al., 2002). Geht man davon aus, dass HSPB1 eine allgemeine Schutzfunktion in der Haut bei Stresssituationen ausübt, könnte die gezeigte transkriptionelle Herunterregulation durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände darauf hindeuten, dass *P. aeruginosa* in der Lage ist, diese Schutzfunktion zu inhibieren.

#### **4.4.6 Zusammenfassende Darstellung der durch *P. aeruginosa*-Kulturüberstände regulierten Gene**

Zusammenfassend werden durch hBD-2-induzierende *P. aeruginosa*-Kulturüberstände andere Gene transkriptionell aktiviert als durch hBD-2-inhibierende Überstände. Einige der Gene, die durch die hBD-2-induzierenden *P. aeruginosa*-Überstände induziert werden können, werden im Zusammenhang mit der angeborenen Immunabwehr gesehen. So fungiert hBD-2 im Rahmen der angeborenen Immunität als antimikrobielles Peptid, was ebenso für das S100-Protein Psoriasin zutreffen könnte. Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, dass die S100-Proteine A8 und A9 Neutrophile zu Entzündungsorten rekrutieren und somit eine angeborene Immunität unterstützen könnten. LCN2 ist, ebenso wie Elafin, zwar kein antimikrobielles Peptid, aber es wirkt antibakteriell, da es durch Bindung von Eisen Bakterien das Überleben erschweren kann. Elafin wirkt antibakteriell, indem es das Wachstum von Bakterien durch einen bisher unbekanntem Mechanismus hemmt.

Auffällig an den Induktionsexperimenten mit den hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberständen ist, dass dadurch einige Gene induziert werden, deren Proteine eine vermittelnde Position zwischen angeborener und adaptiver Immunität einnehmen können. Das könnte darauf hindeuten, dass die Epithelzellen durch die Aktivierung derartiger Gene in der Lage sind, die durch den hBD-2-Inhibitor hervorgerufene Einschränkung der angeborenen Immunität auszugleichen. Zu diesen Genen gehört v.a. CCL20, für welches sowohl eine antimikrobielle Wirkung als auch eine chemotaktische Wirkung für Leukozyten beschrieben wurde. Für CCL2 und CCL4 wurde gezeigt, dass sie chemotaktisch auf Monozyten und T-

Lymphozyten wirken können, so dass auch CCL2 und CCL4 an der Regulation von adaptiver und angeborener Immunantwort beteiligt sein können.

Interessant ist, dass der hBD-2-Inhibitor offensichtlich nicht gegen alle antimikrobiellen Proteine wirkt, da z.B. die RNase7 durch hBD-2-inhibierende Überstände induziert wird. Auffallend ist außerdem, dass durch die hBD-2-inhibierenden *P. aeruginosa*-Kulturüberstände gleich zwei Inhibitoren von NFκB, NFκBIA und TNFAIP3, induziert werden, wodurch eine Aktivierung von NFκB-regulierten Genen theoretisch verhindert werden könnte.

Über bakterielle Strategien zur Überwindung der epithelialen Abwehr ist bisher nur wenig bekannt. Wie bereits erwähnt, stellt die Bildung von Biofilmen während einer Infektion einen Versuch der Bakterien dar, sich der epithelialen Abwehr zu entziehen (s. Abschnitt 4.4.2). Für *P. aeruginosa* wurde außerdem beschrieben, dass von dem Bakterium synthetisierte Elastase sowohl das humane antimikrobielle Protein LL-37 (Schmidtchen et al., 2002) als auch das antimikrobielle Protein Cecropin in Insekten degradiert (Jarosz, 1997). Andere Bakterien sind jedoch auch in der Lage, Faktoren des epithelialen Abwehrsystems zu blockieren. So synthetisiert *Streptococcus pyogenes* einen „Inhibitor of Complement“ (SIC), der die antibakterielle Wirkung von SLPI („Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor“) und Lysozym inhibiert, und somit seine Kolonisation auf Schleimhäuten erleichtert (Ferne-King et al., 2002). Außerdem ist bekannt, dass *Yersinia pestis* das Effektorprotein YopJ exprimiert, welches die Aktivierung wichtiger Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF-κB verhindert, welches für die transkriptionelle Regulation zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren in Epithelzellen von Bedeutung ist (Ruckdeschel et al., 1998; Rhen et al., 2000).

Sollte sich in weiteren Untersuchungen zeigen, dass es sich bei der Synthese von hBD-2-Inhibitoren durch *P. aeruginosa* um eine generelle Strategie der Bakterien zum Überleben im Wirtsorganismus handelt, würde dies eine wichtige Erklärung für die Virulenz einiger Mikroorganismen darstellen.

## 4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass IFIT4 durch Kulturüberstände von mukoiden *P. aeruginosa* induzierbar ist. Durch eine weitere Optimierung der Kultivierungsbedingungen von *P. aeruginosa* sollte untersucht werden, ob sich die IFIT4-Induktor-Produktion beispielsweise durch anaerobe Bedingungen oder durch Zugabe von Metall-Chelatoren weiter steigern lässt. Anhand der vorliegenden Untersuchungen kann bisher nicht gesagt werden, ob von *P. aeruginosa* synthetisierte Faktoren wie Rhamnolipid oder LPS für die IFIT4-Induktion verantwortlich sein könnten. Von daher sollten Inkubationsexperimente mit frisch aus *P. aeruginosa* isoliertem Rhamnolipid und LPS durchgeführt werden. Zur näheren Analyse der molekularen Natur des IFIT4-Induktors sollten außerdem *P. aeruginosa*-Kulturüberstände mittels HPLC-Fraktionierungen (Größenausschluß- und Anionenaustauschchromatographie) analysiert werden. Zudem sollte mit Hilfe von IFN $\alpha$ -Antikörpern überprüft werden, ob die *P. aeruginosa*-abhängige IFIT4-Induktion direkt oder beispielsweise über in der Zelle synthetisiertes IFN $\alpha$  erfolgt.

Um Aussagen über die transkriptionelle Regulation von IFIT4 machen zu können, wäre die Durchführung von Transportergen-Assays sinnvoll. Außerdem sollte die mögliche Funktion von IFIT4 bei antiviralen Prozessen näher charakterisiert werden, indem z.B. in mit Viren infizierten Keratinozyten die Expression von IFIT4 untersucht würde.

Da bisher keine Daten zu einer IFIT4-Proteinexpression vorliegen, sollte ein wichtiges Ziel weiterführender Arbeiten Untersuchungen zur IFIT4-Proteinexpression mit Hilfe von IFIT4-Antikörpern und Western Blot-Experimenten oder ELISA („Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“)-Analysen sein. Ferner sollte die Lokalisation der IFIT4-Expression in der Haut durch *In Situ*-Hybridisierungen nachgewiesen werden, wobei dies vergleichende Analysen verschiedener Hauterkrankungen mit einschließen kann.

Bisher konnte eine IFIT4-Induktion nur nach Inkubation mit *P. aeruginosa*-Kulturüberständen nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, ob wirklich nur *P. aeruginosa* oder ob auch andere Gram-negative bzw. Gram-positive (wie *S. aureus*) Bakterien oder Hefen (wie *C. albicans*) IFIT4-induzierende Faktoren synthetisieren, sollte eine weitere Optimierung der jeweiligen Kultivierungsbedingungen erfolgen.

Des Weiteren deuten die hier durchgeführten Untersuchungen darauf hin, dass *P. aeruginosa* sowohl Induktoren als auch Inhibitoren der Expression von hBD-2 synthetisieren kann. HaCaT-Keratinozyten, die mit hBD-2-induzierenden bzw. -inhibierenden Komponenten enthaltenden Überständen inkubiert worden waren, wiesen unterschiedliche

Genexpressionsprofile auf. Daher wäre es zum einen sinnvoll, die Bedingungen, unter denen *P. aeruginosa* Induktoren und Inhibitoren der hBD-2-Expression synthetisiert, näher zu bestimmen und anschließend eine physikochemische Analyse dieser Faktoren durchzuführen.

Zum anderen sollten sich die Untersuchungen zu den von hBD-2-induzierenden und inhibierenden *P. aeruginosa*-Überständen hervorgerufenen Genexpressionsprofile nicht nur auf die Identifizierung bekannter Gene beschränken, sondern auch unbekannte Gene mit einbeziehen. Dies könnte entweder mit Hilfe weiterer SSH-Analysen oder mit Hilfe von humangenomischen Chips (z.B. von der Fa. Affymetrix), auf denen alle bisher bekannten Gene des menschlichen Genoms repräsentiert sind, erfolgen.

Darüberhinaus sollten die bisher aufgrund der durchgeführten Microarray-Analyse als differentiell exprimiert identifizierten Gene näher untersucht werden. Dazu wären sowohl Untersuchungen zur jeweiligen Proteinexpression als auch Analysen zur Identifizierung der jeweils relevanten Induktoren mittels HPLC-Aufreinigung wichtig.

## 5 Zusammenfassung

Epithelien wie die menschliche Haut sind permanent einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen ausgesetzt. Dennoch kommt es an gesunder Haut nur selten zu Infektionen. Für diese Resistenz der Haut ist neben einer physikalischen Barriere auch eine biochemische Barriere von Bedeutung. Letztere basiert u.a. auf der Wirkungsweise verschiedener konstitutiv exprimierter und durch Kontakt mit Mikroorganismen oder proinflammatorische Zytokine induzierbarer antimikrobieller Proteine wie das humane  $\beta$ -Defensin (hBD) -2.

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass im Rahmen einer komplexen epithelialen Abwehr der Kontakt mit fakultativ pathogenen Mikroorganismen wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* nicht nur zu einer spezifischen Induktion antimikrobieller Proteine sondern auch zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-8 und „Tumor Necrosis Factor“ (TNF)  $\alpha$  sowie weiteren Chemokinen und Wachstumsfaktoren führen kann. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass die Zellen der menschlichen Haut, ähnlich wie *Drosophila melanogaster*, in der Lage sind, zwischen verschiedenen Mikroorganismen zu differenzieren und entsprechend unterschiedliche Abwehrmechanismen zu aktivieren. Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die differentielle Genexpression in Hautkeratinozyten nach Kontakt mit verschiedenen mikrobiellen Stimuli zu untersuchen.

Zunächst wurde eine PCR-basierte Systematische Differential Display (SDD) durchgeführt, um das Genexpressionsprofil von primären Keratinozyten nach Kontakt mit Kulturüberständen von nicht-mukoiden (nicht-schleimbildenden) *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* zu analysieren. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte hierfür zunächst in einer nährstofflimitierten (MG)-Medium-Suspensionskultur, da Vorversuche gezeigt hatten, dass zumindest *P. aeruginosa* unter diesen Bedingungen Induktoren für antimikrobielle Proteine (wie hBD-2) und proinflammatorische Zytokine (wie IL-8) synthetisiert. Mit Hilfe der SDD-Analyse konnte das „Interferon-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats“ (IFIT4) als ein Gen identifiziert werden, welches nach Inkubation mit Kulturüberständen von *P. aeruginosa* induziert wurde. Weitere Untersuchungen zeigten, dass IFIT4 nicht nur durch Kulturüberstände nicht-mukoider *P. aeruginosa* aus MG-Suspensionskulturen, sondern auch durch Überstände mukoider *P. aeruginosa* aus statischen MG-Medium-Kulturen induzierbar ist. Inkubationsexperimente mit Überständen verschiedener *P. aeruginosa*-ATCC-Stämme sowie chemische (Säurepräzipitation) und biochemische Analysen (Anionenaustauschchromatographie)

ergaben, dass sich die von *P. aeruginosa* synthetisierten IFIT4-induzierenden Faktoren von hBD-2- und IL-8-induzierenden Faktoren unterscheiden.

Hinweise auf die mögliche Funktionsweise von IFIT4 bei antiviralen Prozessen ergeben sich aus der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung, dass IFIT4, ähnlich wie Gene mit antiviraler Funktionsweise, durch Interferone induzierbar ist. Diese Interferon-abhängige IFIT4-Induktion konnte durch Zugabe von anti-inflammatorisch wirkenden Glukokortikoiden vermindert werden, so dass IFIT4 zudem bei entzündlichen Prozessen von Bedeutung sein könnte.

Untersuchungen zum Einfluss hBD-2-induzierender Komponenten aus *P. aeruginosa*-Kulturüberständen auf die Genexpression in HaCaT-Keratinocyten erfolgte mit Hilfe der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH). Sechsstündige Inkubationsexperimente mit säurebehandelten, fraktionierten *P. aeruginosa*-Kulturüberständen zeigten eine Induktion des proinflammatorischen IL-8 und des Chemokins CCL2 (auch bezeichnet als „Monocyte Chemotactic Protein-1“, MCP-1), welches u.a. bei der Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten von Bedeutung ist.

Mukoide *P. aeruginosa* synthetisieren neben Induktoren inflammatorischer Gene und Induktoren der hBD-2-Expression jedoch auch Inhibitoren der hBD-2-Expression. Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von Microarray-Analysen gezeigt werden, dass *P. aeruginosa*-Kulturüberstände mit hBD-2-induzierenden Komponenten nach 20-stündiger Inkubation vornehmlich Gene mit antimikrobieller Wirkungsweise (z.B. hBD-2, Protease Inhibitor 3 und S100A7) in HaCaT-Keratinocyten induzieren. *P. aeruginosa*-Überstände mit hBD-2-inhibierenden Komponenten induzierten dagegen neben proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auch Gene wie z.B. „Makrophage Inflammatory Protein -3 $\alpha$ “ (MIP-3  $\alpha$ ), welches sowohl antimikrobiell wirksam ist als auch chemotaktisch auf T- und dendritische Zellen wirkt und somit Bestandteil der angeborenen und der adaptiven Immunität ist.

Keratinocyten sind demnach in der Lage, auf die Anwesenheit infektiöser Mikroorganismen spezifisch mit der Synthese antimikrobiell wirkender Proteine zu reagieren. Diese Expression antimikrobiell wirkender Proteine in der Haut kann jedoch durch die Synthese entsprechender Inhibitoren durch pathogene Bakterien verhindert werden. Die Hautkeratinocyten reagieren auf Kulturüberstände solcher Bakterien mit der Aktivierung weiterer Abwehrmechanismen, die die Aktivierung bestimmter Reaktionen von Zellen des adaptiven Immunsystems mit einschließen und somit dazu beitragen können, Hautinfektionen effektiv zu verhindern.

## 6 Abstract

Epithelia, such as human skin, are constantly exposed to various potentially pathogenic microorganisms. Nevertheless, healthy skin is normally not infected by pathogens. In addition to the physical barrier function of the skin, a biochemical barrier function is of importance for this resistance. The latter is based on the effect of different constitutively expressed and, by contact with microorganisms and proinflammatory cytokines, inducible antimicrobial peptides like human  $\beta$ -defensin (hBD)-2.

Previous studies suggest that contact with facultative pathogenic microorganisms like *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* not only results in a specific induction of antimicrobial peptides but also in the induction of proinflammatory cytokines like Interleukin (IL)-8 and Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  as well as chemokines and growth factors. Therefore, we hypothesized that cells of the human skin are able to discriminate between different microorganisms and, accordingly, are able to activate various defense mechanisms as recently demonstrated in *Drosophila melanogaster*. Consequently, the aim of this study was to investigate differential gene expression in keratinocytes upon contact with different microbial stimuli by use of molecular methods.

A PCR-based Systematic Differential Display (SDD) was performed to analyse the gene expression profile in primary keratinocytes following contact with culture supernatants of non-mucoid (planctonic) *Pseudomonas aeruginosa* as well as *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. For this purpose, microorganisms were cultivated in suspension in a nutrient-limited medium since previous experiments have shown that under these conditions at least *P. aeruginosa* synthesizes inducers of antimicrobial peptides (like hBD-2) and proinflammatory cytokines (like IL-8). By use of SDD, „Interferon-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats“ (IFIT4) was identified as a gene inducible by culture supernatants of *P. aeruginosa*. Further investigations revealed that IFIT4 is not only induced by supernatants of non-mucoid *P. aeruginosa* (cultivated in nutrient-rich medium under shaking conditions) but also by supernatants of mucoid *P. aeruginosa* (cultivated in nutrient-limited medium under static conditions). Incubation experiments with supernatants of different *P. aeruginosa*-ATCC-strains and chemical (acid precipitation) and biochemical (anionic exchange chromatography) analyses indicated a difference between the IFIT4-inducing factors produced by *P. aeruginosa* and the hBD-2- and IL-8-inducing factors.

A possible function of IFIT4 in antiviral processes can be drawn from our observation that IFIT4, similar to genes with antiviral functions, is induced by interferons. This interferon-

dependent IFIT4-induction could be attenuated by anti-inflammatory glucocorticoids. Therefore, IFIT4 might also be involved in inflammatory responses.

Studies addressing the influence of hBD-2-inducing components from *P. aeruginosa* culture supernatants on gene expression in HaCaT-keratinocytes were performed using Suppressive Subtraction Hybridisation (SSH). Incubation experiments (6 h) with acid-treated, fractionated *P. aeruginosa*-culture supernatants showed an induction of proinflammatory IL-8 and the chemokine CCL2 (also referred to as „Monocyte Chemotactic Protein-1“, MCP-1) which participates in the recruitment of monocytes and T-lymphocytes. Mucoid *P. aeruginosa* not only synthesise inducers of inflammatory genes and hBD-2-expression but also inhibitors of hBD-2-expression. By performing microarray analyses we could show that *P. aeruginosa* culture supernatants following a 20 h incubation induce genes with antimicrobial activity (like hBD-2, Protease Inhibitor 3 and S100A7). In contrast, *P. aeruginosa*-supernatants with hBD-2-inhibiting components preferentially induce proinflammatory cytokines like IL-8, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  and genes like „Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$ “ (MIP-3 $\alpha$ ), which shows antimicrobial activity and is also chemotactic to T-cells and dendritic cells. Therefore, MIP-3 $\alpha$  is part of the innate as well as the adaptive immunity.

In conclusion, keratinocytes seem capable of specifically responding to the presence of infectious microorganisms by the release of antimicrobial peptides. Bacteria react to this defense mechanism by producing specific substances that inhibit epithelial expression of antimicrobial peptides. Keratinocytes respond to culture supernatants of such bacteria by activating additional defense mechanisms including the activation of the adaptive immune system therefore enabling the keratinocytes to prevent skin infections.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akahoshi, T., Sasahara, T., Namai, R., Matsui, T., Watabe, H., Kitasato, H., Inoue, M. und Kondo, H. (2003). Production of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) (CCL20) and MIP-3beta (CCL19) by human peripheral blood neutrophils in response to microbial pathogens. *Infect. Immun.* *71*, 524-526.
- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T. und Kishimoto, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* *9*, 1897-1906.
- Alberts, B. Bray, D. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter; P. (2001). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 2. Auflage.
- Aliberti, J.C., Machado, F.S., Souto, J.T., Campanelli, A.P., Teixeira, M.M., Gazzinelli, R.T. und Silva, J.S. (1999). beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* *67*, 4819-4826.
- Allavena, P., Bianchi, G., Zhou, D., Van Damme, J., Jilek, P., Sozzani, S. und Mantovani, A. (1994). Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol.* *24*, 3233-3236.
- Antequera, F. und Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 11995-11999.
- Au, W.C., Moore, P.A., Lowther, W., Juang, Y.T. und Pitha, P.M. (1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 11657-11661.
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmborg, A. und Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* *270*, 286-290.
- Azghani, A.O., Baker, J.W., Shetty, S., Miller, E.J. und Bhat, G.J. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture. *Inflamm. Res.* *51*, 506-510.
- Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K., Nomiyama, H. und Yoshie, O. (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J. Biol. Chem.* *272*, 14893-14898.
- Baeuerle, P.A. und Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 141-179.
- Barker, J.N., Sarma, V., Mitra, R.S., Dixit, V.M. und Nickoloff, B.J. (1990). Marked synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors. *J. Clin. Invest* *85*, 605-608.
- Baroni, A., Perfetto, B., Ruocco, E. und Rossano, F. (1998). Lipoteichoic acid and protein-A from *Staphylococcus aureus* stimulate release of hepatocyte growth factor (HGF) by human dermal fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* *290*, 211-214.
- Barthe, C., Figarella, C., Carrere, J. und Guy-Crotte, O. (1991). Identification of 'cystic fibrosis protein' as a complex of two calcium-binding proteins present in human cells of myeloid origin. *Biochim. Biophys. Acta* *1096*, 175-177.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. und Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* *196*, 80-83.

- Bauer, T.T., Ferrer, R., Kollmeier, J., Torres, A., Hering, S. und Schultze-Werninghaus, G. (2000). Role of bacterial biofilm in the pathogenesis of nosocomial pneumonia. *Intensivmed.* 37, 536-540.
- Bell, D., Young, J.W. und Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv. Immunol.* 72, 255-324.
- Bendall, A.J. und Molloy, P.L. (1994). Base preferences for DNA binding by the bHLH-Zip protein USF: effects of MgCl<sub>2</sub> on specificity and comparison with binding of Myc family members. *Nucleic Acids Res.* 22, 2801-2810.
- Bertioli, D.J., Schlichter, U.H., Adams, M.J., Burrows, P.R., Steinbiss, H.H. und Antoniwi, J.F. (1995). An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 23, 4520-4523.
- Bingle, L., Tetley, T.D. und Bingle, C.D. (2001). Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 84-91.
- Bockelmann, R., Bonnekoh, B. und Gollnick, H. (1999). Optimized visualization and PCR reamplification of differentially displayed cDNA bands detected by silver staining in polyacrylamide gels as established in the model of dithranol-treated keratinocytes. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol* 12, 54-63.
- Boman, H.G. (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* 173, 5-16.
- Boorsma, D.M., Flier, J., Sampat, S., Ottevanger, C., de Haan, P., Hooft, L., Willemze, R., Tensen, C.P. und Stoof, T.J. (1998). Chemokine IP-10 expression in cultured human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 290, 335-341.
- 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.
- Bowcock, A.M., Shannon, W., Du, F., Duncan, J., Cao, K., Aftergut, K., Catier, J., Fernandez-Vina, M.A. und Menter, A. (2001). Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1793-1805.
- Boyle, K.A., Pietropaolo, R.L. und Compton, T. (1999). Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol. Cell Biol.* 19, 3607-3613.
- Bratt, T., Ohlson, S. und Borregaard, N. (1999). Interactions between neutrophil gelatinase-associated lipocalin and natural lipophilic ligands. *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 262-269.
- Brock, T.D. (2000). *Biology of Microorganisms*. 9<sup>th</sup> Edition. Madigan, M.T., Martinko, J. und Parker, J., Prentice-Hall.
- Bucher, P. (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 212, 563-578.
- Bystry, R.S., Aluvihare, V., Welch, K.A., Kallikourdis, M. und Betz, A.G. (2001). B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nature Immunol.* 2, 1126-1132
- Cairns, M.J. und Murray, V. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 17, 915-919
- Campbell, J.J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M.A., Thompson, D.A. und Butcher, E.C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-384.
- Carpenter, L.R., Moy, J.N. und Roebuck, K.A. (2002). Respiratory syncytial virus and TNF alpha induction of chemokine gene expression involves differential activation of Rel A and NF-kappa B1. *BMC. Infect. Dis.* 2, 5.
- Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S. und Springer, T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3652-3656.

- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., Vaure, C., Chemin, K., Dieu-Nosjean, M.C. und Vicari, A. (2002). Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* 73, S7-11.
- Celis, J.E., Cruger, D., Kiil, J., Lauridsen, J.B., Ratz, G., Basse, B. und Celis, A. (1990). Identification of a group of proteins that are strongly up-regulated in total epidermal keratinocytes from psoriatic skin. *FEBS Lett.* 262, 159-164.
- Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J. und Coughlin, S.R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2752-2756.
- Chen, S., Maul, R.S., Kim, H.R. und Chang, D.D. (2000). Characterization of the human EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm) gene reveals distinct promoters for the two EPLIN isoforms. *Gene* 248, 69-76.
- Christophers, E. und Henseler, T. (1987). Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 279 Suppl, S48-S51.
- Cippitelli, M., Ye, J., Viggiano, V., Sica, A., Ghosh, P., Gulino, A., Santoni, A. und Young, H.A. (1996). Retinoic acid-induced transcriptional modulation of the human interferon-gamma promoter. *J. Biol. Chem.* 271, 26783-26793.
- Cole, A.M., Ganz, T., Liese, A.M., Burdick, M.D., Liu, L. und Strieter, R.M. (2001). Cutting edge: IFN-inducible ELR-CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol.* 167, 623-627
- Cooper, J.T., Stroka, D.M., Brostjan, C., Palmetshofer, A., Bach, F.H. und Ferran, C. (1996). A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 271, 18068-18073.
- Costigan, D.C., Guyda, H.J. und Posner, B.I. (1988). Free insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II in human saliva. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 66, 1014-1018.
- Coulin, F., Power, C.A., Alouani, S., Peitsch, M.C., Schröder, J.M., Moshizuki, M., Clark-Lewis, I. und Wells, T.N. (1997). Characterisation of macrophage inflammatory protein-5/human CC cytokine-2, a member of the macrophage-inflammatory-protein family of chemokines. *Eur. J. Biochem.* 248, 507-515.
- Cowland, J.B. und Borregaard, N. (1997). Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 45, 17-23.
- Culley, F.J., Brown, A., Girod, N., Pritchard, D.I. und Williams, T.J. (2002). Innate and cognate mechanisms of pulmonary eosinophilia in helminth infection. *Eur. J. Immunol.* 32, 1376-1385.
- Curry, J.L., Qin, J.Z., Bonish, B., Carrick, R., Bacon, P., Panella, J., Robinson, J. und Nickoloff, B.J. (2003). Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch. Pathol. Lab Med.* 127, 178-186.
- Das, A.K., Cohen, P.W. und Barford, D. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 17, 1192-1199.
- De Bernardis, F., Sullivan, P.A. und Cassone, A. (2001). Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med. Mycol.* 39, 303-313.
- de Veer, J., Sim, H., Whisstock, J.C., Devenish, R.J. und Ralph, S.J. (1998). IFI60/ISG60/IFIT4, a new member of the human IFI54/IFIT2 family of interferon-stimulated genes. *Genomics* 54, 267-277.
- Deb, D.K., Sassano, A., Lekmine, F., Majchrzak, B., Verma, A., Kambhampati, S., Uddin, ., Rahman, A., Fish, E.N. und Plataniias, L.C. (2003). Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *J. Immunol.* 171, 267-273.
- Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M. und Kovarik, P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest* 109, 1271-1277.
- Denning, 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.

- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. und Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15623-15628.
- 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., 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.
- Diamond, G., Jones, D.E. und Bevins, C.L. (1993). Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 4596-4600.
- Diamond, G., Kaiser, V., Rhodes, J., Russel, J.P., Bevins, C.L. (2000). Transcriptional Regulation of  $\beta$ -Defensin Gene Expression in Tracheal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 68, 113-119.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. und Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6025-6030.
- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S. und Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188, 373-386.
- Dieu-Nosjean, M.C., Massacrier, C., Homey, B., Vanbervliet, B., Pin, J.J., Vicari, A., Lebecque, S., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Zlotnik, A. und Caux, C. (2000). Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 192, 705-718.
- Donato, R. (1999). Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim. Biophys. Acta* 1450, 191-231.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., van de Putte, L.B. und Lipsky, P.E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12, 1063-1073.
- Dunsche, A., Acil, Y., Siebert, R., Harder, J., Schröder, J.M. und Jepsen, S. (2001). Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J. Oral Pathol. Med.* 30, 154-158.
- Dunsche, A., Acil, Y., Dommisch, H., Siebert, R., Schröder, J.M. und Jepsen, S. (2002). The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur. J. Oral Sci.* 110, 121-124.
- Eisen, J.A., Sweder, K.S. und Hanawalt, P.C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.* 23, 2715-2723.
- Epelman, S., Bruno, T.F., Neely, G.G., Woods, D.E. und Mody, C.H. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces transcriptional expression of proinflammatory cytokines and chemokines. *Infect. Immun.* 68, 4811-4814.
- Ernst, R.K., Yi, E.C., Guo, L., Lim, K.B., Burns, J.L., Hackett, M. und Miller, S.I. (1999). Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286, 1561-1565.
- Ezpechuk, Y.V., Leung, D.Y., Middleton, M.H., Bina, P., Reiser, R. und Norris, D.A. (1996). Staphylococcal toxins and protein A differentially induce cytotoxicity and release of tumor necrosis factor-alpha from human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 107, 603-609.
- Fernie-King, B.A., Seilly, D.J., Davies, A. und Lachmann, P.J. (2002). Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect. Immun.* 70, 4908-4916.

- Flier, J., Boorsma, D.M., van Beek, P.J., Nieboer, C., Stoof, T.J., Willemze, R. und Tensen, C.P. (2001). Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, und CXCL11 in different types of skin inflammation. *J. Pathol.* *194*, 398-405.
- Fritsch, P. (1998). *Dematologie und Venerologie*, Springer-Verlag
- 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.
- Gadek, J.E., Fells, G.A., Wright, D.G. und Crystal, R.G. (1980). Human neutrophil elastase functions as a type III collagen "collagenase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *95*, 1815-1822.
- Gao, J.L., Kuhns, D.B., Tiffany, H.L., McDermott, D., Li, X., Francke, U. und Murphy, P.M. (1993). Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J. Exp. Med.* *177*, 1421-1427.
- Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* *13*, 122-43, table.
- Ghosh, S. und Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* *109*, Suppl: S81-96
- Gillitzer, R., Ritter, U., Spandau, U., Goebeler, M. und Brocker, E.B. (1996). Differential expression of GRO-alpha and IL-8 mRNA in psoriasis: a model for neutrophil migration and accumulation in vivo. *J. Invest Dermatol.* *107*, 778-782.
- Giustizieri, M.L., Mascia, F., Frezzolini, A., De Pita, O., Chinni, L.M., Giannetti, A., Girolomoni, G. und Pastore, S. (2001). Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* *107*, 871-877.
- Goebeler, M., Gillitzer, R., Kilian, K., Utzel, K., Brocker, E.B., Rapp, U.R. und Ludwig, S. (2001). Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood* *97*, 46-55.
- Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. und Strong, R.K. (2002). The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell* *10*, 1033-1043.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* *111*, 927-930.
- Gosselin, D., DeSanctis, J., Boule, M., Skamene, E., Matouk, C. und Radzioch, D. (1995). Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* *63*, 3272-3278.
- Gottlieb, A.B., Luster, A.D., Posnett, D.N. und Carter, D.M. (1988). Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *J. Exp. Med.* *168*, 941-948.
- Goyette, P., Feng, C.C., Wang, W., Seguin, F. und Lohnes, D. (2000). Characterization of retinoic acid receptor-deficient keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *275*, 16497-16505.
- Gu, L., Tseng, S., Horner, R.M., Tam, C., Loda, M. und Rollins, B.J. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* *404*, 407-411.
- Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B. und Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur. J. Biochem.* *238*, 325-332.
- Hahn, E.L., Tai, H.H., He, L.K. und Gamelli, R.L. (1999). Burn injury with infection alters prostaglandin E2 synthesis and metabolism. *J. Trauma* *47*, 1052-1057.

- Harada, H., Willison, K., Sakakibara, J., Miyamoto, M., Fujita, T. und Taniguchi, T. (1990). Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell* 63, 303-312.
- Hardas, B.D., Zhao, X., Zhang, J., Longqing, X., Stoll, S. und Elder, J.T. (1996). Assignment of psoriasis to human chromosomal band 1q21: coordinate overexpression of clustered genes in psoriasis. *J. Invest Dermatol.* 106, 753-758.
- Harder, J., Siebert, R., Zhang, Y., Matthiesen, P., Christophers, E., Schlegelberger, B. und Schröder, J.M. (1997). Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* 46, 472-475.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J.M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L.M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S. und Schröder, J.M. (2000). Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, und 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., 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. und Schröder, J.M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* 277, 46779-46784.
- Hein, H., Schlüter, C., Kulke, R., Christophers, E., Schröder, J.M. und Bartels, J. (1997). Genomic organization, sequence, and transcriptional regulation of the human eotaxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 537-542.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. und Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hessian, P.A., Edgeworth, J. und Hogg, N. (1993). MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 53, 197-204.
- Hetru, C., Troxler, L. und Hoffmann, J.A. (2003). *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J. Infect. Dis.* 187 Suppl 2, S327-S334.
- Hieshima, K., Imai, T., Opendakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Yoshie, O. und Nomiyama, H. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J. Biol. Chem.* 272, 5846-5853.
- Hoeck, J. und Woisetschlager, M. (2001). STAT6 mediates eotaxin-1 expression in IL-4 or TNF-alpha-induced fibroblasts. *J. Immunol.* 166, 4507-4515.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. und Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L. und Baltimore, D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298, 1241-1245.
- 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.
- Homey, B., Dieu-Nosjean, M.C., Wiesenborn, A., Massacrier, C., Pin, J.J., Oldham, E., Catron, D., Buchanan, M.E., Muller, A., deWaal, M.R., Deng, G., Orozco, R., Ruzicka, T., Lehmann, P., Lebecque, S., Caux, C. und Zlotnik, A. (2000). Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol.* 164, 6621-6632.

- Hoover, D.M., Boulegue, C., Yang, D., Oppenheim, J.J., Tucker, K., Lu, W. und Lubkowski, J. (2002). The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J. Biol. Chem.* *277*, 37647-37654.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. und Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* *168*, 4531-4537.
- Horvath, C.M., Wen, Z. und Darnell, J.E., Jr. (1995). A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* *9*, 984-994.
- Hostetter, M.K. (1994). Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* *7*, 29-42.
- Hsu, H., Xiong, J. und Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* *81*, 495-504.
- Huber, M.A., Denk, A., Peter, R.U., Weber, L., Kraut, N. und Wirth, T. (2002). The IKK-2/Ikappa Balpha /NF-kappa B pathway plays a key role in the regulation of CCR3 and eotaxin-1 in fibroblasts. A critical link to dermatitis in Ikappa Balpha -deficient mice. *J. Biol. Chem.* *277*, 1268-1275.
- Hultmark, D. (1993). Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet.* *9*, 178-183.
- Hultmark, D. (1994). Insect immunology. Ancient relationships. *Nature* *367*, 116-117.
- Ichikawa, J.K., Norris, A., Bangera, M.G., Geiss, G.K., 't Wout, A.B., Bumgarner, R.E. und Lory, S. (2000). Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 9659-9664.
- Imler, J.L. und Hoffmann, J.A. (2000). Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 16-22.
- Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y. und Tanabe, T. (1995). Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J. Biol. Chem.* *270*, 24965-24971.
- Ip, Y.T., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K. und Levine, M. (1993). Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* *75*, 753-763.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum-Verlag
- Janeway, C.A., Jr. und Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197-216.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. und Navaratnam, N. (2002). An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* *79*, 285-296.
- Jarosz, J. (1997). Identification of immune inhibitor from *Pseudomonas aeruginosa* of inducible cell-free antibacterial activity in insects. *Cytobios* *89*, 73-80.
- Jean-Baptiste, S., O'Toole, E.A., Chen, M., Guitart, J., Paller, A. und Chan, L.S. (2002). Expression of eotaxin, an eosinophil-selective chemokine, parallels eosinophil accumulation in the vesiculobullous stage of *incontinentia pigmenti*. *Clin. Exp. Immunol.* *127*, 470-478.
- Jensen, A.G., Espersen, F., Skinhoj, P., Rosdahl, V.T. und Frimodt-Moller, N. (1993). *Staphylococcus aureus* meningitis. A review of 104 nationwide, consecutive cases. *Arch. Intern. Med.* *153*, 1902-1908.
- Jinquan, T., Vorum, H., Larsen, C.G., Madsen, P., Rasmussen, H.H., Gesser, B., Etzerodt, M., Honore, B., Celis, J.E. und Thestrup-Pedersen, K. (1996). Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J. Invest Dermatol.* *107*, 5-10.

- Jinquan, T., Jing, C., Jacobi, H.H., Reimert, C.M., Millner, A., Quan, S., Hansen, J.B., Dissing, S., Malling, H.J., Skov, P.S. und Poulsen, L.K. (2000). CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J. Immunol.* *165*, 1548-1556.
- Kaburagi, Y., Shimada, Y., Nagaoka, T., Hasegawa, M., Takehara, K. und Sato, S. (2001). Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, und eotaxin) in patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* *293*, 350-355.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F. und Liu, Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* *194*, 863-869.
- Kamijo, R., Shapiro, D., Gerecitano, J., Le, J., Bosland, M. und Vilcek, J. (1994). Biological functions of IFN-gamma and IFN-alpha/beta: lessons from studies in gene knockout mice. *Hokkaido Igaku Zasshi* *69*, 1332-1338.
- Kato, A., Homma, T., Batchelor, J., Hashimoto, N., Imai, S., Wakiguchi, H., Saito, H. und Matsumoto, K. (2003). Interferon-alpha/beta receptor-mediated selective induction of a gene cluster by CpG oligodeoxynucleotide 2006. *BMC. Immunol.* *4*, 8.
- Kaufmann, S.H. (1990). Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today* *11*, 129-136.
- Kawaguchi, M., Onuchic, L.F., Li, X.D., Essayan, D.M., Schröder, J., Xiao, H.Q., Liu, M.C., Krishnaswamy, G., Germino, G. und Huang, S.K. (2001). Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma. *J. Immunol.* *167*, 4430-4435.
- Ke, Y., Rudland, P.S., Jing, C, Smith, P. und Foster, C.S. (1999). Systematic differential display: A strategy for a complete assessment of differential gene expression. *Anal. Biochem.* *269*, 201-204.
- Kel, A., Kel-Margoulis, O., Babenko, V. und Wingender, E. (1999). Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells. *J. Mol. Biol.* *288*, 353-376.
- Kimura, T., Nakayama, K., Penninger, J., Kitagawa, M., Harada, H., Matsuyama, T., Tanaka, N., Kamijo, R., Vilcek, J. und Mak, T.W. (1994). Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science* *264*, 1921-1924.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A.H., Sengelov, H. und Borregaard, N. (1993). Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* *268*, 10425-10432.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. und Klinman, D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* *374*, 546-549.
- Kroger, A., Koster, M., Schröder, K., Hauser, und Mueller, P.P. (2002). Activities of IRF-1. *J. Interferon Cytokine Res.* *22*, 5-14.
- Kruppa, G., Thoma, B., Machleidt, T., Wiegmann, K. und Kronke, M. (1992). Inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated NF-kappa B activation by selective blockade of the human 55-kDa TNF receptor. *J. Immunol.* *148*, 3152-3157.
- Kuang, W.W., Thompson, D.A., Hoch, R.V. und Weigel, R.J. (1998). Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res.* *26*, 1116-1123.
- Kupper, T.S. and Groves, R.W. (1995). The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J. Invest Dermatol.* *105*, 62S-66S.
- Kutsch, C.L., Norris, D.A. und Arend, W.P. (1993). Tumor necrosis factor-alpha induces interleukin-1 alpha and interleukin-1 receptor antagonist production by cultured human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* *101*, 79-85.

- Lagoumintzis, G., Christofidou, M., Dimitracopoulos, G. und Paliogianni, F. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. *Infect. Immun.* *71*, 4614-4622.
- Lamb, J.R., Tugendreich, S. und Hieter, P. (1995). Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* *20*, 257-259.
- Larsen, C.G. Anderson, A.O., Oppenheim, J.J. und Matsushima, K. (1989). Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* *68*, 31-36.
- Lehmann, J., Retz, M., Harder, J., Krams, M., Kellner, U., Hartmann, J., Hohgrawe, K., Raffenberg, U., Gerber, M., Loch, T., Weichert-Jacobsen, K. und Stockle, M. (2002). Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC. Infect. Dis.* *2*, 20.
- Leiferman, K.M. (1995). Hypereosinophilic syndrome. *Semin. Dermatol.* *14*, 122-128.
- Leimenstoll, G., Zabel, P., Schroeder, P., Schlaak, M. und Niedermayer, W. (1993). Suppression of OKT3-induced tumor necrosis factor alpha formation by pentoxifylline in renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* *25*, 561-563.
- 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.
- Leung, D.Y. (2000). Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J. Allergy Clin. Immunol.* *105*, 860-876.
- Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R., Reich, N. und Darnell, J.E., Jr. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev.* *2*, 383-393.
- Liang, P. und Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* *257*, 967-971.
- Liao, F., Lee, H.H. und Farber, J.M. (1997). Cloning of STRL22, a new human gene encoding a G-protein-coupled receptor related to chemokine receptors and located on chromosome 6q27. *Genomics* *40*, 175-180.
- Liao, F., Rabin, R.L., Smith, C.S., Sharma, G., Nutman, T.B. und Farber, J.M. (1999). CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J. Immunol.* *162*, 186-194.
- Lin, T.J., Maher, L.H., Gomi, K., McCurdy, J.D., Garduno, R. und Marshall, J.S. (2003). Selective early production of CCL20, or macrophage inflammatory protein 3alpha, by human mast cells in response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* *71*, 365-373.
- Lindl, T. und Bauer, J. (1994). *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Fischer-Verlag. Stuttgart
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. und Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* *75*, 59-72.
- Liu, Q. und Nilsen-Hamilton, M. (1995). Identification of a new acute phase protein. *J. Biol. Chem.* *270*, 22565-22570.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. und Moser, B. (1996). Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. *J. Immunol.* *156*, 322-327.
- Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrucker, H.W., Duncan, G.S., Bischof, S., Rollinghoff, M. und Mak, T.W. (1997). Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity* *6*, 681-689.

- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339, 520-532.
- Lu, B., Rutledge, B.J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., North, R., Gerard, C. und Rollins, B.J. (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. J. Exp. Med. 187, 601-608.
- Lu, T., Costello, C.M., Croucher P.J.P., Häslér, G., Deuschl, G. und Schreiber, S.: A simple and general microarray normalization technique using Zipf's law. (in Revision bei Nucleic Acid Research).
- Lund, P.K., Moats-Staats, B.M., Simmons, G., Hoyt, E., D'Ercole, A.J., Martin, F. und Van Wyk, J.J. (1985). Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding human ubiquitin reveals that ubiquitin is synthesized as a precursor. J. Biol. Chem. 260, 7609-7613.
- Luster, A.D., Unkeless, J.C. und Ravetch, J.V. (1985). Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. Nature 315, 672-676.
- Madsen, P., Rasmussen, H.H., Leffers, H., Honore, B. und Celis, J.E. (1992). Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. J. Invest Dermatol. 99, 299-305.
- Mallbris, L., O'Brien, K.P., Hulthen, A., Sandstedt, B., Cowland, J.B., Borregaard, N. und Stahle-Backdahl, M. (2002). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker for dysregulated keratinocyte differentiation in human skin. Exp. Dermatol. 11, 584-591.
- Marie, I., Durbin, J.E. und Levy, D.E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. EMBO J. 17, 6660-6669.
- Marty, C., Browning, D.D. und Ye, R.D. (2003). Identification of tetratricopeptide repeat 1 as an adaptor protein that interacts with heterotrimeric G proteins and the small GTPase Ras. Mol. Cell Biol. 23, 3847-3858.
- Mathews, M., Jia, H.P., Guthmiller, J.M., Losh, G., Graham, S., Johnson, G.K., Tack, B.F. und McCray, P.B., Jr. (1999). Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. Infect. Immun. 67, 2740-2745.
- Matsukura, S., Stellato, C., Plitt, J.R., Bickel, C., Miura, K., Georas, S.N., Casolaro, V. und Schleimer, R.P. (1999). Activation of eotaxin gene transcription by NF-kappa B and STAT6 in human airway epithelial cells. J. Immunol. 163, 6876-6883.
- Matsuura, H., Sakaue, M., Subbaramaiah, K., Kamitani, H., Eling, T.E., Dannenberg, A.J., Tanabe, T., Inoue, H., Arata, J. und Jetten, A.M. (1999). Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon gamma and transforming growth factor alpha in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. J. Biol. Chem. 274, 29138-29148.
- 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.
- McClaren, M. und Isseroff, R.R. (1994). Dynamic changes in intracellular localization and isoforms of the 27-kD stress protein in human keratinocytes. J. Invest Dermatol. 102, 375-381.
- McGarry, T.J. und Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. Cell 93, 1043-1053.
- Meister, M., Hetru, C und Hoffmann, J.A. (2000). The antimicrobial host defense of *Drosophila*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 248, 17-36.
- Merendino, A.M., Paul, C., Vignola, A.M., Costa, M.A., Melis, M., Chiappara, G., Izzo, V., Bousquet, J. und Arrigo, A.P. (2002). Heat shock protein-27 protects human bronchial epithelial cells against oxidative stress-mediated apoptosis: possible implication in asthma. Cell Stress. Chaperones. 7, 269-280.

- Messer, G. und Rupec, R.A. (2001). Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). I. Function and regulation. *Hautarzt* 52, 677-685.
- Meyer-Hoffert, U., Wichmann, N., Schwichtenberg, L., White, P.C. und Wiedow, O. (2003). Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 12, 418-425.
- Meyer, J.E., Harder, J., Gorogh, T., Schröder, J.M. und Maune, S. (2000). hBD-2 gene expression in nasal mucosa. *Laryngorhinootologie* 79, 400-403.
- Michaut, L., Flister, S., Neeb, M., White, K.P., Certa, U. und Gehring, W.J. (2003). Analysis of the eye developmental pathway in *Drosophila* using DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 4024-4029.
- Middleton, M.H. und Norris, D.A. (1995). Cytokine-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes is highly variable in keratinocyte strains from different donors. *J. Invest Dermatol.* 104, 489-496.
- Ming, W.J., Bersani, L. und Mantovani, A. (1987). Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 138, 1469-1474.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. und Roch, P. (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486, 185-190.
- Mizutani, H., Black, R. und Kupper, T.S. (1991). Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J Clin Invest.* 87, 1066-1071
- Mochizuki, M., Bartels, J., Mallet, A.I., Christophers, E. und Schröder, J.M. (1998). IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J. Immunol.* 160, 60-68.
- Mogi, M., Inagaki, H., Kojima, K., Minami, M. und Harada, M. (1995). Transforming growth factor-alpha in human submandibular gland and saliva. *J. Immunoassay* 16, 379-394.
- Mori, N., Oishi, K., Sar, B., Mukaida, N., Nagatake, T., Matsushima, K. und Yamamoto, N. (1999). Essential role of transcription factor nuclear factor-kappaB in regulation of interleukin-8 gene expression by nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* 67, 3872-3878.
- Mosmann, T.R. und Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.
- Mukaida, N., Okamoto, S., Ishikawa, Y. und Matsushima, K. (1994). Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 56, 554-558.
- Mulligan, M.S., Vaporciyan, A.A., Miyasaka, M., Tamatani, T. und Ward, P.A. (1993). Tumor necrosis factor alpha regulates in vivo intrapulmonary expression of ICAM-1. *Am. J. Pathol.* 142, 1739-1749.
- Murray, H.W. (1992). The interferons, macrophage activation, and host defense against nonviral pathogens. *J. Interferon Res.* 12, 319-322.
- Nacken, W., Roth, J., Sorg, C. und Kerkhoff, C. (2003). S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc. Res. Tech.* 60, 569-580.
- Nagira, M., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Ridanpaa, M., Takagi, S., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H. und Yoshie, O. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J. Biol. Chem.* 272, 19518-19524.
- Nakayama, T., Fujisawa, R., Yamada, H., Horikawa, T., Kawasaki, H., Hieshima, K., Izawa, D., Fujiie, K., Tezuka, T. und Yoshie, O. (2001). Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. *Int. Immunol.* 13, 95-103.

- Nathan, C.F. und Hibbs, J.B. Jr. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 3, 65-70.
- Navarro, D., Lennette, E., Tugizov, S. und Pereira, L. (1997). Humoral immune response to functional regions of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Med. Virol.* 52, 451-459.
- Navarro, L., Mowen, K., Rodems, S., Weaver, B., Reich, N., Spector, D. und David, M. (1998). Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol. Cell Biol.* 18, 3796-3802.
- Navarro, L. und David, M. (1999). p38-dependent activation of interferon regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 274, 35535-35538.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R. und Lefkowitz, J.B. (1986). Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 69-102.
- Nicholl, M.J., Robinson, L.H. und Preston, C.M. (2000). Activation of cellular interferon-responsive genes after infection of human cells with herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 81, 2215-2218.
- Nickoloff, B.J. (2001). Creation of psoriatic plaques: the ultimate tumor suppressor pathway. A new model for an ancient T-cell-mediated skin disease. *Viewpoint. J. Cutan. Pathol.* 28, 57-64.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10, 1-6.
- Nomiyama, H., Fukuda, S., Iio, M., Tanase, S., Miura, R. und Yoshie, O. (1999). Organization of the chemokine gene cluster on human chromosome 17q11.2 containing the genes for CC chemokine MIP1-1, HCC-2, HCC-1, LEC, und RANTES. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 227-234.
- Nomura, I., Goleva, E., Howell, M.D., Hamid, Q.A., Ong, P.Y., Hall, C.F., Darst, M.A., Gao, B., Boguniewicz, M., Travers, J.B. und Leung, D.Y. (2003). Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J. Immunol.* 171, 3262-3269.
- Ogilvie, P., Bardi, G., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. und Uguccioni, M. (2001). Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* 97, 1920-1924.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. und Mattaj, I.W. (2000). PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101, 187-198.
- Opipari, A.W. Jr., Hu, H.M., Yabkowitz, R. und Dixit, V.M. (1992). The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 267, 12424-12427.
- Paulsen, F.P., Pufe, T., Schaudig, U., Held-Feindt, J., Lehmann, J., Schröder, J.M. und Tillmann, B.N. (2001). Detection of natural peptide antibiotics in human nasolacrimal ducts. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2157-2163.
- Pegues, D.A., Carr, D.B. und Hopkins, C.C. (1994). Infectious complications associated with temporary epidural catheters. *Clin. Infect. Dis.* 19, 970-972.
- Pelicano, L., Li, F., Schindler, C. und Chelbi-Alix, M.K. (1997). Retinoic acid enhances the expression of interferon-induced proteins: evidence for multiple mechanisms of action. *Oncogene* 15, 2349-2359.
- Perez-Canadillas, J.M., Zaballos, A., Gutierrez, J., Varona, R., Roncal, F., Albar, J.P., Marquez, G. und Bruix, M. (2001). NMR solution structure of murine CCL20/MIP-3alpha, a chemokine that specifically chemoattracts immature dendritic cells and lymphocytes through its highly specific interaction with the beta-chemokine receptor CCR6. *J. Biol. Chem.* 276, 28372-28379.
- Petering, H., Kluthe, C., Dulkys, Y., Kiehl, P., Ponath, P.D., Kapp, A. und Elsner, J. (2001). Characterization of the CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 116, 549-555.

- Peters, M.S., Schroeter, A.L., Kephart, G.M. und Gleich, G.J. (1983). Localization of eosinophil granule major basic protein in chronic urticaria. *J. Invest Dermatol.* *81*, 39-43.
- Pier, G.B. (2000). Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 8822-8828.
- Pivarsci, 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.
- Ponath, P.D., Qin, S., Post, T.W., Wang, J., Wu, L., Gerard, N.P., Newman, W., Gerard, C. und Mackay, C.R. (1996). Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J. Exp. Med.* *183*, 2437-2448.
- Ponting, C.P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. und Koonin, E.V. (1999). Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol.* *289*, 729-745.
- Powers, J.C. und Bengali, Z.H. (1986). Elastase inhibitors for treatment of emphysema. Approaches to synthesis and biological evaluation. *Am. Rev. Respir. Dis.* *134*, 1097-1100.
- Proost, P., Vynckier, A.K., Mahieu, F., Put, W., Grillet, B., Struyf, S., Wuyts, A., Opdenakker, G. und Van Damme, J. (2003). Microbial Toll-like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN-gamma and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in septic arthritis. *Eur. J. Immunol.* *33*, 3146-3153.
- 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.
- Reilly, C.F. und Travis, J. (1980). The degradation of human lung elastin by neutrophil proteinases. *Biochim. Biophys. Acta* *621*, 147-157.
- Revathi, G., Puri, J. und Jain, B.K. (1998). Bacteriology of burns. *Burns* *24*, 347-349.
- Rhen, M., Eriksson, S. und Pettersson, S. (2000). Bacterial adaptation to host innate immunity responses. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 60-64.
- Rich, B.E. und Steitz, J.A. (1987). Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol Cell Biol.* *7*, 4065-74.
- 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.
- Ristimaki, A., Garfinkel, S., Wessendorf, J., Maciag, T. und Hla, T. (1994). Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* *269*, 11769-11775.
- Romagnani, S. (1996). Development of Th 1- or Th 2-dominated immune responses: what about the polarizing signals? *Int. J. Clin. Lab Res.* *26*, 83-98.
- Romagnoli, G., Nisini, R., Chiani, P., Mariotti, S., Teloni, R., Cassone, A. und Torosantucci, A. (2003). The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. *J. Leukoc. Biol.*
- Roth, J., Teigelkamp, S., Wilke, M., Grun, L., Tummler, B. und Sorg, C. (1992). Complex pattern of the myelomonocytic differentiation antigens MRP8 and MRP14 during chronic airway inflammation. *Immunobiology* *186*, 304-314.

- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. und Goeddel, D.V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.
- 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-kappaB: 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.
- Rudack, C., Hermann, W., Eble, J. und Schröder, J.M. (2002). Neutrophil chemokines in cultured nasal fibroblasts. *Allergy* 57, 1159-1164.
- Rudack, C., Maune, S., Eble, J. und Schröder, J.M. (2003). The Primary Role in Biologic Activity of the Neutrophil Chemokines IL-8 and GRO-alpha in Cultured Nasal Epithelial Cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 23, 113-123.
- Rudt, F. und Pieler, T. (2001). Cytosolic import factor- and Ran-independent nuclear transport of ribosomal protein L5. *Eur. J. Cell Biol.* 80, 661-668.
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. und Tessier, P.A. (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, und S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 170, 3233-3242.
- Saha, S. und Rangarajan, P.N. (2003). Common host genes are activated in mouse brain by Japanese encephalitis and rabies viruses. *J. Gen. Virol.* 84, 1729-1735.
- Sallusto, F., Mackay, C.R. und Lanzavecchia, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277, 2005-2007.
- Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition, Vol. 1-3*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sambrook, J. und Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition, Vol. 1-3*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M. und Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, und preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55-89.
- Sasaki, T., Kano, R., Sato, H., Nakamura, Y., Watanabe, S. und Hasegawa, A. (2003). Effects of *staphylococci* on cytokine production from human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 148, 46-50.
- 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.
- Schaller, M., Mailhammer, R. und Korting, H.C. (2002). Cytokine expression induced by *Candida albicans* in a model of cutaneous candidosis based on reconstituted human epidermis. *J. Med. Microbiol.* 51, 672-676.
- Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K. und Baldwin, A.S. Jr. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-286.
- Schitteck, 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.
- Schröder, J.M., Mrowietz, U., Morita, E. und Christophers, E. (1987). Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J. Immunol.* 139, 3474-3483.

- Schröder, J.M., Gregory, H., Young, J. und Christophers, E. (1992). Neutrophil-activating proteins in psoriasis. *J. Invest Dermatol.* *98*, 241-247.
- Schröder, J.M. (1993). Significance of Cytokines in the Treatment of Infectious Diseases. Sonderdruck. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Schröder, J.M. (1995). Cytokine networks in the skin. *J Invest Dermatol.* *105*, 20S-24S
- Schröder, J.M. und Harder, J. (1999). Human beta-defensin-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *31*, 645-651.
- Schröder, J.M. (1999). Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* *57*, 121-134.
- Schröder, J.M. (2002). Antimicrobial peptides: effector molecules of the skin as immune organ. *Hautarzt* *53*, 424-434.
- Schwichtenberg, L. (2000). Untersuchungen zur Induktion von Abwehrfunktionen epithelialer Zellen durch Mikroorganismen (Diplomarbeit). Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Schwichtenberg, L. (2003). Die Bedeutung Pathogen-assoziiertes Moleküle bei der Induktion epithelialer antimikrobieller Proteine und proinflammatorischer Zytokine (Dissertation). Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Sengelov, H., Boulay, F., Kjeldsen, L. und Borregaard, N. (1994). Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem. J.* *299 ( Pt 2)*, 473-479.
- Seo, S.J., Ahn, S.W., Hong, C.K. und Ro, B.I. (2001). Expressions of beta-defensins in human keratinocyte cell lines. *J. Dermatol. Sci.* *27*, 183-191.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A. und Pamer, E.G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity.* *19*, 59-70.
- Shao, W., Halachmi, S. und Brown, M. (2002). ERAP140, a conserved tissue-specific nuclear receptor coactivator. *Mol. Cell Biol.* *22*, 3358-3372.
- Shoup, M., He, L.K., Liu, H., Shankar, R. und Gamelli, R. (1998). Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 improves survival and restores leukocyte counts in burn infection. *J. Trauma* *45*, 215-220.
- Siembieda, S.P. und Lakatua, D.J. (1998). Improved method to retrieve DNA from dried silver-stained polyacrylamide gels. *Clin. Chem.* *44*, 1989-1991.
- Sikorski, R.S., Boguski, M.S., Goebel, M. und Hieter, P. (1990). A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* *60*, 307-317.
- Simpson, A.J., Maxwell, A.I., Govan, J.R., Haslett, C. und Sallenave, J.M. (1999). Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett.* *452*, 309-313.
- Singer, A.J. und Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* *341*, 738-746.
- Smahi, A., Courtois, G., Rabia, S.H., Doffinger, R., Bodemer, C., Munnich, A., Casanova, J.L. und Israel, A. (2002). The NF-kappaB signalling pathway in human diseases: from *incontinentia pigmenti* to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2371-2375.
- Smart, S.J. und Casale, T.B. (1994). TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. *Am. J. Physiol* *266*, L238-L245.
- Smith, J.B. und Herschman, H.R. (1995). Glucocorticoid-attenuated response genes encode intercellular mediators, including a new C-X-C chemokine. *J. Biol. Chem.* *270*, 16756-16765.

- Smith, J.B. und Herschman, H.R. (1996). The glucocorticoid attenuated response genes GARG-16, GARG-39, und GARG-49/IRG2 encode inducible proteins containing multiple tetratricopeptide repeat domains. *Arch. Biochem. Biophys.* 330, 290-300.
- Smith, J.B., Nguyen, T.T., Hughes, H.J., Herschman, H.R., Widney, D.P., Bui, K.C. und Rovai, L.E. (2002). Glucocorticoid-attenuated response genes induced in the lung during endotoxemia. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 283, L636-L647.
- Smith, R.S., Fedyk, E.R., Springer, T.A., Mukaida, N., Iglewski, B.H. und Phipps, R.P. (2001). IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J. Immunol.* 167, 366-374.
- Smith, R.S., Harris, S.G., Phipps, R. und Iglewski, B. (2002). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J. Bacteriol.* 184, 1132-1139.
- Song, H.Y., Rothe, M. und Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6721-6725.
- Song, H.Y., Rothe, M. und Goeddel, .V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6721-6725.
- Sonnhammer, E. L. L., von Heijne, G., und Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In *Proceedings of the 6th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB)*: 175-182
- Sorensen, O.E., Cowland, J.B., Theilgaard-Monch, K., Liu, L., Ganz, T. und Borregaard, N. (2003). Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.* 170, 5583-5589.
- Sorli, C.H., Zhang, H.J., Armstrong, M.B., Rajotte, R.V., Maclouf, J. und Robertson, R.P. (1998). Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 1788-1793.
- Starmer, T.D., Barker, C.K., Jia, H.P., Kang, Y. und McCray P.B. Jr. (2003). CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29, 627-633
- Stein, J. und Liang, P. (2002). Differential display technology: a general guide. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1235-1240.
- Steinbakk, M., Naess-Andresen, C.F., Lingaas, E., Dale, I., Brandtzaeg, P. und Fagerhol, M.K. (1990). Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 336, 763-765.
- Strasser, F., Gowland, P.L. und Ruef, C. (1997). Elevated serum macrophage inhibitory factor-related protein (MRP) 8/14 levels in advanced HIV infection and during disease exacerbation. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 16, 230-238.
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Showell, H.J., Remick, D.G., Phan, S.H., Ward, P.A. und Marks, R.M. (1989). Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science* 243, 1467-1469.
- Sullivan, S.K., McGrath, D.A., Liao, F., Boehme, S.A., Farber, J.M. und Bacon, K.B. (1999). MIP-3alpha induces human eosinophil migration and activation of the mitogen-activated protein kinases (p42/p44 MAPK). *J. Leukoc. Biol.* 66, 674-682.
- Szolnoky, G., Bata-Csorgo, Z., Kenderessy, A.S., Kiss, M., Pivarcsi, A., Novak, Z., Nagy, N.K., Michel, G., Ruzicka, T., Marodi, L., Dobozy, A. und Kemeny, L. (2001). A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*. *J. Invest Dermatol.* 117, 205-213.

- Taki, S., Sato, T., Ogasawara, K., Fukuda, T., Sato, M., Hida, S., Suzuki, G., Mitsuyama, M., Shin, E.H., Kojima, S., Taniguchi, T. und Asano, Y. (1997). Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1. *Immunity*. *6*, 673-679.
- Tanaka, N., Kawakami, T. und Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol. Cell Biol.* *13*, 4531-4538.
- Tanaka, N., Fujioka, A., Tajima, S., Ishibashi, A. und Hirose, S. (2000). Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha stimulate its secretion in vitro. *Br. J. Dermatol.* *143*, 728-732.
- Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J. und Kelvin, D.J. (1993). Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* *260*, 355-358.
- Taub, D.D., Lloyd, A.R., Conlon, K., Wang, J.M., Ortaldo, J.R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D.J. und Oppenheim, J.J. (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1809-1814.
- Taylor, S.S., Ha, E. und McKeon, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J. Cell Biol.* *142*, 1-11.
- Tosi, M.F., Stark, J.M., Smith, C.W., Hamedani, A., Gruenert, D.C. und Infeld, M.D. (1992). Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *7*, 214-221.
- Tracey, K.J. und Cerami, A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* *45*, 491-503.
- Triebel, S., Blaser, J., Reinke, H. und Tschesche, H. (1992). A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett.* *314*, 386-388.
- 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.
- Uddin, S., Sassano, A., Deb, D.K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A.B., Fish, E.N. und Platanias, L.C. (2002). Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J. Biol. Chem.* *277*, 14408-14416.
- Uguccioni, M., D'Apuzzo, M., Loetscher, M., Dewald, B. und Baggiolini, M. (1995). Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1alpha and MIP-1beta on human monocytes. *Eur J Immunol.* *25*, 64-68
- Uguccioni, M., Mackay, C.R., Ochensberger, B., Loetscher, P., Rhee, S., LaRosa, G.J., Rao, P., Ponath, P.D., Baggiolini, M. und Dahinden, C.A. (1997). High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J. Clin. Invest* *100*, 1137-1143.
- Valyi-Nagy, I., Jensen, P.J., Albelda, S.M. und Rodeck, U. (1992). Cytokine-induced expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in neonatal skin explants. *J. Invest Dermatol.* *99*, 350-356.
- Van Delden, C. und Iglewski, B.H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* *4*, 551-560.
- Van Deventer, S.J. (1997). Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* *40*, 443-448.
- Vasil, M.L. und Ochsner, U.A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.* *34*, 399-413.

- Veckman, V., Miettinen, M., Matikainen, S., Lande, R., Giacomini, E., Coccia, M. und Julkunen, I. (2003). *Lactobacilli* and *streptococci* induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 395-402.
- Velculescu, V. E., Madden, S.L., Zhang, L., Lash, A.E., Yu, J., Rago, C., Lal, A., Wang, C.J., Beaudry, G.A., Ciriello, K.M., Cook, B.P., Dufault, M.R., Ferguson, A.T., Gao, Y., He, T.C., Hermeking, H., Hiraldo, S.K., Hwang, P.M., Lopez, M.A., Luderer, H.F., Mathews, B., Petroziello, J.M., Polyak, K., Zavel, L. und Kinzler, K.W. (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nat. Genet.* *23*, 387-388.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304-1351.
- von Stein, O.D., Thies, W.G. und Hofmann, M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2598-2602.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K.R., Fellermann, K., Schröder, J.M. und Stange, E.F. (2003). Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* *9*, 215-223.
- Weinberg, A.N. und Swartz, M.N. (1993). 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.. 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.
- 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.
- 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.
- Wieland, C.W., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M.L., Dinarello, C.A. und Fantuzzi, G. (2002). Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, und exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect. Immun.* *70*, 1352-1358.
- Wong, L.H., Sim, H., Chatterjee-Kishore, M., Hatzinisiriou, I., Devenish, R.J., Stark, G. und Ralph, S.J. (2002). Isolation and characterization of a human STAT1 gene regulatory element. Inducibility by interferon (IFN) types I and II and role of IFN regulatory factor-1. *J. Biol. Chem.* *277*, 19408-19417.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X.F. und Achong, M.K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest* *101*, 311-320.
- Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N. und Yamamoto, S. (1995). Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 31315-31320.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. und Akira, S. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *4*, 1144-1150.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M. und Oppenheim, J.J. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* *286*, 525-528.
- Yang, D., Chen, Q., Hoover, D.M., Staley, P., Tucker, K.D., Lubkowski, J. und Oppenheim, J.J. (2003). Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 448-455.

- Yang, G.P., Ross, D.T., Kuang, W.W., Brown, P.O. und Weigel, R.J. (1999). Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* *27*, 1517-1523.
- 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.
- Yu, M., Tong, J.H., Mao, M., Kan, L.X., Liu, M.M., Sun, Y.W., Fu, G., Jing, Y.K., Yu, L., Lepaslier, D., Lanotte, M., Wang, Z.Y., Chen, Z., Waxman, S., Wang, Y.X., Tan, J.Z. und Chen, S.J. (1997). Cloning of a gene (RIG-G) associated with retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells and representing a new member of a family of interferon-stimulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 7406-7411.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, und 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.
- Zepter, K., Haffner, A., Soohoo, L.F., De Luca, D., Tang, H.P., Fisher, P., Chavinson, J. und Elmets, C.A. (1997). Induction of biologically active IL-1beta-converting enzyme and mature IL-1beta in human keratinocytes by inflammatory and immunologic stimuli. *J Immunol.* *159*, 6203-6208.
- Zhang, Q.H., Ye, M., Wu, X.Y., Ren, S.X., Zhao, M., Zhao, C.J., Fu, G., Shen, Y., Fan, H.Y., Lu, G., Zhong, M., Xu, X.R., Han, Z.G., Zhang, J.W., Tao, J., Huang, Q.H., Zhou, J., Hu, G.X., Gu, J., Chen, S.J., und Chen, Z. (2000). Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome Res* *10*, 1546-1560
- Zhang, J., Dyer, K.D. und Rosenberg, H.F. (2003). Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res.* *31*, 602-607.
- Zhu, H., Cong, J.P. und Shenk, T. (1997). Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 13985-13990.
- Zimmerman, G.A. (2001). Two by two: the pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 10023-10024.
- Zlotnik, A. und Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* *12*, 121-127.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL	N-(3-oxododecanoyl)Homoserinlacton
A	Adenin
AD	Atopische Dermatitis
AP	Activator Protein
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
CBP	Transcriptional Coactivator CREB Binding Protein
CCL	Chemokin, CC-Motiv, Ligand
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
Cox-2	Cyclooxygenase 2
CXCL	CXC Chemokin Ligand
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	deionisierter Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälber Serum
fg	femtogramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GAS	Interferon $\gamma$ -Activated Site
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HBD	humanes $\beta$ -Defensin
HCl	Salzsäure
HCMV	Humaner Cytomegalovirus
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazinSulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HSC	Herpes Simplex Virus
HSP	Hitzeschockprotein
HSPB1	Heat Shock 27kDa Protein 1
ICE	IL-1 $\beta$ Converting Enzyme
IFN	Interferon
IFIT4	Interferon-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IP10	Inferferon $\gamma$ -Inducible Protein 10
IRF	Interferon Regulatory Factor
ISG	Interferon-stimulated Gene
ISGF	Interferon-stimulated Transcription Factor
ISRE	Interferon-stimulated Response Element
ITGB4	Integrin $\beta$ 4
JAK	Janus Kinase
IU	International Units
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LCN	Lipocalin

LPS	Lipopolysacharid
MA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MG-Medium	« Mager »-Medium
Min.	Minute(n)
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
mM	Millimol
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
NF	Nuclear Factor
NFκB	Nuclear Factor of κ Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells
NFκBIA	Nuclear Factor of κ Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells Inhibitor α
NGAL	Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NO	Nitric Oxide
<i>P.a.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAA	Polycrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Pathogen-assoziierte Moleküle
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3	Protease Inhibitor 3, skin-derived
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristatacetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSGL	P-Selectin Glycoprotein Ligand
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
RA	Retinolsäure
RANTES	Regulated on Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
<i>S.a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCY	Small Inducible Cytokine
SDD	Systematische Differential Display
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SELPLG	Selectin P Ligand
SSH	Suppressive Subtractive Hybridisierung
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Std.	Stunde(n)
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor α -induced protein 3
TPR	Tetratricopeptide Repeats
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain Protein
TSB	Trypticase Soy Broth
TYK	Tyrosin Kinase
U	Unit (Enzymaktivität)
USF	Upstream Stimulatory Factor
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

## 9 Anhang

### 9.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide (in 5' - 3'-Richtung)

#### 9.1.1 Für RT- und „Real-Time“-PCR verwendete Oligonukleotide

Produkt	Primer	Sequenz	Annealing-Temp. in °C	Produktgröße in bp
A20 (TNFAIP3)	A20 F	AAG CCG GCT TGT ATT TTG	60	440
	A20 R	GTC TTC GGG GGC AGG CTC ACC		
ALP	ALP F	CCC CCA ATT TCT GTG AGA TG	60	182
	ALP R	ATC AGT GGT GGA GCC AAG TC		
APOBEC3C	Apobec F	GTC GCT GTG GAG ATC ATG G	60	194
	Apobec R	TGA GCA GGA GGC TAG AGG AG		
BUB3	BUB3 F	AGT GGC GAG TAG TGG AAA CG	60	504
	BUB3 R	CTG TTC CCA CAA TCA GCC G		
CCR7	CCR7 F	TCC TTC TCA TCA GCA AGC TGT C	58	500
	CCR7 R	GAG GCA GCC CAG GTC CTT GAA G		
Cox-2 (PTGS2)	Cox-2 F	TCC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT	54	304
	Cox-2 R	AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT		
Elafin (PI3)	PPEL F	CGT GGT GGT GTT CCT CAT C	60	258
	PPEL R	TTC AAG CAG CCC TTA GGG		
Eotaxin (SCYA11)	EOSQP-F	CCC AAC CAC CTG CTG CTT TAA CCT G	60	208
	EOSPQ-B	TGG CTT TGG AGT TGG AGA TTT TTG G		
EPLIN	EPLIN F	GTG CTT CCG TTG CTC CTA TT	60	147
	EPLIN R	TTT TGC CCC ATA GAT CC		
GAPDH	GAPDH F	CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC	variabel	360
	GAPDH R	ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT		
Geminin	Geminin F	AAG TGG CAG AAA AAC GGA GA	60	190
	Geminin R	TCC AGA GGT TCA CCA TTC AG		
HBD-2	hBD2 fa	ATC AGC CAT GAG GGT CTT GT	60	210
	hBD-2 ra	GAG ACC ACA GGT GCC AAT TT		
HBD-2	HBD2-ex-Nco	AGC CCA TGG GTA TAG GCG ATC CTG TTA C	58	130
	HBD2-ex-Xho	ATT TCT CGA GTC ATG GCT TTT TGC AGC ATT T		
HBD- 3	S3-17	AGC CTA GCA GCT ATG AGG ATC	60	206
	S3-13	CTT CGG CAG CAT TTT CGG CCA		
Helicase (PASG)	PASG F	CGA ATG CTG CCA GAA CTA AA	60	115
	PASG R	TGC TGA AGT TGA AAT CTC TG		
HSPB1	HSPB F	ACG AGC ATG GCT ACA TCT CC	60	235
	HSPB R	CTT TAC TTG GCG GCA GTC TC		
HSPC 154	HSPC F	AAA GGC TAT GGG GAG GTG AC	60	170
	HSPC R	TCA CCA CTT CCT GGG TTC TC		

IL-1 $\beta$	IL-1 $\beta$ F	CCA GCT ACG AAT CTC CGA CCA CCA CTA C	60	580
	IL-1 $\beta$ R	TGC TTG AGA GGT GCT GAT GTA CCA GTT G		
IL-8	IL8 F	ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG	60	290
	IL8 R	TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT T		
IFIT4	IFIT4 IS1 F	CTT GAG GCA GAC AGG AAG ACT	60	129
	IFIT4 IS1R	GCT GTG GAA GGA TTT TCT CC		
IP10	IP10 SQ F	CTG CGA TTC TGA TTT GCT GCC T	60	
	IP10 SQ R	GAC ATC TCT TCT CAC CCT TCT TTT TC		
IRF1	IRF 1 F	TAC AAA GCA GGG GAA AAG GA	61	203
	IRF 1 R	TTA GCA TCT CGG CTG GAC TT		
ITGB4	ITGB F	GCT GCA AAG CGA GTA CAG CAG	63	210
	ITGB R	TGC GGT CAA GTT TGG AAG AAC		
MIP-3 $\alpha$	MIP3 $\alpha$ F	CTC CTG GCT GCT TTG ATG TC	61	203
	MIP3 $\alpha$ R	GCG CAC ACA GAC AAC TTT TT		
NF $\kappa$ BIA	NF $\kappa$ BIA F	CTA CAC CTT GCC TGT GAG CA	61	250
	NF $\kappa$ BIA R	CAG GAT TTT GCA GGT CCA CT		
NGAL	NGAL F	ACT CCA CCT CAG ACC TGA T	60	500
	NGAL R	TTC AGG GAG GCC CAG ATA TTT		
PHAX	PHAX F	TCC TAG TAT CAG CGA GGA ACA A	60	242
	PHAX R	ACT TGG CTT CTG CAT GTC CT		
Psoriasisin (S100A7)	Pso1	TTC TTC TAC TCG TGA CGC TTC	62	317
	Pso2	CTC TGC TTG TGG TAG TCT GTG		
RNase7	S2-31	GGAGTCACAGCACGAAGACCA	60	235
	S2-33	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA		
RPL5	RPL5 F	GCA GGA TGG GGT TTG TTA AA	60	209
	RPL5 R	ACG GGC ATA AGC AAT CTG AC		
RPLPO	RPLPO F	TCG ACA ATG GCA GCA TCT AC	60	223
	RPLPO R	GCC TTG ACC TTT TCA GCA AG		
Primase 1	Prim 1 F	TGC CAT TTC CAC TAA TGA AGA G	60	239
	Prim 1 R	CTG TGG TTG AAG GCA GAA GA		
CCL2	SCYA2 F	CCC CAG TCA CCT GCT GTT AT	61	166
	SCYA2 R	TCC TGA ACC CAC TTC TGC TT		
CCL4	SCYA4 F	GTA GCT GCC TTC TGC TCT CC	58	174
	SCYA4 R	GCT TGC TTC TTT TGG TTT GG		
SELPLG	SELPLG F	CTT CTT CGT GTG CAC TGT GGT G	61	234
	SELPLG R	GAT GGC AGA GTG AGC TAA GGG		
S100A8	S100A8 F	ATG CCG TCT ACA GGG ATG AC	60	160
	S100A8 R	ACG CCC ATC TTT ATC ACC AG		
S100A9	S100A9 F	TCA TCA ACA CCT TCC ACC AA	59	169
	S100A9 R	TCT GCA TTT GTG TCC AGG TC		
Small Acidic Protein	SMAP F	TCA ACA TCT CAC TTC CGA ACC	60	169
	SMAP R	CTC CAG CCA CAT CAC CTT CT		
TIMP4	TIMP4 F	CAG ACC CTG CTG CAC CTG AA	61	225
	TIMP4 R	AGG GCT CGA TGT AGT TGC AC		
TNF $\alpha$	TNF- $\alpha$ F	TCA GCT TGA GGG TTT GCT ACA A	59	300
	TNF- $\alpha$ R	TCT GGC CCA GGC AGT CAG ATC		
Oligo d(T)	Oligo d(T)	18xT	42	-
TA-Vektor	PUC B	CGG GCC TCT TCG CTA TTA C	58	Sequenzier- primer
	PUC F	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CC		
	A1SEQ	CTC GCT GCT CTG GCT GCT GT		
	M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG AC		
	M13 F (-20)	CTG GCC GTC GTT TTA C		
	M13 F (-40)	T CGT GAC TGG GAA AAC		

### 9.1.2 Für die SDD-Analyse verwendete Oligonukleotide

ANK	CCT GTG CGC CTG GAG CCT
ANK11A	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TA
ANK11C	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TC
ANK11G	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TG
3DPT11-AA	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TAA
3DPT11-AT	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TAT
3DPT11-AC	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TAC
3DPT11-AG	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TAG
3DPT11-CA	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TCA
3DPT11-CT	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TCT
3DPT11-CC	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TCC
3DPT11-CG	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TCG
3DPT11-GA	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TGA
3DPT11-GT	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TGT
3DPT11-GC	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TGC
3DPT11-GG	CCT GTG CGC CTG GAG CCT TTT TTT TTT TGG
NA1L	A CAG CAG CCA ATA TTA T
NA1O	AAC TTC CCA CCG CCG CTA C
NA1UA	AAC TTC CCA CCG CCG CTA CAC TCG CTG CTC TGG CTG CTG TA
NA1UT	AAC TTC CCA CCG CCG CTA CAC TCG CTG CTC TGG CTG CTG TT
NA1UG	AAC TTC CCA CCG CCG CTA CAC TCG CTG CTC TGG CTG CTG TG
NA1UC	AAC TTC CCA CCG CCG CTA CAC TCG CTG CTC TGG CTG CTG TC
A1DP-AA	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TAA
A1DP-AT	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TAT
A1DP-AC	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TAC
A1DP-AG	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TAG
A1DP-TA	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TTA
A1DP-TT	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TTT
A1DP-TC	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TTC
A1DP-TG	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TTG
A1DP-CA	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TCA
A1DP-CT	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TCT
A1DP-CC	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TCC
A1DP-CG	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TCG
A1DP-GA	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TGA
A1DP-GT	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TGA
A1DP-GC	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TGA
A1DP-GG	C TCG CTG CTC TGG CTG CTG TGA

## 9.2 Untersuchungen zur differentiellen Genexpression mit Hilfe der SDD

Gen-Bezeichnung	Accession-No. gemäß NCBI	Primerpaar*	Bandengröße in bp auf DD-Gel	Länge der mRNA in bp	Lage des sequenzierten Bereiches im Transkript	Anzahl sequenzierter Klone/Häufigkeit des überprüften Gens	Differentielle Genexpression bei: **	Alternatives Splicen
				Anzahl Aminosäuren				
CYR61	NM_001554	5'-AA/CG-3'	680	1887 381	1315-1637	4/1	<i>S.a.</i>	-
Metallothionein 2A	BC007034	5'-AT/CC-3'	395	451 61	58-401	3/1	<i>P.a.</i>	-
Annexin A2	BC021114	5'-AA/AT-3'	800	1368 339	1116-1351	3/1	<i>S.a.</i>	-
Peroxi-redoxin 4	NM_006406	5'-AT/GG-3'	260	921 271	701-921	2/1	HPLC	-
TEGT	XM_035490	5'-AT/AA-3'	1000	2572 237	2345-2560	5/1	<i>S.a.</i>	-
Keratin 16	AF061809	5'-CT/CC-3'	300	2921 473	2688-2921	4/1	<i>P.a.</i>	-
Ferritin (FTH1)	XM_043419	5'-AG/GT-3'	550	804 183	339-802	Direktsequenzierung 1/1	<i>S.a.</i>	-
RAB13	BC000799	5'-AT/GT-3'	325	1211 203	963-1143	6/1	<i>C.a.</i>	-
EMP1	NM_001423	5'-GC/AT-3'	360	2786 157	1637-1946	2/2	<i>S.a.</i>	-
IFIT4	XM_048183	5'-TA/CC-3'	270	2041 490	385-588	5/3	<i>P.a.</i>	-
Reticulon 3	XM_037756	5'-TT/GC-3'	440	2250 167	1091-1332	19/6	<i>P.a.</i>	+
Keratin 17	BC000159	5'-TT/GC-3'	500	1543 432	1301-1497	6/5	<i>P.a.</i>	-
TightJunction Protein 2	XM_005446	5'-TT/GC-3'	440	4480 1190	4128-4478	19/4	<i>P.a.</i>	+
Stonin 2	NM_033104	5'-TT/GC-3'	440	2919 905	2641-2919	12/4	<i>S.a.</i>	-
DnaJ	XM_028966	5'-TT/GC-3'	1100	5160 198	3967- 4589	11/3	HPLC	2
S100 A2	NM_005978	5'-GA/AA-3'	290	428 97	14-264	2/1	<i>P.a.</i>	-
Clone 11	AF397158	Unterschiedl.	Ver-schieden	585	unterschiedlich	14	<i>P.a.</i> , HPLC	-

**Tabelle 8.1. Übersicht über die RT-PCR-Produkte, die nach Durchführung der SDD differentiell erschienen und sequenziert wurden.** Die Übersicht stellt eine Auswahl dar.

\* jeweils angegeben sind die letzten beiden Nukleotide am 3'-Ende der 3-DPT11- und der A1DP-Primer (Stammsequenzen dieser Primer s.9.1.2).

\*\* Bei den hier aufgeführten Organismen war das Signal auf dem silbergefärbtem SDD-Gel am stärksten, aber nicht unbedingt ausschließlich vorhanden.

### 9.3 Übersichtstabelle der auf dem Microarray gebundenen *target*-Gene

ID gemäß NCBI	Genbezeichnung	Synonym
<b>Zytokine, Chemokine und Defensine:</b>		
NM_000576	IL1B	Interleukin 1 $\beta$
NM_000589	IL4	Interleukin 4
NM_000879	IL5	Interleukin 5
NM_000600	IL6	Interleukin 6
NM_000880	IL7	Interleukin 7
NM_000584	IL8	Interleukin 8
NM_000572	IL10	Interleukin 10
NM_000641	IL11	Interleukin 11
NM_000882	IL12	Interleukin 12
NM_002188	IL13	Interleukin 13
XM_034511	IL14	Interleukin 14
NM_000585	IL15	Interleukin 15
NM_004513	IL16	Interleukin 16
NM_014443	IL17B	Interleukin 17B
NM_001562	IL18	Interleukin 18
NM_013371	IL19	Interleukin 19
NM_002986	SCYA11	Chemokine (C-C Motif) ligand 11, Eotaxin
NM_005408	SCYA13	Chemokine (C-C Motif) ligand 13, MCP-4
NM_002982	SCYA2	Chemokine (C-C Motif) ligand 2, MCP1
NM_002990	SCYA22	Small inducible Zytokine A22
NM_002983	SCYA3	Small inducible Zytokine A3
NM_002984	SCYA4	Small inducible Zytokine A4, MIP-1 $\beta$
NM_002985	SCYA5	Chemokine (C-C Motif) ligand 5, RANTES
NM_006273	SCYA7	Chemokine (C-C Motif) ligand 7, MCP 3
NM_005623	SCYA8	Chemokine (C-C Motif) ligand 8, MCP2
NM_001565	SCYB10	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 10, IFI10, INP10
NM_005409	SCYB11 (SCYB9B)	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 11, IP9
NM_002993	SCYB6	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 6 granulocyte chemotactic Protein 2
NM_002995	SCYC1	Chemokine (C Motif) ligand 1, lymphotactin
NM_001511	GRO1	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 1, melanoma growth stimulating activity
NM_002089	GRO2	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 2, MIP2A
NM_002090	GRO3	Chemokine (C-X-C Motif) ligand 3, MIP2B
NM_000757	CSF1	Colony stimulating Factor 1
NM_000758	CSF2	Colony stimulating Factor 2
NM_000759	CSF3	Colony stimulating Factor 3
NM_005217	DEFA3	Defensin, $\alpha$ 3, Neutrophil-Specific
NM_001925	DEFA4	Defensin, $\alpha$ 4, Corticostatin
NM_001926	DEFA6	Defensin, $\alpha$ 6
NM_024013	IFNA1	Interferon, $\alpha$ 1
NM_002176	IFNB1	Interferon, $\beta$ 1
NM_000594	TNF	Tumor Necrosis Factor (TNF Superfamily, Member 2)
NM_000595	LTA	Lymphotoxin $\alpha$ (TNF Superfamily, Member 1)
NM_002638	PI3	Proteaseinhibitor 3, Elafin
NM_000625	NOS2A	Nitric Oxide Synthase 2A
NM_015953	NOSIP	Nitric Oxide Synthase Interacting Protein

<b>Rezeptoren:</b>		
NM_001295	CCR1	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 1
NM_000648	CCR2	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 2
NM_001837	CCR3	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 3
NM_005508	CCR4	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 4
NM_000579	CCR5	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 5
NM_004367	CCR6	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 6
NM_001838	CCR7	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 7
NM_005201	CCR8	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 8
NM_031200	CCR9	Chemokine (C-C Motif) Rezeptor 9
NM_001558	IL10RA	Interleukin 10 Rezeptor, $\alpha$
NM_001559	IL12RB2	Interleukin 12 Rezeptor, $\beta$ 2
NM_003855	IL18R1	Interleukin 18 Rezeptor 1
NM_000877	IL1R1	Interleukin 1 Rezeptor, Type I
NM_004633	IL1R2	Interleukin 1 Rezeptor, Type II
NM_000577	IL1RN	Interleukin 1 Rezeptor antagonist
NM_000418	IL4R	Interleukin 4 Rezeptor
NM_000565	IL6R	Interleukin 6 Rezeptor
NM_000634	IL8RA	Interleukin 8 Rezeptor, $\alpha$
NM_001557	IL8RB	Interleukin 8 Rezeptor, $\beta$
NM_001504	GPR9 (CXCR3)	Chemokine (C-X-C Motif) Rezeptor 3
NM_001296	CCBP2 (CCR10)	Chemokine Binding Protein 2
NM_001716	BLR1 (CXCR5)	Burkitt Lymphoma Rezeptor 1
NM_001736	C5R1	complement component 5 Rezeptor 1
NM_005228	EGFR	epidermal growth Factor Rezeptor
NM_005211	CSF1R	Colony stimulating Factor 1 Rezeptor
NM_006140	CSF2RA	Colony stimulating Factor 2 Rezeptor, $\alpha$
NM_000395	CSF2RB	Colony stimulating Factor 2 Rezeptor, $\beta$
NM_000760	CSF3R	Colony stimulating Factor 3 Rezeptor (granulocyte)
NM_003467	CXCR4	Chemokine (C-X-C Motif) Rezeptor 4
NM_005242	F2RL1	coagulation Factor II (thrombin) Rezeptor-like 1
NM_004101	F2RL2	coagulation Factor II (thrombin) Rezeptor-like 2
NM_003950	F2RL3	coagulation Factor II (thrombin) Rezeptor-like 3
NM_001065.1	TNFRSF1A	Tumor Necrosis Factor Rezeptor superFamily, member 11
NM_001066	TNFRSF1B	Tumor Necrosis Factor Rezeptor superFamily, member 1B
NM_001242	TNFRSF7	Tumor Necrosis Factor Rezeptor superFamily, member 7
NM_002029	FPR1	formyl peptide Rezeptor 1
NM_050434	IFNGR1	Interferon gamma Rezeptor 1
NM_005534	IFNGR2	Interferon gamma Rezeptor 2
NM_002332	LRP1	low density lipoProtein-related Protein 1
NM_002609	PDGFRB	platelet-derived growth Factor Rezeptor
NM_000952	PTAFR	platelet-activating Factor Rezeptor
NM_003242	TGFBR2	transforming growth Factor, $\beta$ Rezeptor II
<b>TLRs und Signaltransduktion:</b>		
NM_003263	TLR1	Toll-Like Rezeptor 1
NM_030956.1	TLR10	Toll-Like Rezeptor 10
NM_003264	TLR2	Toll-Like Rezeptor 2
NM_003265	TLR3	Toll-Like Rezeptor 3
NM_003266	TLR4	Toll-Like Rezeptor 4
NM_003268	TLR5	Toll-Like Rezeptor 5
NM_006068	TLR6	Toll-Like Rezeptor 6
NM_016562	TLR7	Toll-Like Rezeptor 7
NM_016610	TLR8	Toll-Like Rezeptor 8

NM_138688	TLR9	Toll-Like Rezeptor 9
NM_002467	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NM_002468	MYD88	myeloid differentiation primary response gene
<b>MAP-Kinasen- und Signaltransduktion:</b>		
NM_002755	MAP2K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
NM_030662	MAP2K2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2
NM_002756	MAP2K3	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3
NM_003010	MAP2K4	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4
NM_002757	MAP2K5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 5
NM_031988	MAP2K6	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6
NM_005043	MAP2K7	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7
XM_042066	MAP3K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1
NM_002419	MAP3K11	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 11
NM_006301	MAP3K12	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 12
NM_004721	MAP3K13	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 13
NM_006609	MAP3K2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2
NM_006724	MAP3K4	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4
NM_005923	MAP3K5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 5
NM_003188	MAP3K7	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7
NM_005204	MAP3K8	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8, Cot, Tpl
NM_007181	MAP4K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 1
NM_004579	MAP4K2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 2
NM_004834	MAP4K4	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4
NM_006575	MAP4K5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 5
NM_002745	MAPK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
XM_055766	MAPK3	Mitogen-Activated Protein Kinase 3
NM_002747	MAPK4	Mitogen-Activated Protein Kinase 4
NM_002748	MAPK6	Mitogen-Activated Protein Kinase 6
NM_002749	MAPK7	Mitogen-Activated Protein Kinase 7
NM_002750	MAPK8	Mitogen-Activated Protein Kinase 8
NM_002753	MAPK10	Mitogen-Activated Protein Kinase 10
XM_035889	MAPK11	Mitogen-Activated Protein Kinase 11
NM_002969	MAPK12	Mitogen-Activated Protein Kinase 12
NM_002754	MAPK13	Mitogen-Activated Protein Kinase 13
NM_001315	MAPK14	Mitogen-Activated Protein Kinase 14
NM_012324	MAPK8IP2	Mitogen-Activated Protein Kinase 8 interacting Protein 2
NM_015133	MAPK8IP3	Mitogen-Activated Protein Kinase 8 interacting Protein 3
NM_002752	MAPK9	Mitogen-Activated Protein Kinase 9
NM_032960	MAPKAPK2	Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2
NM_004635	MAPKAPK3	Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 3
NM_004417	DUSP1	Dual Specificity Phosphatase 1
NM_004418	DUSP2	Dual Specificity Phosphatase 2
NM_004090	DUSP3	Dual Specificity Phosphatase 3
NM_001394	DUSP4	Dual Specificity Phosphatase 4
NM_004419	DUSP5	Dual Specificity Phosphatase 5
NM_001946	DUSP6	Dual Specificity Phosphatase 6
NM_004420	DUSP8	Dual Specificity Phosphatase 8
NM_001395	DUSP9	Dual Specificity Phosphatase 9
NM_007207	DUSP10	Dual Specificity Phosphatase 10
NM_004083	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
NM_005252	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
NM_005229	ELK1	member of ETS oncogene Family (ELK1)
NM_001973	ELK4	ETS-domain Protein (SRF accessory Protein 1)

NM_003684	MKNK1	MAP Kinase-interacting serine/threonine Kinase 1
<b>Differenzierungsmarker:</b>		
NM_003125	SPRR1B	Small Proline-Rich Protein 1B (Cornifin)
NM_005988	SPRR2A	Small Proline-Rich Protein 2A
NM_006518	SPRR2C	Small Proline-Rich Protein 2C
AF333955	SPRR2E	Small Proline-Rich Protein 2E
AF333956	SPRR2F	Small Proline-Rich Protein 2F
M60502	FLG	Profilaggrin
NM_005547	IVL	Involucrin
NM_000421	KRT10	Keratin 10
<b>Transkriptionsfaktoren:</b>		
NM_003220	TFAP2A	Transcription Factor AP-2 $\alpha$
NM_003221	TFAP2B	Transcription Factor AP-2 $\beta$
NM_003222	TFAP2C	Transcription Factor AP-2 $\gamma$
NM_0034223	TFAP4	Transcription Factor AP-4
NM_001880	ATF2	activating Transcription Factor 2
NM_004898	CLOCK	clock homolog (mouse)
NM_005902	MADH3	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 3 (Drosophila)
NM_005359	MADH4	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 4 (Drosophila)
NM_005903	MADH5	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 5 (Drosophila)
NM_005904	MADH7	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 7 (Drosophila)
NM_005239	ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
NM_002198	IRF1	Interferon regulatory Factor 1
NM_002199	IRF2	Interferon regulatory Factor 2
NM_002228	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog
NM_002229	JUNB	jun B proto-oncogene
NM_002163	ICSBP1	Interferon consensus sequence Binding Protein 1
NM_002382	MAX	MAX Protein
NM_002397	MEF2C	MADS box Transcription enhancer Factor 2, polypeptide C
NM_006599	NFAT5	nuclear Factor of Activated T-cells 5
<b>Adhäsionsmoleküle:</b>		
NM_000591	CD14	CD14 Antigen
NM_001770	CD19	CD19 Antigen
NM_001771	CD22	CD22 Antigen
NM_006139	CD28	CD28 Antigen(Tp44)
NM_001772	CD33	CD33 Antigen(gp67)
NM_001775	CD38	CD38 Antigen(p45)
NM_000732	CD3D	CD3D antigen
NM_000610	CD44	CD44 Antigen
NM_001777	CD47	CD47 Antigen(integrin associated signal transducer)
NM_001779	CD58	CD58 antigen, (lymphocyte function-associated Antigen3)
NM_001791	CDC42	cell division cycle 42 (GTP Binding Protein, 25kDa)
NM_000201	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
NM_000873	ICAM2	intercellular adhesion molecule 2
NM_002162	ICAM3	intercellular adhesion molecule 3
NM_002209	ITGAL	integrin, $\alpha$ L (CD11A)
NM_000632	ITGAM	integrin, $\alpha$ M
X07979	ITGB1	integrin, $\beta$ 1
NM_000211	ITGB2	integrin, $\beta$ 2
NM_000212	ITGB3	integrin, $\beta$ 3
NM_000213	ITGB4	integrin, $\beta$ 4

NM_003006	SELPLG	selectin P ligand
NM_003123	SPN	sialophorin (CD43)
NM_001712	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
NM_000425	L1CAM	L1 cell adhesion molecule
NM_080682	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
NM_000450	SELE	selectin E (endothelial adhesion molecule 1)
NM_003005	SELP	selectin P (CD62)
NM_000615	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
NM_000442	PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31)
NM_002205	ITGA5	integrin ( $\alpha$ 5), fibronectin Rezeptor
<b>JAK/STAT-Pathway und daran beteiligte Gene:</b>		
NM_007315	STAT1	signal transducer and activator of Transcription 1
NM_005419	STAT2	signal transducer and activator of Transcription 2
NM_003150.1	STAT3	signal transducer and activator of Transcription 3
NM_003151	STAT4	signal transducer and activator of Transcription 4
NM_003152	STAT5A	signal transducer and activator of Transcription 5A
NM_012448	STAT5B	signal transducer and activator of Transcription 5B
NM_003877	SOCS2	suppressor of Zytokine signaling 2
NM_003745	SSI-1	suppressor of Zytokine signaling 1
NM_003955	SSI-3	suppressor of Zytokine signaling 3
NM_002227	JAK1	Janus Kinase 1
NM_004972	JAK2	Janus Kinase 2
NM_004232	CIS4	suppressor of Zytokine signaling 4
<b>NF<math>\kappa</math>B-Pathway:</b>		
NM_003998.1	NFKB1	NFkappa B 1 (p105)
NM_002502	NFKB2	NFkappa B 2 (p49/p100)
NM_020529	NFKBIA	NFkappa B Inhibitor, $\alpha$
NM_002503	NFKBIB	NFkappa BInhibitor, $\beta$
NM_004556	NFKBIE	NFkappa BInhibitor, epsilon
XM_032491	IKBKB	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase $\beta$
NM_003639	IKBKG	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase $\gamma$
AF080158	IKK- $\beta$	I $\kappa$ B Kinase- $\beta$
<b>"Haushalts"- Gene:</b>		
NM_012423	RPL13A	ribosomal Protein L13a
NM_000969	RPL5	ribosomal Protein L5
NM_002953	RPS6KA1	ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, polypeptide 1
NM_004755	RPS6KA5	ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, polypeptide 5
NM_001013	RPS9	ribosomal Protein S9
NM_003406	YWHAZ	"brain-protein" 14-3-3
NM_002046	GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NM_001614	ACTG1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, $\alpha$ 1 polypeptide
NM_000701	ATP1A1	ATP synthase,
NM_001677	ATP1B1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, $\beta$ 1 polypeptide
NM_004046	ATP5A1	ATP synthase, $\alpha$ subunit, isoform 1
NM_005174	ATP5C1	ATP synthase, gamma polypeptide 1
NM_005176	ATP5G2	ATP synthase, subunit c, isoform 2
NM_001685	ATP5J	ATP synthase, subunit F6
NM_001219	CALU	Calumenin
NM_007208	MRPL3	Mitochondrial Ribosomal Protein L3

<b>MatrixmetalloProteinasen und Inhibitoren:</b>		
NM_002421	MMP1	Interstitial Collagenase
NM_002425	MMP10	Stromelysin 2
NM_005940	MMP11	Stromelysin 3
NM_002426	MMP12	Macrophage Elastase
NM_002427	MMP13	Collagenase 3
NM_004530	MMP2	Gelatinase A, 72kDa Type IV Collagenase
NM_032950	MMP28	MMP28
NM_002423	MMP7	Matrilysin
NM_002424	MMP8	Neutrophil Collagenase
NM_004994	MMP9	Gelatinase B, 92kDa Type IV Collagenase
NM_033878	TIMP1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1
NM_003255	TIMP2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2
NM_000362	TIMP3	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3
NM_003256	TIMP4	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4
<b>S100-Proteine:</b>		
NM_002963	S100A7	S100 Calcium Binding Protein A7, Psoriasin 1
NM_002964	S100A8	S100 Calcium Binding Protein A8 , Calgranulin A
NM_002965	S100A9	S100 Calcium Binding Protein A8 , Calgranulin B
NM_006272	S100B	S100 Calcium Binding Protein, $\beta$
<b>Onkogene:</b>		
NM_002880	RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
NM_002908	REL	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene
NM_021975	RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
NM_002524	NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NM_005417	SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
NM_001654	ARAF1	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1
NM_004333	BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
NM_005433	YES1	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1
NM_005163	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
NM_005343	HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>TNF-bezogene Proteine:</b>		
NM_006290	TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor, $\alpha$ -induced Protein 3
NM_003789	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
NM_005658	TRAF1	TNF Receptor-associated Factor 1
NM_021138	TRAF2	TNF Receptor-associated Factor 2
NM_004620	TRAF6	TNF Receptor-associated Factor 6
<b>Kinasen:</b>		
NM_003331.1	TYK2	Tyrosine Kinase 2
NM_000061	BTK	Bruton Agammaglobulinemia Tyrosine Kinase
NM_003656	CAMK1	Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I
NM_004383	CSK	c-src Tyrosine Kinase
NM_001895	CSNK2A1	Casein Kinase 2, $\alpha$ 1 Polypeptide
NM_001569	IRAK1	Interleukin-1 Rezeptor-Associated Kinase 1
NM_001570	IRAK2	Interleukin-1 Rezeptor-Associated Kinase 2
NM_003177	SYK	Spleen Tyrosine Kinase
NM_002576	PAK1	p21/Cdc42/Rac1-Activated Kinase 1
NM_000291	PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1
NM_002738	PRKCB1	Protein Kinase C, $\beta$ 1
NM_002740	PRKCI	Protein Kinase C, iota

NM_004103	PTK2B	PTK2B ProteinTyrosine Kinase 2 B
<b>RNasen:</b>		
NM_002933	RNASE1	RNase A Family, 1
NM_002934	RNASE2	RNase A Family, 2, Eosinophil-Derived Neurotoxin
NM_002935	RNASE3	Rnase A Family, 3, Eosinophil Cationic Protein
NM_002937	RNASE4	RNase A Family, 4
NM_005615	RNASE6	RNase A Family, 6
NM_032572	RNASE7	RNase A Family, 7
NM_001145	ANG	Angiogenin, Ribonuclease, RNase A Family, 5
<b>Verschiedenes:</b>		
NM_001088	AANAT	Arylalkylamine N-Acetyltransferase
NM_006111	ACAA2	Acetyl-Coenzyme A Acyltransferase 2
NM_000697	ALOX12	12-Lipoxygenase
NM_001140	ALOX15	15-Lipoxygenase
NM_000698	ALOX5	5-Lipoxygenase
NM_005167	ARHC	hypothetical Protein MGC19531
NM_004324	BAX	BCL2-Associated X Protein
NM_004345	CAMP	Cathelicidin Antimicrobial Peptide
NM_032976	CASP10	Caspase 10, Apoptosis-Related Cysteine Protease
NM_004346	CASP3	Caspase 3, Apoptosis-Related Cysteine Protease
NM_003914	CCNA1	Cyclin A1
NM_005190	CCNC	Cyclin C
NM_053056	CCND1	Cyclin D1
NM_001792	CDH2	Cadherin 2
NM_000076	CDKN1C	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C
NM_000784	CYP27A1	Cytochrome P450, Family 27, Subfamily A, Polypeptide 1
NM_003366	UQCRC2.	Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein II
NM_001964.1	EGR1	Early Growth Response 1
NM_001486	GCKR	Glucokinase (hexokinase 4) Regulatory Protein
NM_006288	THY1	Thy-1 Cell Surface Antigen
NM_002161	IARS	Isoleucine-tRNA Synthetase
NM_000239	LYZ	Lysozym
NM_002109	HARS	Histidyl-tRNA Synthetase
NM_006824	EBNA1BP2	EBNA1 Binding Protein 2
NM_004092	ECHS1	Enoyl Coenzyme A Hydratase
NM_001963	EGF	Epidermal Growth Factor
NM_000126	ETFA	Electron-Transfer-FlavoProtein, $\alpha$ Polypeptide
NM_002086	GRB2	Growth Factor Rezeptor-Bound Protein 2
NM_000883	IMPDH1	Inosine Monophosphate Dehydrogenase 1
NM_000251	MSH2	mutS homolog 2
NM_002457	MUC2	mucin 2
NM_005918	MDH2	malate dehydrogenase 2
NM_2417.2	MKI67	MKI67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoProtein
NM_000596	IGFBP1	insulin-like growth Factor Binding Protein 1
NM_000597	IGFBP2	insulin-like growth Factor Binding Protein 2
NM_000191	HMGCL	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase
NM_033554	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP $\alpha$ 1
NM_002117	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C
NM_004131	GZMB	granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1
NM_005318	H1F0.	H1 histone Family, member 0
NM_000194	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)
NM_001540	HSPB1	heat shock 27kDa Protein 1

NM_005850	SF3B4	splicing Factor 3b, subunit 4, 49kDa
NM_003037.1	SLAM	signaling lymphocytic activation molecule
NM_005633	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
NM_000358	TGFBI	transforming growth Factor, $\beta$ -induced, 68kDa
NM_000359	TGM1	transglutaminase 1
NM_003920	TIMELESS	timeless homolog (Drosophila)
NM_004152	OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1
NM_002592	PCNA	proliferating cell nuclear Antigen
NM_002616	PER1	period homolog 1 (Drosophila)
NM_AB002345	PER2	period homolog 2 (Drosophila)
NM_016831	PER3	period homolog 3 (Drosophila)
NM_005091	PGLYRP	peptidoglycan recognition Protein
NM_006218	PIK3CA	phosphoinositide-3-Kinase, catalytic, $\alpha$ polypeptide
NM_006219	PIK3CB	phosphoinositide-3-Kinase, catalytic, $\beta$ polypeptide
NM_015192	PLCB1	Phospholipase C, $\beta$ 1
NM_002777	PRTN3	Proteinase 3
NM_080591	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
NM_000963	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
NM_004103	PTK2B	PTK2B Protein tyrosine Kinase 2 $\beta$
NM_005051	QARS	glutaminyl-tRNA synthetase
NM_000265	NCF1	neutrophil cytosolic Factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease)
NM_006153	NCK1	NCK adaptor Protein 1

## Danksagung

Herrn Dr. Bartels danke ich aufrichtig für die Vergabe dieses Themas. Seine Anregungen und Ratschläge haben diese Arbeit sehr bereichert.

Herrn Prof. Schröder danke ich für sein intensives Interesse an dieser Arbeit. Seine zahlreichen Ideen waren für die Durchführung und Erstellung dieser Arbeit von größtem Nutzen.

Herrn Prof. Bosch danke ich besonders für die Bereiterklärung zur Begutachtung dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich herzlichst dafür, dass ich einige wichtige Arbeiten in seinem Labor durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Stephanie Neunzig. Ohne ihre tatkräftige Unterstützung hätte ich die Arbeit in diesem Rahmen nicht durchführen können.

Jutta Quitzau und Claudia Mehrens danke ich insbesondere für ihre Unterstützung bei den HPLC-Analysen.

Eine „Riesendankeschön“ gilt Dr. Jürgen Harder sowohl für die Durchsicht dieser Arbeit und seine konstruktiven Vorschläge zur Verbesserung als auch seine fachlichen Tips.

Dr. Ulf Meyer-Hoffert danke ich insbesondere für den Stockholmer „Literaturservice“ und für viele anregende Gespräche.

Ein tiefer Dank gilt auch Dr. Lars Schwichtenberg für seine ständige Kommunikations- und Hilfsbereitschaft, die vielen Anregungen zur Erstellung dieser Arbeit, die Bereitstellung von Proben und v.a. für seine „Sicht der Dinge“.

Christian Roehlk danke ich für seine kompetente Hilfe bei der Durchführung der SSH-Hybridisierungen und für seinen „bayrischen“ Humor.

Ein großes Dankeschön geht auch nach Heidelberg zur Firma Clontech. Frau Dr. Carmen Kaiser hat mich ausdauernd und immer gutgelaunt bei allen Fragen rund um die SSH begleitet.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Robert Häsler, der mir bei der Analyse der Microrarray-Daten zur Seite gestanden hat.

Frau Dr. Regine Gläser danke ich für ihre Beratung in Sachen „Psoriasis“ und ärztliche Ratschläge bei allen stressbedingten Wehwehchen.

Nils Wichmann danke ich v.a. für viel „Geteiltes Leid ist halbes Leid“ in den letzten Wochen und seine kompetenten Hilfestellungen zu Beginn meiner Arbeit.

Meinen lieben Freundinnen Sibylle Resemann und Benedikte Willert danke ich für ihre Hilfe „auf den letzten Drücker“. Ebenso danke ich meinen Freunden, die das alles mit mir durchgestanden haben.

Meinen lieben Eltern möchte ich sehr aufrichtig für ihre ständige Unterstützung und Rückendeckung danken. Sie waren und sind immer für mich da.

Meinem lieben Jürgen danke ich eigentlich für alles!

## 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

Berit Göthel

### Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

B. Göthel, L. Schwichtenberg, J. Bartels (2001): Identification of microorganisms-induced differential keratinocyte gene expression using an improved systematic differential display PCR approach  
Kiel-Aarhus Meeting, Aarhus (Vortrag).

B. Göthel, L. Schwichtenberg, J.-M. Schröder, J. Bartels (2002): Identification of differentially expressed keratinocytes genes upon stimulation with microbial supernatants.  
Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Berlin (Poster).

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)

### Weitere Publikationen

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 (Poster)

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).

