

**Untersuchungen zur Bedeutung
antimikrobieller Ribonukleasen für die
epitheliale Infektionsabwehr**

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Bente Rudolph

Kiel 2005

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 2. Material und Methoden..... | 6 |
| 2.1 Chemikalien und Reagenzien..... | 6 |
| 2.1.1 Chemikalien..... | 6 |
| 2.1.2 Enzyme..... | 7 |
| 2.1.3 Oligonukleotide..... | 7 |
| 2.1.4 Mikroorganismen und Plasmide..... | 9 |
| 2.1.5 Herstellung von Bakterienüberständen..... | 10 |
| 2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen..... | 11 |
| 2.2.1 HaCaT-Zelllinie..... | 11 |
| 2.2.2 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten..... | 11 |
| 2.2.3 Subkultivierung der HaCaT-Zellen und der primären Keratinozyten..... | 12 |
| 2.2.4 Stimulation der Zellen..... | 12 |
| 2.2.5 Gewinnung von Überständen primärer Keratinozyten-Kulturen..... | 13 |
| 2.3 Molekularbiologische Methoden..... | 13 |
| 2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 13 |
| 2.3.1.1 PCR zur Amplifikation der zu klonierenden Gene und Promotorkonstrukte ... | 13 |
| 2.3.1.2 PCR zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR)..... | 14 |
| 2.3.1.3 PCR zur Generierung mutierter Expressionsplasmide..... | 15 |
| 2.3.1.4 3'-RACE-PCR..... | 16 |
| 2.3.1.5 5'-RACE-PCR..... | 17 |
| 2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese..... | 17 |
| 2.3.3 Restriktionshydrolyse von DNA..... | 18 |
| 2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten..... | 18 |
| 2.3.5 Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen..... | 18 |
| 2.3.6 Transformation..... | 19 |
| 2.3.7 DNA-Sequenzierung..... | 19 |
| 2.3.8 Transfektion von Zellen..... | 20 |
| 2.4 Rekombinante Expression von RNase 7 und RNase 8 in <i>E. coli</i> | 20 |
| 2.4.1 Struktur der Expressionsvektoren..... | 20 |
| 2.4.2 Durchführung der Expression..... | 21 |
| 2.5 Chromatographische Aufreinigung von Proteinen..... | 22 |
| 2.5.1 Aufreinigung nativer RNase 7 aus Psoriasissschuppen und aus dem <i>Stratum corneum</i> gesunder Haut..... | 22 |
| 2.5.2 Heparin-Affinitätssäule..... | 23 |
| 2.5.3 C8-Umkehrphasen-HPLC..... | 23 |
| 2.5.4 Kationenaustausch-HPLC..... | 23 |
| 2.5.5 C2/C18-Umkehrphasen-HPLC..... | 24 |
| 2.5.6 Aufreinigung von rekombinanter RNase 7 und RNase 8 aus <i>E. coli</i> | 24 |
| 2.5.7 C4-Umkehrphasen-HPLC..... | 25 |
| 2.6 Proteinanalytik..... | 25 |
| 2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 25 |
| 2.6.2 Aufschluss eukaryotischer Zellen..... | 26 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.6.3 | Proteinbestimmung..... | 26 |
| 2.6.4 | Herstellung polyklonaler RNase 7-Antikörper aus Ziege | 27 |
| 2.6.4.1 | Immunisierung | 27 |
| 2.6.4.2 | Aufreinigung..... | 27 |
| 2.6.4.3 | Biotinylierung | 28 |
| 2.6.5 | Westernblot..... | 28 |
| 2.6.6 | RNase 7-ELISA | 29 |
| 2.6.7 | Immunhistochemische Färbung..... | 29 |
| 2.6.8 | Nachweis von RNase 7 in Waschlösungen der Haut | 30 |
| 2.6.9 | Messung der Erythrozytenlyse | 31 |
| 2.6.10 | Bestimmung der Ribonuklease-Aktivität (RNA-Hydrolyse)..... | 31 |
| 2.6.11 | Luziferase-Assay | 31 |
| 2.6.12 | Massenspektrometrie | 32 |
| 2.7 | Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität..... | 32 |
| 2.8 | Genexpression in Epithelzellen | 33 |
| 2.8.1 | Semiquantitative RT-PCR..... | 33 |
| 2.8.1.1 | RNA-Isolierung | 33 |
| 2.8.1.2 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 33 |
| 2.8.1.3 | Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese) | 33 |
| 2.8.1.4 | „Real-time“-RT-PCR | 34 |
| 2.8.2 | Generierung einer stabilen RNase 7-überexprimierenden HaCaT-Zelllinie | 35 |
| 2.9 | Darstellung der Ergebnisse | 36 |
| 3. | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | RNase 7..... | 37 |
| 3.1.1 | Generierung polyklonaler RNase 7-Antikörper | 37 |
| 3.1.1.1 | Etablierung eines RNase 7-ELISAs..... | 39 |
| 3.1.2 | Regulation der Expression von RNase 7 | 40 |
| 3.1.2.1 | Haut und primäre Keratinozyten exprimieren RNase 7 | 40 |
| 3.1.2.2 | Das Intron in der 5´-UTR ist für die hohe RNase 7-Grundexpression essentiell..... | 41 |
| 3.1.2.3 | Es gibt drei verschiedene 3´-UTR-Varianten von RNase 7 | 43 |
| 3.1.2.4 | RNase 7 lässt sich induzieren | 45 |
| 3.1.2.4.1 | Induktion von RNase 7 durch Bakterienüberstände | 45 |
| 3.1.2.4.2 | Induktion von RNase 7 durch PMA..... | 48 |
| 3.1.2.4.3 | Induktion von RNase 7 durch Vektor-DNA | 50 |
| 3.1.2.5 | Die RNase 7 Expression ist inhibierbar | 52 |
| 3.1.3 | RNase 7 wird gewebespezifisch exprimiert..... | 53 |
| 3.1.4 | <i>In vivo</i> -Expression von RNase 7 | 54 |
| 3.1.4.1 | Etablierung der immunhistochemischen Färbung von RNase 7..... | 54 |
| 3.1.4.2 | Sezernierung von RNase 7 auf der menschlichen Haut..... | 56 |
| 3.1.5 | Funktionelle Charakterisierung von RNase 7 | 58 |
| 3.1.5.1 | Rekombinante Expression von RNase 7 | 58 |
| 3.1.5.2 | Ribonuklease-Aktivität von RNase 7 | 60 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 3.1.5.3 | Antimikrobielle Aktivität von RNase 7 | 61 |
| 3.1.5.3.1 | RNase 7 besitzt ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität | 61 |
| 3.1.5.3.2 | Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 ist nicht salzempfindlich | 62 |
| 3.1.5.3.3 | Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 ist nicht pH-abhängig | 63 |
| 3.1.5.3.4 | Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 ist nicht von der Ribonuklease-Aktivität abhängig | 64 |
| 3.1.5.4 | RNase 7 zeigt keine hämolytische Aktivität | 65 |
| 3.1.5.5 | RNase 7 lässt sich durch BSA-Zugabe stabiler lagern | 66 |
| 3.1.5.6 | Überexpression von RNase 7 in humanen Zellen | 67 |
| 3.1.5.7 | RNase 7 trägt zur antimikrobiellen Aktivität der Keratinozyten bei | 68 |
| 3.2 | RNase 8 | 71 |
| 3.2.1 | Klonierung der cDNA von RNase 8 (5'- und 3'-RACE) | 72 |
| 3.2.2 | RNase 8 mRNA wird gewebespezifisch exprimiert | 74 |
| 3.2.3 | RNase 8 ist induzierbar | 74 |
| 3.2.4 | Rekombinante Expression von RNase 8 | 75 |
| 3.2.4.1 | Ribonuklease-Aktivität von RNase 8 | 78 |
| 3.2.5 | Antimikrobielle Aktivität von RNase 8 | 78 |
| 3.2.5.1 | RNase 8 besitzt ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität | 78 |
| 3.2.5.2 | Die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 ist salzempfindlich | 79 |
| 3.2.5.3 | Die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 ist nicht pH-abhängig | 80 |
| 3.2.6 | RNase 8 zeigt keine hämolytische Aktivität | 81 |
| 4. | Diskussion | 83 |
| 4.1 | Antimikrobielle Proteine der Haut | 83 |
| 4.2 | RNase 7 | 84 |
| 4.2.1 | RNase 7 ist ein dominierendes antimikrobielles Protein der Haut | 85 |
| 4.2.2 | Regulation von RNase 7 | 86 |
| 4.2.3 | RNase 7 besitzt potente antimikrobielle Aktivität | 90 |
| 4.2.4 | RNase 7 lässt sich rekombinant in <i>E. coli</i> herstellen | 91 |
| 4.2.5 | Assoziation von RNase 7 mit Hautkrankheiten | 93 |
| 4.3 | RNase 8 | 94 |
| 4.4 | Weitere Eigenschaften antimikrobieller Proteine | 96 |
| 4.5 | Mechanismen von antimikrobiellen Proteinen | 97 |
| 4.6 | Bedeutung von antimikrobiellen Proteinen für die Infektionsabwehr | 98 |
| 4.7 | Einsatz antimikrobieller Proteine als Therapeutika | 100 |
| 5. | Zusammenfassung | 103 |
| 6. | Summary | 105 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 107 |
| 8. | Abkürzungsverzeichnis | 115 |
| | Danksagung | 117 |
| | Lebenslauf | 118 |
| | Erklärung | 119 |

1. Einleitung

Die Haut als größte Kontaktfläche des Menschen zur Umwelt wird nahezu permanent mit Mikroorganismen konfrontiert. Trotzdem kommt es bei gesunden Menschen nur relativ selten zu Hautinfektionen durch pathogene Mikroorganismen wie Pilze, Viren und Bakterien (Fitzpatrick et al., 1993). Der Grund hierfür liegt u. a. in der intakten physikalischen Barriere, welche die Haut als Schutz gegen Pathogenbefall bildet. Durch die stetige Oberflächenerneuerung der Haut werden adhärierende Mikroorganismen mechanisch entfernt. Ein Eindringen der Bakterien in die vitale Epidermis wird durch eine Lipidbarriere aus langkettigen Fettsäuren erschwert. So konnte gezeigt werden, dass nach einer Acetonbehandlung der Haut experimentell applizierte Mikroorganismen in größerer Keimzahl auswachsen (Aly et al., 1972). Ein weiterer Faktor, der zur natürlichen Integrität der Epithelien und insbesondere der Haut beiträgt, ist ein relativ niedriger pH-Wert („Säureschutzmantel“). Eine intakte physikalische Barriere allein reicht jedoch für eine erfolgreiche Infektionsabwehr nicht aus (Weinberg und Swartz, 1993); es sind weitere Mechanismen erforderlich, um die Integrität der Haut zu bewahren.

Neben der epithelialen, physikalischen Barriere besitzen Wirbeltiere ein effizientes System zur Abwehr von Infektionen, basierend auf dem Zusammenspiel mehrerer spezialisierter Effektorzellen. Dazu gehören u. a. neutrophile Granulozyten zur Abwehr von Bakterien und Pilzen, eosinophile Granulozyten zur Parasitenabwehr, natürliche Killerzellen, die virusinfizierte Zellen erkennen, Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten. Phagozyten wie z. B. neutrophile Granulozyten zirkulieren normalerweise im Blut und werden durch Botenstoffe wie Zytokine veranlasst, in entzündete Epithelien zu wandern. Diese Effektorzellen befinden sich also üblicherweise nicht in den Epithelien und können daher primär nicht für die natürliche Resistenz der Epithelien gegen ständig drohende mikrobielle Infektionen verantwortlich sein.

Wie neuere Studien zeigen besitzen Epithelien wie die menschliche Haut als Abwehrsystem auch eine „chemische Barriere“, die zur Erhaltung der natürlichen Integrität der Haut beiträgt (Boman, 2000). Bereits 1922 konnte Alexander Fleming in menschlichem Nasensekret ein Protein mit antimikrobieller Aktivität nachweisen, das später als Lysozym identifiziert wurde (Fleming, 1922). Dieses Protein ist in der

Lage, in seiner Eigenschaft als Muramidase die Zellwand von Bakterien zu zerstören. Lange Zeit gerieten die Erkenntnisse Flemings in Vergessenheit, doch zahlreiche Studien der letzten Jahre belegen die Bedeutung eines chemischen Abwehrsystems für den Erhalt der Integrität der Epithelien. Dabei könnte insbesondere antimikrobiell wirksamen Proteinen als phylogenetisch alte Effektormoleküle eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunität der Epithelien zukommen (Schröder, 1999).

Antimikrobielle Proteine sind überwiegend kleinere, kationische Polypeptide, die aufgrund ihrer Fähigkeit, das Wachstum von Mikroorganismen zu inhibieren, zusammengefasst werden. Als wichtige Komponente der angeborenen Immunität vermögen antimikrobielle Proteine ein breites Spektrum an Bakterien, Pilzen und Viren abzutöten. Zusätzlich verändern diese Proteine die lokale Entzündungsantwort und aktivieren Mechanismen der zellulären und adaptiven Immunität (Braff et al., 2005). Die Bedeutung von antimikrobiell wirksamen Substanzen wird besonders am Beispiel wirbelloser Organismen deutlich. Im Unterschied zu den Wirbeltieren verfügen diese 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 Proteine aus sieben verschiedenen Familien (Dipericine, Attacine, Drosocine, Cecropine, Defensine, Drosomycine und Metchnikowine) synthetisiert (Übersicht bei Hetru et al., 2003).

Auch Vertebraten verfügen über dieses epitheliale, chemische Schutzschild (Schröder, 1999). So beobachtete Michael Zasloff Mitte der achtziger Jahre, dass Frösche, die nach einer Entnahme der Oozyten in den verschmutzten Laborteich zurückgesetzt wurden, trotz ihrer frischen Wunden keine Infektionen entwickelten. Er vermutete, dass die Haut der Frösche antimikrobielle Proteine produziert, die den Frosch vor Infektionen schützen. Diese Hypothese konnte er mit der Isolierung zweier antimikrobieller Peptide, die er Magainine nannte (hebräisch: Schutzschild), bestätigen (Zasloff, 1987). Magainine sind kleine, kationische Peptide, die in sehr niedrigen Konzentrationen sehr effektiv Gram-negative und Gram-positive Bakterien sowie Pilze abtöten. Der Entdeckung der Magainine folgte die Isolierung einer

Vielzahl weiterer antimikrobieller Proteine aus verschiedenen Amphibienhäuten. Daher lässt sich vermuten, dass antimikrobielle Proteine eine wichtige Bedeutung für die natürliche Resistenz der Amphibienhaut haben (Barra und Simmaco, 1995).

Die Entdeckung der Gen-Expression von Alpha-Defensinen in den Darmepithelien der Maus war ein erstes Indiz dafür, dass antimikrobielle Proteine in Säugetieren zum Schutz der Epithelien vor Infektionen beitragen könnten (Ouellette et al., 1989). Alpha-Defensine sind kleine, kationische Proteine, die antimikrobiell aktiv sind. Alle Alpha-Defensine besitzen eine für diese Molekül-Klasse typische Anordnung von sechs Cysteinen, welche durch drei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Lehrer et al., 1993). Die nachfolgende Entdeckung der Expression eines neuen Defensins TAP (Tracheales antimikrobielles Peptid) in den Epithelien der Rinderluftröhre bestätigte die Hypothese über die Fähigkeit der Säugetierepithelien zur Produktion von antimikrobiellen Proteinen (Diamond et al., 1991). TAP ist zwar ähnlich klein wie die Alpha-Defensine (4 kDa) und besitzt auch sechs Cysteine, diese sind jedoch an anderen Positionen lokalisiert. Dies hat eine andere Verknüpfung der Disulfidbrücken zur Folge und bedingt damit auch eine abweichende Tertiärstruktur. Diese Abgrenzung von den Alpha-Defensinen führte zur Eingliederung des Moleküls in die neue Klasse der Beta-Defensine (Lehrer et al., 1993).

Im Jahr 1995 gelang es dann, aus dem Blutplasma des Menschen das erste humane Beta-Defensin (hBD-1) zu isolieren (Bensch et al., 1995). Die Hypothese unserer Arbeitsgruppe, dass auch menschliche Haut antimikrobielle Proteine exprimiert, konnte durch die Identifizierung und Isolierung eines neuen epithelialen antimikrobiellen Proteins aus läsionalen Hautschuppen von Psoriasis-Patienten bestätigt werden. Dieses antimikrobielle Protein wurde als humanes Beta-Defensin-2 (hBD-2) bezeichnet (Harder et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass hBD-2 besonders nach Kontakt mit Gram-negativen Bakterien und pro-inflammatorischen Stimuli in Epithelzellen gebildet wird. Die Expression von hBD-2 mRNA wurde mittlerweile auch in verschiedenen Epithelien wie z. B. im Respirationstrakt und im Verdauungstrakt nachgewiesen (Schröder und Harder, 1999). HBD-2 zeigt eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und vor allem *Pseudomonas aeruginosa*, jedoch keine Aktivität gegen den Gram-positiven Erreger *Staphylococcus aureus*. Im Jahr 2001 konnte ein weiteres induzierbares antimikrobielles Protein (hBD-3) in Keratinozyten identifiziert werden, das

antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive wie Gram-negative Erreger aufweist (Harder et al., 2001).

Diese beiden Beta-Defensine hBD-2 und hBD-3 sind durch inflammatorische Stimuli und Mikroorganismen induzierbar; sie sind daher in gesunder Haut kaum zu finden. Es stellte sich daher die Frage, durch welche antimikrobiellen Faktoren sich die gesunde Haut zu schützen vermag. Dabei gelang es unserer Arbeitsgruppe in Vorarbeiten aus *Stratum corneum* hautgesunder Probanden ein weiteres, in relativ großen Mengen vorkommendes, neues antimikrobielles Protein zu isolieren, das aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Mitgliedern der humanen Ribonuklease A-Familie (RNase A-Familie) als Ribonuklease 7 (RNase 7) bezeichnet wurde (Harder und Schröder, 2002). Im Rahmen weiterer Vorarbeiten konnte das RNase 7-Gen kloniert werden, und es wurde gezeigt, dass RNase 7 als induzierbares antimikrobielles Protein primär von Epithelien, insbesondere von Haut-Keratinocyten, produziert wird (Harder und Schröder, 2002).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde auf genomischer Ebene eine weitere Ribonuklease mit der Bezeichnung Ribonuklease 8 (RNase 8) identifiziert (Zhang et al., 2002). RNase 8 besitzt eine Sequenzidentität zu RNase 7 von 78 % und einen genomischen Abstand von nur 15000 Basenpaaren. Es wurde beschrieben, dass RNase 8 ausschließlich in der Plazenta exprimiert wird und trotz der hohen Homologie zu RNase 7 keine antimikrobielle Aktivität aufweist (Zhang et al., 2002).

Fragestellungen der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von RNase 7 für die kutane Abwehr zu analysieren, dabei sollte insbesondere die Regulation der Expression von RNase 7 in Keratinocyten untersucht werden. Weiterhin sollte das Wirkungsspektrum der antimikrobiellen Aktivität von RNase 7 charakterisiert werden und es galt zu klären, ob die Ribonuklease-Aktivität von RNase 7 für deren antimikrobielle Aktivität von Bedeutung ist. Da diese Untersuchungen hohe Substanzmengen an RNase 7 erfordern, sollte dieses antimikrobielle Protein rekombinant in *E. coli* hergestellt werden. Die Etablierung eines solchen Expressionssystems würde zudem die Möglichkeit eröffnen, das therapeutische Potenzial von RNase 7 zu untersuchen. Um auch Einblicke in die Protein-Expression von RNase 7 zu erhalten, sollten mit dem

aus der rekombinanten Expression gewonnenen Material RNase 7-spezifische Antikörper generiert werden.

Zudem stellte sich die Frage, ob auch RNase 8 eine Rolle für die kutane Abwehr spielen könnte. Daher sollten Untersuchungen zur Genexpression von RNase 8 durchgeführt werden. Um eine potenzielle, antimikrobielle Aktivität von RNase 8 zu untersuchen, sollte auch RNase 8 in rekombinanter Form in *E. coli* hergestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Chemikalien

| | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 100 bp-DNA-Leiter | Invitrogen, Karlsruhe |
| Acetonitril | Promochem GmbH, Wesel |
| Agarose | Biozym Hess, Oldendorf |
| Bacto-Hefe-Extrakt | Gibco, Eggenstein |
| Bacto-Trypton | Gibco, Eggenstein |
| Blastizidin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Carbenicillin | Roth, Karlsruhe |
| Chloramphenicol | Roth, Karlsruhe |
| DMEM | Cellconcepts, Umkirch |
| dNTPs | Pharmacia, Freiburg |
| EDTA | Gibco, Eggenstein |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| FCS | PAA Laboratories GmbH, Linz |
| Fugene | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Glycerin | USB, Cleveland, USA |
| Glykogen | Roche Diagnostics, Mannheim |
| H ₂ O (für HPLC) | Promochem GmbH, Wesel |
| L-Glutamin | Gibco, Eggenstein |
| Methanol | Promochem GmbH, Wesel |
| NucleoSpin Plasmid Quick pure | Macherey-Nagel, Düren |
| PBS | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | Biochrom, Berlin |
| Pepton (aus Sojamehl) | Unipath LTD, Hampshire, England |
| Qiaex Gel Extraction Kit II | Qiagen, Hilden |
| Trifluoressigsäure | Promochem GmbH, Wesel |
| Trizol-Reagenz | Invitrogen, Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA-Lösung | Invitrogen, Karlsruhe |

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden über Merck (Darmstadt) oder Sigma-Chemie (Deisenhofen) bezogen.

2.1.2 Enzyme

| | |
|--|--------------------------------------|
| Alkaline Phosphatase (CIP) | NEB, Schwalbach |
| LightCycler-FastStart DNA Master SYBR GreenI | Roche Diagnostics, Mannheim |
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase | Stratagene, La Jolla, USA |
| Restriktionsendonukleasen | NEB, Schwalbach |
| Reverse Transkriptase (SuperskriptII) | Invitrogen, Karlsruhe |
| SequiTherm EXCEL II Long-Read-DNA Sequencing Kit-Alf | Biozym, Oldendorf |
| T4-DNA-Ligase | Invitrogen, Karlsruhe |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| | Invitrogen, Karlsruhe |

2.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer), die für die reverse Transkription, die verschiedenen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) und für die Sequenzierungen verwendet wurden, wurden über die Firma Sigma-Genosys (Deisenhofen) bezogen. Die für die Klonierung verwendeten Primer wurden so konstruiert, dass sie an ihrem 5'-Ende jeweils eine Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in die verschiedenen Vektoren aufwiesen. Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide besaßen eine 5'-Cy5-Markierung (Carbocyaninfarbstoff 5).

| Bezeichnung | Primersequenz (5'-3') | RE |
|-----------------------------|---|--------------|
| Promotorkonstrukte: | | |
| R7-pTAL-f ₂ | TACC ACGCGT ACTCTCAGTTACCTGCTCCA | <i>MluI</i> |
| R7-pTAL-f ₃ | TACC ACGCGT AAGCTCACAAGAGCTTGGAG | <i>MluI</i> |
| R7-pTAL-f ₄ | TACC ACGCGT AGCCCGGGCCAGCTCTTA | <i>MluI</i> |
| R7-pTAL-f ₅ | TACC ACGCGT GTGAGGCTGTGGCAGGATC | <i>MluI</i> |
| R7-pTAL-r ₁ | GCGT CTCGAG CTGGGACAGAGGTGTTTCAGT | <i>XhoI</i> |
| R7-pTAL-r ₂ | GCGT CTCGAG CTTTGCGCTTGGTCTTCGTG | <i>XhoI</i> |
| R7-pTAL-r ₃ | GCGT CTCGAG ACGCTGTGTCTGTTTGGGG | <i>XhoI</i> |
| R7-pTAL-r ₄ | GCGT CTCGAG CTCCAAGCTCTTGTGAGCTT | <i>XhoI</i> |
| R7-pGL3-3UTR-f ₁ | TTACTGG CTAGC TTTTCCAGACTGGCTTGCTC | <i>NheI</i> |
| R7-pGL3-3UTR-r ₁ | TTATTT GCTAGC ACAAATATGAAGTGGTATTTATTTAT | <i>NheI</i> |
| R7-pGL3-3UTR-r ₂ | TTATTT GCTAGC AGAGAGGTAATGACCTTTATTGC | <i>NheI</i> |
| rekomb. Expression: | | |
| R7-ex-pET32-f ₁ | ACT GAGATCT GGGTACCGACGACGACGACAAGAAGCCCAAGG GCATGACCTC | <i>BglII</i> |

| Bezeichnung | Primersequenz (5'-3') | RE |
|---------------------------------------|---|--------------|
| R7-ex-pQE2-f | ACTGCATATGAAGCCCAAGGGCATGACCTC | <i>NdeI</i> |
| R7-ex-pET32/pQE-r ₁ | ATTTGCGGCCGCCTAAAGGACTCTGTCCAAGTG | <i>NotI</i> |
| R8-ex-pET32-f ₁ | ACTGAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGAAGCCCAAGG ACATGACATCA | <i>BglII</i> |
| R8-ex-pQE2-f | ACTGCATATGAAGCCCAAGGACATGACATCA | <i>NdeI</i> |
| R8-ex-pET32/pQE-r ₁ | ATTTGCGGCCGCCTTAGACAACCTTTATCCAAGTGCA | <i>NotI</i> |
| R7-ex-r ₁ HisMut | ATTTGCGGCCGCCTAAAGGACTCTGTCCAAGTCTACAGG | <i>NotI</i> |
| R7-lys38-mut-f | GCACACAAAACGGTGCAGAGACCTCAACACC | - |
| R7-lys38-mut-r | GGTGTGAGGTCTCTGCACCGTTTTGTGTGC | - |
| R7-Überexpression: | | |
| R7-forw-S2-31 | GGAGTCACAGCACGAAGACC | - |
| R7-ex-r ₁ | ATTTGCGGCCGCCTAAAGGACTCTGTCCAAGTG | - |
| Sequenzierung und Kolonie-PCR: | | |
| GL2 | CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA | - |
| RV3 | CTAGCAAATAGGCTGTCC | - |
| T7-Terminator | TAATACGACTCACTATAGG | - |
| T7-Promotor | GCTAGTTATTGCTCAGCGG | - |
| pQE-f | GCGGATAACAATTTACACACAG | - |
| pQE-r | AGTTCTGAGGTCATTACTGG | - |
| pEF6-T7-Terminator | ACGACTCACTATAGGGAGAC | - |
| pEF6-Rev | AGGGATAGGCTTACCTTCGA | - |
| M13f | GTTTTCCCAGTCACGAC | - |
| M13r | CAGGAAACAGCTATGAC | - |
| pGL3-seq-3UTR-f1 | TTACCGGAAAACCTCGACGCA | - |
| pGL3-seq-3UTR-r1 | CATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA | - |
| RT-PCR: | | |
| Oligo(dT) | (T) ₁₈ | - |
| Frohmann(dt) | CCTGTGACGGTACCAAGC(T) ₁₇ | - |
| „real-time“-RT-PCR: | | |
| R7-forw-S2-31 | GGAGTCACAGCACGAAGACC | - |
| R7-rev-S2-33 | CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA | - |
| GA-forw | CCAGCCGAGCCACATGGCTC | - |
| GA-rev | ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT | - |
| R8-f1 | AAGAGAAGCACCTGAACACAC | - |
| R8-ex-r ₁ | ATTTGCGGCCGCCTTAGACAACCTTTATCCAAGTGCA | - |
| 5'-RACE-PCR: | | |
| AP1 | CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC | - |
| AP2 | ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC | - |
| R7-rev-S2-33 | CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA | - |

| Bezeichnung | Primersequenz (5'-3') |
|---------------------|--------------------------------------|
| R7-rev-S2-13 | ACTGACTGGGATCTCTGCCAC |
| R8-r1 | TTCTGTGTA CT TATTGATGATGC |
| R8-r10 | CTTGGCTCTGACTAGGAC |
| 3'-RACE-PCR: | |
| R7-forw-S2-9 | AGCCTGCAAGAATGGCGATAAA |
| R7-forw-S2-15 | AAAAGGACTCTCAGCAATTCCA |
| R8-f1 | AAGAGAAGCACCTGAACACAC |
| R8-f5 | CATTTCCCTCCCACACACTC |
| Frohmann-long | CCTGTCGACGGTACCAAGC |
| Frohmann-short | CCTGTCGACGGTACCAAG |

Tab. 1: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Restriktionsschnittstellen der Restriktionsendonukleasen (RE) sind fett gekennzeichnet.

2.1.4 Mikroorganismen und Plasmide

Im Folgenden wird eine tabellarische Zusammenstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen und Plasmide gegeben:

| Stamm | Referenz | Stamm | Referenz |
|--------------------------------|----------------|-----------------------------------|-----------------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | ATCC 19606 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 13882 |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 24433 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 13883 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | NCTC 9750 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 11440 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | ATCC 13047 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 10145 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 29212 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 51299 VRE | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | CF 446 MR |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | PEG 205 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | NCTC10038 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | PEG 212 | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | DSM 2146 | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 43300 MRSA |
| <i>Enterococcus faecium</i> | Ulm 68 VRE | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 33593 MRSA |
| <i>Enterococcus faecium</i> | W 354 VRE | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 12598 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | W 356 VRE | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 12600 |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | <i>Staphylococcus aureus</i> | W 355 MRSA |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 35218 | <i>Staphylococcus aureus</i> | W 358 MRSA |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 11775 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | ATCC 14990 |
| <i>E. coli</i> TOP10F' | Invitrogen | <i>Streptococcus pyogenes</i> | ATCC 12344 |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS | Novagen | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ATCC 33400 |

Tab. 2: Bakterien- und Hefestämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden. PEG = Paul-Ehrlich-Gesellschaft, CF = Cystische Fibrose, W = Wildtyp, VRE = Vancomycin-resistent, MR = Methicillin-resistent, SA = *Staphylococcus aureus*.

| PCR-Produkt | Plasmid | Referenz (Plasmid) | Größe (Insert) |
|--|-------------|--------------------------------------|----------------|
| pTAL-R7-f2r1 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 2311 bp |
| pTAL-R7-f3r1 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 1422 bp |
| pTAL-R7-f4r1 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 637 bp |
| pTAL-R7-f5r1 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 510 bp |
| pTAL-R7-f2r2 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 1800 bp |
| pTAL-R7-f2r3 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 1673 bp |
| pTAL-R7-f2r4 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 908 bp |
| pTAL-R7-f3r2 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 913 bp |
| pTAL-R7-f3r3 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 785 bp |
| pTAL-R7-f4r2 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 127 bp |
| pTAL-R7-f3exr1 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 825 bp |
| pTAL-R7-f3exr2 | pTAL-Luc | Clontech, BD Biosciences, Heidelberg | 874 bp |
| pGL3-R7-3UTR-V1-f ₁ r ₁ | pGL3-Basic | Promega, Mannheim | 442 bp |
| pGL3-R7-3UTR- V2-f ₁ r ₂ | pGL3-Basic | Promega, Mannheim | 763 bp |
| pGL3-R7-3UTR- V0-f ₁ r ₂ | pGL3-Basic | Promega, Mannheim | 276 bp |
| R7-pET-32a | pET-32a | Novagen, Madison, USA | 387 bp |
| R7-pQE2 | pQE-2 | Qiagen, Hilden | 387 bp |
| R7-His-Mut-pET-32a | pET-32a | Novagen, Madison, USA | 387 bp |
| R7-His-Lys-Mut-pET-32a | pET-32a | Novagen, Madison, USA | 387 bp |
| R8-pET-32a | pET-32a | Novagen, Madison, USA | 384 bp |
| R8-pQE2 | pQE-2 | Qiagen, Hilden | 384 bp |
| R7-pEF6 | pEF6/V5-His | Invitrogen, Karlsruhe | 540 bp |
| control-pEF6 | pEF6/V5-His | Invitrogen, Karlsruhe | kein Insert |

Tab. 3: PCR-Produkte und zugehörige Zielplasmide. Aufgeführt sind die jeweiligen PCR-Produkte und die zugehörigen Plasmide, in die die PCR-Produkte kloniert wurden. Die zur Generierung der PCR-Produkte verwendeten Primer sind in Tab. 1 aufgeführt.

2.1.5 Herstellung von Bakterienüberständen

Für die Herstellung von Bakterienkulturüberständen wurden die Bakterien mit Hilfe einer Impföse aus einer Glycerinkultur (-80 °C) des entsprechenden Bakterienstammes entnommen und in 7 ml TSB-Medium (*P. aeruginosa*) bzw. halbkonzentriertem TSB-Medium (*S. aureus*) angeimpft (36 g bzw. 18 g Tryptic soy broth/l H₂O). Nach einer 16-stündigen Inkubation wurden die Bakterienkulturen 1:20 (*P. aeruginosa*) bzw. 1:6 (*S. aureus*) in das entsprechende Medium überimpft und bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer optischen Dichte (OD₆₂₀) von 1 kultiviert. 5 ml dieser Flüssigkultur wurden anschließend in 45 ml TSB- bzw. halbkonzentriertem TSB-

Medium angeimpft und für 24 h unter statischen Bedingungen (adhärent) in 500 cm² Tripel-Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterienkulturen 5 min bei 6000 x g zentrifugiert und die Überstände über einen Filter mit 0,2 µm Porengröße (Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel) sterilfiltriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese Überstände bei -20 °C gelagert.

2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.2.1 HaCaT - Zelllinie

Die verwendete HaCaT-Zelllinie ist eine humane, immortalisierte, nicht karzinogene Zelllinie, die spontan durch Kultivierung humaner Keratinozyten bei erhöhter Temperatur und geringer Kalziumkonzentration entstand (Boukamp et al., 1988). Die HaCaT-Zellen (DKFZ, Heidelberg) wurden in 10 ml DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ergänzt mit 10 % fetalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin angezüchtet. Die Kultivierung der HaCaT-Zelllinie erfolgte bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter 5 %iger CO₂-Atmosphäre in 75 cm² Kulturgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht).

2.2.2 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten

Humane Keratinozyten wurden aus frischen Vorhäuten isoliert. Dazu wurde die Haut von Fett- und Bindegewebe befreit, in Streifen (ca. 2 x 5 mm) geschnitten und die Epidermis von der Dermis nach Inkubation in 0,25 %iger Trypsinlösung über Nacht bei 4 °C mechanisch getrennt. Anschließend wurden die Keratinozyten durch Abschaben von den übrigen Zellschichten gelöst. Die Zellen wurden resuspendiert und nach einer Zentrifugation (800 x g, 5 min) in Zellkulturflaschen mit 10 ml EpiLife-Medium ausgesät. Die Lebensfähigkeit der Keratinozyten ließ ca. 3-4 Subkultivierungen zu, wobei die Zellen schon bei niedriger Konfluenz passagiert wurden, um eine zu schnelle Ausdifferenzierung zu verhindern.

2.2.3 Subkultivierung der HaCaT-Zellen und der primären Keratinozyten

Die Subkultivierung adhärent wachsender HaCaT-Zellen erfolgte bei 80-90 % Konfluenz, da die Zellen in Kultur bei Erreichen der Konfluenz im Wachstum inhibiert werden (Lindl und Bauer, 1994). Bei den primären Keratinozyten war der Grad der Ausdifferenzierung für den Zeitpunkt der Subkultivierung entscheidend. Die adhärent wachsenden HaCaT-Zellen bzw. primären Keratinozyten wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 0,1 % Trypsin-0,02 % EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Klopfen an die Kulturflasche vom Kulturgefäßboden vollständig abgelöst. Durch Zugabe des gleichen Volumens an FCS-haltigem Medium wurde die Trypsin-bedingte enzymatische Proteolyse abgestoppt. Nach Resuspension und Zentrifugation (800 x g, 5 min) wurden die Zellen mit DMEM- bzw. EpiLife-Medium gewaschen und in sterile Kulturflaschen eingesät (Subkultivierung) bzw. für Stimulationsversuche in 6- oder 12-Loch-Kultur-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt.

2.2.4 Stimulation der Zellen

Die zu stimulierenden Zellen wurden vor Beginn eines Experimentes in 6- oder 12-Loch-Kultur-Platten als 2 ml bzw. 1 ml Zellsuspension pro Vertiefung überführt (siehe oben). Um die Stimulierbarkeit der Zellen nicht durch undefinierte Faktoren im FCS zu beeinflussen, wurde das Zellkulturmedium 16-24 h vor Versuchsbeginn nach zweimaligem Waschen mit PBS durch FCS-freies Nährmedium ersetzt. Da eine zu hohe Zelldichte die Stimulation negativ beeinflusste (eigene Beobachtung), erfolgte die Stimulation bei maximal 90 % Zellkonfluenz. Der Stimulus wurde in der gewünschten Konzentration in serumfreiem DMEM-Medium bzw. Keratinozyten-Medium mit 0,1% Albumin (BSA, w/v) aufgenommen und zu den Zellen gegeben. BSA sollte dabei eine mögliche unspezifische Wechselwirkung des Stimulus mit der Gefäßwand verhindern. Die Stimulationszeit betrug 6-24 h, unmittelbar danach wurden die Zellen entsprechend der geplanten Experimente weiter verarbeitet. Als Stimuli wurden die hergestellten Überstände adhärent gewachsener Bakterienkulturen (siehe 2.1.5) in verschiedenen Konzentrationen sowie der Phorbolster Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA, 40 ng/ml) eingesetzt.

2.2.5 Gewinnung von Überständen primärer Keratinozyten-Kulturen

Primäre Keratinozyten wurden in 75 cm² Zellkulturgefäßen wie unter 2.2.2 beschrieben kultiviert und bei einer Zellkonfluenz von ca. 70-100 % auf 5 ml EpiLife-Medium mit 0,1 % BSA ohne Zusatz von Antibiotika umgesetzt. Die Zellen wurden so 48-72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und über Vivaspin 15R-Säulen mit 2 kDa-Ausschlussvolumen (Vivascience, Hannover) nach Angaben des Herstellers entsalzt und einkonzentriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese Überstände bei -20 °C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis et al., 1986) ist eine Methode, um DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Sie wurde für die Amplifikation des RNase 7- und des RNase 8-Gens sowie der verschiedenen RNase 7-Promotorkonstrukte verwendet. Außerdem diente die PCR zur Überprüfung von Plasmiden auf ein inseriertes PCR-Produkt. Die Reaktionen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 30 oder 50 µl in einem Thermocycler (Trio-Block, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die PCR, bestehend aus den Phasen Denaturierung, Primer-Anlagerung und Kettenverlängerung, wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Spezifität der Oligonukleotid-Primer in Bezug auf die vom Hersteller angegebenen Schmelzpunkte (Sigma-Genosys, Deisenhofen) variiert. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tab. 1 aufgeführt. Die verschiedenen PCR-Anwendungen werden im Folgenden erläutert:

2.3.1.1 PCR zur Amplifikation der zu klonierenden Gene und Promotorkonstrukte

Zur Amplifikation der Gene für die Klonierung in die Expressionsvektoren sowie für die Herstellung von Promotorkonstrukten wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Diese aus *Pyrococcus furiosus* stammende DNA-Polymerase besitzt im Gegensatz zu der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* eine 3'-5'-Exonuklease-

aktivität, durch welche falsch eingebaute Nukleotide entfernt werden („proof-reading“) und somit die Genauigkeit der DNA-Synthese erhöht wird (Kunkel, 1992).

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 5,0 µl 10x *Pfu*-cloned-buffer
- 5,0 µl dNTPs (2 mM)
- 2,5 µl genspezifischer Vorwärts-Primer (10 µM)
- 2,5 µl genspezifischer Rückwärts-Primer (10 µM)
- 3,0 µl genomische DNA (200 ng/µl)
- 22 µl H₂O
- 1,0 µl *Pfu*-Polymerase in 9 µl H₂O, Zugabe erst bei 85 °C

Die PCR wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 95 °C - 2 min
 - 85 °C - 1 min -Zugabe der *Pfu*-Polymerase
 - 94 °C - 1 min
 - 60 °C - 30 s
 - 72 °C - 3-5 min
 - 72 °C - 10 min
 - 4 °C - ∞
- } 32 Zyklen

2.3.1.2 PCR zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR)

Von den aus der Transformation erhaltenen Kolonien wurden jeweils zehn ausgewählt, um die Plasmide auf inserierte PCR-Produkte der erwarteten Länge zu überprüfen. Dieses ist erforderlich, da durch eine unvollständige Restriktionshydrolyse (siehe 2.3.3) Transformanten ohne inserierte PCR-Produkte vorhanden sein können. Ohne Insert wurde nur die Klonierungsstelle amplifiziert, während mit Insert ein entsprechend größeres PCR-Fragment amplifiziert wurde. Eine Übersicht über die für die Selektion verwendeten Primer gibt die Tab. 1. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden direkt aus dem Nähragar der Agarplatte Zellen aus den Einzelkolonien entnommen und in 0,5 ml Reaktionsgefäße mit 20 µl PCR-Mix überführt. Die Ansätze wurden zur Denaturierung der DNA 5 min auf 95 °C erhitzt. Für die Kolonie-PCR wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

- 3,0 µl 10x Reaktionspuffer
- 3,0 µl dNTPs (2 mM)
- 0,9 µl MgCl₂ (50 mM)
- 1,0 µl Vorwärts-Primer (10 µM)
- 1,0 µl Rückwärts-Primer (10 µM)
- 11,1 µl H₂O
- 0,2 µl *Taq*-Polymerase in 9,8 µl H₂O, Zugabe erst bei 85 °C

Folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler (Trio-Block, Biometra, Göttingen) wurde verwendet:

| | |
|-----------------|------------------------------------|
| 95 °C - 5 min | |
| 85 °C - 1 min | -Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase |
| 94 °C - 1 min | } 30 Zyklen |
| 58 °C - 20 s | |
| 72 °C - 2-5 min | |
| 72 °C - 5 min | |
| 4 °C - ∞ | |

2.3.1.3 PCR zur Generierung mutierter Expressionsplasmide

Für die Generierung von rekombinanter RNase 7 mit inaktiviertem Ribonuklease-Zentrum wurde zunächst eine Aminosäure des reaktiven Zentrums verändert. Dafür wurde die PCR wie unter Punkt 2.3.1.1 beschrieben durchgeführt und der in Tab. 1 aufgeführte Rückwärts-Primer verwendet, durch den die Aminosäure Histidin an Stelle 123 (His¹²³) in Aspartat mutiert wurde. Zusätzlich wurde eine weitere RNase 7-Mutante generiert, bei der neben His¹²³ auch Lysin an Stelle 38 in Arginin mutiert wurde. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mit dem QuikChangeTMMulti-Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die PCR wurde der Vektor pET-32 mit inserierter RNase 7-His¹²³-Mutante (s. oben) als Template verwendet. Die Primer wurden so konstruiert, dass sie die zu mutierende Stelle in der Sequenzmitte aufwiesen (Tab. 1). Für die PCR wurden zur Vermeidung von Primerdimerisierungen zunächst getrennt voneinander folgende Reaktionsansätze verwendet:

- 3,0 µl 10x *Pfu*-reaction-buffer (Stratagene)
- 2,0 µl quicksolution (Stratagene)
- 0,6 µl dNTPs (2 mM)
- 0,6 µl genspezifischer Vorwärts-Primer bzw. genspezifischer Rückwärts-Primer (10 µM)
- 1,7 µl pET-32a mit R7His-Mutation (30 ng/µl)
- 12,1 µl H₂O
- 0,6 µl *Pfu*-Polymerase in 9,4 µl H₂O, Zugabe erst bei 85 °C

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

| | |
|---------------|---|
| 95 °C - 3 min | |
| 85 °C - 1 min | -Zugabe der <i>Pfu</i> -Polymerase |
| 94 °C - 1 min | } 11 Zyklen |
| 60 °C - 1 min | |
| 68 °C - 8 min | |
| 12 °C - ∞ | |
| 4 °C - ∞ | -Vermischen der beiden Reaktionsansätze |

| | |
|---------------|------------|
| 94 °C - 1 min | } 9 Zyklen |
| 60 °C - 1 min | |
| 68 °C - 8 min | |
| 4 °C - ∞ | |

Anschließend wurde die Template-DNA durch Zugabe von 1,2 µl *DPM* für 1 h bei 37 °C hydrolysiert.

2.3.1.4 3'-RACE-PCR

Die RACE-PCR (RACE = Rapid Amplification of cDNA Ends; Frohman et al., 1988) ist ein Verfahren, welches die schnelle Amplifizierung von 3'- und 5'-cDNA-Enden ermöglicht. Die mRNA wird dabei zuerst wie unter Punkt 2.8.1.3 beschrieben in cDNA revers transkribiert, wobei in der 3'-RACE der eingesetzte Oligo(dT)-Primer am 5'-Ende eine Anker-Sequenz besitzt (siehe Tab. 1). Mit Hilfe eines Anker-Primers, welcher die Anker-Sequenz besitzt, und eines genspezifischen Primers kann dann ein genspezifisches PCR-Produkt erzeugt werden. Diese Methode wurde verwendet, um aus der Gesamt-cDNA von primären Keratinozyten die zugehörige cDNA-Sequenz der antimikrobiellen Proteine RNase 7 und RNase 8 zu identifizieren. Die Sequenz der genspezifischen Primer für RNase 7 und RNase 8 sind der Tab. 1 zu entnehmen. Diese Primer wurden jeweils zusammen mit dem oben aufgeführten Anker-Primer in folgender PCR-Reaktion eingesetzt:

- 3,0 µl 10x Amplitaq-Gold-PCR-Puffer
- 2,4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,6 µl dNTPs (10 mM)
- 1,0 µl genspezifischer Vorwärts-Primer (10 µM)
- 1,0 µl Frohmann-Anker-Primer (10 µM)
- 3,0 µl cDNA-Vorlage
- 18,85 µl H₂O
- 0,15 µl Amplitaq-Gold-Polymerase

Folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler (Trio-Block, Biometra) wurde verwendet:

| | |
|---------------|-------------|
| 95 °C - 9 min | } 35 Zyklen |
| 94 °C - 1 min | |
| 55 °C - 20 s | |
| 72 °C - 2 min | |
| 72 °C - 3 min | |
| 4 °C - ∞ | |

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem horizontalen 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt (siehe 2.3.2) und anschließend aus dem Gel eluiert, kloniert und sequenziert.

2.3.1.5 5'-RACE-PCR

Die 5'-cDNA-Sequenzabschnitte wurden in einer 5'-RACE (siehe auch 2.3.1.4) unter Verwendung des „Marathon-Ready cDNA-Kits“ (Clontech, BD Biosciences, Heidelberg) mit aus Haut isolierter Gesamt-RNA ermittelt.

Die Durchführung der 5'-RACE erfolgte dabei nach dem Protokoll des Herstellers. Die Sequenz der genspezifischen Primer, die für die erste und zweite PCR für RNase 7 und RNase 8 verwendet wurden, sind in Tab. 1 aufgeführt. Die generierten PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem horizontalen 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Punkt 2.3.2) und anschließend aus dem Gel eluiert, kloniert und sequenziert.

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1-2 %igen (w/v) Agarose-Gelen. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 40 mM Essigsäure, 1 mM Na₂EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C und Zugabe von 7 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Lösung in eine horizontale Gießvorrichtung (Horizon 11-14; Life Technologies, Karlsruhe) gegossen. Die DNA wurde mit DNA-Auftragagspuffer versetzt (0,1 M EDTA, 50 % Glycerin (v/v), 1 % Bromphenolblau (w/v), 1 % Xylencyanol (w/v), 0,1 % SDS (w/v)). Die Elektrophorese erfolgte für 30-45 min bei konstant 100 V (ca. 60 mA) in TAE-Puffer. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Banden durch Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei 266 nm detektiert und mit Hilfe einer BioDoc-Fotodokumentationsanlage (Biometra, Göttingen) digital dokumentiert.

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus der PCR oder aus Restriktionshydrolysen für Ligationen erfolgte über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese. Plasmid-DNA wurde in einem 1 %igen, PCR-Produkte in einem 2 %igen Agarose-Gel

elektrophoretisch aufgetrennt, auf einem UV-Bildschirm sichtbar gemacht und aus dem Gel herausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem Qiaex Gel Extraction Kit II (Qiagen, Hilden) nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll.

2.3.3 Restriktionshydrolyse von DNA

Für Restriktionshydrolysen wurden 2,5-5 U Enzym/ μg Plasmid und 7-10 U/ μg PCR-Produkt eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in dem vom Hersteller angegebenen optimalen Puffer für 8 h bei 37 °C. Die Restriktionsendonukleasen wurden anschließend durch zwanzigminütige Erhitzung bei 65 °C inaktiviert.

2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Vektor-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte in einem Volumen von 10 μl . Das Verhältnis von Vektor zu Insert wurde so eingestellt, dass das Insert mindestens im fünffachen Überschuss vorlag. Die Ligationsreaktion erfolgte mit 1 μl T4-DNA-Ligase (1 U) zunächst bei 25 °C für 30 min, woran sich ein weiterer dreißigminütiger Inkubationsschritt bei 22 °C anschloss. Als Kontrolle wurde geschnittener Vektor ohne Fragment verwendet, um abschätzen zu können, inwieweit der Vektor mit sich selbst religiert.

2.3.5 Herstellung CaCl_2 -kompetenter Zellen

Die Herstellung CaCl_2 -kompetenter Zellen der *E. coli*-Derivate TOP10F' und BL21(DE3) pLysS erfolgte in Anlehnung an das Protokoll im T-Cloning Kit Manual der Firma Fermentas (Vilnius, Litauen). Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 5000 \times g und 4 °C. 40 ml LB-Medium (0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0) wurden 1 %ig (v/v) mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD_{620} von 0,6 inkubiert. Dann wurden die Zellen 20 min auf Eis gelagert, 15 min zentrifugiert und der Kulturüberstand dekantiert. Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem TBS-Puffer aufgenommen (100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM Tris/HCl pH 7,0) und für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert (100 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 5 mM Tris/HCl

pH 7,0), 20 min auf Eis inkubiert und 10 min wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und dann mit 500 μl 86 %igem Glycerin versetzt. 50 μl -Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.6 Transformation

Transformationen von Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgten modifiziert nach einem Protokoll von Tang und Mitarbeitern (Tang et al., 1994). 1 μl Plasmid-DNA aus einer Plasmid-Minipräparation (Macherey-Nagel, Düren) oder 1 μl Ligationsansatz wurden mit 25 μl kompetenten *E. coli* (TOP10F' (Invitrogen, Groningen, Niederlande) bzw. BL21(DE3) pLysS (Novagen, Madison, USA)) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung bei $42\text{ }^\circ\text{C}$ für 30 s folgte eine dreiminütige Inkubation auf Eis. Dann wurden 125 μl SOC-Medium (0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM D-Glucose) zugegeben und der Transformationsansatz für 1 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 200 Upm inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit dem für das jeweilige Plasmid selektiven Antibiotikum versetzt waren (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Carbenicillin, 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol), und über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Klone wurden über Kolonie-PCR (2.3.1.2) auf das korrekte Plasmid überprüft und das Plasmid über ein Mini- oder Maxipräparationskit (Macherey-Nagel, Düren bzw. Qiagen, Hilden) nach Angaben der Hersteller aufgereinigt.

2.3.7 DNA-Sequenzierung

Für DNA-Sequenzierungen wurde das SequiTherm EXCEL II Long-Read DNA Sequencing Kit-Alf (Biozym, Oldendorf) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach der Methode der Zyklus-Sequenzierung (Innis et al., 1988), deren Grundlage die Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1992) ist. Die Detektion der Fragmente erfolgte fluorimetrisch unter Verwendung Cy5-markierter Sequenzierprimer (Tab. 1) mit einem Alf-Express DNA Sequencer™ (Pharmacia, Freiburg) unter den vom Hersteller genannten Bedingungen.

2.3.8 Transfektion von Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien mit Promotorkonstrukten und Expressionsplasmiden (Tab. 3) transfiziert, um den Einfluss der verschiedenen Promotorregionen bzw. die Überexpression von RNase 7 zu untersuchen. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen dazu passagiert und auf 12- oder 6-Loch-Platten ausgesät. Zur Transfektion wurde das Reagenz Fugene 6 (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Gemäß Herstellerprotokoll wurden pro Vertiefung 1 bzw. 2 µl Fugene 6 in einem Gesamtvolumen von 100 µl serumfreiem Grundmedium verdünnt und je nach Plasmid 0,025-2 µg DNA dazugegeben. Zur Bildung des DNA-Lipidkomplexes wurde diese Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, tropfenweise auf die Kulturplatte gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Bei jeder Transfektion diente eine nicht-transfizierte Probe als Kontrolle. Das Kulturmedium der Zellen wurde nach 6 h gewechselt. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert oder geerntet und je nach Bedarf eine Proteinisolierung und -analyse vorgenommen. Dafür wurden die Zellen nach Abnahme des Überstandes durch Zugabe von 350 µl bzw. 700 µl Lysispuffer (Promega, Mannheim) 15 min lang bei Raumtemperatur lysiert. Die Luziferaseaktivität der Zelllysate wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim) gemessen (2.6.11).

Für die Generierung einer RNase 7-überexprimierenden, stabilen HaCaT-Zelllinie (2.8.2) wurden die transfizierten Zellen nach 48 h subkultiviert (2.2.3), mit Blastizidin-haltigem Medium (10 µg/ml) in Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert. Zum Nachweis der RNase 7-Überexpression wurden aus den transfizierten Zellen Proteine für Westernblot-Analysen (2.6.5) und RNA für „real-time“-PCR-Analysen (2.8.1.4) isoliert. Die Zellkulturüberstände wurden in einem ELISA untersucht (2.6.6).

2.4 Rekombinante Expression von RNase 7 und RNase 8 in *E. coli*

2.4.1 Struktur der Expressionsvektoren

Für die Expression von RNase 7 und RNase 8 in *E. coli* wurden die Vektoren pET-32a (Novagen, Madison, USA) sowie pQE-2 (Qiagen, Hilden) verwendet. Diese beiden Vektoren ermöglichen es, ein rekombinantes Fusionsprotein herzustellen,

welches N-terminal eine „His-Tag“-Sequenz besitzt, die für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins über eine Nickel-Affinitätssäule benutzt werden kann. Der N-terminale Fusionsabschnitt des aufgereinigten, rekombinanten Fusionsproteins kann dann mittels einer Endoproteinase (Enterokinase bei pET-32a bzw. Dipeptidyl-peptidase bei pQE-2) abgespalten werden, so dass das gewünschte Protein freigesetzt wird.

Für die Klonierung in die Expressionsvektoren wurden die in Tab. 1 aufgeführten RNase 7 bzw. RNase 8 spezifischen Primer verwendet, welche den für das native Protein codierenden Genabschnitt amplifizieren. Die Primer für die Klonierung der Genprodukte in den Vektor pET-32a besitzen zusätzlich eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen *Bgl*II und *Not*I sowie für eine Enterokinase. Die Primer für die Klonierung in den Vektor pQE-2 weisen eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Not*I (Tab. 1) auf. Mit diesen Primern wurde eine PCR mit humaner genomischer DNA (Promega, Mannheim) durchgeführt, wobei die in Punkt 2.3.1.1 aufgeführten PCR-Reaktionsbedingungen verwendet wurden.

Die PCR-Produkte wurden in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert (2.3.3, 2.3.4, 2.3.6) und zur Feststellung des korrekten Leserasters sequenziert (2.3.7).

2.4.2 Durchführung der Expression

Die Expression von RNase 7 und RNase 8 erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Dieser Zellstamm besitzt unter Kontrolle des lacUV5-Promotors das Gen für die T7-RNA-Polymerase. Im Expressionsvektor pET-32a stehen die klonierten Gene unter der Kontrolle der T7-Transkription (Studier und Moffat, 1986; Studier et al., 1990). Der Expressionsvektor pQE-2 basiert hingegen auf dem T5-Promotor Transkriptions-Translationssystem (Bujard et al., 1987). Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) kann in beiden Expressionssystemen die Transkription der klonierten Gene induziert werden.

Die Expressionsvektoren R7pET-32a und R8pQE2 wurden wie unter 2.3.6 beschrieben in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformiert. Positive Klone wurden durch die Plasmid-vermittelte Antibiotika-Resistenz selektiert. Für die Expression wurden 5 ml LB-Medium mit Carbenicillin (100 μ g/ml) und

Chloramphenicol (34 µg/ml) mit einer Einzelkolonie *E. coli* BL21(DE3) pLysS mit den entsprechenden Vektoren angeimpft und über Nacht schüttelnd (250 Upm) bei 37 °C inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur wurden zentrifugiert (3 min, 6000 x g), die Bakterien in 200 ml frischem LB-Medium mit Carbenicillin und Chloramphenicol resuspendiert und ca. 2 h bei 37 °C auf dem Schüttler vermehrt. Bei einer OD₆₂₀ von 0,4-1 wurde die Expression der verschiedenen Proteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach einer Induktionszeit von 3 h bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 6000 x g) und bis zur Aufreinigung der rekombinanten RNase 7 bzw. RNase 8 (2.5.6) bei -20 °C gelagert.

2.5 Chromatographische Aufreinigung von Proteinen

2.5.1 Aufreinigung nativer RNase 7 aus Psoriasischuppen und aus dem *Stratum corneum* gesunder Haut

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von nativer RNase 7 wurden läsionale Hautschuppen von Psoriasis-Patienten sowie Kallusstücke (*Stratum corneum*) mit einer Dicke von ca. 0,2-0,4 mm von Fußsohlen gesunder Probanden verwendet. 50 g vereinigte läsionale Hautschuppen von Psoriasis-Patienten bzw. Stücke von *Stratum corneum* wurden in 300 ml H₂O + 7,5 g Zitronensäure gelöst. Diese Suspension wurde anschließend mit Hilfe eines Scherkraftdesintegrators (Ultra-Turrax T25®, Janke & Kunkel, Staufen) für 2 h bei 4 °C homogenisiert. Nach Zugabe von 300 ml 96 %igem Ethanol wurde der Ansatz für ca. 12 h bei -20 °C eingefroren. Die Proben wurden aufgetaut, 20 min zentrifugiert (6000 x g, 4 °C) und die Überstände bis zu einem Volumen von etwa 10 ml durch Ultrafiltration mit einer Amicon YM3-Membran (Amicon Corp., Danvers, USA) eingeeengt. Die so gewonnenen Konzentrate wurden mit Ammoniak auf pH 8,0 und anschließend sofort mit konzentrierter Ameisensäure auf pH 4-4,7 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation bei 6000 x g (15 min, 4 °C) wurden die Überstände auf pH 7,3 eingestellt.

2.5.2 Heparin-Affinitätssäule

Die aus Psoriasissschuppen und *Stratum corneum* gewonnenen Konzentrate (2.5.1) wurden gegen Puffer A (0,01 M Tris + 0,01 M Zitronensäure, pH 7,4) diafiltriert. Als Säule wurde eine 1 ml HiTrap Heparin-Affinitätssäule (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die Säule wurde vor Benutzung mit Puffer A äquilibriert. Die Elution des an die Säule gebundenen Materials erfolgte für 20 min mit 2 M NaCl in Puffer A bei einer Flussrate von 1 ml/min. Das eluierte Material wurde dann auf ein Volumen von etwa 1-2 ml durch eine Amicon YM3-Membran eingeeengt und für die C8-Umkehrphasen-HPLC (2.5.3) eingesetzt.

2.5.3 C8-Umkehrphasen-HPLC

Für die weitere Aufreinigung des eluierten Materials der Heparin-Affinitätssäule (2.5.2) bzw. Nickel-Affinitätssäule (2.5.6) wurde eine präparative Nucleosil 300-7 C8-Säule (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Für die Elution wurde ein Gradient von Puffer A (0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in H₂O) zu Puffer B (0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in Acetonitril) verwendet. Eluiert wurde mit einer Durchflussrate von 3 ml/min, beginnend mit 5 min 10 % Puffer B, gefolgt von einem linearen 25 min Gradienten zu 60 % Puffer B. Es folgten ein linearer 1 min Gradient zu 100 % Puffer B und abschließend 9 min Puffer B.

2.5.4 Kationenaustausch-HPLC

Die aus der C8-Umkehrphasen-HPLC stammenden Fraktionen (2.5.3) wurden mit Hilfe einer Kationenaustausch-HPLC weiter aufgereinigt. Die Auftrennung erfolgte mittels einer „SMART™ System“-Anlage (Pharmacia, Freiburg), wobei als Säule eine Mono S-PC 1.6/5 (Pharmacia, Freiburg) zum Einsatz kam. Die UV-Absorption des eluierten Materials wurde bei 215, 254 und 280 nm gemessen, wobei die Fraktionierung manuell durchgeführt wurde. Als Elutionspuffer wurden Puffer A (25 % Acetonitril (v/v) in H₂O + 0,2 M Ammoniumformiat, pH 4,0) und Puffer B (Puffer A + 1 M NaCl) verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0 % bis 100 % Puffer B innerhalb von 20 min bei einer Flussrate von 100 µl/min.

2.5.5 C2/C18-Umkehrphasen-HPLC

Als letzter chromatographischer Reinigungsschritt wurde eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC mit Hilfe der „SMART™ System“-Anlage (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine μ RPC C2/C18 SC 2.1/10 (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die Fraktionierung des eluierten Materials wurde durch Registrierung der Absorption bei 215, 254 und 280 nm manuell durchgeführt. Für die Elution wurde ein Gradient von Puffer A (0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in H₂O) zu Puffer B (0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in 80 % Acetonitril) bei einer Durchflussrate von 100 μ l/min. verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 100 % Puffer A äquilibriert. Dann folgte ein linearer Gradient bis 25 % Puffer B innerhalb von 10 min, gefolgt von einem 30 min Gradienten bis zu 70 % Puffer B und einem abschließenden 10 min Gradienten bis zu 100 % Puffer B.

2.5.6 Aufreinigung von rekombinanter RNase 7 und RNase 8 aus *E. coli*

Die aus der Expression erhaltenen Bakterienzellen (2.4.2) wurden in 4 ml eiskaltem Bindungs-Puffer (5 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9) aufgenommen und mit Hilfe von Ultraschall lysiert (50 Zyklen, 60 % Leistung, 10 Impulse; Sonoplus GM70, Bandelin Elektronik, Berlin). Das Zelllysat wurde 30 min bei 15500 x g zentrifugiert und der Überstand auf eine Nickel-Affinitätssäule (Protino Ni Resin, Macherey-Nagel, Düren) mit 2 ml Säulenvolumen aufgetragen. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (pET System Manual, 7th edition). Die rekombinanten Proteine wurden abschließend mit 7,5 ml Elutionspuffer (1 M Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9) von der Säule eluiert. Die eluierten Proteine wurden dann durch Zugabe konzentrierter Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und für eine weitere Aufreinigung über C8-Umkehrphasen-HPLC (2.5.3) eingesetzt.

Die aus der C8-Umkehrphasen-HPLC resultierenden Fraktionen wurden über SDS-PAGE-Analyse (2.6.1) sowie über Massenspektrometrie-Analyse (2.6.12) auf Vorhandensein der rekombinanten Proteine überprüft. Positive Fraktionen wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge (VR-1, Heto, Dänemark) getrocknet und in 100 μ l Enterokinase- (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. Dipeptidylpeptidase-1x-Puffer (Qiagen, Hilden) pro 100 μ g Protein für eine nachfolgende Abspaltung des

„His-Tags“ gelöst. Für die Proteolyse des Enterokinasesystems wurde 1 U Enterokinase pro 100 µg gelöstes Protein zugegeben und der Ansatz 16 h bei 37 °C inkubiert. Für die Proteolyse des Dipeptidylpeptidasesystems wurden dem gelösten Protein nach Angaben des Herstellers aktivierte Dipeptidylpeptidase (5 mU/100 µg Protein) zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Die einzelnen Proteolysereaktionen wurden durch Einfrieren bei -20 °C gestoppt und so bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Zur weiteren Aufreinigung der exprimierten rekombinanten Proteine wurden die Ansätze mit 0,1 % Trifluoressigsäure auf 1 ml aufgefüllt und in der C4-Umkehrphasen-HPLC (2.5.7) eingesetzt.

2.5.7 C4-Umkehrphasen-HPLC

Die weitere Aufreinigung der Proteine erfolgte durch C4-Umkehrphasen-HPLC. Es wurden eine analytische C4-Säule (4.6 x 250 mm, Wide-Pore Butyl, 5 micron, J.T. Baker, Phillipsburg, USA) und die Puffer A und B (siehe C8-Umkehrphasen-HPLC, 2.5.3) verwendet. Die Durchflussrate betrug 0,5 ml/min. Die Säule wurde zunächst 10 min mit 10 % Puffer B äquilibriert. Dann folgte ein linearer Gradient bis 40 % Puffer B innerhalb von 10 min, gefolgt von einem 20 min Gradienten bis zu 70 % Puffer B und einem abschließenden 10 min Gradienten bis zu 100 % Puffer B. Die Elution wurde durch UV-Absorption bei 215 nm verfolgt, wobei die Fraktionierung des eluierten Materials manuell erfolgte.

Um zu überprüfen, ob es zur Abspaltung des gewünschten rekombinanten Produkts gekommen ist, wurden die resultierenden Fraktionen im Massenspektrometer analysiert (2.6.12) und anschließend einem letzten HPLC-Reinigungsschritt mit einer Sephasil-C2/C18-Säule (2.5.5) unterzogen.

2.6 Proteinanalytik

2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die mittels HPLC aufgereinigten Proteine wurden zur Kontrolle der Reinheit und Größe elektrophoretisch über Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür

wurde das XCell sure lock Mini-Cell-Gelsystem mit den dazugehörigen Puffern von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 1 h in 100 ml Färbelösung (25 % Ethanol (v/v), 7 % Essigsäure (v/v), 0,2 % Coomassie Brilliant Blau R250 (w/v)) gefärbt. Nach Inkubation in der Färbelösung wurde das Gel in 100 ml Entfärber-Lösung (25 % Isopropanol (v/v), 7 % Essigsäure (v/v)) bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes inkubiert.

Für Westernblotanalysen (2.6.5) wurden Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gele nach Schagger und von Jagow (1987) verwendet. Die Proteine wurden in Gelen mit einem Anteil von 6 % Bisacrylamid und 6 M Harnstoff in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad, München) elektrophoretisch aufgetrennt.

Als molekularer Größenstandard diente in beiden Fällen der Standard SeeBluePlus2 (Invitrogen, Karlsruhe).

2.6.2 Aufschluss eukaryotischer Zellen

Um eukaryotische Zellen aufzuschließen und die Proteine der Zelllysate mittels ELISA oder Westernblot zu analysieren, wurden die Zellen mit einem Zellschaber in PBS von der Zellkulturplatte gelöst und für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 10-100 µl Lysispuffer (5 mM Tris, 250 mM Sucrose, 1 mM EGTA, pH 7,5, 1 % Triton X-100) aufgenommen, für 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Die Proteinkonzentration in den Überständen wurde wie unter 2.6.3 beschrieben bestimmt.

2.6.3 Proteinbestimmung

Zur quantitativen Proteinbestimmung von Zelllysaten wurden die Lösungen des BIORAD DC Protein assays (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Extinktion wurde bei 620 nm mit einem Spektralphotometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) gemessen. Anhand einer Standardkurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen wurden aus den gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentrationen berechnet.

2.6.4 Herstellung polyklonaler RNase 7-Antikörper aus Ziege

2.6.4.1 Immunisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper gegen RNase 7 hergestellt. Hierfür wurde ein Gemisch aus aufgereinigter rekombinanter und nativer RNase 7 mittels Glutaraldehyd an „Keyhole Limpet Hemocyanin“ (KLH) gekoppelt und in die zu immunisierende Ziege injiziert. Zunächst wurde 1 mg KLH mit 1 μ l Glutaraldehyd versetzt und 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene Glutaraldehyd über eine 30 kDa-Filter-Säule (Vivascience, Hannover) abgetrennt und das KLH-Glutaraldehydkonjugat mit PBS gewaschen. Zur Kopplung wurden 1,2 mg RNase 7 in 850 μ l PBS gelöst und mit 400 μ l KLH-Glutaraldehyd-Gemisch versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Kopplungsreaktion durch Zugabe von 5 μ l 1 M Tris/HCl pH 8 abgestoppt. Nach Zugabe von 0,6 mg ungekoppelter RNase 7 (in 300 μ l PBS) konnte die Immunisierung vorgenommen werden. Hierfür wurde der Ziege drei Mal in Intervallen von 14 Tagen das Antigen (je 0,5 mg/ml) injiziert. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurde der Ziege Blut entnommen und das Serum bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Immunisierung der Ziege wurde vom ZIKA-Kaninchenbetrieb in Gottin durchgeführt.

2.6.4.2 Aufreinigung

Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte über eine Affinitätssäule, bei der eine Kombination aus nativer und rekombinanter RNase 7 kovalent an Sepharosematerial (HiTrap NHS-activated HP, Pharmacia, Freiburg) gekoppelt wurde. Die Kopplung erfolgte nach Angaben des Herstellers. 1,5 mg RNase 7 wurde in 1 ml Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) auf die Säule aufgetragen. Nach 1 h wurde die Säule drei Mal alternierend mit Puffer A (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3) und Puffer B (0,1 M Azetat, 0,5 M NaCl, pH 4) gewaschen. Die Säule wurde bei 4 °C in Äquilibriumspuffer (10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,3) gelagert.

Zur Antikörperaufreinigung wurden jeweils 500 μ l des RNase 7-Antiserums auf die äquilibrierte RNase 7-Affinitätschromatographie-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Äquilibriumspuffer gewaschen. Zur Elution der an die Matrix gebundenen Immunglobuline wurde zunächst 1 M NaCl, pH 7 und im Anschluss für die Elution

hochaffiner Antikörper ein 0,2 M Glycin-HCl Puffer, pH 3 verwendet. Die eluierten Antikörper wurden in vorgepufferten Röhrchen (15 µl 1 M Tris, pH 7,5) aufgefangen. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,5 wurden die gereinigten Antikörperfraktionen für weiterführende Versuche über eine Vivaspin 0,5 ml concentrator Säule (30 kDa Filter; Vivascience, Hannover) einkonzentriert und gegen PBS (pH 7,4) umgepuffert. Der Proteingehalt der Antikörper wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Der RNase 7-Antikörper wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.6.4.3 Biotinylierung

Für die Entwicklung eines RNase 7-ELISA (2.6.6) wurde biotinylierter RNase 7-Sekundärantikörper benötigt. Dafür wurde 1 mg D-Biotin-N-Hydroxysuccinimidester in 1 ml DMSO gelöst und von dieser Stammlösung sofort 3,3 µl pro mg Protein zu der antikörperhaltigen Lösung gegeben. Nach 2,5-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (200 Upm) wurde überschüssiges Biotin mit einer Vivaspin 0,5 ml concentrator Säule (30 kDa Filter; Vivascience, Hannover) entfernt und die antikörperhaltige Lösung gegen PBS (pH 7,4) umgepuffert. Der biotinylierte RNase 7-Antikörper wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.6.5 Westernblot

Es wurde ein Westernblot zum Nachweis von RNase 7 verwendet. Die Proteine wurden zunächst elektrophoretisch in einer Tricine-SDS-PAGE aufgetrennt (2.6.1). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines „Sartoblot“-Apparates (Sartorius, Göttingen) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Transferzeit betrug 2 h bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² Gelfläche. Danach wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h in 5 % Milchpulver (w/v, Heirler) in PBS inkubiert. 10 µg/ml primärer anti-RNase 7-Antikörper (2.6.4) in Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween) wurden zugefügt und die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Membran sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Ziege IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg; 1:20000 in PBS verdünnt) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem, achtmaligen Waschen

erfolgte die Detektion mit Hilfe des CPS („chemiluminescent peroxidase substrate“)-Detektionsreagenz (Sigma, Deisenhofen) nach Angaben des Herstellers.

2.6.6 RNase 7-ELISA

Für die Detektion und Bestimmung von RNase 7 in Überständen und Zelllysaten wurde ein selbst entwickelter ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) verwendet. Der ELISA wurde in 96 Loch-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Plate Maxisorp, Nunc GMBH, Wiesbaden) durchgeführt. Jede Vertiefung wurde mit 415 ng anti-RNase 7-Antikörper (2.6.4) in 50 µl 0,05 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,6 beschichtet und schüttelnd (300 Upm) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Unspezifische Proteinbindungen wurden durch eine zehnmütige Inkubation mit 200 µl 1 %iger (w/v) boviner Serumalbumin-Lösung (BSA) in PBS abgesättigt. Danach wurden alle Löcher zweimal mit je 200 µl Waschpuffer (0,01 % Tween 20 in PBS) gewaschen. Je 100 µl der zu testenden Überstände sowie eine RNase 7-Konzentrationsreihe (0,1 bis 40 ng/ml) als Standard wurden in die 96 Loch-Mikrotiterplatten gegeben und 30 min inkubiert. Die Vertiefungen wurden dreimal gewaschen, anschließend mit 480 ng biotinyliertem RNase 7-Antikörper (2.6.4.3) in Waschpuffer befüllt und für 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 50 µl Peroxidase-konjugierter Avidin-Komplex (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die 96 Loch-Mikrotiterplatte wurden dann sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und die gebundene Peroxidase mit 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonsäure (ABTS, Roche Diagnostics, Mannheim) als Substrat quantifiziert. Die einsetzende Färbereaktion wurde durch Messung der Extinktion bei 405 nm in einem Multikanal Photometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) bestimmt. Native sowie rekombinante RNase 7 dienten zur Erstellung von Eichkurven.

2.6.7 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Paraffin eingebettete Hautgewebestücke aus dem Archiv der Kieler Hautklinik verwendet. Mit einem Mikrotom wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Superfrost-Objektträger

aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet wurden. Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Zur Inhibierung der intrazellulär vorhandenen Peroxidase wurden die Gewebesektionen 5 min in einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung in TBS inkubiert. Durch zweimaliges Waschen der Objektträger in *Aqua dest.* wurde anschließend die überschüssige Wasserstoffperoxid-Lösung entfernt. Nachdem die Präparate 30 min bei 80 °C in 10 mM Citratpuffer erhitzt worden waren, wurden sie 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt und 5 min in TBS gespült. Anschließend wurden die Präparate für 30 min in 10 % normalem Ziegenserum (NGS, DAKO Diagnostica Hamburg) in TBS inkubiert. Die Schnitte wurden für 16 h bei 4 °C mit primärem anti-RNase 7-Antikörper (2.6.4) in einer Verdünnung von 1:100 in TBS inkubiert. Nach Entfernung des primären Antikörpers durch Spülen in TBS wurden die Schnitte für 30 min mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (mouse-anti-goat, 1:500, v/v in TBS, DAKO Diagnostica Hamburg) beschichtet. Nach einer weiteren Reinigung in TBS wurde der StreptABComplex (Streptomycin-Avidin-Biotin-Complex, 1:500, v/v in TBS, DAKO Diagnostica Hamburg) für 30 min auf die Präparate gegeben. Die Farbreaktion erfolgte schließlich nach erneutem Waschen in TBS durch die Peroxidase-Substrat-Lösung DAB (3,3'-Diaminobenzidin chromogen Lösung, BioGenex, San Ramon, Kanada) nach Angaben des Herstellers. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Schnitte mit Glycergel eingedeckelt. Als Kontrolle dienten Schnitte, auf die Präserum statt primärer Antikörper gegeben wurde und Schnitte ohne Zugabe von Primärantikörper, wobei die Schnitte sonst auf gleiche Weise behandelt wurden. Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop (Axioskop) der Firma Zeiss (Zeiss, Oberkochen).

2.6.8 Nachweis von RNase 7 in Waschlösungen der Haut

Zum Nachweis einer Sekretion von RNase 7 auf Hautoberflächen wurde an verschiedenen Lokalisationen eine Fläche von 0,79 cm² mit je 250 µl 10 mM Natriumphosphat-Puffer + 1 % BSA (pH 7,3) dreimal gespült und die Hautwaschungsflüssigkeiten bis zur Analyse mittels ELISA (2.6.6) bei -80 °C gelagert. Die Untersuchungen erfolgten an 15 hautgesunden Probanden sowie Psoriasis-Patienten.

2.6.9 Messung der Erythrozytenlyse

Um zu prüfen, ob RNase 7 bzw. RNase 8 hämolytische Aktivität besitzen, wurden jeweils 10 µl Erythrozytenkonzentrat (ca. 10^9 Erythrozyten/ml in Testpuffer (0,34 M Sucrose in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,3)) mit 2 µl RNase 7 bzw. RNase 8 (50-400 µg/ml in 10 mM Natriumphosphat-Puffer) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 90 µl PBS wurde der Ansatz für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes in einer 96-Loch-Platte (Nunc) bei 450 nm im Spektralphotometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) gemessen. Als Positivkontrolle (vollständige Hämolyse) wurde 0,1 % Triton X-100 statt antimikrobielles Protein eingesetzt.

2.6.10 Bestimmung der Ribonuklease-Aktivität (RNA-Hydrolyse)

Die Bestimmung der Ribonuklease-Aktivität von RNase 7 bzw. RNase 8 wurde leicht modifiziert nach der Methode von Anfinsen (Anfinsen et al., 1954) durchgeführt. Die Methode basiert auf der spektrophotometrischen Bestimmung von säurelöslichen Nukleotiden bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für die Bestimmung der Ribonuklease-Aktivität wurden 200 µl Reaktionspuffer (40 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2) mit 5 µg Hefe-tRNA versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µg RNase gestartet. Die Reaktionsansätze wurden für 1-30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 125 µl eiskaltem Fällungsmittel (20 mM Lanthanumnitrat, 3 % Perchlorsäure (v/v)) versetzt. Die Fällung der hochmolekularen RNA erfolgte durch vierzigminütige Inkubation auf Eis. Die Trennung der gefällten Komponenten von den säurelöslichen Oligonukleotiden wurde durch Zentrifugation (5 min, 10000 x g, 4 °C) erreicht. Anschließend wurde die Extinktion der Zentrifugationsüberstände bei 260 nm bestimmt. Als Leerwert diente ein Reaktionsansatz ohne Enzym.

2.6.11 Luziferase-Assay

Der Luziferase-Assay wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim) durchgeführt. Nach Aufnahme der transfizierten Zellen in Lysispuffer (2.3.8), wurde die Lumineszenz im Luminometer (TD-20/20, Turner Designs, Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dabei wurden die Aktivitäten der Firefly-Luziferase und der Renilla-Luziferase getrennt

gemessen. Das Gen für Renilla-Luziferase findet sich auf dem Kontrollvektor phRG-TK (Promega, Mannheim), der stets kotransfiziert wurde. Die Aktivität der Renilla-Luziferase diente als Maß für die Transfektionseffizienz und das Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luziferase-Aktivität wurde jeweils ermittelt.

2.6.12 Massenspektrometrie

Massebestimmungen erfolgten mittels Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie an einem Quadropol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF II, Micromass, Manchester, UK) im Positiv-Ionen-Modus. Das Instrument wurde über einen Massenbereich von 50-2000 Da mit einer Natriumiodid-Lösung kalibriert. Rohdaten kombinierter Spektren wurden Hintergrund-korrigiert und Durchschnittsproteinmassen mittels Maximum Entropy 1 („MaxEnt1“) Dekonvolution ermittelt (MassLynx-Software, Micromass, UK).

2.7 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von RNase 7, RNase 8 sowie von Überständen primärer Keratinozyten (2.2.5) wurde ein Flüssigkultur-Testsystem (Ganz et al., 1985) in modifizierter Form verwendet. Die verschiedenen Mikroorganismen (s. Tab. 2) wurden in TSB-Medium kultiviert, in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) verdünnt und davon 90 µl mit 10 µl der zu testenden Substanz (in unterschiedlichen Konzentrationen) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze 1:10 und 1:100 in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 100 µl in drei Parallelansätzen auf TSB-Agar ausplattiert. Nach Inkubation der Platten für 24 h bei 37 °C wurden die kolonienbildenden Einheiten (KBE) ausgezählt. Als Kontrolle wurde je ein Ansatz nur mit 10 mM Natriumphosphat-Puffer direkt vor und nach der dreistündigen Inkubation ausplattiert.

Zur Testung, ob der RNase 7-Antikörper (2.6.4) die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 neutralisieren kann, wurden 0,25 µg RNase 7 mit 10 µg RNase 7-Antikörper vorinkubiert und anschließend im Flüssigkultur-Testsystem die antimikrobielle Aktivität bestimmt. Zur Kontrolle wurden statt RNase 7-Antikörper ein irrelevanter Antikörper (Psoriasis-Antikörper) und 5 µM BSA eingesetzt.

2.8 Genexpression in Epithelzellen

2.8.1 Semiquantitative RT-PCR

2.8.1.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den kultivierten Epithelzellen erfolgte mit dem „TRIzol™“-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe), welches eine schnelle Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen ermöglicht.

Die RNA-Isolierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die RNA-Isolierung aus den kultivierten Epithelzellen wurde jeweils 0,5 ml „TRIzol™“-Reagenz je Vertiefung einer 12-Loch-Platte bzw. 1 ml „TRIzol™“-Reagenz je Loch einer 6-Loch-Platte verwendet. Die isolierte RNA wurde in 25 µl 25 %-Formamid-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

2.8.1.3 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)

Zur weiteren Analyse wurde die aus Zellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Bei diesem Prozess der reversen Transkription wird die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase genutzt (Gallo, 1971). Diese synthetisiert mittels einer RNA-Vorlage die komplementäre DNA (cDNA). Für einen Reaktionsansatz wurde 1 µg Gesamt-RNA und 1,5 µl Oligo(dT)-Primer (20 µM) mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 12,5 µl gebracht. Dieser Ansatz wurde für 10 min in einem Thermoblock auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben und anschließend sofort auf Eis gestellt. Hinzugefügt wurden:

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

Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 °C. Anschließend wurde die Lösung zur Inaktivierung des Enzyms für 5 min auf 90 °C erhitzt. Die so gewonnene cDNA wurde mit 80 µl H₂O versetzt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Untersuchung verschiedener humaner Gewebe mit RT-PCR hinsichtlich der RNase 8 mRNA-Expression wurde die RNA aus den Geweben mit einem Oligo(dT)-Primer umgeschrieben, der eine Ankersequenz für einen Frohmann-Ankerprimer besitzt (Frohmann(dt), s. Tab. 1). Im nächsten Schritt wurde aus dieser cDNA ein RNase 8-spezifisches PCR-Produkt generiert, indem ein genspezifischer Vorwärtsprimer sowie der Frohmann-Ankerprimer (Frohmannshort, s. Tab. 1) verwendet wurden. Die Untersuchungen der RNase 7 mRNA-Expression wurden mit Hilfe von Intron-überspannenden Primern (s. unten) durchgeführt.

2.8.1.4 „Real-time“-RT-PCR

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

Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA wurde in einer PCR-Analyse mit zwei genspezifischen Primern (GSP 1 und GSP 2) amplifiziert. Es wurden Intron-überspannende Primer eingesetzt, um cDNA von genomischer DNA unterscheiden zu können. Zur Ermittlung eines internen Standards wurden Primer verwendet, die ein spezifisches, 360 bp großes Fragment der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifizieren, die in Epithelzellen konstant exprimiert wird. Die entsprechenden Primer-Sequenzen sind in Tab. 1 angegeben. Die PCR-Reaktionen erfolgten dabei unter Verwendung eines „real-time“-Cyclers der Firma Roche Diagnostics, Mannheim (Light Cycler). Es wurden 10 ng cDNA in folgendem Reaktionsansatz eingesetzt:

-5,8 µl H₂O
-1,2 µl MgCl₂ (25 mM)
-1,0 µl Enzymlösung
-0,5 µl GSP 1 (10 µM)
-0,5 µl GSP 2 (10 µM)

Die PCR wurden als „touch down“-PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C - 10 min
95 °C - 10 s }
68 °C - 5 s } 45 Zyklen, pro Zyklus um 1 °C herunterreguliert bis auf 60 °C
72 °C - 10 s }

Die SYBR Green I Fluoreszenz wurde bei 72 °C am Ende jedes Zyklus gemessen. Die Spezifität der jeweiligen PCR-Produkte wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Mit Hilfe verschiedener Verdünnungen von Plasmiden mit inserierten Genen oder cDNA wurden für jedes Primerpaar Standardkurven erstellt. Die relative mRNA-Expression der spezifischen Gene wurde durch Division mit dem entsprechenden GAPDH-Transkriptionslevel errechnet.

2.8.2 Generierung einer stabilen RNase 7-überexprimierenden HaCaT-Zelllinie

Um eine polyklonale stabile Zelllinie zu generieren, die RNase 7 überexprimiert, wurde das für RNase 7 kodierende Gen in den Vektor pEF6/V5-His (Tab. 3) kloniert. Dieser Vektor besitzt ein Resistenzgen für Blastizidin, das eine Selektion erfolgreich transfizierter Zellen durch Zugabe von Blastizidin in das Zellkulturmedium ermöglicht. Für die Klonierung in den Vektor pEF6/V5-His wurden die in Tab. 1 aufgeführten RNase 7-spezifischen Primer verwendet. Mit diesen Primern wurde eine PCR mit aus primären Keratinozyten-RNA revers transkribierter cDNA (2.8.1.3) als Template durchgeführt, wobei die in Punkt 2.3.1.1 aufgeführten PCR-Reaktionsbedingungen Verwendung fanden. Für die Klonierung in den Vektor pEF6/V5-His, der einen 3'-T-Überhang aufweist, wurde dem Ansatz nach Beendigung der PCR 0,5 µl (0,5 Units) *Taq*-Polymerase hinzugefügt und das Gemisch für 30 min bei 72 °C inkubiert. Durch die nicht sequenzabhängige terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase wird dem PCR-Produkt auf diese Weise ein 3'-A-Überhang angefügt. Der weitere Ablauf der Klonierung erfolgte wie unter den Punkten Ligation (2.3.4), Transformation (2.3.6) und Sequenzierung (2.3.7) beschrieben.

Die HaCaT-Zellen wurden nach Aussäung in 6-Lochplatten wie unter 2.3.8 beschrieben mit 1 µg Vektor-DNA und 2 µl Fugene transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen subkultiviert (2.2.3), mit Blastizidin-haltigem Medium in Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert. Zum Nachweis der RNase 7-Überexpression wurden aus den transfizierten Zellen Proteine für Westernblot-Analysen und RNA für „real-time“-PCR-Analysen isoliert. Die Zellkulturüberstände wurden in einem ELISA untersucht.

2.9 Darstellung der Ergebnisse

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

Die angegebenen Messwerte entsprechen, soweit nicht anders angegeben, den Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. Als Fehlerbalken sind die Standardabweichungen der Messungen eingezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 RNase 7

Obwohl gesunde menschliche Haut ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt ist, wird sie normalerweise nicht von diesen infiziert. Ein Grund für diese natürliche Resistenz ist unter anderem die Produktion und Sezernierung von antimikrobiellen Proteinen durch Keratinozyten (Schröder, 1999). Die antimikrobielle Ribonuklease 7 (RNase 7) konnte als ein dominierendes antimikrobielles Protein der Haut identifiziert werden (Harder und Schröder, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von RNase 7 für die Infektionsabwehr der Haut näher zu charakterisieren. Um auch die Proteinexpression von RNase 7 untersuchen zu können, wurde ein RNase 7-spezifischer Antikörper generiert. Hierzu wurde eine Kombination aus nativer sowie rekombinant hergestellter RNase 7 (3.1.5.1) verwendet.

3.1.1 Generierung polyklonaler RNase 7-Antikörper

Zur Generierung spezifischer RNase 7-Antikörper wurde eine Ziege drei Mal mit einer Kombination aus rekombinanter und nativer RNase 7 in Intervallen von 14 Tagen immunisiert. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurde der Ziege Blut entnommen und das Serum über eine RNase 7-Affinitätssäule (2.6.4.2) aufgereinigt. Die für RNase 7 spezifischen Antikörper eluierten mit 0,2 M Glycin-HCl-Puffer (pH 3) (s. Abb. 1).

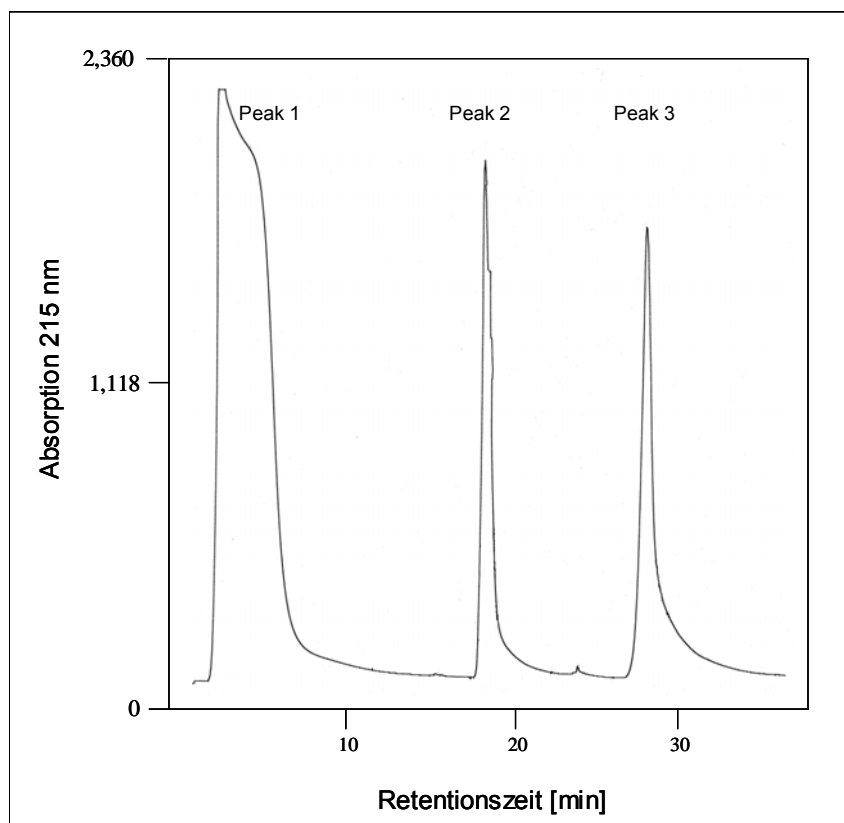


Abb. 1: Durch die Generierung einer RNase 7-Affinitätssäule konnten spezifisch RNase 7-Antikörper aus Ziegenserum aufgereinigt werden. Gezeigt ist die Aufreinigung von Ziegenserum einer mit RNase 7 immunisierten Ziege über eine RNase 7-Affinitätssäule. Peak 1 stellt den Durchfluss ungebundener Proteine dar, Peak 2 zeigt die mit 2 M NaCl, pH 7 eluierten Proteine und Peak 3 repräsentiert die mit 0,2 M Glycin-HCl, pH 3 eluierten spezifischen RNase 7-Antikörper.

Die Spezifität der RNase 7-Antikörper wurde durch Westernblot-Analyse überprüft (Abb. 2). In Extrakten von *Stratum corneum* detektierte der RNase 7-Antikörper eine Bande, die mit rekombinanter und nativer RNase 7 auf gleicher Höhe lief (s. Abb. 2) und der erwarteten Größe von RNase 7 (etwa 17 kDa in der SDS-PAGE) entsprach (Harder und Schröder, 2002). Mittels dieser RNase 7-Antikörper konnten Westernblot-Analysen, ELISAs (3.1.1.1), immunhistochemische Färbungen (3.1.4.1) und funktionelle Untersuchungen (3.1.5.7) durchgeführt werden.

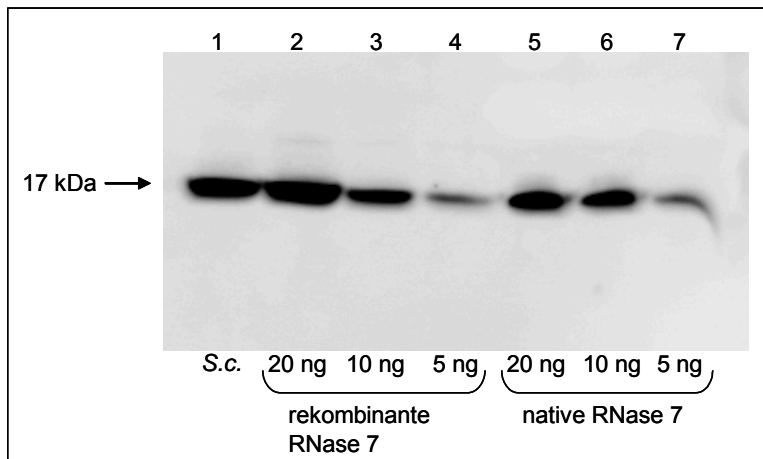


Abb. 2: Detektion von RNase 7 mittels der generierten Antikörper im Westernblot. Die RNase 7-Antikörper detektieren im Westernblot nur eine spezifische Bande. Spur 1: 0,5 μ g Protein aus *Stratum corneum*-Extrakt (S.c.), Spur 2-4: native RNase 7 in den angegebenen Konzentrationen, Spur 5-7: rekombinante RNase 7 in den angegebenen Konzentrationen.

3.1.1.1 Etablierung eines RNase 7-ELISAs

Um die RNase 7-Sekretion verschiedener kultivierter Zellen und die RNase 7-Verteilung auf humaner Haut zu untersuchen, wurde mit Hilfe der generierten Antikörper (3.1.1) ein RNase 7-ELISA etabliert. Die untere Nachweisgrenze des RNase 7-ELISAs liegt bei 1 ng/ml, maximal sind 40 ng/ml RNase 7 im linearen Bereich detektierbar (s. Abb. 3). Andere antimikrobielle Proteine wie hBD-2 oder RNase 8 werden im RNase 7-ELISA nicht erkannt (Daten nicht gezeigt).

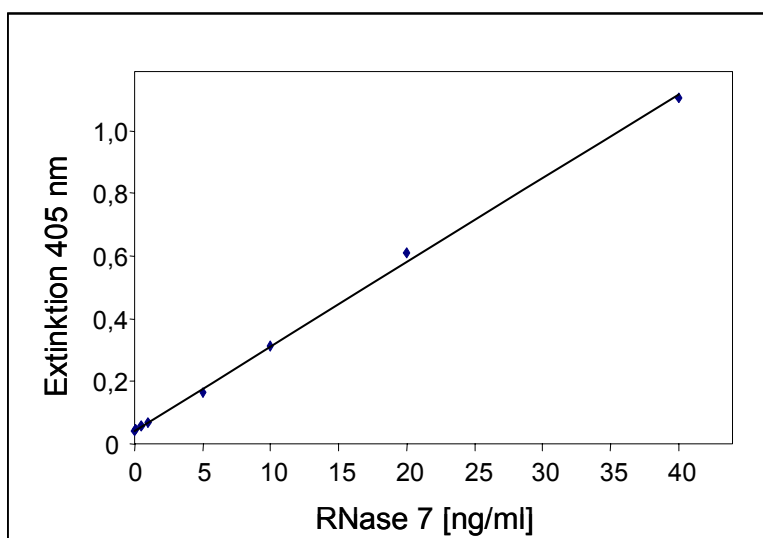


Abb. 3: Standardgerade des RNase 7-ELISAs. Gezeigt ist die lineare Abhängigkeit zwischen der Extinktion und der entsprechenden RNase 7-Konzentration des RNase 7-ELISAs, die durch verschiedene Verdünnungen von rekombinanter RNase 7 (0-40 ng/ml) erstellt wurde.

3.1.2 Regulation der Expression von RNase 7

3.1.2.1 Haut und primäre Keratinozyten exprimieren RNase 7

RNase 7 wurde aus Hautschuppen hautgesunder Probanden isoliert und aufgereinigt. Dargestellt sind die Konzentrationen an RNase 7 im Vergleich zu den antimikrobiellen Proteinen hBD-2 und hBD-3, die pro Gramm Hautschuppen hautgesunder Probanden sowie von Psoriasis-Patienten isoliert wurden (s. Tab. 4).

| | Gesunde Haut | Psoriasis-Haut |
|---------|--------------|----------------|
| hBD-2 | 1 µg/g | 10-50 µg/g |
| hBD-3 | 0,1 µg/g | 1-10 µg/g |
| RNase 7 | 5-10 µg/g | 50-100 µg/g |

Tab. 4: Proteinexpression von antimikrobiellen Proteinen in Hautextrakten. Die aufgeführten antimikrobiellen Proteine wurden aus gesunder Haut (*Stratum corneum*, Fersenkallus) und aus läsionalen psoriatischen Hautschuppen isoliert. Die Konzentration der Proteine wurde photometrisch bestimmt.

Ein Vergleich der mRNA-Expressionen verschiedener antimikrobieller Proteine in „real-time“-PCR-Experimenten zeigte, dass RNase 7 im Gegensatz zu anderen antimikrobiellen Proteinen wie hBD-2 und Psoriasin in unstimulierten humanen, primären Keratinozyten auf einem vergleichsweise hohen Niveau exprimiert wird (s. Tab. 5).

| antimikrobielles Protein | Transkripte/10 ng RNA aus primären Keratinozyten |
|--------------------------|--|
| RNase 7 | 4960 |
| Psoriasin | 1270 |
| hBD-2 | 46 |
| hBD-3 | 1598 |

Tab. 5: Genexpression von RNase 7 und weiteren antimikrobiellen Proteinen in unstimulierten primären Keratinozyten. Dargestellt sind die Transkripte verschiedener antimikrobieller Proteine, die pro 10 ng RNA in „real-time“-PCR-Experimenten nachgewiesen wurden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führten zu der Frage, warum RNase 7 in der Haut und in primären Keratinozyten konstitutiv so hoch exprimiert wird. Um Einblicke in die Regulation der Genexpression zu bekommen, sollte als nächstes die Promotorregion von RNase 7 analysiert werden.

3.1.2.2 Das Intron in der 5'-UTR ist für die hohe RNase 7-Grundexpression essentiell

Ein Gen ist der Abschnitt auf dem DNA-Strang, der für die Bildung der primären Transkripteinheit Voraussetzung ist. Dazu gehören der nichttranskribierte 5'-Promotorbereich, die transkribierten, aber nicht translatierten 5'- und 3'-Bereiche (untranslatierte Region, UTR) und der eigentliche transkribierte Bereich, der aus den translatierten Exon- und den nichttranslatierten Intron-Regionen besteht. Das RNase 7-Gen ist wie die Gene aller bekannten Mitglieder der Ribonuklease A-Familie auf Chromosom 14 lokalisiert. Auch der Aufbau des für RNase 7 kodierenden Gens ist typisch für die RNase-A-Familie: Dem nicht-kodierten Exon 1 und dem einzigen Intron in der 5'-UTR folgt das Exon 2, welches die kodierende Sequenz beinhaltet (s. Abb. 4).

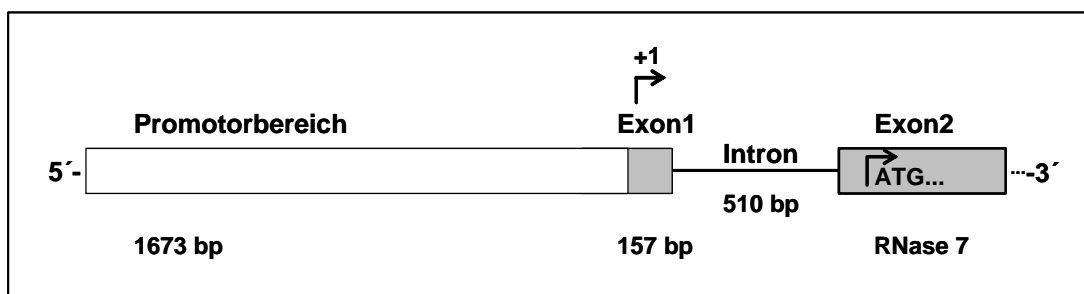


Abb. 4: Struktur des RNase 7-Gens. Gezeigt ist ein schematischer Überblick über die Organisation des RNase 7-Gens. Die Länge der einzelnen Abschnitte verhält sich proportional zur Größe in Basenpaaren (bp).

Um zu prüfen, welcher Bereich der RNase 7-Promotorregion einen Einfluss auf die Grundexpression von RNase 7 haben könnte, wurden verschiedene Fragmente des RNase 7-Promotorbereichs mittels PCR generiert und in ein Reporterplasmid (pTAL, Firefly-Luziferase-Gen, Clonetech) kloniert (s. Abb. 5).

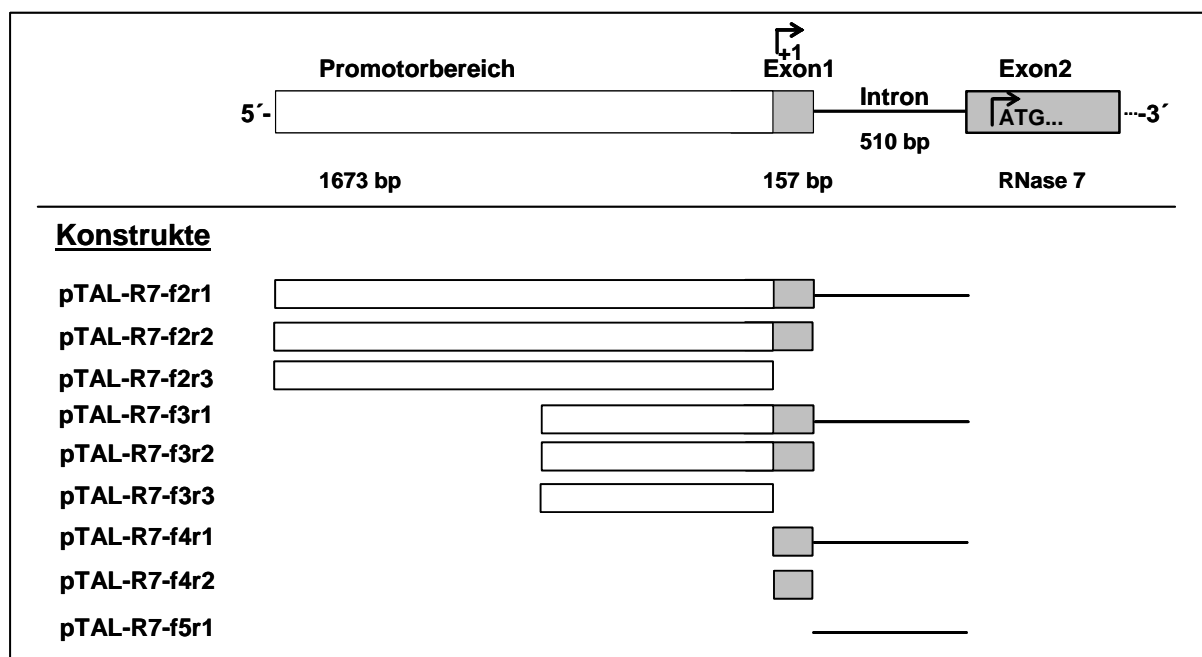


Abb. 5: Übersicht der verwendeten RNase 7-Promotor-Fragmente. Gezeigt ist ein schematischer Überblick über die verwendeten RNase 7-Promotorfragmente. Die Länge der einzelnen Abschnitte verhält sich proportional zur Größe in bp. Die einzelnen Fragmente wurden in das pTAL-Luziferase-Reporter-Plasmid kloniert und transient in primäre Keratinozyten transfiziert.

Die in Abb. 5 dargestellten Konstrukte wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene (Roche Diagnostics) für 24 h transient in primäre Keratinozyten transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Reporterogenaktivität luminometrisch gemessen. Die Reporterogenaktivität ist als relative Luziferaseaktivität (RLA) angegeben. Dabei zeigte sich, dass das Konstrukt aus Promotor, Exon 1 und Intron (f3r1) die höchste RLA aufwies (s. Abb. 6). Bei Entfernung des Introns (f3r2) verringerte sich die RLA um fast 60 %. Das Konstrukt f3r1, das nur aus dem Promotor besteht, zeigte wiederum eine 30 % höhere RLA als das Konstrukt aus Promotor und Exon 1 (f3r2) (s. Abb. 6). Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Konstrukte mit dem 889 bp längerem Promotorfragment (f2r1, f2r2, f2r3, Daten nicht gezeigt). Die RLA der Konstrukte aus Exon 1 alleine (f4r2), Intron alleine (f5r1) sowie Exon 1 und Intron zusammen (f4r1) waren nicht höher als die RLA der Vektorkontrolle (s. Abb. 6). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das einzige Intron in der 5'-UTR des RNase 7-Gens für die hohe Genexpression von RNase 7 essentiell ist. Weiterhin scheint das Exon 1 unter diesen Versuchsbedingungen einen inhibitorischen Effekt auf die RNase 7 Expression auszuüben.

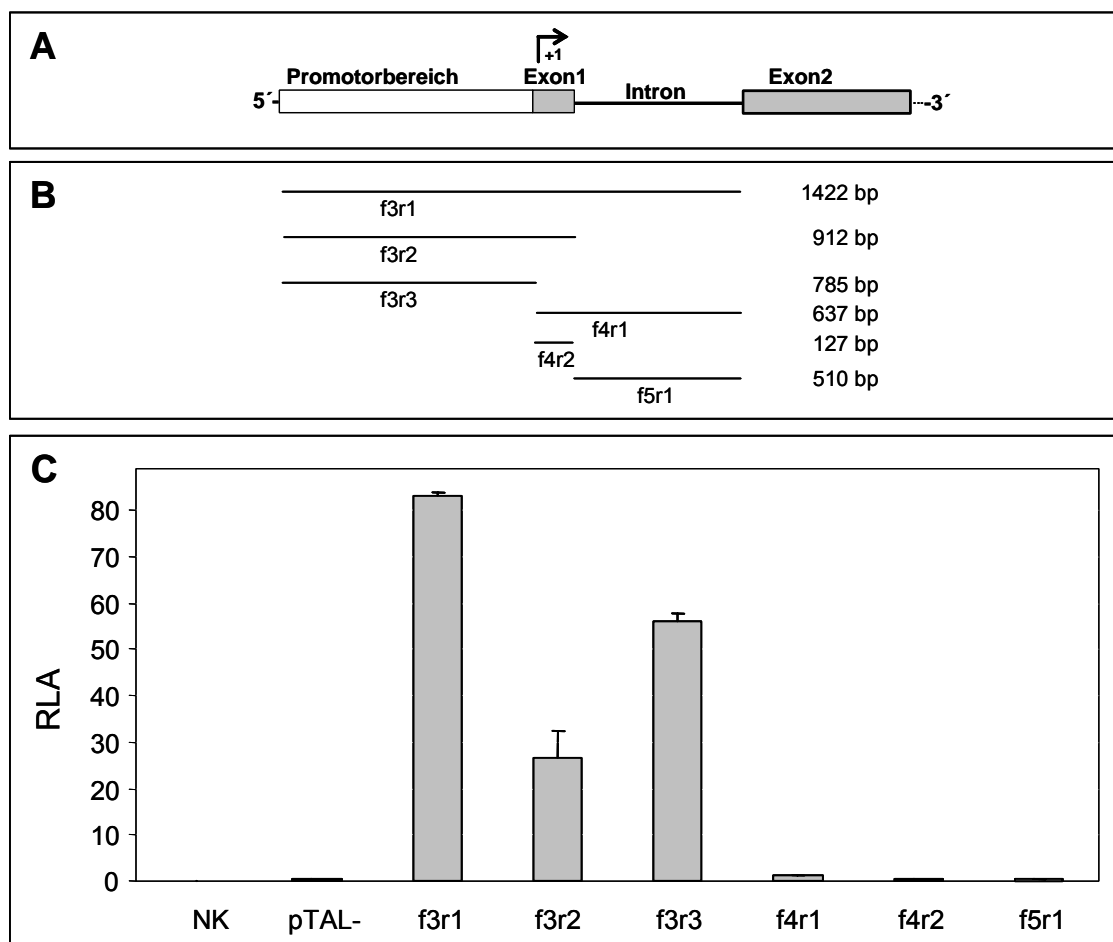


Abb. 6: Unterschiedliche transkriptionelle Aktivitäten der RNase 7-Promotor-konstrukte. A: Struktur des RNase 7-Gens, B: Schematischer Überblick über die verwendeten RNase 7-Promotorfragmente, C: Primäre Keratinozyten wurden mit unterschiedlich langen Fragmenten des RNase 7-Promotors (kloniert in ein Luziferase-Reporter-Plasmid) für 24 h transient transfiziert. Gezeigt ist die relative Luziferaseaktivität (RLA) der Promotorkonstrukte.

3.1.2.3 Es gibt drei verschiedene 3'-UTR-Varianten von RNase 7

In der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von RNase 7 gibt es mehrere Polyadenylierungs-Signale. An diese Sequenzen können Faktoren binden, die der DNA-abhängigen RNA-Polymerase das Ende der Transkription anzeigen und dafür sorgen, dass die prä-RNA durch die Polymerase polyadenyliert wird. In der RNase 7-Sequenz sind mehrere verschiedene Polyadenylierungs-Signale am 3'-Ende vorhanden, und somit können unterschiedlich lange Transkripte von derselben DNA erstellt werden. Durch 3'-RACE-Experimente konnten drei verschiedene 3'-UTR-Varianten von RNase 7 in primären Keratinozyten nachgewiesen werden (s. Abb. 7). Bei der Variante 2 (V_2) handelt es sich um die in primären Keratinozyten überwiegend gefundene und mit 763 bp längste Variante. Die Variante 0 (V_0) stellt

mit 276 bp die kürzeste Form der drei unterschiedlichen 3'-UTR-Varianten von RNase 7 dar. Bei dieser Variante ist das 5'-UTR-Intron herausgespleißt. Die Variante 1 (V_1) ist durch den Verlust von 193 bp gekennzeichnet und hat eine Länge von 442 bp (s. Abb. 7).

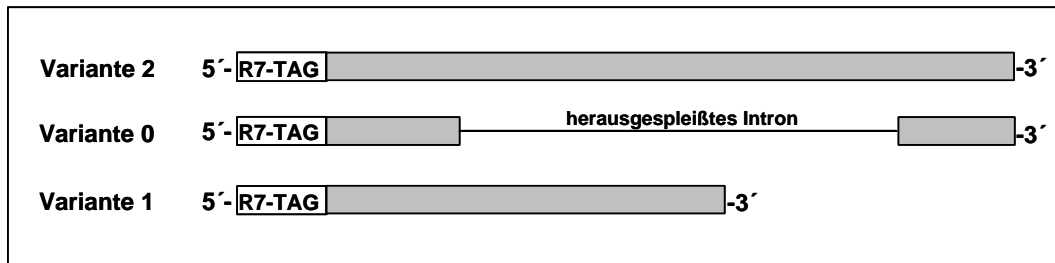


Abb. 7: Übersicht über die verschiedenen 3'-UTR-Varianten von RNase 7. Gezeigt ist eine schematische Darstellung der drei RNase 7-3'-UTR-Varianten, die durch 3'-RACE in primären Keratinozyten detektiert wurden. Die Länge der einzelnen Abschnitte verhält sich proportional zur Größe in bp.

Um zu prüfen, ob die unterschiedlichen 3'-UTR-Varianten von RNase 7 einen regulatorischen Einfluss haben, wurden die drei Fragmente (V_0 , V_1 und V_2 , s. Abb. 7) hinter den RNase 7-Promotor (f2r2) in den pGL3-basic-Vektor (Promega) kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte transient in primäre Keratinozyten transfiziert. Die Reporterogenaktivität wurde luminometrisch gemessen und ist als relative Luziferaseaktivität (RLA) angegeben. Die Variante V_2 zeigte dabei im Vergleich zu V_0 und V_1 eine erhöhte Luziferaseaktivität (s. Abb. 8).

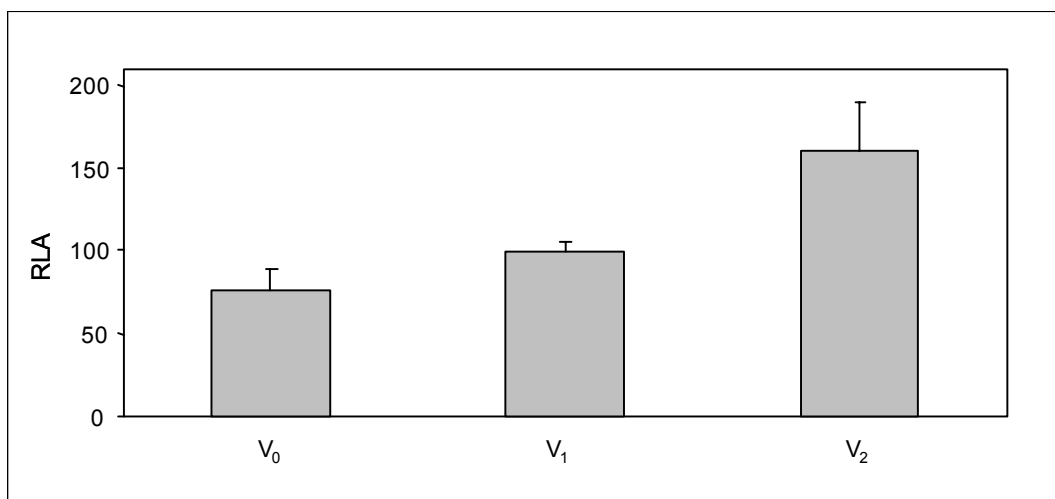


Abb. 8: Erhöhte Luziferaseaktivität der Variante V_2 nach Transfektion in primäre Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit den Vektoren pGL3 V_0 - V_2 für 24 h transfiziert. Anschließend wurde in einem Luziferase-Genreporterassay die Luziferaseaktivität in den lysierten Zellen gemessen. Die Reporterogenaktivität ist als relative Luziferaseaktivität (RLA) angegeben.

3.1.2.4 RNase 7 lässt sich induzieren

3.1.2.4.1 Induktion von RNase 7 durch Bakterienüberstände

Wie unter Punkt 3.1.2.1 aufgeführt, ist die RNase 7-Grundexpression in primären Keratinozyten zu anderen antimikrobiellen Proteinen vergleichsweise hoch. Um zu prüfen, ob die Expression von RNase 7 induzierbar ist, wurden primäre Keratinozyten für 16 h mit Überständen adhärent gewachsener Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staphylococcus aureus* (100 µl/ml) behandelt oder für 16 h mit dem Phorbol-Ester Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA, 40 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von RNase 7 mittels „real-time“-PCR analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die RNase 7 mRNA-Expression durch Stimulation der primären Keratinozyten mit den verwendeten Bakterienüberständen um das 40-50-fache steigern ließ (s. Abb. 9). Bei Behandlung der Zellen mit PMA war eine 100-fache Induktion detektierbar (s. Abb. 9).

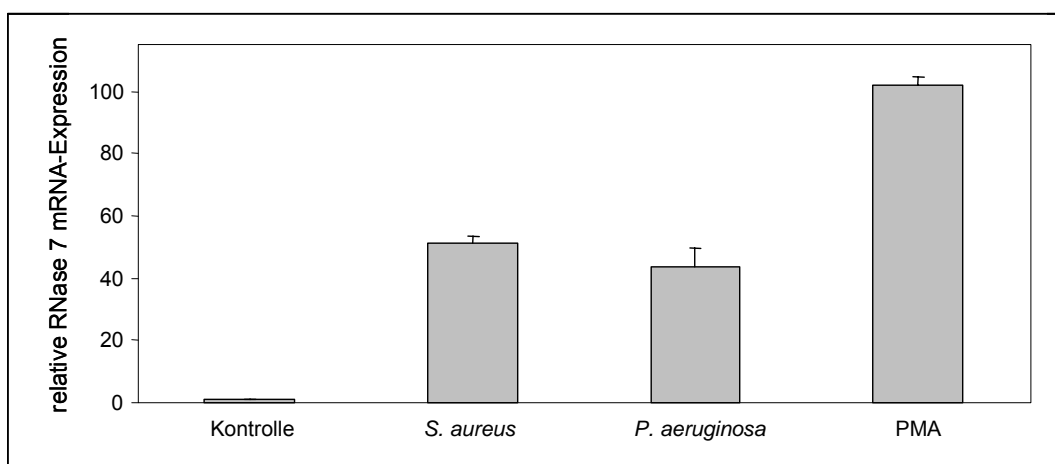


Abb. 9: RNase 7 mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 16 h mit Überständen adhärent gewachsener *Staphylococcus aureus*- bzw. *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen oder 40 ng/ml PMA behandelt. Mittels „real-time“-PCR-Analyse wurde die RNase 7 mRNA-Expression untersucht. Gezeigt ist die relative RNase 7 mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

In Versuchen mit primären Keratinozyten, die für 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen adhärent gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-Überständen versetzt wurden, war eine Abhängigkeit der RNase 7 mRNA-Expression von der Konzentration der Bakterienüberstände erkennbar (s. Abb. 10).

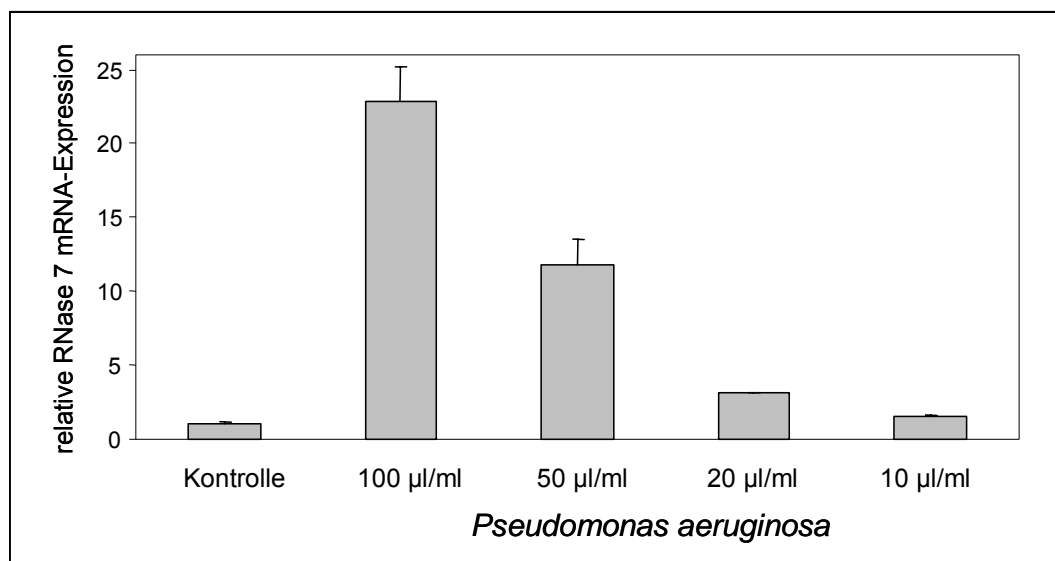


Abb. 10: Überstände von *Pseudomonas aeruginosa* induzieren die RNase 7 mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 16 h mit Überständen adhärent gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde die RNase 7 mRNA-Expression mittels „real-time“-PCR-Analyse untersucht. Gezeigt ist die relative RNase 7 mRNA-Expression im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Auch auf Proteinebene konnte mit Hilfe von Westernblot- und ELISA-Analysen gezeigt werden, dass die RNase 7 Proteinexpression in primären Keratinozyten durch Behandlung mit Überständen adhärenter Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert wird (s. Abb. 11 und 12).

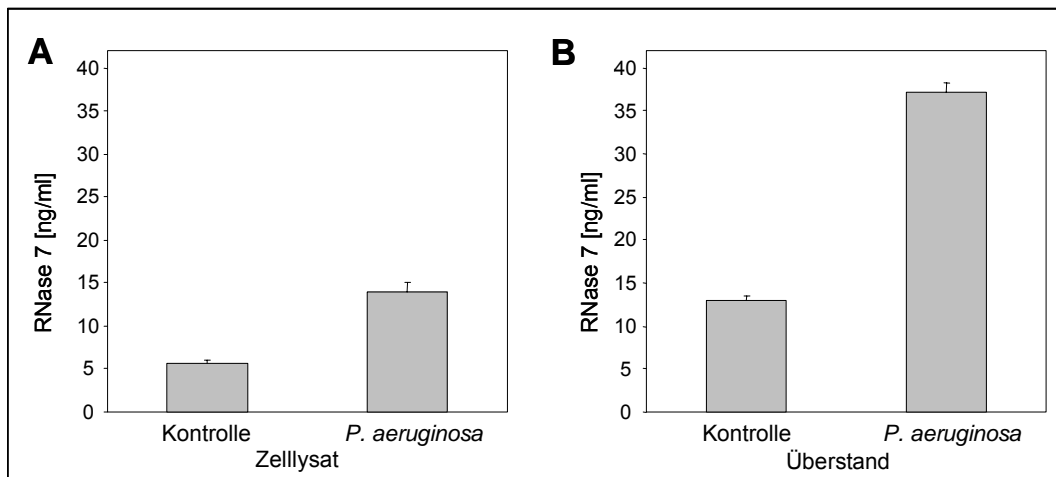


Abb. 11: Überstände von *Pseudomonas aeruginosa* induzieren die RNase 7 Proteinproduktion in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 16 h mit Überständen adhärent gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen behandelt. Die Zelllysate (A) sowie die Zellkulturüberstände (B) wurden anschließend mittels ELISA in Hinblick auf RNase 7 Proteinexpression analysiert.

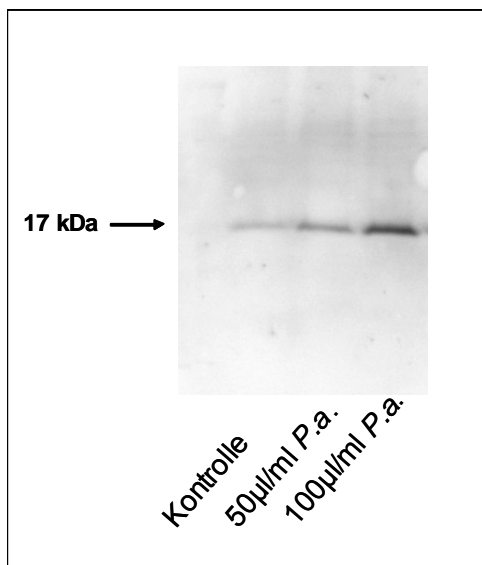


Abb. 12: Überstände von *Pseudomonas aeruginosa* induzieren die RNase 7 Proteinexpression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 16 h mit Überständen adhärent gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-(*P.a.*)-Kulturen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die RNase 7 Proteinexpression in den Zelllysaten wurde anschließend mittels Westernblot analysiert.

3.1.2.4.2 Induktion von RNase 7 durch PMA

Stimulationsexperimente zeigten, dass es durch Behandlung primärer Keratinozyten mit PMA zu einer 100-fachen Genexpression von RNase 7 kommt (3.1.2.4.1). Im Vergleich zu den getesteten Bakterienüberständen zeigte sich PMA dabei als der effektivere Stimulus für die Geninduktion von RNase 7 (s. Abb. 9). Um zu prüfen, ob auch die RNase 7 Proteinexpression durch PMA induzierbar ist, wurden primäre Keratinozyten für 6 h mit 40 ng/ml PMA behandelt. Anschließend wurden die Zelllysate mittels Westernblot und die Zellkulturüberstände mittels ELISA analysiert (s. Abb. 13 A und B). Dabei zeigte sich ein hoher Anstieg der RNase 7 Proteinexpression in den Zelllysaten der stimulierten primären Keratinozyten (Abb. 13 A). Auch in den Zellkulturüberständen konnte eine etwa 10-fach höhere RNase 7-Konzentration detektiert werden (Abb. 13 B).

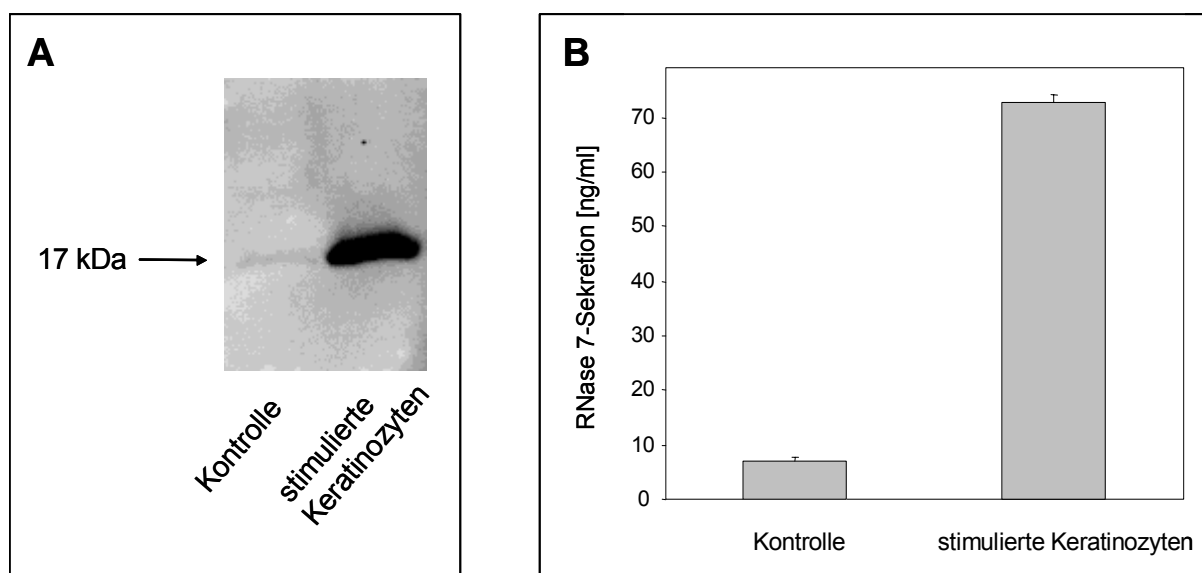


Abb. 13: PMA induziert die RNase 7 Proteinexpression in primären Keratinozyten. Primäre kultivierte Keratinozyten wurden für 6 h mit 40 ng/ml PMA stimuliert. Anschließend wurde die RNase 7 Proteinexpression in den Zelllysaten mittels Westernblot (A) sowie in den Zellkulturüberständen mittels ELISA (B) analysiert.

Um zu überprüfen, nach welcher Inkubationsdauer RNase 7 durch PMA induziert wird, wurde eine Zeitkinetik aufgenommen und primäre Keratinozyten über unterschiedlich lange Zeitspannen mit 40 ng/ml PMA inkubiert (s. Abb. 14).

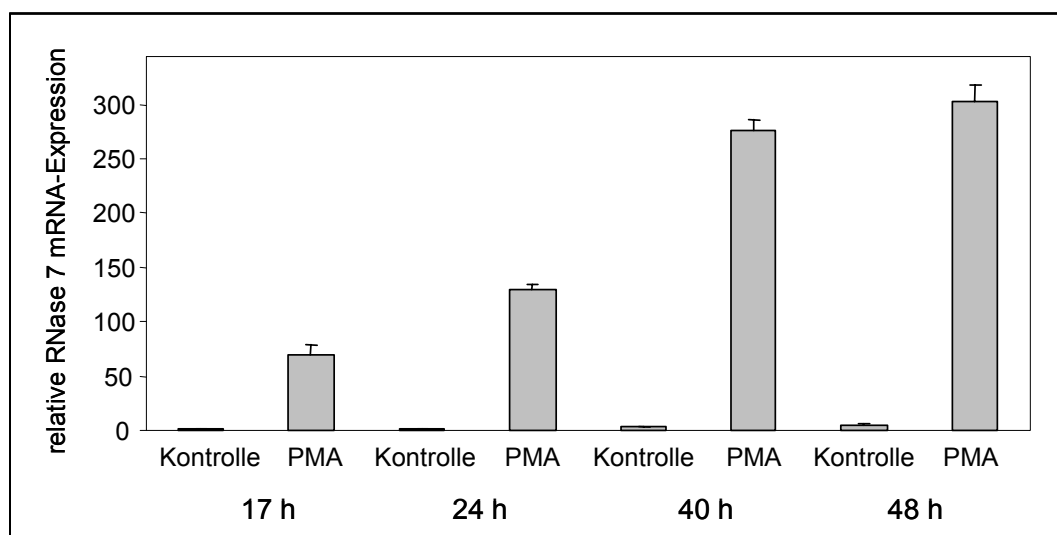


Abb. 14: Die PMA-vermittelte RNase 7-Induktion in primären Keratinozyten ist abhängig von der Inkubationsdauer. Primäre Keratinozyten wurden für 17, 24, 40, und 48 h mit je 40 ng/ml PMA inkubiert. Die RNase 7 mRNA-Expression wurde mittels „real-time“-PCR-Analyse bestimmt. Gezeigt ist die relative RNase 7 mRNA-Expression im Vergleich zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA-Expression.

Das Ergebnis zeigte, dass die RNase 7 mRNA-Expression nach einer 48-stündigen Inkubation 300-fach induziert wurde (s. Abb. 14).

Auch die Beta-Defensine sind insbesondere durch PMA stimulierbar (Harder et al., 2004). Interessanterweise wurde gezeigt, dass das Vitamin A-Derivat *all-trans*-Retinsäure diese Induktion bis zu 90 % inhibieren kann (Harder et al., 2004). Um zu prüfen, ob die durch PMA vermittelte RNase 7-Induktion auch durch *all-trans* Retinsäure inhibiert wird, wurden primäre Keratinozyten mit 10^{-7} M *all-trans* Retinsäure oder dem Vehikel DMSO für 16 h vorinkubiert und anschließend 6 h mit PMA (40 ng/ml) stimuliert. Das Ergebnis zeigte, dass sich die durch PMA vermittelte RNase 7 mRNA-Induktion durch Behandlung mit *all-trans* Retinsäure ebenfalls um 90 % inhibieren ließ (Abb. 15).

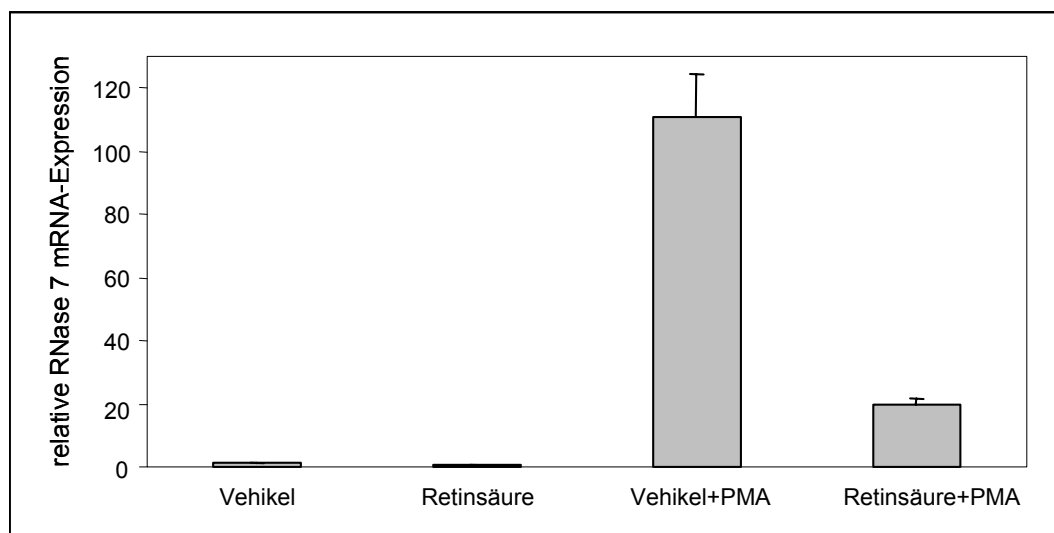


Abb. 15: RNase 7 mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre kultivierte Keratinozyten wurden für 16 h mit 10^{-7} M Retinsäure oder dem Vehikel DMSO vorinkubiert und anschließend 6 h mit PMA (40 ng/ml) stimuliert. Die RNase 7 mRNA-Expression wurde mittels „real-time“-PCR-Analyse untersucht. Gezeigt ist die relative RNase 7 mRNA-Expression im Vergleich zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA-Expression.

3.1.2.4.3 Induktion von RNase 7 durch Vektor-DNA

In Versuchen, in denen die verschiedenen Promotorfragmente (s. 3.1.2.2) von RNase 7 in primäre und in HaCaT-Keratinozyten transfiziert und die Zellen anschließend stimuliert wurden, zeigte sich in den Luziferase-Experimenten, dass nahezu keine Stimulation detektierbar war (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde die mRNA der transfizierten und stimulierten Zellen isoliert, revers transkribiert und die cDNA mittels „real-time“-PCR-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Vektoren allein schon RNase 7 induzieren (Abb. 16). So wurde RNase 7 durch die Transfektion von primären Keratinozyten mit pTAL-Leervektor auf mRNA-Ebene ca. 25-fach induziert (Abb. 16). Das Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Mannheim) ist für diese Induktion der RNase 7 mRNA-Expression durch Transfektion mit pTAL-Leervektor essentiell. Das Transfektionsreagenz bildet einen Komplex mit der Vektor-DNA und transportiert diese in die Zellen, ohne Transfektionsreagenz wird die RNase 7 mRNA-Expression nicht induziert (s. Abb. 16).

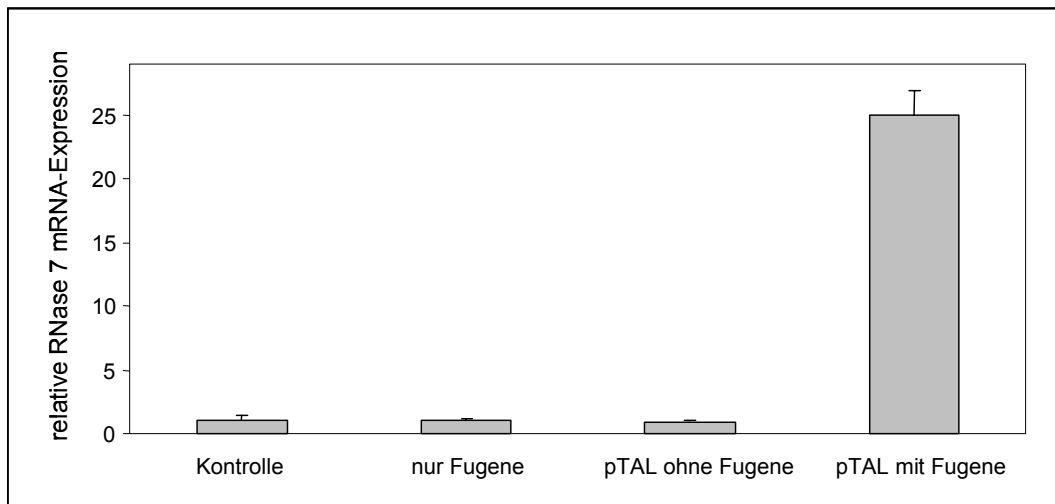


Abb. 16: Induzierbare mRNA-Expression von RNase 7 in HaCaT-Keratinocyten. Dargestellt ist eine „real-time“-PCR-Analyse der RNase 7 mRNA-Expression in HaCaT-Keratinocyten, die für 24 h mit dem Leervektor pTAL mit und ohne Fugene transfiziert wurden. Gezeigt ist die relative RNase 7 mRNA-Expression im Vergleich zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA-Expression.

In weiteren Experimenten führte eine Transfektion von HaCaT-Keratinocyten mit dem Leervektor pTAL zu einer 14-fachen Induktion der RNase 7 mRNA-Expression. Diese Induktion wurde durch Behandlung der transfizierten Zellen mit Überständen adhärenz gewachsener *S. aureus*-Kulturen 57-fach gesteigert, in Relation entspricht dies nur noch einer etwa 4-fachen RNase 7 mRNA Induktion (s. Abb. 17).

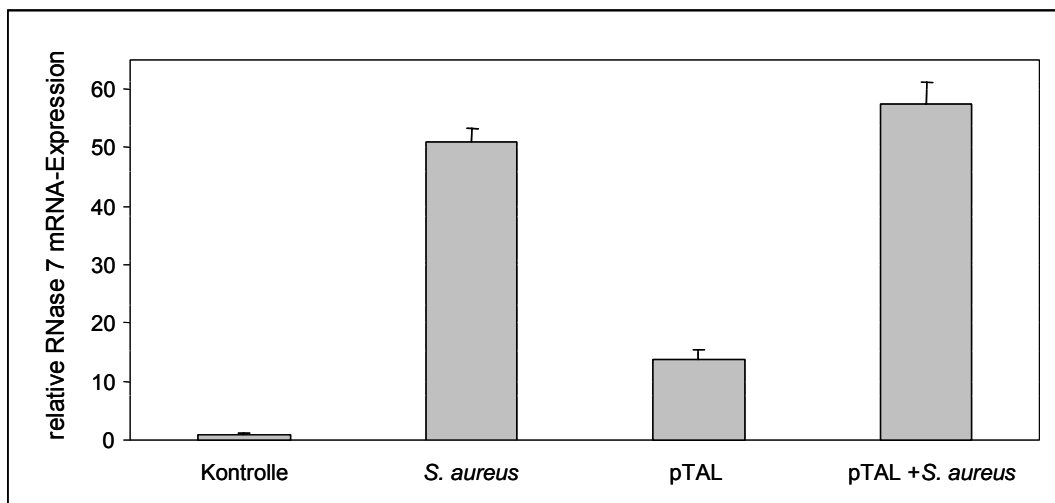


Abb. 17: Induzierbare mRNA-Expression von RNase 7 in HaCaT-Keratinocyten. Gezeigt ist eine „real-time“-PCR-Analyse der RNase 7 mRNA-Expression in HaCaT-Keratinocyten, die für 24 h mit dem Leervektor pTAL transfiziert wurden und anschließend für 6 h mit Überständen adhärenz gewachsener *S. aureus*-Kulturen (ATCC 6538) stimuliert wurden. Dargestellt ist die relative RNase 7 mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

3.1.2.5 Die RNase 7 Expression ist inhibierbar

Unter Punkt 3.1.2.4.1 wurde gezeigt, dass Überstände des adhärent gewachsenen *S. aureus*-Stamms ATCC 6538 die RNase 7 mRNA- und Proteinexpression induzieren. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass Überstände des adhärent gewachsenen *S. aureus*-Stamms ATCC 12598 die mRNA- und Proteinexpression von RNase 7 inhibieren. Überstände dieses *S. aureus*-Stamms zeigten eine konzentrationsabhängige Repression von RNase 7 auf mRNA-Ebene (s. Abb. 18). Stimulationen primärer Keratinozyten mit Überständen dieses Stamms verringerten ebenfalls die RNase 7 Proteinexpression, wie in Westernblot-Analysen gezeigt werden konnte (Abb. 19).

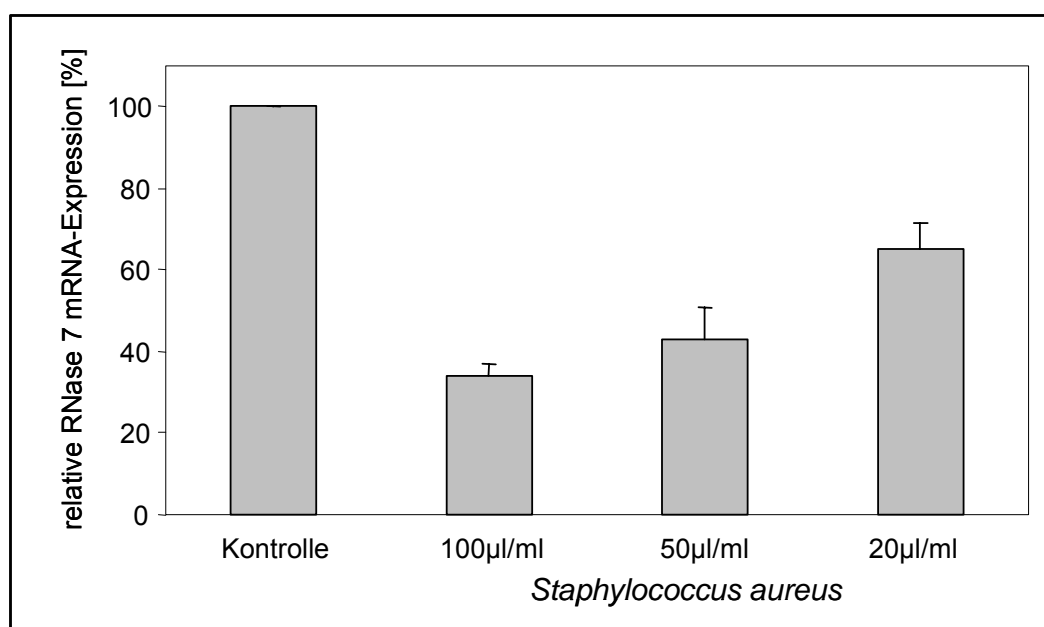


Abb. 18: Überstände von *Staphylococcus aureus* inhibieren die RNase 7 mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 6 h mit Überständen adhärent gewachsener *Staphylococcus aureus*-Kulturen (ATCC 12598) in den angegebenen Konzentrationen versetzt. Anschließend wurde die RNase 7 mRNA-Expression mittels „real-time“-PCR-Analyse quantifiziert. Gezeigt ist die relative RNase 7 mRNA-Expression im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Als Kontrolle wurde Kulturmedium ohne Bakterien verwendet.

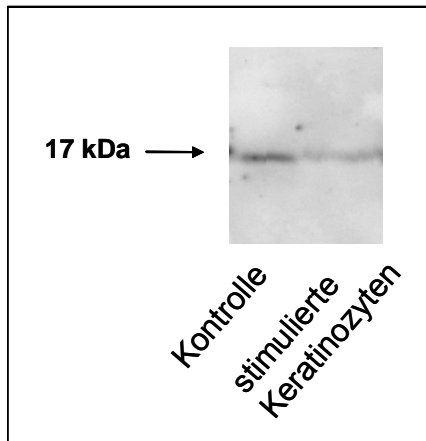


Abb. 19: Überstände von *Staphylococcus aureus* inhibieren die RNase 7 Proteinexpression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 6 h mit 100 μ l/ml *S. aureus*-Kulturüberstand (ATCC 12598) versetzt. Die RNase 7 Proteinproduktion in den Zellen wurde mittels Westernblot-Analyse untersucht. Als Kontrolle wurde Kulturmedium ohne Bakterien verwendet.

3.1.3 RNase 7 wird gewebespezifisch exprimiert

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase-(RT)-PCR und Intron-überspannenden Primern sollte untersucht werden, in welchen Geweben die mRNA für RNase 7 exprimiert wird. Eine hohe Expression der RNase 7 mRNA wurde in der Haut und primären Keratinozyten detektiert (Abb. 20). Des Weiteren ließ sich eine RNase 7 mRNA-Expression in Speicheldrüse, Trachea und Thymus nachweisen. Abb. 20 gibt einen Überblick über die RNase 7 mRNA-Expression in verschiedenen Geweben.

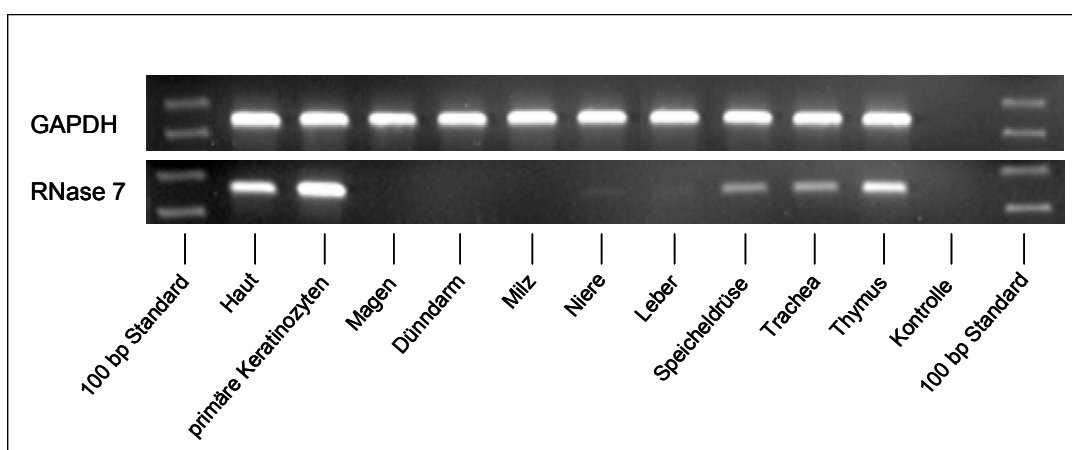


Abb. 20: RNase 7 mRNA-Expression in verschiedenen humanen Geweben. Die RNA von verschiedenen Geweben wurde revers transkribiert und in einer RT-PCR-Analyse hinsichtlich RNase 7 mRNA Expression untersucht. Gezeigt sind die spezifischen PCR-Amplifikate von RNase 7 (235 bp) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 360 bp). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA.

Da diese Ergebnisse zeigen, dass RNase 7 insbesondere in der Haut exprimiert wird, wurde im Folgenden die *in vivo*-Expression von RNase 7 in humaner Haut mittels immunhistochemischer Färbung und ELISA-Analysen untersucht.

3.1.4 *In vivo*-Expression von RNase 7

3.1.4.1 Etablierung der immunhistochemischen Färbung von RNase 7

Um zu untersuchen, in welchen Zellschichten humaner Haut RNase 7 exprimiert wird, wurden immunhistochemische Färbungen von RNase 7 an Paraffin-Hautpräparaten gesunder Probanden mit den generierten, affinitätsgereinigten RNase 7-Antikörpern (s. 3.1.1) durchgeführt. In Gewebeschnitten von gesunder Haut konnte RNase 7 Expression mit Hilfe der RNase 7-Antikörper nachgewiesen werden, wohingegen Kontrollfärbungen mit Präserum zu keiner spezifischen Färbung führten (s. Abb. 21). Durch die immunhistochemische Analyse von Hautbiopsien von hautgesunden Probanden sowie Probanden mit Psoriasis sollte untersucht werden, ob und in welchen Bereichen RNase 7 in der Haut exprimiert wird. Sowohl in gesunder Haut als auch in läsionaler Haut der Psoriasis-Probanden konnte eine hohe RNase 7 Expression nachgewiesen werden. RNase 7-Immunreaktivität wurde vor allem in der Epidermis, insbesondere in den äußeren Schichten, dem *Stratum corneum* und dem *Stratum granulosum* detektiert (s. Abb. 22).

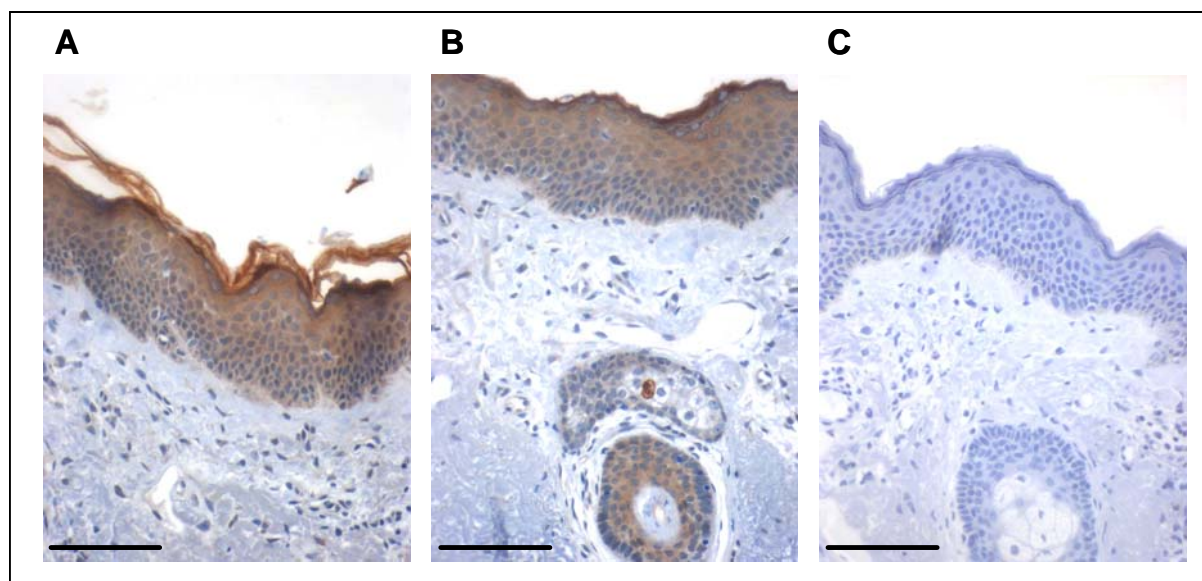


Abb. 21: Immunreaktivität von RNase 7 in gesunder Haut. Gezeigt ist eine immunhistochemische Färbung von Hautschnitten mit affinitätsgereinigten RNase 7-Antikörpern. A und B: Behandlung eines Paraffin-Schnittes von gesunder Haut mit RNase 7-Antikörper, C: Behandlung eines Paraffin-Schnittes mit Präserum. Der RNase 7-Antikörper zeigt eine starke Färbung in gesunder Haut, mit dem Präserum als Kontrolle ist keine spezifische Färbung erkennbar. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 μm .

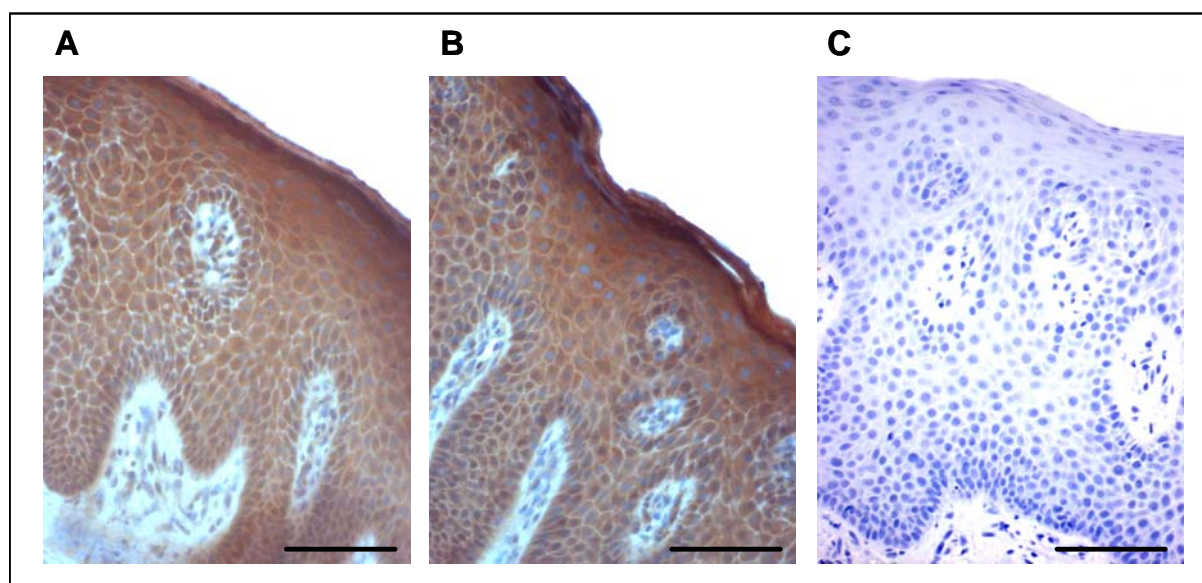


Abb. 22: Immunreaktivität von RNase 7 in läSIONALER Psoriasis-Haut. Gezeigt ist eine immunhistochemische Färbung von Hautschnitten mit affinitätsgereinigten RNase 7-Antikörpern. A und B: Behandlung eines Paraffin-Schnittes von läSIONALER Psoriasis-Haut mit RNase 7-Antikörper, C: Behandlung eines Paraffin-Schnittes mit Präserum. Der RNase 7-Antikörper zeigt eine starke Färbung in läSIONALER Psoriasis-Haut, mit dem Präserum als Kontrolle ist keine spezifische Färbung erkennbar. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 μm .

3.1.4.2 Sezernierung von RNase 7 auf der menschlichen Haut

Mit Hilfe des etablierten RNase 7-ELISAs (3.1.1.1) wurde die RNase 7-Sezernierung auf der menschlichen Haut untersucht. Dazu wurden auf verschiedenen Hautregionen hautgesunder Probanden Waschungen durchgeführt und die Menge an freigesetzter RNase 7 quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass sowohl die RNase 7-Sekretion innerhalb der untersuchten Körperregionen eines Probanden als auch die Sekretion verschiedener Probanden schwankte. Abb. 23 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Hautwaschung eines Probanden.

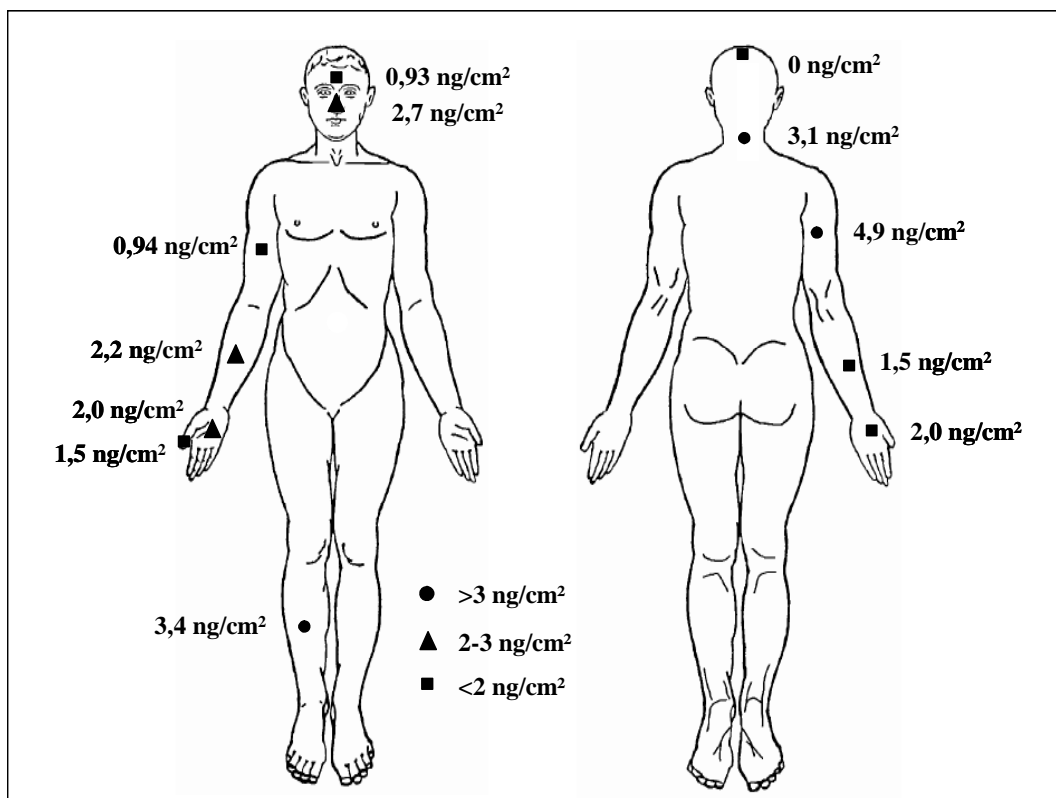


Abb. 23: In vivo-Sekretion von RNase 7 an der Hautoberfläche. Standardisierte Areale der Hautoberfläche an verschiedenen Körperlokalisationen wurden mit Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) + 1 % BSA gespült. Die Konzentrationen an RNase 7 in der Spülflüssigkeit wurden mit einem RNase 7-ELISA bestimmt. Gezeigt ist exemplarisch der Mittelwert der jeweiligen Region eines Probanden.

Neben Hautarealen hautgesunder Probanden wurden auch läSIONALE und nichtläSIONALE Hautareale am Unterarm von Patienten mit Psoriasis in Hinblick auf RNase 7-Sekretion untersucht. Hierbei zeigte sich eine erhöhte RNase 7 Expression in Hautwaschungsflüssigkeiten psoriatischer Probanden (s. Abb. 24).

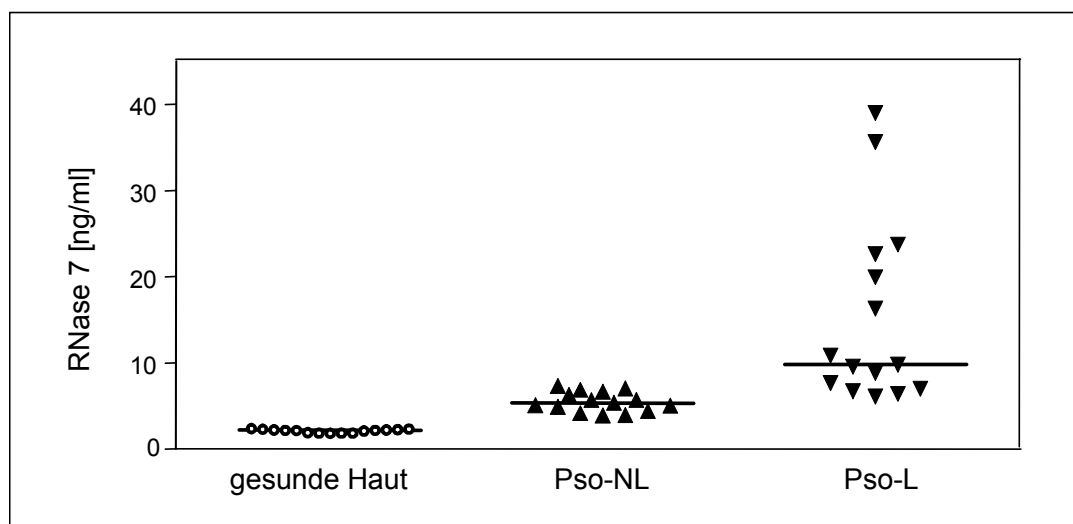


Abb. 24: Die RNase 7 Proteinexpression ist in psoriatischer Haut erhöht. Hautwaschungsflüssigkeiten von Unterarmen 15 hautgesunder sowie von 15 Psoriasis-Patienten wurden mit Hilfe eines RNase 7-spezifischen ELISAs untersucht. Pso-NL = nicht läSIONALE *Psoriasis vulgaris*-Haut, Pso-L = läSIONALE *Psoriasis vulgaris*-Haut. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Probe, der Median des Kollektivs ist als Balken dargestellt.

Vergleichbare Ergebnisse lieferten „real-time“-PCR-Experimente: Bei einer Untersuchung von RNA aus Hautbiopsien hautgesunder Probanden sowie von Psoriasis-Patienten konnte festgestellt werden, dass die RNase 7 mRNA-Expression in Haut von Psoriasis-Patienten im Vergleich zur Haut gesunder Probanden erhöht ist (s. Abb. 25).

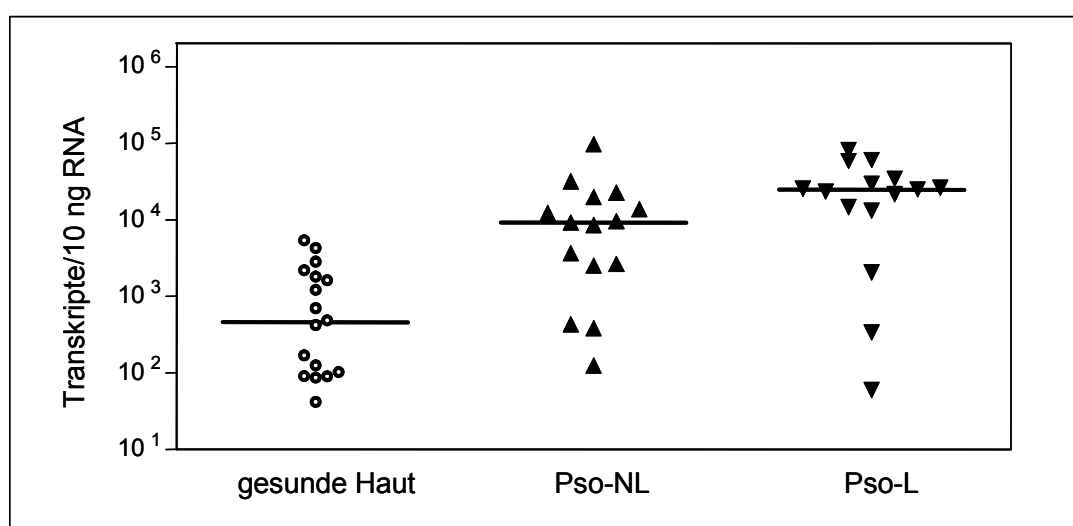


Abb. 25: Die RNase 7 mRNA-Expression ist in psoriatischer Haut erhöht. Dargestellt sind die RNase 7-Transkripte, die pro 10 ng RNA aus gesunder Haut von 17 Probanden und aus Haut von 15 Psoriasis-Patienten in „real-time“-PCR-Experimenten nachgewiesen wurden. Pso-NL = nicht läSIONALE *Psoriasis vulgaris*-Haut, Pso-L = läSIONALE *Psoriasis vulgaris*-Haut. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Probe, der Median des Kollektivs ist als Balken dargestellt.

3.1.5 Funktionelle Charakterisierung von RNase 7

Um RNase 7 näher zu charakterisieren und Mutationsstudien durchzuführen, wurde das Protein rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert.

3.1.5.1 Rekombinante Expression von RNase 7

Zunächst wurde das RNase 7-Gen für die Klonierung mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Mit spezifischen Primern konnte ein 387 bp großes Fragment amplifiziert werden (nicht gezeigt), welches der Länge des zu erwarteten Produktes entspricht. Das PCR-Produkt und der Vektor pET-32a wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert und in *E. coli* TOP10 transformiert. Der Einbau des Gens in den Vektor wurde durch eine Kolonie-PCR überprüft. Durch Sequenzierung des Vektors mit inseriertem PCR-Produkt wurden die korrekte Orientierung und die Fehlerfreiheit der Sequenz des entsprechenden Gens überprüft. Der Vektor wurde mit R7pET32a bezeichnet.

Zur Expression wurde der Vektor in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformiert. Nach Expression, Ernte und Aufschluss der Zellen war auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel eine ausgeprägte Überexpression eines ca. 32 kDa großen Proteins erkennbar (Abb. 27). Dieses Molekulargewicht entspricht der Proteingröße des Fusionsprotein RNase 7 mit „His-Tag“. Versuche zur Optimierung der Expressionsbedingungen ergaben die höchste Proteinausbeute nach dreistündiger Expression bei 37 °C mit Zellen, die bei einer OD_{620} von 0,8 mit IPTG induziert wurden. Das RNase 7-Fusionsprotein konnte in löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden und wurde nach Aufschluss der Bakterien über eine Nickel-Affinitätssäule und C8-Umkehrphasen-HPLC weiter aufgereinigt. Der N-terminale „His-Tag“ konnte anschließend über Behandlung des Fusionsproteins mit Enterokinase abgespalten werden. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt über C4-Umkehrphasen-HPLC eluierte die aufgereinigte RNase 7 bei ca. 60 % Acetonitril; die über massenspektrometrische Analyse bestimmte Masse betrug 14545 kDa (s. Abb. 26). Die molekulare Masse liegt somit 8 Dalton unter der theoretisch errechneten Masse. Dies erklärt sich dadurch, dass RNase 7 acht Cysteine besitzt, die über vier Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind.

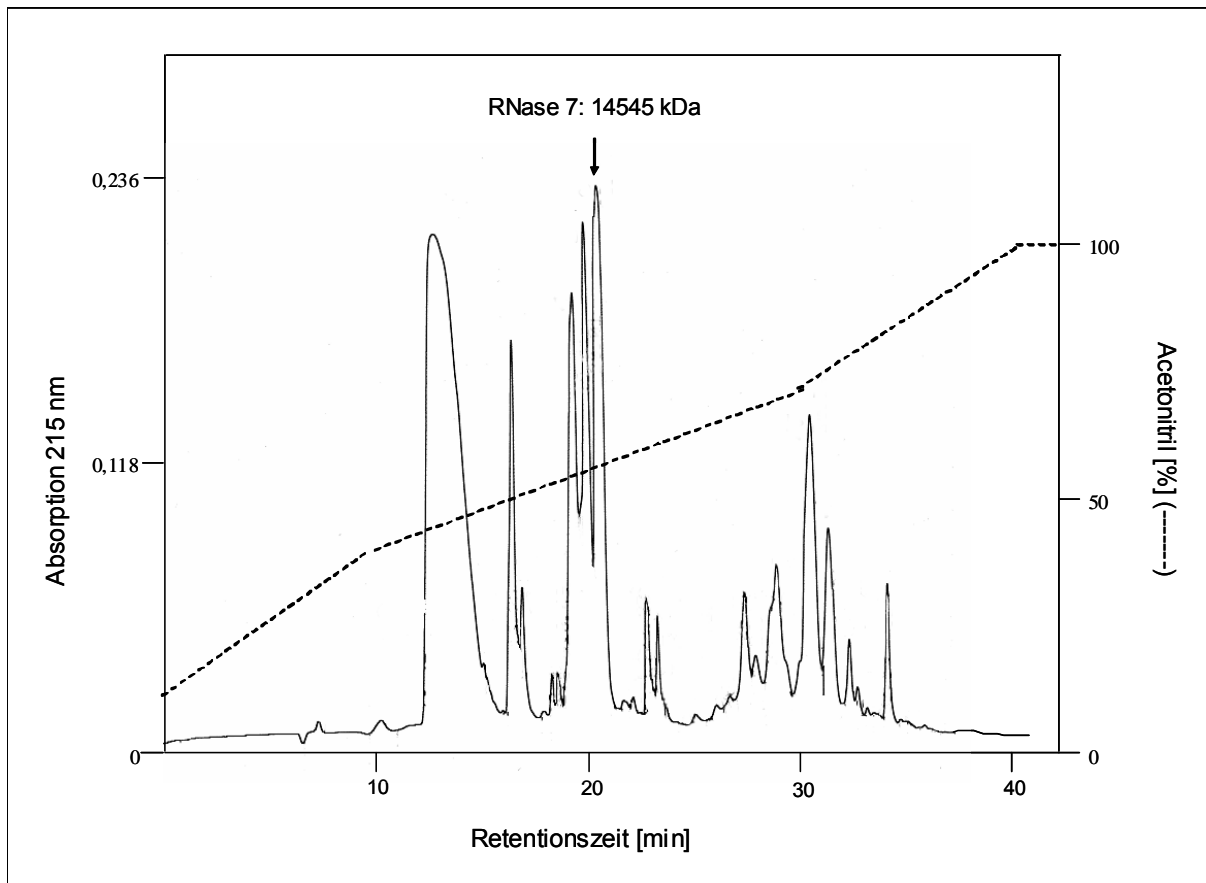


Abb. 26: Aufreinigung von rekombinanter RNase 7 über C4-Umkehrphasen-HPLC nach proteolytischer Abspaltung des „His-Tags“. Dargestellt sind die kontinuierlich gemessene Absorption bei 215 nm und der Acetonitrilgehalt des Eluats (gestrichelte Linie).

SDS-PAGE-Analysen zeigten, dass die aufgereinigte rekombinante RNase 7 die gleiche elektrophoretische Mobilität wie native RNase 7 besitzt und bei ca. 17 kDa läuft (Abb. 27). Die Diskrepanz von erwarteter Proteingröße der RNase 7 (14,5 kDa) zu der tatsächlich auftretenden Größe in der SDS-PAGE (ca. 17 kDa) wurde bereits beschrieben (Harder und Schröder, 2002).

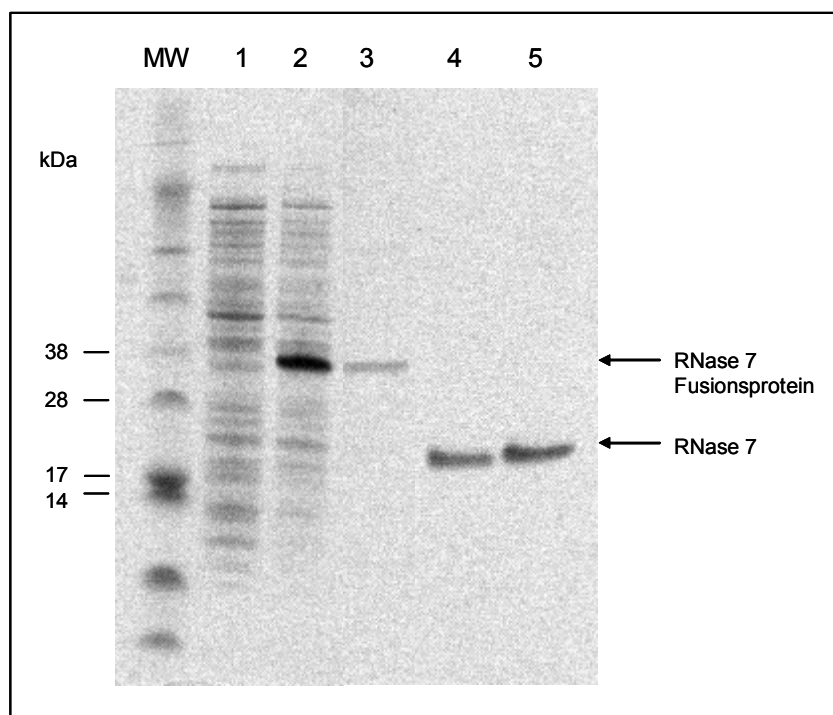


Abb. 27: Coomassie Blue-gefärbte SDS-PAGE der rekombinanten Expression und Aufreinigung von RNase 7. MW: Molekulargewichtsstandard, Spur 1: gesamte Zellproteine vor Induktion, Spur 2: gesamte Zellproteine 3 h nach Induktion, Spur 3: rekombinante RNase 7 als Fusionsprotein, Spur 4: rekombinante RNase 7 nach Enterokinase-Proteolyse und Aufreinigung, Spur 5: native RNase 7.

Durch die rekombinante Expression von RNase 7 in *E. coli* konnten aus 200 ml *E. coli*-Kultur ca. 250 µg rekombinante RNase 7 aufgereinigt werden. Auf gleiche Weise wurden die RNase 7-Einfachmutante sowie die RNase 7-Doppelmutante hergestellt (siehe 1.3.1.3).

3.1.5.2 Ribonuklease-Aktivität von RNase 7

Um zu prüfen, ob rekombinante RNase 7 die gleiche Ribonuklease-Aktivität wie native RNase 7 aufweist, wurde Hefe-tRNA mit gleichen Mengen rekombinanter bzw. nativer RNase 7 versetzt und für verschiedene Zeiträume inkubiert. Anschließend wurde die nicht hydrolysierte RNA gefällt und die säurelöslichen Oligonukleotide durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Rekombinante und native RNase 7 zeigten gleiche Ribonuklease-Aktivitäten; nach 30 min war die Hefe-tRNA nahezu vollständig hydrolysiert (Abb. 28).

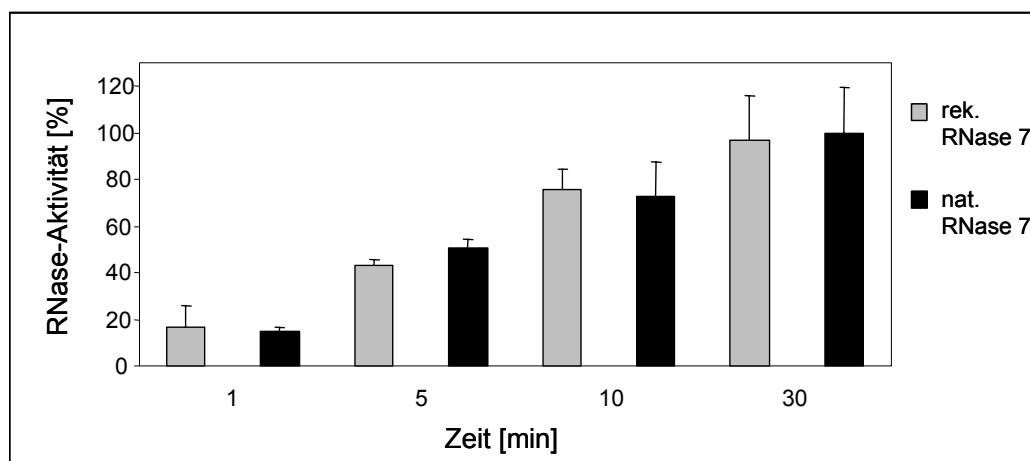


Abb. 28: Rekombinante und native RNase 7 zeigen vergleichbare Ribonuklease-Aktivitäten. 5 µg Hefe-tRNA wurden für die angegebenen Zeiten bei 37 °C mit jeweils 1 µg rekombinanter (rek.) bzw. nativer (nat.) RNase 7 inkubiert. Nach Fällung und Abtrennung der hochmolekularen RNA wurden die durch Ribonuklease-Aktivität gebildeten Oligonukleotide photometrisch bestimmt.

3.1.5.3 Antimikrobielle Aktivität von RNase 7

3.1.5.3.1 RNase 7 besitzt ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität

Die antimikrobielle Aktivität von rekombinanter RNase 7 wurde mit der antimikrobiellen Aktivität von nativer, aus Psoriasissschuppen aufgereinigter RNase 7 verglichen. Es zeigte sich, dass rekombinante RNase 7 *E. coli* mit einer LD₉₀ (letale Dosis von 90 %) zwischen 0,39-0,78 µg/ml effizient abtötete. Dies entspricht der Aktivität von natürlicher RNase 7. Die LD₉₀ gibt den Konzentrationsbereich der jeweiligen antimikrobiellen Substanz an, bei dem es zu einer 90 %igen Reduktion der eingesetzten koloniebildenden Einheiten (KBE) nach dreistündiger Inkubation mit dieser antimikrobiellen Substanz kommt. Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, funktionell aktive RNase 7 in rekombinanter Form in *E. coli* zu produzieren.

Um die antimikrobiellen Eigenschaften von RNase 7 genauer zu charakterisieren, wurde dieses Protein in verschiedenen Konzentrationen in einem Flüssigkulturtest (s. Material und Methoden, 2.7) hinsichtlich antimikrobieller Aktivität untersucht. Aus Tab. 6 wird ersichtlich, dass RNase 7 nicht nur gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien potente antimikrobielle Aktivität aufweist, sondern auch in niedrigen Konzentrationen die Hefe *Candida albicans* abtötet. Selbst pathogene Bakterien wie Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* und MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*) werden durch RNase 7 mit einer LD₉₀ im nanomolaren Bereich effizient abgetötet (s. Tab. 6). Diese Ergebnisse

zeigen, dass RNase 7 potente antimikrobielle Aktivität mit einem weiten Wirkspektrum aufweist.

| Gram-positive Stämme | LD ₉₀ [µM] | Gram-positive Stämme | LD ₉₀ [µM] |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|
| <i>St. aureus</i> ATCC 12600 | 0,110 | <i>Ec. faecium</i> W 354 (VRE) | 0,014 |
| <i>St. aureus</i> ATCC 33593 (MRSA) | 0,054 | <i>Ec. faecium</i> W 356 (VRE) | 0,014 |
| <i>St. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA) | 0,027 | Gram-negative Stämme | LD ₉₀ [µM] |
| <i>St. aureus</i> 355 (MRSA) | 0,054 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 0,027 |
| <i>St. aureus</i> 358 (MRSA) | 0,054 | <i>E. coli</i> ATCC 35218 | 0,054 |
| <i>Ec. faecalis</i> ATCC 51299 (VRE) | 0,007 | <i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 13883 | 0,108 |
| <i>Ec. faecalis</i> PEG 205 | 0,014 | <i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 10145 | 0,108 |
| <i>Ec. faecalis</i> PEG 212 | 0,007 | <i>Ac. baumannii</i> ATCC 19606 | 0,007 |
| <i>Ec. faecium</i> DSM 2146 | 0,007 | Pilze | LD ₉₀ [µM] |
| <i>Ec. faecium</i> Ulm 68 (VRE) | 0,014 | <i>C. albicans</i> ATCC 24433 | 0,027 |

Tab. 6: RNase 7 besitzt ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität. Die aufgeführten Mikroorganismen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an RNase 7 in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) durch Ausplattieren auf Agar-Nährmediumplatten und Inkubation bei 37 °C bestimmt. Gezeigt ist die LD₉₀. MRSA = Methicilin-resistente *Staphylococcus aureus*, VRE = Vancomycin-resistent, PEG = Paul-Ehrlich-Gesellschaft.

3.1.5.3.2 Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 ist nicht salzempfindlich

Wie die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1.5.3 zeigen, besitzt RNase 7 potente antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* sowie gegen Gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus*. Verschiedene antimikrobielle Proteine werden durch die Anwesenheit von NaCl gehemmt (Tam et al., 2002). Um die biologische Relevanz der antimikrobiellen Aktivität von RNase 7 unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde im Flüssigkulturtest der Einfluss verschiedener Salz-Konzentrationen auf die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 analysiert. Hierfür wurden *E. coli* (8×10^3 /ml) und *S. aureus* (2×10^4 /ml) mit RNase 7 (50 µg/ml) unter ansteigenden NaCl-Konzentrationen inkubiert. Wie Abb. 29 zeigt, wurde die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 gegen *E. coli* sowie gegen *S. aureus* durch NaCl nicht inhibiert.

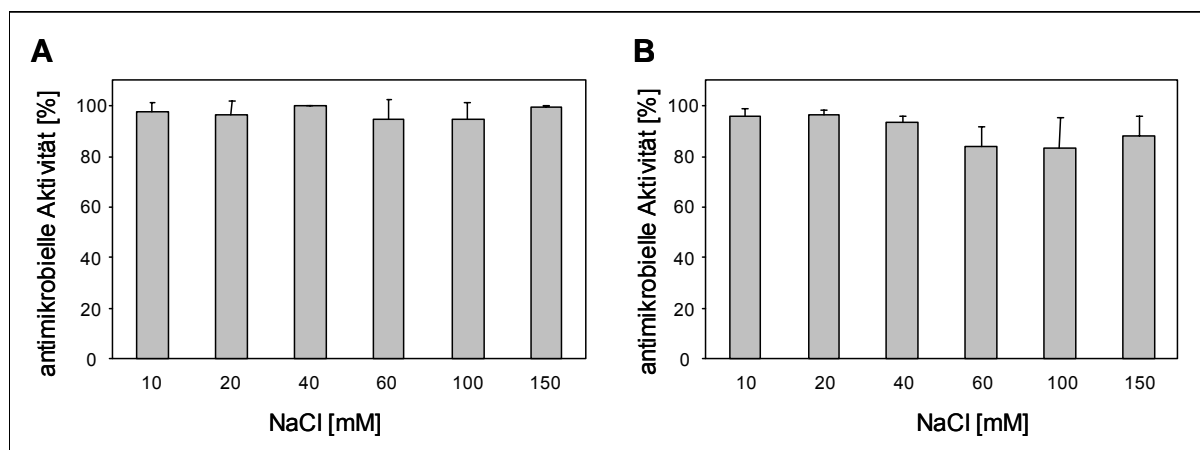


Abb. 29: Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 gegen *E. coli* und *S. aureus* wird durch erhöhte NaCl-Konzentrationen nicht inhibiert. RNase 7 (50 µg/ml) wurde bei 37 °C für 3 h mit 8×10^3 /ml KBE von *E. coli* (A) bzw. 2×10^4 /ml KBE von *S. aureus* (B) in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) und den angegebenen NaCl-Konzentrationen inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 wurde durch Ausplattieren der jeweiligen Ansätze auf TSB-Platten, Inkubation über Nacht bei 37 °C und Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt.

3.1.5.3.3 Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 ist nicht pH-abhängig

In weiteren Untersuchungen wurde überprüft, inwieweit die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 vom pH-Wert abhängig ist. Dafür wurden *Escherichia coli* ($3,2 \times 10^4$ /ml) und *Staphylococcus aureus* (4×10^4 /ml) mit RNase 7 (50 µg/ml) in Natriumphosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Wie Abb. 30 zeigt, wurde die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 unter verschiedenen pH-Bedingungen weder gegen *E. coli*, noch gegen *S. aureus* inhibiert.

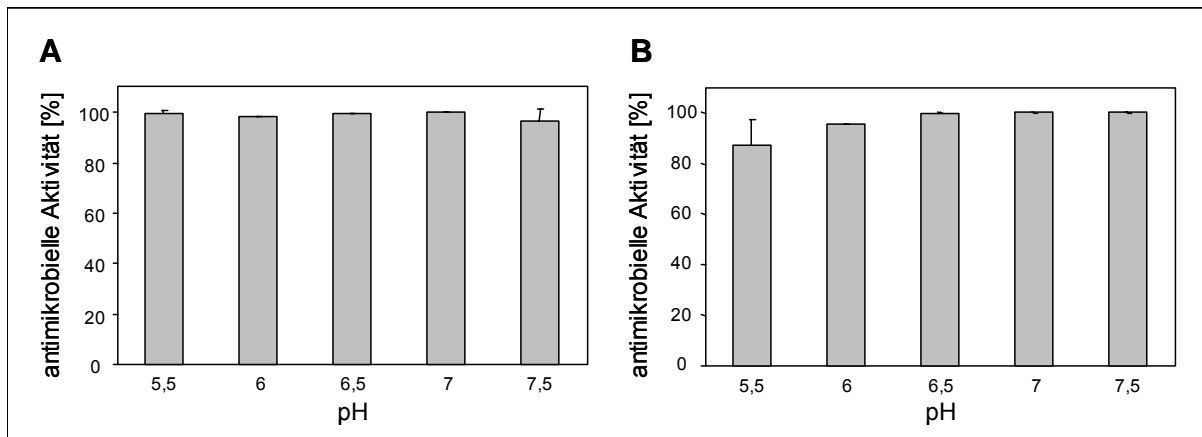


Abb. 30: Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 wird durch unterschiedliche pH-Werte nicht inhibiert. RNase 7 (50 µg/ml) wurde bei 37 °C für 3 h mit $3,2 \times 10^4$ /ml koloniebildenden Einheiten (KBE) von *E. coli* (A) bzw. 4×10^4 /ml KBE von *S. aureus* (B) in Natriumphosphat-Puffer mit den angegebenen pH-Werten inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 wurde durch Ausplattieren der jeweiligen Ansätze auf TSB-Platten, Inkubation über Nacht bei 37 °C und Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt.

3.1.5.3.4 Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 ist nicht von der Ribonuklease-Aktivität abhängig

Um zu prüfen, ob die Ribonuklease-Aktivität von RNase 7 für die antimikrobielle Aktivität des Proteins nötig ist, wurde zunächst eine Aminosäure im reaktiven Zentrum von RNase 7 mutiert. Die Mutation der Aminosäure Histidin¹²³ in Asparaginsäure (= einfach mutierte RNase 7) führte zu einer um 60 % verringerten Ribonuklease-Aktivität (s. Abb. 31). Erst durch Mutation einer zusätzlichen Aminosäure (Lysin³⁸ in Arginin) im reaktiven Zentrum von RNase 7 (= zweifach mutierte RNase 7) konnte die Ribonuklease-Aktivität vollständig inaktiviert werden (s. Abb. 31).

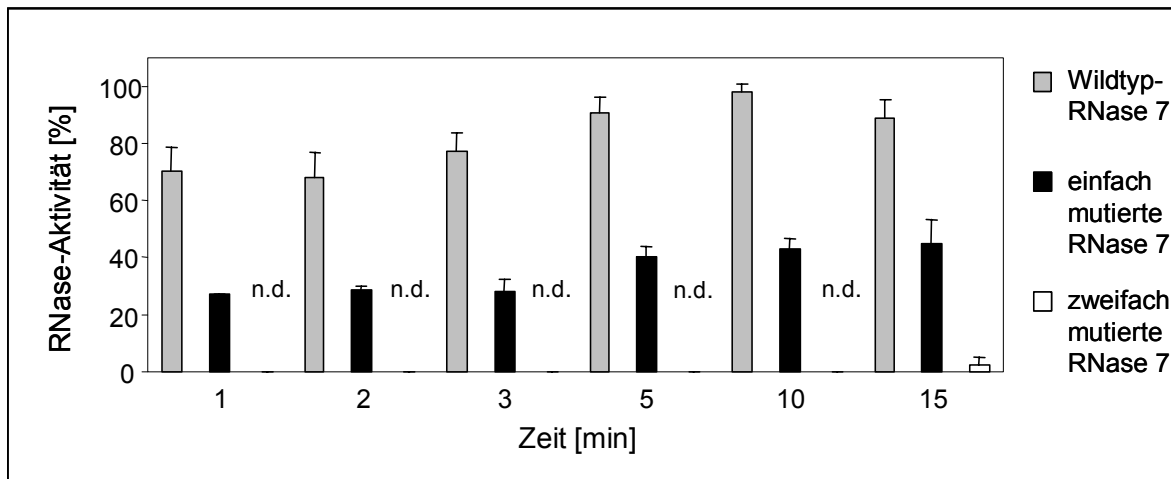


Abb. 31: Ribonuklease-Aktivitäten von Wildtyp- und mutierter RNase 7. 5 µg Hefe-tRNA wurden für die angegebenen Zeiten bei 37 °C mit jeweils 1 µg Wildtyp-, einfach bzw. zweifach mutierter RNase 7 inkubiert. Nach Fällung und Abtrennung der hochmolekularen RNA wurden die durch Ribonuklease-Aktivität gebildeten Oligonukleotide photometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Ribonuklease-Aktivitäten von rekombinanter Wildtyp-, einfach und zweifach mutierter RNase 7 im Vergleich. n. d. = nicht detektierbar.

Nach Testung der antimikrobiellen Aktivität von rekombinanter Wildtyp- und zweifach mutierter RNase 7 zeigte sich, dass beide Proteine eine identische LD₉₀ von 0,78 µg/ml gegenüber *E. coli* aufweisen. Somit hatte die Inaktivierung der Ribonuklease-Aktivität durch Mutation der rekombinanten RNase 7 keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli*. Diese Daten zeigen, dass die Ribonuklease-Aktivität von RNase 7 nicht für die antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* verantwortlich ist.

3.1.5.4 RNase 7 zeigt keine hämolytische Aktivität

Es ist bekannt, dass antimikrobielle Proteine zytotoxische Aktivität gegenüber eukaryotischen Zellen aufweisen können (Oren et al., 1999). Um zu prüfen, ob RNase 7 zur Hämolyse von Erythrozyten führt, wurden humane Erythrozyten über einen Zeitraum von 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an RNase 7 inkubiert. Das Ergebnis zeigte auch bei den höchsten untersuchten Konzentrationen von 400 µg nativer RNase 7/ml keinen Hinweis auf eine hämolytische Aktivität von RNase 7 (Abb. 32). Versuche mit rekombinanter RNase 7 zeigten ein vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

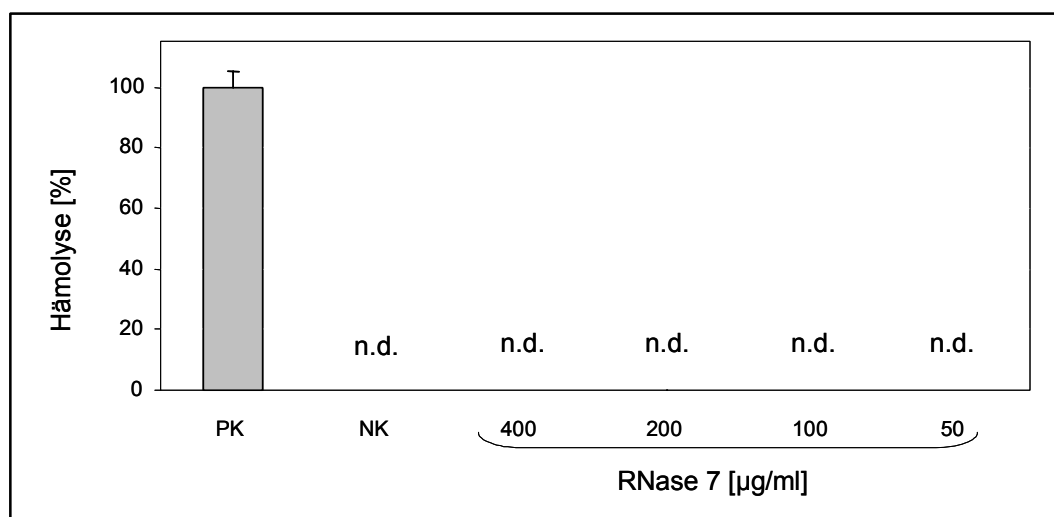


Abb. 32: RNase 7 zeigt keine hämolytische Aktivität. Humane Erythrozyten wurden für 3 h mit verschiedenen Konzentrationen an nativer RNase 7 inkubiert. RNase 7 führte in allen untersuchten Konzentrationen nicht zur Hämolyse. PK = Positivkontrolle: 0,1 % Triton X-100, NK = Negativkontrolle: 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3). n.d.= nicht detektierbar.

3.1.5.5 RNase 7 lässt sich durch BSA-Zugabe stabiler lagern

Durch die Beobachtung, dass kationische Proteine wie z. B. hBD-3 dazu neigen, irreversibel an Materialien wie Plastik zu binden (Jürgen Harder, persönliche Mitteilung), sollte geprüft werden, ob auch RNase 7 diese Eigenschaft aufweist. 10 ng rekombinante RNase 7 wurden für 72 h bei Raumtemperatur (RT), 4 °C, -20 °C und -80 °C in Natriumphosphat-Puffer oder in mit 0,1 % BSA versetztem Natriumphosphat-Puffer gelagert. Die verbliebene RNase 7-Konzentration wurde anschließend im ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass nach Lagerung der Proben ohne BSA unabhängig von der Temperatur noch ca. 2-10 % der eingesetzten RNase 7-Konzentration detektierbar war. Bei Aufbewahrung von RNase 7 mit 0,1 % BSA bei -80 °C waren hingegen noch ca. 90 % der eingesetzten RNase 7-Konzentration nachweisbar (s. Abb. 33). Die Ergebnisse zeigen, dass RNase 7 sich in 0,1 %-BSA-Lösung und -80 °C stabil lagern lässt.

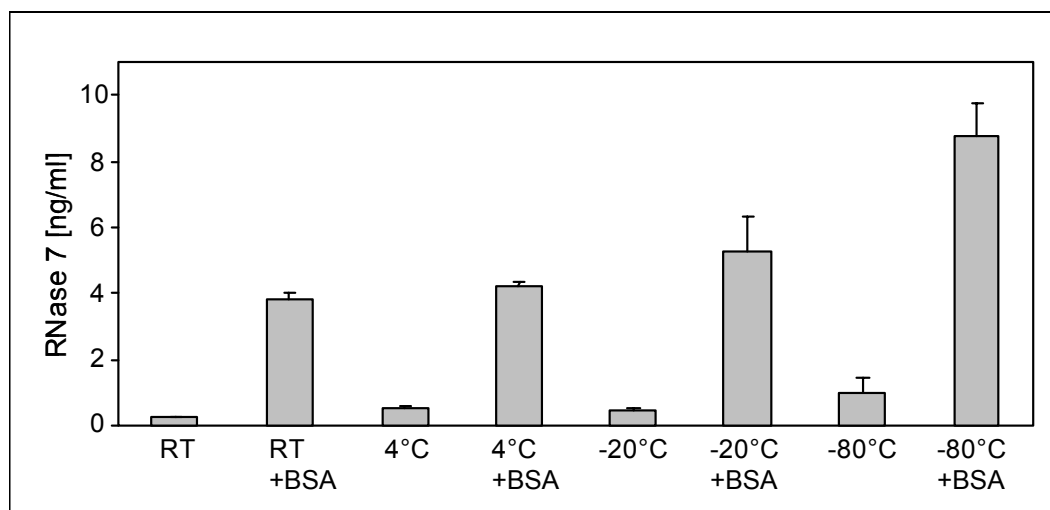


Abb. 33: Erhöhte RNase 7-Stabilität durch Zugabe von 0,1 % BSA. 10 ng rekombinante RNase 7 wurden in Natriumphosphat-Puffer oder in mit 0,1 % BSA versetztem Natriumphosphat-Puffer bei unterschiedlichen Temperaturen für 72 h inkubiert. Anschließend wurde mittels eines RNase 7-ELISAs die verbliebene RNase 7-Konzentration bestimmt, RT = Raumtemperatur.

3.1.5.6 Überexpression von RNase 7 in humanen Zellen

Um langfristig in humanen Zellen funktionelle Untersuchungen durchführen zu können, wurde eine stabile HaCaT-Zelllinie generiert, die dauerhaft RNase 7 in den Zellkulturüberstand sezerniert. Dafür wurde die komplette RNase 7-cDNA mittels PCR amplifiziert und in den eukaryotischen Vektor pEF-6/V5-His (Invitrogen) kloniert. HaCaT-Zellen wurden mit diesem Vektor transfiziert und wie unter Material und Methoden beschrieben (2.8.2) kultiviert. Als Kontrolle diente eine Transfektion der Zellen mit dem Leervektor (Kontrollvektor). Sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene konnte in den stabil transfizierten Zellen eine hohe RNase 7-Überexpression detektiert werden (s. Abb. 34).

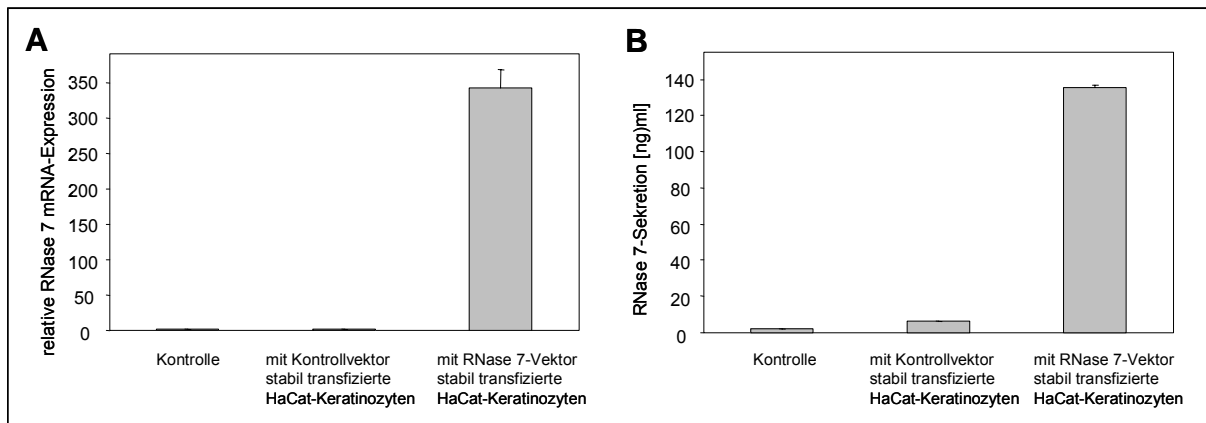


Abb. 34: Die stabile RNase 7-HaCaT-Zelllinie zeigt erhöhte RNase 7 Expression. Nach stabiler Transfektion von RNase 7 in HaCaT-Keratinozyten, wurde die RNase 7 Expression mit Hilfe von „real-time“-PCR-Analysen auf mRNA-Ebene (A) sowie in einem ELISA auf Proteinebene (B) untersucht.

Eine Untersuchung der Zellysate stabil transfigierter HaCaT-Zellen mittels ELISA zeigte, dass ca. 1 % RNase 7-Protein in den Zellen detektiert wurde. 99 % RNase 7-Protein wurden in dem Zellkulturüberstand dieser Zellen gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass RNase 7 in stabil transfigierten HaCaT-Keratinozyten in den Überstand sezerniert wird.

In weiteren Versuchen wurde RNase 7 transient in primären Keratinozyten überexprimiert. Auch dabei konnte eine hohe RNase 7-Sekretion in Zellkulturüberständen mittels ELISA detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.5.7 RNase 7 trägt zur antimikrobiellen Aktivität der Keratinozyten bei

Eine Untersuchung von Überständen konfluenten primärer Keratinozyten mit Hilfe Protein-spezifischer ELISAs zeigte, dass RNase 7 im Vergleich zu anderen antimikrobiellen Proteinen wie hBD-2 und Psoriasin als ein dominierender antimikrobieller Faktor von primären Keratinozyten sezerniert wird (Abb. 35). So war in den untersuchten Keratinozytenüberständen RNase 7 in einer 8-fach höheren Konzentration detektiert als Psoriasin, was von der Tendenz her auch den Transkriptionsergebnissen entspricht (Tab. 5, Seite 40).

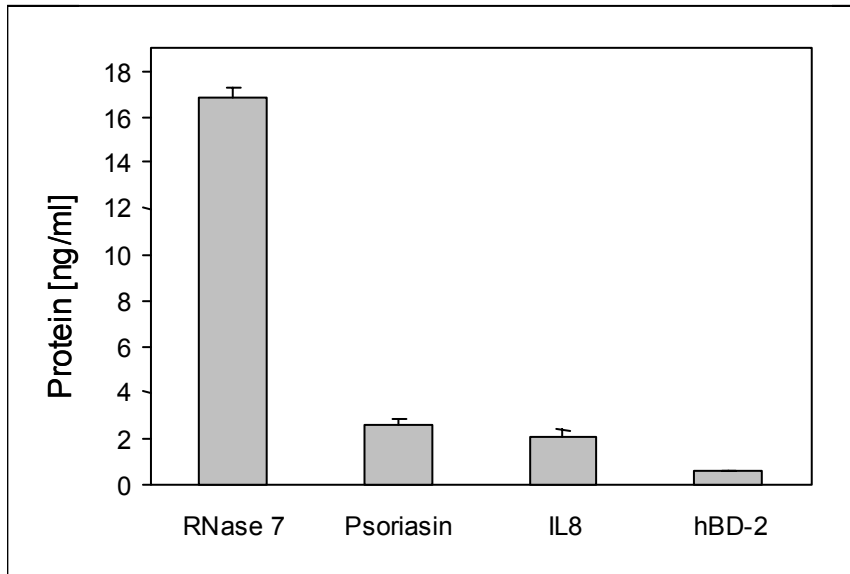


Abb. 35: RNase 7 ist ein dominierendes antimikrobielles Protein in den Überständen primärer Keratinozyten. Überstände von konfluenten primären Keratinozyten wurden mit Hilfe von ELISAs in Hinblick auf Vorhandensein verschiedener antimikrobieller Proteine und Interleukin-8 (IL8) untersucht.

Die Überstände der primären Keratinozyten wurden entsalzt und einkonzentriert und anschließend auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Es konnte dabei antimikrobielle Aktivität dieser Überstände gegen *E. coli* nachgewiesen werden (Abb. 37). Um zu prüfen, inwieweit diese antimikrobielle Aktivität durch RNase 7 vermittelt wird, wurde zunächst getestet, ob mit Hilfe der selbst generierten RNase 7-Antikörper (s. 3.1.1) die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 blockiert werden kann. In antimikrobiellen Tests gegen *E. coli* konnte nach 30minütiger Vorinkubation von 0,25 µg RNase 7 (0,25 µg/µl) mit 10 µg RNase 7-Antikörper (10 µg/µl) gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 von 100 % auf 0 % reduziert wurde (s. Abb. 36). Als Kontrolle wurde RNase 7 auch mit einem Psoriasin-Antikörper und 5 µM BSA vorinkubiert, dabei konnte keine Reduktion der antimikrobiellen Aktivität beobachtet werden (s. Abb. 36). Diese Ergebnisse zeigen, dass der RNase 7-Antikörper die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 neutralisiert.

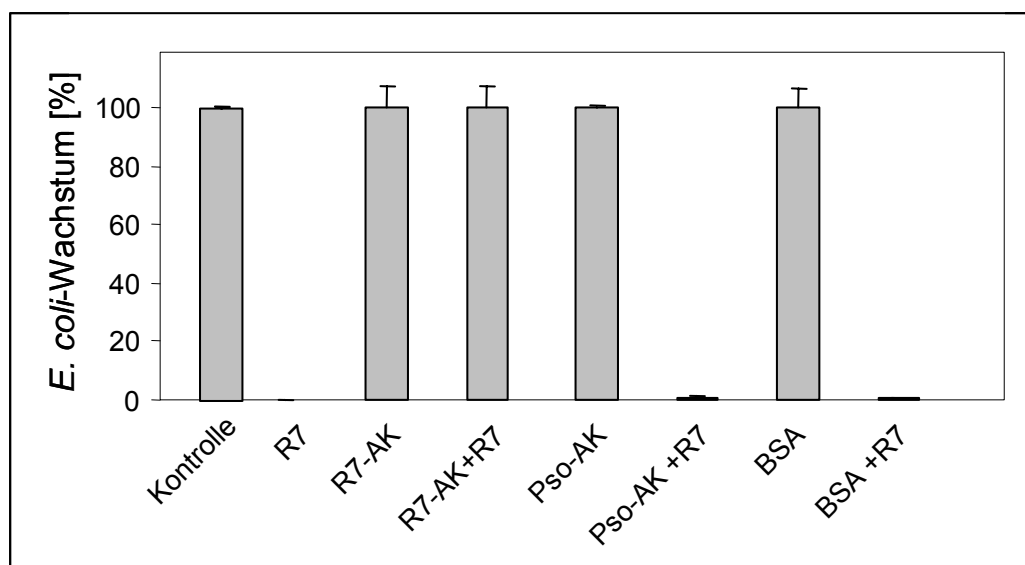


Abb. 36: Inaktivierung von RNase 7 durch einen blockierenden Antikörper inhibiert die *E. coli*-zide Aktivität von RNase 7. RNase 7 wurde entweder mit Natriumphosphat-Puffer, 5 μ M BSA, einem irrelevanten Psoriasis-Antikörper (Pso-AK, 1 μ g/ μ l) oder einem neutralisierenden Antikörper gegen RNase 7 (R7-AK, 1 μ g/ μ l) für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von *E. coli* ($3,2 \times 10^4$ /ml KBE) wurden die Ansätze für 3 h inkubiert und die KBE von *E. coli* durch Ausplattieren der Ansätze auf Nährbodenplatten bestimmt. Kontrolle = Wachstumskontrolle.

Um nun den Anteil von RNase 7 an der antimikrobiellen Aktivität der Überstände der primären Keratinozyten zu bestimmen, wurden die Überstände mit dem neutralisierenden RNase 7-Antikörper vorinkubiert und anschließend die antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* ermittelt. Das Ergebnis zeigte eine um 40 % reduzierte antimikrobielle Aktivität der mit RNase 7-Antikörper behandelten Überstände im Vergleich zu unbehandelten Überständen (s. Abb. 37).

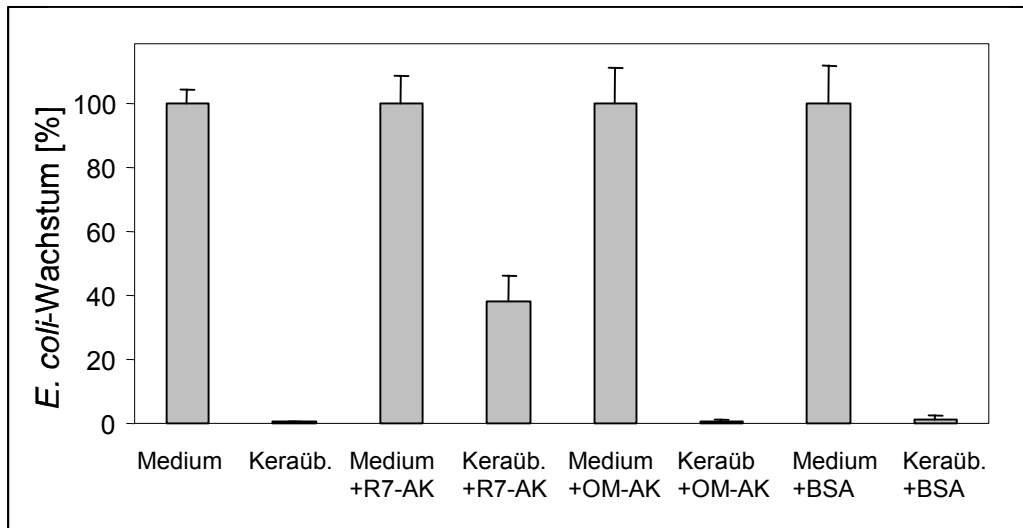


Abb. 37: Inaktivierung von RNase 7 durch einen blockierenden Antikörper vermindert die *E. coli*-zide Aktivität von Überständen primärer Keratinozyten. Überstände primärer Keratinozyten (Keraüb.) oder reines Zellkulturmedium als Kontrolle wurden entweder mit Natriumphosphat-Puffer, 5 μ M BSA, einem irrelevanten Antikörper (OM-AK, ein Antikörper gegen Ovomukoid, 1 μ g/ μ l) oder einem neutralisierenden Antikörper gegen RNase 7 (R7-AK, 1 μ g/ μ l) für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von *E. coli* ($3,2 \times 10^4$ /ml KBE) wurden die Ansätze für 3 h inkubiert und die KBE von *E. coli* durch Ausplattieren der Ansätze auf Nährbodenplatten bestimmt.

3.2 RNase 8

Zu Beginn dieser Arbeit wurde auf genomischer Ebene eine weitere Ribonuklease mit der Bezeichnung RNase 8 identifiziert und als neues Mitglied der RNase A-Familie beschrieben (Zhang et al., 2002). RNase 8 besitzt eine Sequenzidentität von 78 % zu RNase 7 und einen genomischen Abstand von 15000 Basenpaaren (s. Abb. 38). Es wurde beschrieben, dass RNase 8 ausschließlich in der Plazenta exprimiert wird und trotz der hohen Homologie zu RNase 7 keine antimikrobielle Aktivität aufweist (Zhang et al, 2002). Um zu prüfen, ob RNase 8 zur kutanen Abwehr beiträgt, wurden Untersuchungen zur Genexpression durchgeführt und RNase 8 in rekombinanter Form als Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt.


```

1 TGTATTATTAGAGGCACAAAAAGGCACATTATCTGCTGGTACTAAACAATAGAATGCCAGG 60
61 GGTGTTCAATATCTTAGGCTGCACATTGCCCTGCAATAACTGGCTTAGGGTATGAAATTC 120
121 TTAGAAGGACTAACAAGACTCCCCATGATGACCTATTCATCCACCTACCTCCTCACTCT 180
181 GTTCCACTGTCTCCCTTAAGAGAGATGGCACCGGCCAGAGCAGGATGCTGCCCCCTGCTG 240
      M A P A R A G C C P L L
241 CTGCTGCTTCTGGGGCTGTGGGTGGCAGAGGTCCCTAGTCAGAGCCAAGCCCAAGGACATG 300
      L L L L G L W V A E V L V R A K P K D M
301 ACATCATCTCAGTGGTTTTAAACTCAGCATGTGCAGCCCAGCCCTCAAGCATGCAACTCA 360
      T S S Q W F K T Q H V Q P S P Q A C N S
361 GCCATGAGCATCATCAATAAGTACACAGAACGGTGCAAAGACCTCAACACCTTCCTGCAC 420
      A M S I I N K Y T E R C K D L N T F L H
421 GAGCCCTTCTCCAGTGTGGCCATCACCTGCCAGACCCCCAACATAGCTGCAAGAATAGC 480
      E P F S S V A I T C Q T P N I A C K N S
481 TGTA AAAACTGCCACCAGAGCCACGGGCCCATGTCCCTGACCATGGGTGAGCTCACCTCA 540
      C K N C H Q S H G P M S L T M G E L T S
541 GGGAAGTACCCAAACTGCAGGTACAAAGAGAAGCACCTGAACACACCTTACATAGTGGCC 600
      G K Y P N C R Y K E K H L N T P Y I V A
601 TGTGACCCTCCACAACAGGGTGACCCAGGGTACCCACTTGTTCCTGTGCACTTGGATAAA 660
      C D P P Q Q G D P G Y P L V P V H L D K
661 GTTGTCTAAGCCCTGGTGCCACGTTCCACCTCACACTCTGCAGACTGTATGCTGCTGCT 720
      V V *
721 TTTCTCCCTCCAGTTCGTTATTAATCCTTGCTCCCCACTGCAAATGCCATTTCCCTCCC 780
781 ACACACTCAACCTCACATACTCTTGGTTTCTTAGGGAGTTTTACAGACGCTCCAAACGAT 840
841 GAAAGAAGAGGGCAGATTCTCTTCAGCCTTTCATTGTAGCTTACTTTGCAGCCCTTCCAG 900
901 AGTCAAGCACTCAGGATCCCCACAAGGATGGATCTGGGTTTGGTGAGGCCTGTGGCTCAC 960
961 CAAAGACCCTCTTAAAGAAAAAGAATATAAAATTACAAACGTAAATAAGTCAGATCCTTG 1020
1021 GAAGGGCTGTGGCTGGACAGTCCAGGGAGATCCCAGACAGGGGTAATTATCTAAGGAAGG 1080
1081 AAGGAAGGGGAATCTCTGCTGTGTTCCCTGTGTTGGGCAAAGAAATGCATCTGATCTTGC 1140
1141 TGTAATAAAGACTCTGCTGTTGCTG 1165

```

Abb. 39: Vollständige cDNA- und Aminosäuresequenz von RNase 8. Gezeigt ist die komplette cDNA-Sequenz und die dazugehörige Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) von RNase 8. Das native RNase 8-Protein ist fettgedruckt, die erste Aminosäure ist unterstrichen.

3.2.2 RNase 8 mRNA wird gewebespezifisch exprimiert

Die vollständige cDNA von RNase 8 konnte aus primären Keratinozyten kloniert werden (3.2.1), was zu der Frage führte, ob RNase 8 auch in der Haut exprimiert wird. Eine Untersuchung verschiedener humaner Gewebe mit RT-PCR hinsichtlich der RNase 8 mRNA-Expression sollte einen Überblick über die topographische Verteilung der RNase 8 mRNA-Expression geben. Wie Abb. 40 zeigt, wird RNase 8 mRNA in der Haut und in humanen primären Keratinozyten erhöht exprimiert. Daneben konnte RNase 8 mRNA in der Niere, der Trachea und in der Speicheldrüse nachgewiesen werden.

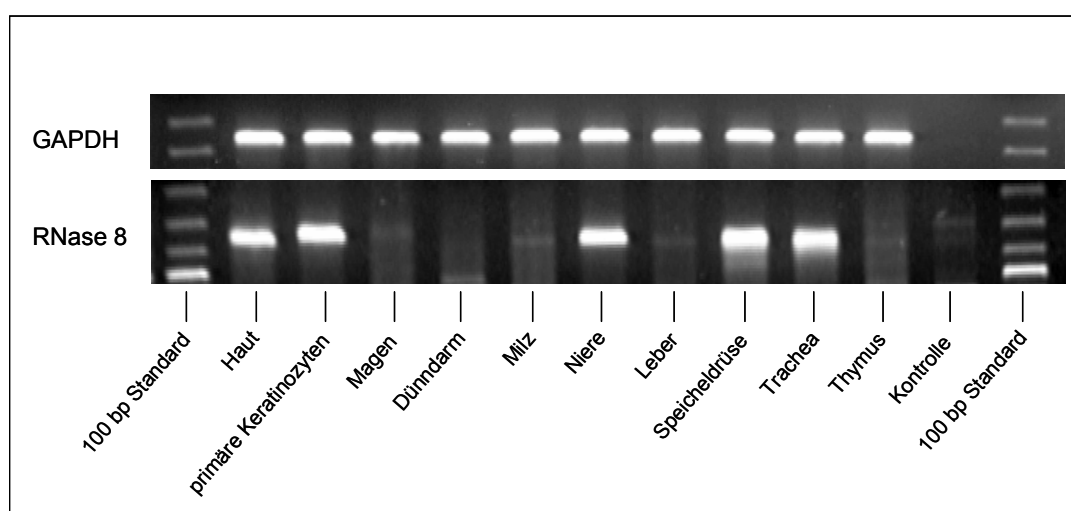


Abb. 40: RNase 8 mRNA-Expression in verschiedenen humanen Geweben. Die RNA von verschiedenen Geweben wurde revers transkribiert und in einer RT-PCR hinsichtlich RNase 8 mRNA-Expression untersucht (s. 2.8.1.3). Gezeigt sind die spezifischen PCR-Amplifikate von RNase 8 (440 bp) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 360 bp). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA.

3.2.3 RNase 8 ist induzierbar

Da in der Gensequenz von RNase 8 kein Intron nachweisbar war, konnten keine Intron-spannenden RNase 8-Primer für „real-time“-PCR-Analysen generiert werden. Um dennoch die Spezifität der RNase 8-Primer zu gewährleisten, wurde die jeweilige cDNA zunächst mit Intron-spannenden RNase 7-Primern auf Kontamination mit genomischer DNA überprüft. Mittels „real-time“-PCR-Analysen konnte eine mRNA-Expression von RNase 8 in primären Keratinozyten nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob die mRNA-Expression von RNase 8 induzierbar ist, wurden primäre

Keratinocyten für 16 h mit Überständen adhärent gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen oder für 6 h mit PMA inkubiert und die mRNA-Expression von RNase 8 mittels „real-time“-PCR-Analyse quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die RNase 8 mRNA-Expression durch *Pseudomonas aeruginosa*-Überstände bis zu 18-fach und durch PMA 5-fach steigern ließ (s. Abb. 41).

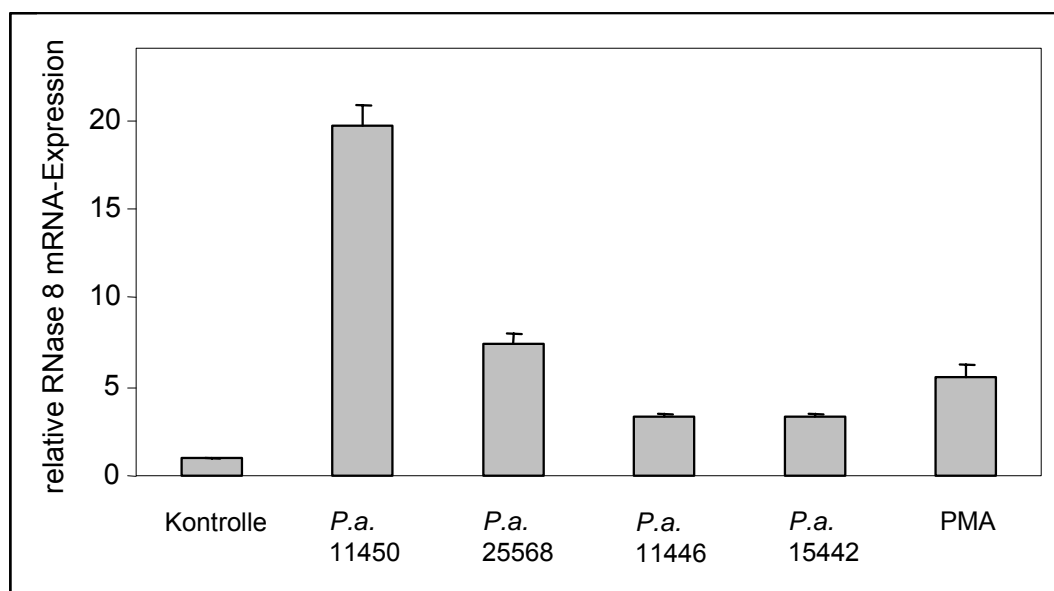


Abb. 41: RNase 8 mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 16 h mit Überständen verschiedener adhärent gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme (*P.a.*, 100µl/ml.) oder für 6 h mit PMA (40 ng/ml) versetzt. RNase 8 mRNA-Expression wurde mittels „real-time“-PCR-Analyse untersucht. Gezeigt ist die relative RNase 8 mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

3.2.4 Rekombinante Expression von RNase 8

Das RNase 7-Gen wurde in den Vektor pET-32a kloniert, das Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und mittels Enterokinase von dem N-terminalen „His-Tag“ abgespalten. Daher sollte versucht werden, auch das RNase 8-Gen in diesen Vektor zu klonieren. Die Expression des Fusionsproteins gelang, allerdings konnte trotz Variation der Versuchsbedingungen der „His-Tag“ mittels Enterokinase-Proteolyse nicht abgespalten werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde eine andere Klonierungsstrategie gewählt.

Zunächst wurde das RNase 8-Gen für die Klonierung mittels PCR amplifiziert. Mit spezifischen Primern konnte ein 384 bp großes Fragment amplifiziert werden (nicht gezeigt), welches der Länge des zu erwartenden Produktes entspricht. Das PCR-

Produkt und der Vektor pQE-2 wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, mittels T4-DNA-Ligase ligiert und in *E. coli* TOP10 transformiert. Der Einbau des Gens in den Vektor wurde durch eine Kolonie-PCR überprüft. Durch Sequenzierung des Vektors mit inseriertem PCR-Produkt wurden die korrekte Orientierung und die Fehlerfreiheit der Sequenz des entsprechenden Gens überprüft. Der Vektor wurde mit R8pQE-2 bezeichnet.

Zur Expression von RNase 8 wurde der Vektor in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformiert. Nach Expression, Ernte und Aufschluss der Zellen war auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel eine ausgeprägte Überexpression eines ca. 21 kDa großen Proteins erkennbar (Abb. 42). Dieses Molekulargewicht entspricht der berechneten Proteingröße des Fusionsprotein RNase 8 mit „His-Tag“. Versuche zur Optimierung der Expressionsbedingungen ergaben die höchste Proteinausbeute nach dreistündiger Expression bei 37 °C mit Zellen, die bei einer OD₆₂₀ von 0,8 mit IPTG induziert wurden. Das RNase 8-Fusionsprotein konnte in löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden. Nach Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Nickel-Affinitätssäule und C8-Umkehrphasen-HPLC wurde der N-terminale „His-Tag“ des Fusionsproteins mittels Dipeptidylpeptidase abgespalten. Das so erhaltene Protein lief in der SDS-PAGE bei ca. 17 kDa (Abb. 42). Die berechnete Molekülmasse von RNase 8 liegt bei 14 kDa. Da das Protein aber sehr kationisch ist (pI 8,6), zeigt es offenbar ein untypisches Laufverhalten in der SDS-PAGE, ähnlich wie es auch für RNase 7 beobachtet wurde (Abb. 27).

Die Masse von HPLC-aufgereinigter rekombinanter RNase 8 aus *E. coli* wurde mit Hilfe eines Quadropol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometers bestimmt. Die massenspektrometrisch ermittelte Durchschnittsmasse betrug 14201 Dalton (s. Abb. 43). Die molekulare Masse liegt somit 8 Dalton unter der theoretisch errechneten Masse. Dies erklärt sich dadurch, dass RNase 8 acht Cysteine besitzt, die über vier Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind.

Auf diese Weise konnten aus 200 ml *E. coli*-Kultur ca. 120 µg rekombinante RNase 8 aufgereinigt werden.

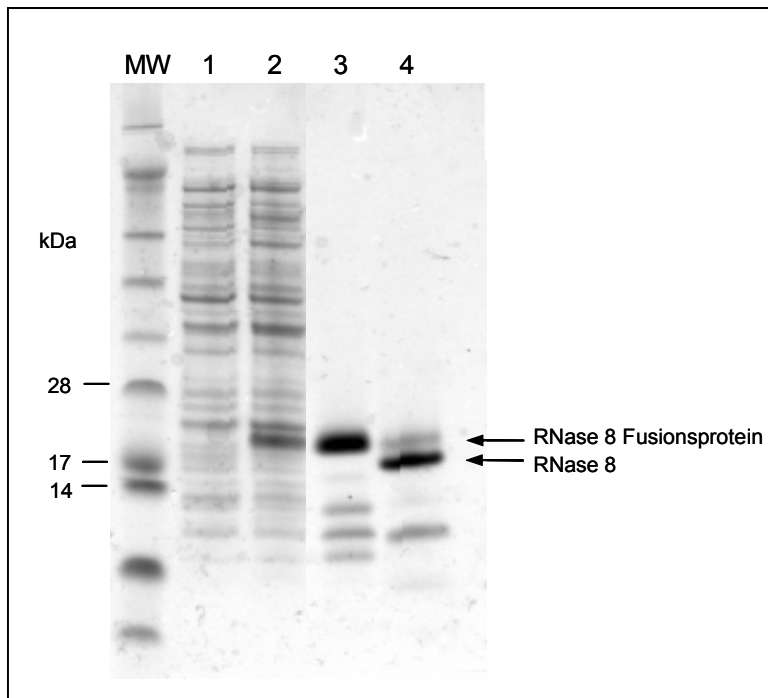


Abb. 42: Coomassie Blue-gefärbte SDS-PAGE der rekombinanten Expression und Aufreinigung von RNase 8. MW: Molekulargewichtsstandard, Spur 1: gesamte Zellproteine vor Induktion, Spur 2: gesamte Zellproteine 3 h nach Induktion, Spur 3: rekombinante RNase 8 als Fusionsprotein, Spur 4: rekombinante RNase 8 nach Dipeptidase-Proteolyse.

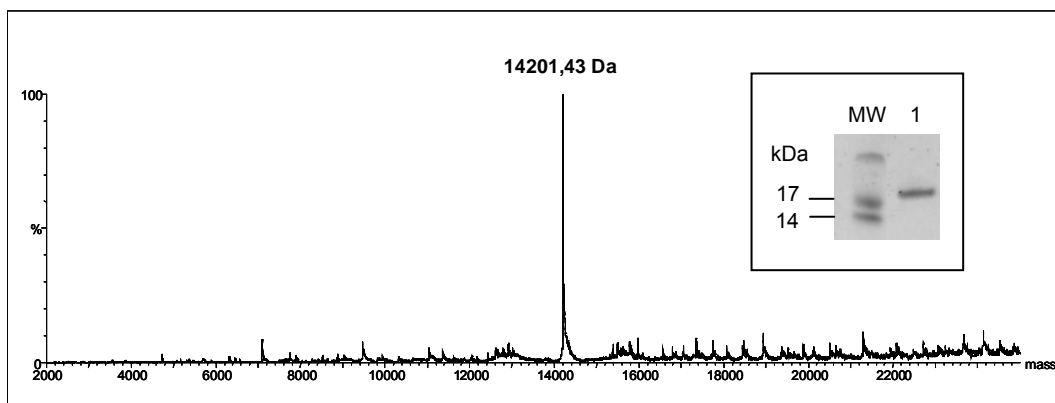


Abb. 43: Massenbestimmung von RNase 8 mittels QTOF-Massenspektrometrie. Die Masse von aufgereinigter rekombinanter RNase 8 wurde mittels Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie an einem Quadropol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF II, Micromass, Manchester, UK) im Positiv-Ionen-Modus durchgeführt. Der Einsatz (Spur 1) zeigt eine SDS-PAGE der nach C2/C18-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten rekombinanten RNase 8, MW: Molekulargewichtsstandard.

3.2.4.1 Ribonuklease-Aktivität von RNase 8

Um zu prüfen, ob rekombinante RNase 8 Ribonuklease-Aktivität aufweist, wurde ein Ribonuklease-Test durchgeführt, bei dem der Abbau von Hefe-tRNA durch Ribonukleasen gemessen wird. Hierbei zeigte sich, dass RNase 8 im Vergleich zu RNase 7 eine um ca. 90 % geringere Ribonuklease-Aktivität aufwies (Abb. 44).

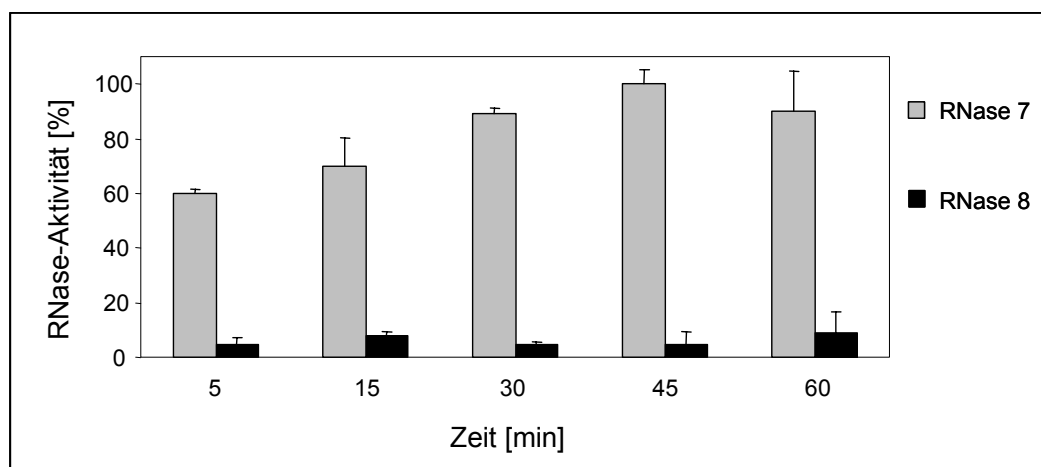


Abb. 44: Ribonuklease-Aktivität von RNase 8 im Vergleich zu RNase 7. 5 µg Hefe-tRNA wurden für die angegebenen Zeiten bei 37 °C mit jeweils 1 µg RNase 7 bzw. RNase 8 inkubiert. Nach Fällung und Abtrennung der hochmolekularen RNA wurden die durch Ribonuklease-Aktivität gebildeten Oligonukleotide photometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Ribonuklease-Aktivitäten von RNase 7 und RNase 8 im Vergleich.

3.2.5 Antimikrobielle Aktivität von RNase 8

3.2.5.1 RNase 8 besitzt ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität

Zur genaueren Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften von RNase 8, wurde das rekombinante Protein in verschiedenen Konzentrationen im Flüssigkulturtest hinsichtlich antimikrobieller Aktivität analysiert. Es zeigte sich, dass RNase 8 sehr hohe Aktivität gegen verschiedene, potenziell pathogene Bakterien wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* und *Pseudomonas aeruginosa* aufwies (LD₉₀ = 0,11-0,22 µM, s. Tab. 7). RNase 8 zeigte besonders hohe antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Acinetobacter baumannii* mit einer LD₉₀ im nanomolaren Bereich (s. Tab. 7).

| Gram-positive Stämme | LD ₉₀ [µM] | Gram-negative Stämme | LD ₉₀ [µM] |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>St. aureus</i> ATCC 6538 | 0,88 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 0,05 |
| <i>St. aureus</i> ATCC 12600 | 0,44 | <i>E. coli</i> ATCC 35218 | 0,05 |
| <i>St. aureus</i> ATCC 33593 (MRSA) | 0,44 | <i>E. coli</i> ATCC 11775 | 0,11 |
| <i>St. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA) | 0,22 | <i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 13882 | 0,22 |
| <i>St. epidermidis</i> ATCC 14990 | 0,88 | <i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 13883 | 0,05 |
| <i>Str. pyogenes</i> ATCC 12344 | 0,44 | <i>Eb. cloacae</i> ATCC 13047 | 0,44 |
| <i>Str. pneumoniae</i> ATCC 33400 | 7,00 | <i>Citr. freundii</i> NCTC 9750 | 3,50 |
| <i>Ec. faecalis</i> ATCC 29212 | 0,22 | <i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 10145 | 0,22 |
| <i>Ec. faecalis</i> ATCC 51299 (VRE) | 0,22 | <i>Ps. aeruginosa</i> CF 446 (MR) | 0,11 |
| <i>Ec. faecium</i> DSM 2146 | 0,22 | <i>Ps. fluorescens</i> NCTC 10038 | 1,76 |
| <i>Ec. faecium</i> Ulm 68 (VRE) | 0,22 | <i>Ac. baumannii</i> ATCC 19606 | 0,05 |
| <i>Ec. faecium</i> W 354 (VRE) | 0,22 | Pilze | LD₉₀ [µM] |
| <i>Ec. faecium</i> W 356 (VRE) | 0,22 | <i>C. albicans</i> ATCC 24433 | 0,22 |

Tab. 7: RNase 8 besitzt ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität. Die aufgeführten Mikroorganismen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an RNase 8 in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die KBE durch Ausplattieren auf Agar-Nährmediumplatten und Inkubation bei 37 °C bestimmt. Gezeigt ist die LD₉₀.

3.2.5.2 Die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 ist salzempfindlich

In Abschnitt 3.1.5.3.2 wurde gezeigt, dass die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 salzunabhängig ist. Allerdings ist bekannt, dass antimikrobielle Proteine auch durch die Anwesenheit von NaCl gehemmt werden können (Tam et al., 2002). Wie bereits unter 3.2.5.1 gezeigt werden konnte, besitzt RNase 8 potente antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien wie *E. coli* sowie gegen Gram-positive Bakterien wie *S. aureus*. Um die biologische Relevanz der antimikrobiellen Aktivität von RNase 8 unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde im Flüssigkulturtest der Einfluss verschiedener Salz-Konzentrationen auf die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 analysiert. Dafür wurden *E. coli* (9×10^3 /ml) und *S. aureus* (1×10^4 /ml) mit RNase 8 (50 µg/ml) unter ansteigenden NaCl-Konzentrationen inkubiert. Wie Abb. 45 zeigt, wurde die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 gegen *E. coli* sowie gegen *S. aureus* durch NaCl ab 60 mM dosisabhängig inhibiert, bei 150 mM NaCl wurde die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 fast vollständig inaktiviert.

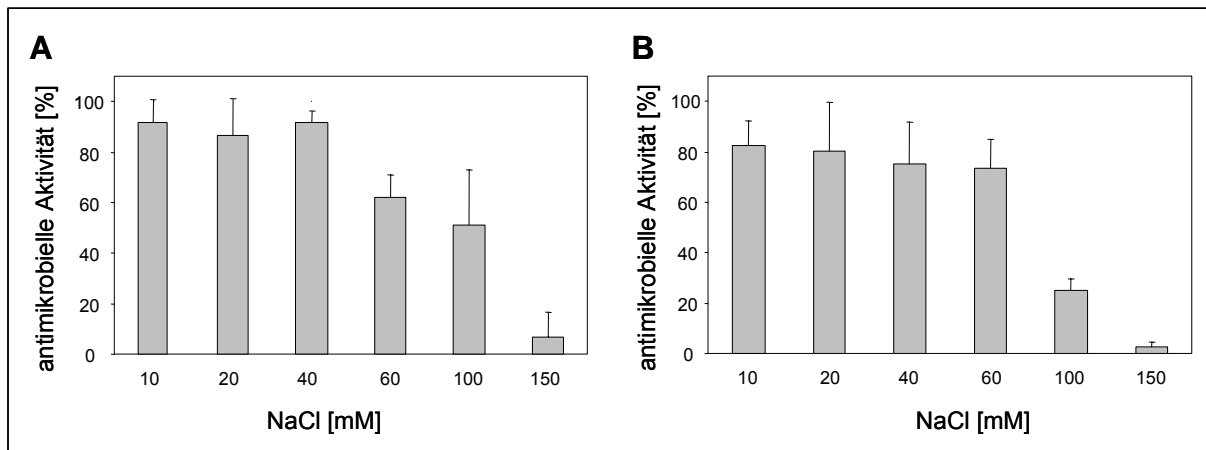


Abb. 45: Die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 wird durch erhöhte NaCl-Konzentrationen inhibiert. RNase 8 (50 µg/ml) wurde bei 37 °C für 3 h mit 5×10^5 /ml KBE von *E. coli* (A) bzw. 5×10^5 /ml KBE von *S. aureus* (B) in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) und den angegebenen NaCl-Konzentrationen inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 wurde durch Ausplattieren der jeweiligen Ansätze auf TSB-Platten, Inkubation über Nacht bei 37 °C und Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt.

3.2.5.3 Die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 ist nicht pH-abhängig

Wie unter Punkt 3.1.5.3.3 aufgeführt, zeigte die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 keine pH-Abhängigkeit. Um zu prüfen, inwieweit die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 durch niedrige oder hohe pH-Werte beeinflusst wird, wurden *E. coli* ($6,4 \times 10^3$) und *S. aureus* (9×10^3) mit RNase 8 (50 µg/ml) und Natriumphosphat-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Wie Abb. 46 zeigt, wurde die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 unter verschiedenen pH-Bedingungen weder gegen *E. coli*, noch gegen *S. aureus* inhibiert.

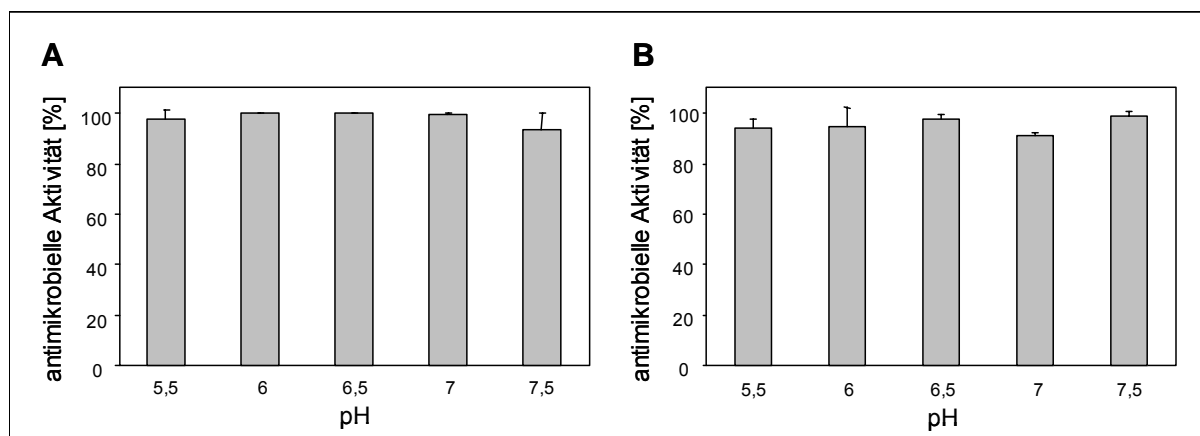


Abb. 46: Die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 wird durch unterschiedliche pH-Werte nicht inhibiert. RNase 8 (50 µg/ml) wurde bei 37 °C für 3 h mit $6,4 \times 10^3$ /ml KBE von *Escherichia coli* (A) bzw. 9×10^3 /ml KBE von *Staphylococcus aureus* (B) in Natriumphosphat-Puffer mit den angegebenen pH-Werten inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von RNase 8 wurde durch Ausplattieren der jeweiligen Ansätze auf TSB-Platten, Inkubation über Nacht bei 37 °C und Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt.

3.2.6 RNase 8 zeigt keine hämolytische Aktivität

RNase 7 zeigte keine hämolytische Aktivität auf humane Erythrozyten (3.1.5.4); es ist aber bekannt, dass antimikrobielle Proteine zytotoxische Aktivität gegenüber eukaryotischen Zellen aufweisen können (Oren et al. 1999). Um zu prüfen, ob RNase 8 zur Hämolyse von Erythrozyten führt, wurden humane Erythrozyten über einen Zeitraum von 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an RNase 8 inkubiert. Als Ergebnis zeigte sich auch bei den höchsten untersuchten Konzentrationen von 400 µg RNase 8/ml maximal eine hämolytische Aktivität von 1,6 % (Abb. 47).

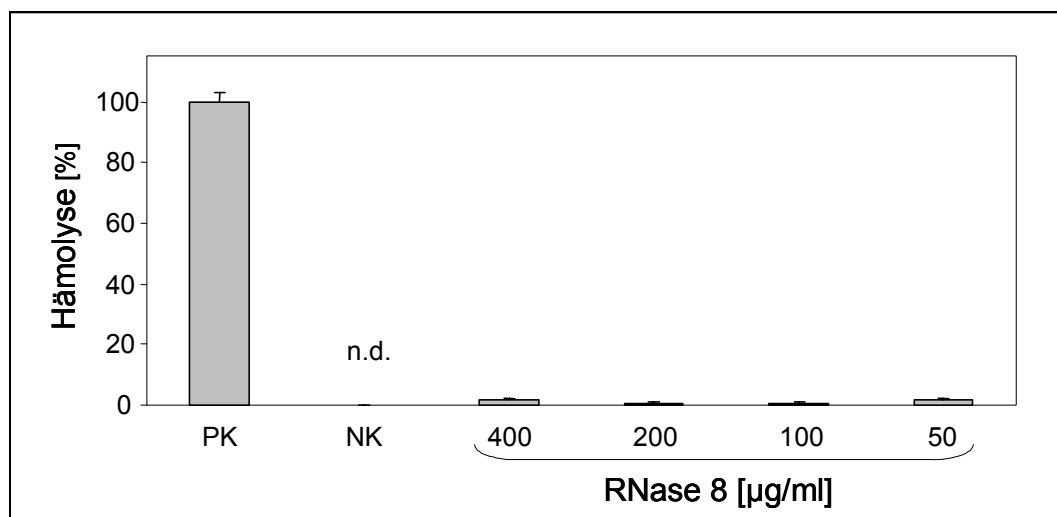


Abb. 47: RNase 8 zeigt keine hämolytische Aktivität. Humane Erythrozyten wurden für einen Zeitraum von 3 h mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinanter RNase 8 inkubiert. RNase 8 führte in allen untersuchten Konzentrationen maximal zu einer Hämolyse von 1,6 %. PK = Positivkontrolle: 0,1 % Triton X-100, NK = Negativkontrolle: 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3). n.d. = nicht detektierbar.

4. Diskussion

4.1 Antimikrobielle Proteine der Haut

In den letzten Jahren wurde durch verschiedene Studien immer deutlicher, dass die menschliche Haut über spezialisierte Abwehrmechanismen verfügt und eine Reihe von Effektormolekülen produziert, die das Wachstum von Mikroorganismen auf der Hautoberfläche kontrollieren. Zu diesen Effektormolekülen zählen die antimikrobiellen Proteine, die größtenteils der Familie der Defensine oder der Cathelicidine zuzuordnen sind (Pivarcsi et al., 2004). Defensine sind kleine, kationische und Cystein-reiche Mitglieder einer hoch konservierten Genfamilie. Sie bestehen aus Alpha- und Beta-Untergruppen, die sich in ihrer Disulfidbrückenpaarung unterscheiden (Ganz, 2003). Alle vier Beta-Defensine des Menschen (hBD-1-4, „human beta-defensins 1-4“) werden in Keratinozyten exprimiert und zeigen potente antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, Hefen und Viren (Elias, 2005). Neben den Defensinen wird von der menschlichen Epidermis auch das Cathelicidin hCAP-18 („human cationic antimicrobial protein“; Zaiou und Gallo, 2002; Gallo und Nizet, 2003) exprimiert. Cathelicidine bilden eine Klasse kleiner, kationischer Peptide mit einem hoch konservierten, N-terminalen Cathelinsegment, das Cysteinprotease-Aktivität besitzt, und einem antimikrobiellen, C-terminalen Segment (Zaiou und Gallo, 2002). Das C-terminale Fragment des hCAP-18 ist das so genannte LL-37, welches ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität aufweist und auch antivirale Aktivität besitzt (Howell et al., 2004).

Neben den Defensinen und Cathelicidinen produzieren humane Keratinozyten auch Proteaseinhibitoren, die Proteasen wie z. B. Elastase inhibieren und somit einer Gewebsschädigung vorbeugen können. Dabei konnte den Serinprotease-Inhibitoren Elafin/SKALP („skin-derived anti-leukoprotease“) (Wiedow et al., 1990) und Antileukoprotease (ALP)/SLPI („secretory leucocyte protease inhibitor“) (Wiedow et al., 1998) auch eine antimikrobielle Aktivität zugewiesen werden. Für die Antileukoprotease (ALP)/SLPI konnte gezeigt werden, dass diese sowohl gegen

Gram-positive und Gram-negative Bakterien, als auch gegen Hefen wirksam ist (Wiedow et al., 1998).

Weiterhin führten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zu der Identifizierung des S100-Proteins Psoriasin als antibiotisch wirksames Protein. Psoriasin wird von der Haut gebildet und hemmt spezifisch das Wachstum von *E. coli* (Gläser et al., 2005).

Die meisten der aus der Haut gewonnenen antimikrobiellen Proteine werden von Keratinozyten produziert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Schweißdrüsen der Haut die Möglichkeit besitzen, antimikrobielle Proteine zu exprimieren. Dermcidin ist ein neu entdecktes, anionisches antimikrobielles Protein, das ausschließlich in menschlichen Schweißdrüsen produziert wird (Schittek et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass die prozessierte, antimikrobiell aktive Form von Dermcidin (Dermcidin-1) gegen Bakterien wie *E. coli* und *S. aureus* sowie gegen die Hefe *Candida albicans* aktiv ist und in den Schweiß abgegeben wird (Schittek et al., 2001).

Viele antimikrobielle Proteine wie z. B. Lysozym (Klenha und Krs, 1967), SLPI/ALP, Dermcidin und hBD-1 werden konstitutiv in gesunder Haut von Keratinozyten bzw. Schweißdrüsen produziert. Andere antimikrobielle Proteine werden in gesunder Haut in geringen Mengen produziert und erst im Rahmen von Entzündungen oder Infektionen vermehrt gebildet. Zu diesen induzierbaren antimikrobiellen Proteinen gehören die humanen Beta-Defensine hBD-2 und hBD-3 und das Cathelicidin LL-37. Diese Moleküle spielen als zusätzlich induzierbare antimikrobielle Proteine eine wichtige Rolle in der epithelialen Erregerabwehr.

4.2 RNase 7

Die Entdeckung der induzierbaren Beta-Defensine hBD-2 (Harder et al., 1997) und hBD-3 (Harder et al., 2001), die in gesunder Haut kaum exprimiert werden, führte zu der Frage, ob und durch welche antimikrobiellen Faktoren sich die gesunde Haut zu schützen vermag. Dabei gelang es, aus *Stratum corneum* hautgesunder Probanden ein neues antimikrobielles Protein zu isolieren, das aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Mitgliedern der humanen RNase A-Familie als RNase 7 bezeichnet wurde (Harder und Schröder, 2002). RNase 7 ist nicht das erste antimikrobielle Protein des Menschen mit Ribonuklease-Aktivität. Eine weitere Ribonuklease mit antimikrobieller

Aktivität ist die in den eosinophilen Granulozyten produzierte RNase ECP („eosinophil cationic protein“; Gleich et al., 1986). ECP besitzt neben seiner Ribonuklease-Aktivität antiparasitische (Yazdanbakhsh et al., 1987), antivirale (Domachowske et al., 1998) sowie antibakterielle Aktivität (Lehrer et al., 1989). Lehrer et al. konnten 1989 zeigen, dass ECP (50 µg/ml) innerhalb von 2 h eine über 99 %ige Reduktion der koloniebildenden Einheiten von *S. aureus* bewirkte. Über die Bedeutung von antimikrobiell wirksamen Ribonukleasen in humanen Epithelien war bisher wenig bekannt. Daher sollte in dieser Arbeit die Expression und die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 näher charakterisiert werden.

4.2.1 RNase 7 ist ein dominierendes antimikrobielles Protein der Haut

RNase 7 wurde aus Hautschuppen gesunder Probanden isoliert und in vergleichsweise hohen Mengen aufgereinigt. Es konnte dabei 10-100-fach mehr RNase 7 pro Gramm Hautschuppen gewonnen werden als beispielsweise hBD-2 oder hBD-3. Auch ein Vergleich der mRNA-Expression verschiedener antimikrobieller Proteine in „real-time“-PCR-Experimenten zeigte, dass RNase 7 im Gegensatz zu anderen antimikrobiellen Proteinen in unstimulierten, humanen primären Keratinozyten auf einem vergleichsweise hohen Niveau exprimiert wird. Weiterhin konnte durch eine Untersuchung von Kulturüberständen konfluenter primärer Keratinozyten mit Hilfe Protein-spezifischer ELISAs gezeigt werden, dass RNase 7 im Vergleich zu anderen antimikrobiellen Proteinen wie hBD-2 als ein dominierender antimikrobieller Faktor von primären Keratinozyten sezerniert wird. So war in den untersuchten Keratinozytenüberständen RNase 7 in einer fast 30-fach höheren Konzentration detektierbar als hBD-2. Diese Daten beziehen sich auf Untersuchungen von gesunder Haut bzw. von unstimulierten Keratinozyten. Interessanterweise wurde beschrieben, dass auch in Schuppenextrakten von Psoriasis-Patienten RNase 7 als ein dominierendes antimikrobielles Protein identifiziert werden konnte (Harder und Schröder, 2005b). Daneben wurden in diesen Extrakten weitere antimikrobielle Proteine wie Psoriasin und hBD-2 in hohen Mengen detektiert. Es wird vermutet, dass hBD-2 durch proinflammatorische Zytokine induziert wird, die in psoriatischer Haut verstärkt produziert werden (Harder und Schröder, 2005a). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass RNase 7 für einen konstitutiven Schutz der gesunden Haut mitverantwortlich ist, wohingegen

antimikrobielle Proteine wie beispielsweise hBD-2 eher bei entzündlichen Prozessen eine Rolle spielen.

4.2.2 Regulation von RNase 7

Basierend auf der Beobachtung, dass RNase 7 in der Haut und in Keratinozyten sehr hoch exprimiert wird, sollten im Rahmen dieser Arbeit Promotorstudien durchgeführt werden, um zu analysieren, welche regulativen Genabschnitte für die hohe konstitutive Expression von RNase 7 verantwortlich sein könnten. Hierzu wurden verschiedene Fragmente der RNase 7-Promotorregion in ein Reporterplasmid kloniert und anschließend in primäre Keratinozyten transfiziert. Eine Analyse der RNase 7-Promotorregion mittels Luziferase-Experimenten zeigte, dass das Konstrukt aus Promotor, Exon 1 und Intron die höchste relative Luziferaseaktivität (RLA) aufwies. Bei Deletion des Introns verringerte sich die RLA um fast 60 %. Bestimmte Sequenzen im Intron von RNase 7 scheinen also einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription auszuüben. Es gibt Hinweise darauf, dass eine verstärkte Transkription von Mitgliedern der RNase A-Familie unter anderem auch über Promotor-ähnliche Sequenzen der Introns vermittelt wird. So wird z. B. die optimale Expression der RNase EDN („eosinophil-derived neurotoxin“, RNase 2) über die ersten 60 Basenpaare des Introns vermittelt. In diesem Sequenzabschnitt liegen potenzielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 („activator protein-1“) und NF-AT1 („nuclear factor of activated T-cells 1“) (Tiffany et al., 1996). Auch die Gen-Expression von ECP („eosinophil cationic protein“, RNase 3) ist von bestimmten Intron-Sequenzabschnitten abhängig, wobei die dort bindenden Transkriptionsfaktoren noch nicht identifiziert werden konnten (Handen und Rosenberg, 1997). Auch im Intron von RNase 7 sind potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise AP-1 vorhanden. In weiterführenden Untersuchungen könnte z. B. in „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSAs) analysiert werden, welche Transkriptionsfaktoren an dieser Regulation beteiligt sind. Weiterhin zeigten die Luziferaseexperimente, dass das Exon 1 der RNase 7-Promotorregion eine hemmende Funktion ausübt. Im Vergleich zur Aktivität des Konstruktes aus Promotor und Exon 1 stieg die RLA des Konstruktes mit deletiertem Exon 1 wieder an. Unter diesen Versuchsbedingungen scheint das Exon 1 von RNase 7 also einen inhibierenden Effekt auszuüben. Für die RNasen EDN und ECP wurde für das

Exon 1 in beiden Fällen kein Einfluss auf die Gen-Expression festgestellt (Tiffany et al., 1996; Handen und Rosenberg, 1997). In weiterführenden Experimenten wäre daher zu analysieren, ob durch Transfektion primärer Keratinozyten mit einem Konstrukt, aus dem das Exon 1 entfernt wurde, so dass es nur aus Promotor und Intron besteht, eine erhöhte RLA zu detektieren ist.

Nicht nur die 5'-Bereiche des RNase 7-Gens scheinen die Grundexpression zu kontrollieren. So wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von 3'-RACE-Experimenten gezeigt, dass es drei verschiedene 3'-UTR-Varianten (UTR = untranslatierte Region) von RNase 7 gibt. Da bekannt ist, dass 3'-UTR einen regulativen Einfluss auf die Genexpression ausüben können (Yasuda et al., 2004), sollte mit Hilfe von Luziferasestudien geklärt werden, ob dies auch für die RNase 7 3'-UTR-Varianten gilt. Dazu wurden die drei Varianten unter Kontrolle des RNase 7-Promotors in ein Transporterplasmid kloniert und die Konstrukte in primäre Keratinozyten transfiziert. Die Analyse der Luziferaseexperimente zeigte, dass die RNase 7-Variante 2 eine um 40-50 % höhere RLA aufwies als die anderen beiden Varianten. Diese Daten legen nahe, dass die Genexpression von RNase 7 über die unterschiedlichen 3'-UTR reguliert werden kann. Ob die verschiedenen Varianten einen Einfluss auf die Regulation der Transkription haben oder auch die Halbwertszeit der mRNA beeinflussen, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die hohe basale Grundexpression der RNase 7 kann durch Stimulation primärer Keratinozyten mit Kulturüberständen verschiedener Bakterien noch weiter erhöht werden. Neben den antimikrobiellen Proteinen hBD-2 und hBD-3 gehört somit auch RNase 7 zu den induzierbaren antimikrobiellen Proteinen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kulturüberstände von *P. aeruginosa*, einem klinisch bedeutsamen Erreger der Haut, sowie von *S. aureus*, einem der wichtigsten Erreger nosokomialer Infektionen, in primären Keratinozyten die mRNA- und Proteinexpression von RNase 7 induzieren können. Die Stärke der Induktion war sowohl von der Menge der eingesetzten Bakterienüberstände als auch von der Stimulationsdauer abhängig. Dies verdeutlicht, dass Keratinozyten in der Lage sind, eindringende Mikroorganismen zu erkennen und nachfolgend durch die erhöhte Produktion von antimikrobiellen Proteinen wie z. B. RNase 7 zu bekämpfen. Der molekulare Mechanismus der Erkennung der Bakterien durch Keratinozyten ist noch weitgehend unbekannt. Es ist davon auszugehen, dass bestimmte bakterielle PAMPs („pathogen associated molecular patterns“) durch auf oder in den

Keratinocyten exprimierte Rezeptoren (PRRs; „pathogen recognition receptors“) erkannt werden. Zu den PAMPs zählen beispielsweise Endotoxin und andere Zellwandbestandteile, aber auch nichtmethylierte DNA, RNA und verschiedene Proteine (Janeway und Medzhitov, 2002). PRRs finden sich extrazellulär, membranständig oder intrazellulär in verschiedenen Zellkompartimenten (Gordon, 2002). Die bekannteste Gruppe der PRRs ist die Familie der „Toll-Like“-Rezeptoren (TLR), die in Leukozyten und Epithelzellen in unterschiedlichen Mustern exprimiert werden (Medzhitov et al., 1997). Beim Menschen wurden bislang 10 verschiedene TLRs entdeckt, davon wurden auf Keratinocyten TLR 1, 2, 4 und 5 beschrieben (Kawai et al., 2002; Song et al., 2002; Baker et al., 2003; Pivarsci et al., 2003). Weiterhin können auch intrazelluläre PRRs für eine Signalvermittlung verantwortlich sein. Eine Klasse intrazellulärer PRRs, die in den letzten Jahren mit der Pathogenese des Morbus Crohn in Verbindung gebracht wurde, sind die NOD-Moleküle („Nucleotide-binding oligomerization domain protein“; Murray, 2005). Diese können wie die TLRs über eine C-terminale Leucin-reiche-Region (LRR) PAMPs binden und über ihre N-terminale CARD („caspase-recruitment domain“)-Region NF- κ B und MAP-Kinasen aktivieren (Inohara et al., 1999; Girardin et al., 2001; Ogura et al., 2001). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass auch primäre Keratinocyten NOD-2 exprimieren und dass NOD-2 die hBD-2-Regulation vermitteln kann (Voss et al., 2005). Diese Befunde lassen vermuten, dass die bakterielle Induktion von antimikrobiellen Proteinen in Keratinocyten unter anderem über TLR- oder NOD-Rezeptoren vermittelt werden kann. Welche Arten von Rezeptoren für die RNase 7-Induktion in Frage kommen, müssen weitere Studien klären. Interessant wäre auch zu untersuchen, ob RNase 7 direkt durch mikrobielle Faktoren aktiviert wird oder indirekt durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie z. B. TNF- α oder IL-1 (Harder und Schröder, 2002).

Eine besonders hohe Induktion von RNase 7 wird auch durch Stimulation mit dem Phorbol-Ester Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA) erreicht. Für RNase 7 wurde mit 40 ng/ml PMA eine 100-fache Induktion der mRNA-Expression beobachtet. PMA kann in Keratinocyten den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren (Diaz et al., 2000). Bindungsstellen für AP-1 finden sich auch in der Promotorregion von RNase 7 wieder und deuten darauf hin, dass AP-1 in die PMA-vermittelte Induktion von RNase 7 involviert sein könnte.

Es ist beschrieben worden, dass PMA auch die Expression der Beta-Defensine hBD-2 und hBD-3 induzieren kann und dass durch all-*trans*-Retinsäure die PMA-vermittelte Induktion der Beta-Defensine gehemmt wird (Harder et al., 2004). Daher sollte der Einfluss von all-*trans*-Retinsäure auf die RNase 7 Expression untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass all-*trans*-Retinsäure die Induktion von RNase 7 durch PMA bis zu 90 % inhibiert. All-*trans*-Retinsäure entfaltet seine biologische Wirkung u. a. durch Hemmung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Schule et al., 1991; Pfahl, 1993; Love und Gudas, 1994). Wie bereits erwähnt beinhaltet die Promotorregion von RNase 7 potenzielle Bindungsstellen für AP-1. Es ist bekannt, dass AP-1 die Expression von verschiedenen Genen nach Stimulierung mit PMA vermitteln kann (Hobbie et al., 1997; Diaz et al., 2000; Ng et al., 2000). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass AP-1 an der Induktion von RNase 7 durch PMA beteiligt sein könnte und dass die Hemmung dieser Induktion durch Retinsäure auf der Hemmung von AP-1 basieren könnte. Ob diese Hypothese tatsächlich zutrifft, muss in weiteren Experimenten überprüft werden. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass es während und kurz nach einer Behandlung mit Retinsäuren zu einem gehäuften Auftreten von Infektionen insbesondere mit *S. aureus* kam (Graham et al., 1986; Leyden und James, 1987). Deshalb wäre es interessant zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der durch Retinsäure verursachten Hemmung der Induktion von epithelialen antimikrobiellen Proteinen wie z. B. den Beta-Defensinen und RNase 7 und erhöhter epithelialer Infektionsanfälligkeit besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *S. aureus*-Stamm (ATCC 12598) untersucht, dessen Kulturüberstände interessanterweise die nicht-induzierte, konstitutive RNase 7-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene konzentrationsabhängig inhibierten. Dies lässt vermuten, dass *S. aureus* Inhibitoren synthetisiert, die eine Expression von RNase 7 in Keratinozyten inhibieren. Ein ähnlicher Effekt wurde für einen *P. aeruginosa*-Stamm beschrieben, der in der Lage ist, über spezifische Inhibitoren die hBD-2-Expression zu inhibieren und so möglicherweise die Effektorfunktionen des epithelialen Abwehrsystems einschränkt (Dissertation Schwichtenberg, CAU Kiel, 2003). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass potenziell pathogene Bakterien wie *S. aureus* und *P. aeruginosa* in der Lage sind, eine Induktion von Abwehrmaßnahmen durch Epithelzellen, wie z. B. die Induktion von hBD-2 und RNase 7, durch die Synthese entsprechender Inhibitoren zu verhindern. Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, ob es sich

hierbei um eine generelle Strategie der Bakterien zum Überleben im Wirtsorganismus handelt und welche molekularen Eigenschaften diese Inhibitoren besitzen.

4.2.3 RNase 7 besitzt potente antimikrobielle Aktivität

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass RNase 7 nicht nur gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien potente antimikrobielle Aktivität aufweist, sondern auch in niedrigen Konzentrationen die Hefe *Candida albicans* abtötet. Selbst pathogene Bakterien wie Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* und MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*) werden durch RNase 7 mit einer LD₉₀ im nanomolaren Bereich effizient abgetötet. Diese Ergebnisse zeigen, dass RNase 7 ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität aufweist und eines der effektivsten antimikrobiellen Proteine des Menschen darstellt. In vorherigen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das antimikrobielle Protein Psoriasin ein Hauptfaktor der Haut ist und diese vor allem vor einer Besiedlung und Infektion mit dem prävalenten, Gram-negativen Darmkeim *E. coli* zu schützen scheint (Gläser et al., 2005). Für RNase 7 wurde im Rahmen dieser Arbeit besonders hohe Aktivität gegen Enterokokken beobachtet. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass RNase 7 ein Hauptfaktor der Haut ist, der insbesondere infektiöse Gram-positive Darmkeime abtöten könnte.

Die rekombinante RNase 7 zeigt vergleichbare antimikrobielle und Ribonuklease-Aktivität wie die natürliche RNase 7. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von rekombinanter RNase 7, die durch die gezielte Mutation zweier Aminosäuren keine Ribonuklease-Aktivität mehr aufwies, gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 gegen *E. coli* trotz des Verlustes der Ribonuklease-Aktivität voll erhalten bleibt. Auch die Inhibierung der Ribonuklease-Aktivität durch RNase-Inhibitoren hatte keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 (Daten nicht gezeigt). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für die ebenfalls antimikrobiell aktive RNase ECP („eosinophil cationic protein“, RNase 3) dargestellt (Rosenberg, 1995). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass zumindest bei ECP und RNase 7 die antibakterielle Aktivität nicht von der Ribonuklease-Aktivität abhängt. Weitere Studien müssen zeigen, ob die Ribonuklease-Aktivität von RNase 7 eventuell für eine potenzielle antivirale Aktivität verantwortlich ist, so wie es bei den RNasen ECP und

EDN („eosinophil-derived neurotoxin“, RNase 2) der Fall ist (Domachowske et al., 1998). Bei diesen RNasen scheint die Ribonuklease-Aktivität für die antivirale Wirkung essentiell zu sein. In ersten Versuchen konnte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Überla in Bochum gezeigt werden, dass RNase 7 die Infektionsfähigkeit von antiviralen Vektoren in HEK (human embryonic kidney)-Zellen inhibiert (Daten nicht gezeigt). Um zu prüfen, ob für diese antivirale Aktivität auch in diesem Fall die Ribonuklease-Aktivität von Bedeutung ist, wurde ferner die mutierte RNase 7 ohne Ribonuklease-Aktivität hinsichtlich antiviraler Aktivität getestet. Im Gegensatz zu normaler RNase 7 weist die mutierte RNase 7 ohne Ribonuklease-Aktivität jedoch keine antivirale Aktivität auf (Daten nicht gezeigt). Somit scheint die Ribonuklease-Aktivität von RNase 7 für die antivirale Aktivität entscheidend zu sein, nicht aber für die antimikrobielle Aktivität, wie es auch für die RNase ECP gezeigt wurde (Domachowske et al., 1998; Rosenberg, 1995). Diese Beobachtungen geben Anlass zu der Vermutung, dass die menschlichen Epithelien neben der Abwehr von Bakterien und Pilzen auch in der Lage sind, Viren durch die Abgabe von antiviralen Substanzen zu inaktivieren, bevor diese ihre Zielzellen infizieren können.

Es ist ein gut dokumentiertes Phänomen, dass die Haut offenbar mit Ribonuklease-Aktivitäten assoziiert ist, die es notwendig machen, bei molekularbiologischen Arbeiten mit RNA Handschuhe zu benutzen, um einer Degradierung der RNA durch RNasen der Haut vorzubeugen. Erstaunlicherweise sind die mit der Haut assoziierten Ribonuklease-Aktivitäten bisher molekular nicht charakterisiert worden. Die Beobachtung, dass RNase 7 hohe Ribonuklease-Aktivität besitzt und in hohen Mengen von Keratinozyten produziert und freigesetzt wird, lässt vermuten, dass RNase 7 zumindest zum Teil für die hohe, mit der Haut assoziierte Ribonuklease-Aktivität verantwortlich ist.

4.2.4 RNase 7 lässt sich rekombinant in *E. coli* herstellen

Obwohl Psoriasissschuppen und *Stratum corneum* eine gute Quelle für die Isolierung von nativer RNase 7 darstellen, ist die Aufreinigung dieses Proteins mit Hilfe diverser HPLC-Schritte sehr aufwendig. Um größere Mengen an RNase 7 für weitergehende Versuche zu erhalten und für die gezielte Einbringung bestimmter Mutationen wurde versucht, RNase 7 in rekombinanter Form herzustellen. Die Technik der rekombinanten Expression von Proteinen in prokaryotischen Zellen (z. B. *E. coli*)

oder auch eukaryotischen Zellen erlaubt die schnelle und effiziente Produktion von Proteinen in großen Mengen. Als Organismus für die rekombinante Expression von RNase 7 wurde *E. coli* gewählt, da dieses Bakterium aufgrund seiner einfachen Kultivierbarkeit im Labor und seiner schnellen Verdopplungszeit gut für die Expression von rekombinanten Proteinen geeignet ist (Sambrook et al., 1989). Bei der Expression von RNase 7 in *E. coli* war allerdings zu beachten, dass dieses Protein antimikrobiell aktiv ist und effizient *E. coli* abtöten kann, so dass die Expression von RNase 7 in *E. coli* toxisch für das Bakterium sein könnte. Die hohe Aktivität vieler antimikrobieller Proteine gegen *E. coli* könnte ein Grund dafür sein, dass die rekombinante Expression von antimikrobiellen Proteinen in *E. coli* oftmals gescheitert ist (Valore und Ganz, 1997).

Um dieses Problem zu umgehen, wurde mit dem pET-32a-Expressionsvektor von Novagen ein Expressionssystem gewählt, welches es gestattet, das gewünschte Protein als Fusionsprotein zu exprimieren. Durch anschließende Abspaltung des N-terminalen Fusionsabschnittes mittels einer Enterokinase wird das gewünschte Produkt erhalten. Dieses System beinhaltet zwei große Vorteile: Zum einen enthält der N-terminale Fusionsabschnitt eine „His-Tag“-Sequenz (sechs hintereinander gereihete Histidine), welche die einfache und effiziente Aufreinigung mittels einer Nickel-Affinitätssäule erlaubt. Zum anderen besitzt das Fusionsprotein keine antimikrobielle Aktivität, so dass es nicht toxisch auf *E. coli* wirkt.

Tatsächlich ermöglichte die Verwendung dieses Systems die rekombinante Expression von RNase 7 in *E. coli*. Nach Abspaltung des N-terminalen Fusionsproteins zeigte die rekombinante Form von RNase 7 vergleichbare biochemische Eigenschaften und antimikrobielle Aktivität wie native RNase 7. Diese Ergebnisse belegen, dass es möglich ist, gegen *E. coli* wirksame antimikrobielle Proteine in *E. coli* als Fusionsprotein zu exprimieren, die nach Abspaltung des N-terminalen Fusionsabschnittes gleiche funktionelle Eigenschaften wie die nativen Proteine besitzen. Allerdings soll an dieser Stelle auch erwähnt werden, dass versucht wurde, RNase 7 ohne „His-Tag“ als natives Protein mit Start-Methionin am N-Terminus zu exprimieren (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise konnte keine RNase 7 hergestellt werden, was vermutlich an der hohen antimikrobiellen Aktivität von RNase 7 gegenüber *E. coli* liegt und somit zu einem Absterben des Wirtes führt.

4.2.5 Assoziation von RNase 7 mit Hautkrankheiten

Psoriasis ist eine chronische, hyperproliferative, nicht-infektiöse, inflammatorische Erkrankung der Haut (Harder und Schröder, 2005b). Hierbei ist bekannt, dass die Haut von Psoriasis-Patienten stärker mit Mikroorganismen besiedelt ist. Die Zusammensetzung der Bakterienflora unterscheidet sich qualitativ zwar nicht von derjenigen von Kontrollpersonen, die Anzahl der Mikroorganismen ist jedoch signifikant höher (Singh und Rao, 1978). So ist in der Psoriasisläsion eine ca. achtfache, auf unbeeinträchtigtener Haut eine etwa dreifache Bakteriendichte nachweisbar. Umso erstaunlicher ist daher, dass Psoriasis-Patienten signifikant weniger Hautinfektionen aufweisen, als zu erwarten wäre (Henseler und Christophers, 1995). Es könnte daher postuliert werden, dass die große Bakterienzahl im ersten Schritt zu einer verstärkten Expression von induzierbaren antimikrobiellen Proteinen wie z. B. RNase 7 führt. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde RNase 7 aus der Haut biochemisch aufgereinigt (Harder und Schröder, 2002). Die Isolierung gelang aus der Hornschicht (*Stratum corneum*) gesunder Probanden. Es zeigte sich jedoch, dass RNase 7 auch aus Psoriasissschuppen gewonnen werden konnte. Im Vergleich zu *Stratum corneum*-Extrakten gesunder Probanden ließ sich RNase 7 aus Psoriasissschuppenextrakten in etwa zehnfach höherer Menge isolieren.

Auch im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen zeigte sich in der läsionalen Psoriasis-Haut eine ausgeprägte Immunreaktivität für RNase 7, die noch stärker erschien als bei Kontrollpersonen in gleicher Lokalisation. Weiterhin ist die RNase 7 mRNA-Expression in psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder Haut erhöht und auch die Untersuchung von Hautwaschungsflüssigkeiten ergab im Vergleich zu gesunder Haut eine erhöhte RNase 7-Sekretion in läsionaler Psoriasis-Haut. Die verstärkte Expression von RNase 7 und auch anderen antimikrobiellen Proteinen in der psoriatischen Haut (Harder und Schröder, 2005b) könnte in der Folge dazu führen, dass die Mikroorganismen in der läsionalen und nicht-läsionalen Haut der Patienten in ihrem Wachstum kontrolliert werden, so dass trotz der höheren Bakteriendichte eine Infektion ausbleibt.

Eine ebenso weit verbreitete Hautkrankheit ist die atopische Dermatitis. Hierbei handelt es sich um eine chronische Hauterkrankung, die auch als „atopisches Ekzem“ oder „Neurodermitis“ bezeichnet wird. Es ist bekannt, dass die atopische Dermatitis mit Hautinfektionen in den betroffenen Arealen assoziiert ist, die beispielsweise

durch *S. aureus* ausgelöst werden können. In diesen entzündlichen Hautläsionen konnte keine vermehrte Expression der antimikrobiellen Proteine LL-37 und hBD-2 nachgewiesen werden (Ong et al., 2002). Weiterhin demonstrierte die Arbeitsgruppe um B. Schittek, dass die Expression des antimikrobiellen Proteins Dermcidin, welches in den Schweißdrüsen der Haut produziert und in den Schweiß abgegeben wird, im Schweiß von Atopikern reduziert ist (Rieg et al., 2005).

Erste Versuche haben bereits gezeigt, dass auch die RNase 7-Konzentration in Hautwaschungsflüssigkeiten von Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu Probanden mit gesunder Haut erniedrigt ist (Daten nicht gezeigt). Da RNase 7 sehr potente antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* aufweist, könnte man daher vermuten, dass ein Mangel freigesetzter antimikrobieller Proteine wie RNase 7 die Anfälligkeit von Patienten mit atopischer Dermatitis für Hautinfektionen erklärt. Weitere Versuche, in denen eine größere Probandenzahl untersucht werden soll, werden zeigen, ob sich diese Hypothese bestätigen lässt.

4.3 RNase 8

Zu Beginn dieser Arbeit wurde auf genomischer Ebene eine weitere Ribonuklease mit der Bezeichnung RNase 8 identifiziert und als neues Mitglied der RNase A-Familie beschrieben (Zhang et al., 2002). RNase 8 befindet sich wie alle Mitglieder der RNase A-Familie auf Chromosom 14 und liegt nur 15000 Basenpaare von RNase 7 entfernt. Überraschenderweise besitzt RNase 8 zu RNase 7 eine Identität von 78 %. Diese Daten lassen vermuten, dass RNase 7 und RNase 8 beide aus einem gemeinsamen Ursprungs-Gen durch ein Duplikationsereignis entstanden sind.

Um RNase 8 funktionell charakterisieren zu können, sollte das Protein in ausreichenden Mengen rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. RNase 7 konnte mit Hilfe des Vektors pET-32a als Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und durch Proteolyse mit Enterokinase von dem N-terminalen „His-Tag“ abgespalten werden. Daher sollte versucht werden, auch RNase 8 mit dieser Strategie rekombinant zu produzieren. Obwohl das Fusionsprotein erfolgreich exprimiert werden konnte, gelang es trotz Variation der Versuchsbedingungen nicht, den N-terminalen Fusionsabschnitt mittels Enterokinaseproteolyse abzuspalten. Es wurde beschrieben, dass die proteolytische Abspaltung von Fusionsabschnitten wie

„His-Tags“ problematisch sein können (Smyth et al., 2003). Hierfür sind verschiedene Gründe denkbar: Aufgrund der Faltung des Fusionsproteins kann beispielsweise die Schnittstelle für das Enzym unzugänglich sein. Weiterhin wäre es auch möglich, dass das Fusionsprotein als Proteaseinhibitor wirken könnte und daher die Enterokinase in ihrer Aktivität blockiert. Aus diesem Grund wurde eine andere Klonierungsstrategie gewählt und der Vektor pQE-2 der Firma Qiagen verwendet. Auch in diesem System wird ein N-terminal vorhandener „His-Tag“ aus sechs Histidinen nach erfolgreicher Expression des Fusionsproteins abgespalten. Allerdings wird hier eine Dipeptidylpeptidase eingesetzt, die N-terminal Aminosäurepaare abspaltet. Auf diese Weise konnten ausreichende Konzentrationen an rekombinanter RNase 8 in *E. coli* für die funktionelle Charakterisierung hergestellt werden.

Es wurde beschrieben, dass rekombinante RNase 8 im Gegensatz zu RNase 7 nicht antimikrobiell wirksam ist (Zhang et al. 2002). Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen zeigte die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte rekombinante RNase 8 antimikrobielle Aktivität. RNase 8 weist entgegen bisheriger Annahmen ausgeprägte antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien und gegen die Hefe *Candida albicans* in niedrigen Konzentrationen von 0,1-2 μM auf. Auch verschiedene, potenziell pathogene Bakterien wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden effizient von RNase 8 abgetötet. Neben RNase 7 und RNase 8 besitzen auch andere Mitglieder der RNase A-Familie antimikrobielle Eigenschaften. ECP zeigt antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* und *E. coli* in ähnlichen Konzentrationsbereichen wie RNase 7 und RNase 8 (LD_{50} 0,5-1 μM ; Lehrer et al., 1989). Auch Angiogenin (RNase 5) ist in mikromolaren Konzentrationen antimikrobiell aktiv gegen *Streptococcus pneumoniae* und die Hefe *Candida albicans* (Hooper et al., 2003). Durch diese Ergebnisse konnte RNase 8 als ein neues, weiteres, antimikrobielles Mitglied der humanen RNase A-Familie identifiziert werden.

Obwohl RNase 8 die typischen Strukturmerkmale der Ribonukleasen der RNase A-Familie aufweist, besitzt das Protein keine Ribonuklease-Aktivität. Interessanterweise weist dieses Protein dennoch hohe antimikrobielle Aktivität auf. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die antimikrobielle Aktivität der RNasen unabhängig von der Ribonuklease-Aktivität zu sein scheint. In weiterführenden Versuchen soll

rekombinante RNase 8 in Richtung RNase 7 mutiert werden, um zu prüfen, welche Strukturen notwendig sind, damit die Ribonuklease-Aktivität ausgebildet wird.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, in welchen Geweben die RNase 8 mRNA exprimiert wird. Eine RNase 8 mRNA-Expression ist entgegen den Literaturangaben nicht nur in der Plazenta (Zhang et al. 2002), sondern auch in der Haut und in der Trachea nachweisbar. Mittels „real-time“-PCR-Analysen konnte eine Genexpression von RNase 8 auch in primären Keratinozyten nachgewiesen werden. Die RNase 8 mRNA-Expression ließ sich durch Behandlung primärer Keratinozyten mit Überständen adhärent gewachsener *P. aeruginosa*-Kulturen induzieren. Die Expression von RNase 8 in primären Keratinozyten wurde bisher allerdings nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Das Protein konnte noch nicht aus Hautextrakten, Keratinozyten oder deren Kulturüberständen aufgereinigt werden. Da eine mRNA-Synthese nicht automatisch zu der Synthese des entsprechenden Proteins führen muss (Lewin, 1994), bleibt zu untersuchen, ob die Induktion der RNase 8 mRNA-Expression in Keratinozyten mit einer gesteigerten Produktion des Proteins korreliert. Zu diesem Zweck sollen in weiterführenden Versuchen mit Hilfe von rekombinanter RNase 8 spezifische Antikörper generiert werden. Damit soll untersucht werden, ob RNase 8-Protein von primären Keratinozyten oder humaner Haut produziert wird.

Aufgrund der hohen antimikrobiellen Aktivität gegen verschiedene, potenziell pathogene Erreger und der Induzierbarkeit durch Bakterien kann man vermuten, dass RNase 8 die menschliche Haut und andere Epithelien gegen Infektionen schützt und somit eine wichtige Rolle in der epithelialen Abwehr spielen könnte.

4.4 Weitere Eigenschaften antimikrobieller Proteine

Für viele antimikrobielle Proteine wurden neben der antimikrobiellen Aktivität weitere Eigenschaften beschrieben. So besitzen die Beta-Defensine hBD-2 und hBD-3 beispielsweise nicht nur antimikrobielle Eigenschaften, sondern es wurde gezeigt, dass diese Proteine chemotaktische Aktivität für T-Helferzellen und dendritische Zellen besitzen, die über den CCR6-Rezeptor vermittelt wird (Yang et al., 1999; Wu et al., 2003). Die Beta-Defensine können somit bestimmte Effektorzellen zum Ort der Infektion locken und als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem

Immunsystem fungieren. Auch das antimikrobielle Protein LL-37 weist weitere Funktionen auf und scheint neben der direkten antimikrobiellen Wirkung auch an der Reepithelialisierung von Hautwunden beteiligt zu sein (Heilborn et al., 2003). Kürzlich konnte ferner ein Effekt von LL-37 auf die Angiogenese beobachtet werden (Koczulla et al., 2003). Weiterhin wurde beschrieben, dass LL-37 über den Formylpeptid-ähnlichen Rezeptor 1 chemotaktisch auf Neutrophile, Monozyten und T-Zellen wirkt (De et al., 2000). Niyonsaba et al. konnten außerdem zeigen, dass LL-37 in Mastzellen Chemotaxis induziert (Niyonsaba et al., 2002). Diese Beobachtungen demonstrieren, dass auch LL-37 neben seiner antimikrobiellen Aktivität die Fähigkeit besitzt, Effektorzellen zu Entzündungsorten zu locken.

Die physiologische Bedeutung der Mitglieder der RNase A-Familie ist noch nicht geklärt. Die antiviralen Aktivitäten von EDN und ECP sowie die antibakterielle und antiparasitische Aktivität von ECP lassen vermuten, dass diese beiden durch eosinophile Granulozyten produzierten Ribonukleasen für ein durch eosinophile Granulozyten vermitteltes Abwehrsystem von Bedeutung sind (Rosenberg und Domachowske, 1999). Für RNase 5 (Angiogenin) wurde gezeigt, dass es angiogene (Badet, 1999) und antimikrobielle (Hooper et al., 2003) Aktivität besitzt. Dies zeigt, dass die antimikrobiellen Eigenschaften der Ribonukleasen offenbar von wesentlicher Bedeutung sind. Es bleibt zu prüfen, ob RNase 7 und RNase 8 neben ihren antimikrobiellen Eigenschaften noch über weitere relevante physiologische Eigenschaften verfügen.

4.5 Mechanismen von antimikrobiellen Proteinen

Durch welche Mechanismen RNase 7 ihre antimikrobielle Wirkung ausübt, ist noch nicht geklärt. Es ist allerdings interessant, dass RNase 7 bereits in nanomolaren Konzentrationen z. B. gegen Enterokokken antimikrobiell aktiv ist. Da die Ribonuklease-Aktivität zumindest für die antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* nicht verantwortlich ist, wäre möglich, dass RNase 7 über einen anderen Mechanismus wirkt. RNase 7 ist ein extrem kationisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 10,1. Auch die RNase ECP ist mit einem pI > 11 sehr kationisch. Daher wurde vermutet, dass die positive Ladung von ECP für die antimikrobielle Aktivität relevant ist (Carreras et al., 2003); diese Tatsache könnte auch im Wirkmechanismus von RNase 7 eine Bedeutung haben. Allgemein wird diskutiert, dass kationische

antimikrobielle Proteine aufgrund ihres amphiphilen Charakters in der Lage sind, in die Bakterienmembran einzudringen und dort durch Oligomerisierung Poren auszubilden (Lehrer, 2004). Auch im Fall der RNase ECP wurde dieser Mechanismus vorgeschlagen (Young et al., 1986); eine Wirkungsweise, die ebenso für RNase 7 denkbar wäre. Allerdings konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass sich bei mit hBD-3 abgetöteten *S. aureus*-Kulturen die Zellwand ablöst (Harder et al., 2001). Somit könnte im Falle vom hBD-3 auch die Zellwand ein primäres Ziel dieses antibiotischen Proteins sein. Diese Hypothese wird dadurch gestärkt, dass *S. aureus* nach Inkubation mit dem in die Zellwandsynthese eingreifenden Antibiotikum Penicillin eine ähnliche Morphologie aufweist wie ein mit hBD-3 behandelte *S. aureus* (Giesbrecht et al., 1998, Harder et al., 2001). Im Gegensatz dazu scheint das antimikrobielle Protein Psoriasin nicht die äußere Hülle der Bakterien als primären Wirkungsort für seine antimikrobielle Aktivität zu nutzen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von durch Psoriasin abgetöteten *E. coli* zeigten keine Zeichen von Membran- oder Zellwandschäden (Gläser et al., 2005). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Psoriasin durch Inkubation mit Zink-Ionen gehemmt wird (Gläser et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eventuell der Entzug von essentiellen Zink-Ionen die *E. coli* zum Absterben bringt. Ob ähnliche Mechanismen wie die hier für die Defensine oder Psoriasin beschriebenen auch für die Wirkungsweise von RNase 7 in Frage kommen, muss in weiteren Studien untersucht werden.

4.6 Bedeutung von antimikrobiellen Proteinen für die Infektionsabwehr

Inzwischen sind Erkrankungen bekannt, in deren Pathogenese antimikrobielle Proteine eine entscheidende Rolle spielen könnten. So wurde *in vivo* anhand eines Mausmodells erstmals gezeigt, dass die endogene Expression des Cathelizidins CRAMP („Cathelin-related antimicrobial peptide“; das murine Homolog zu humanem LL-37) der Maus die Abwehr gegen eine invasive bakterielle Infektion unterstützt (Nizet et al., 2001). So waren CRAMP-negative „knock-out“-Mäuse bedeutend anfälliger gegenüber Hautinfektionen durch Streptokokken der Gruppe A (Nizet et al., 2001).

Es wäre interessant, auch die Bedeutung von RNase 7 im Mausmodell zu untersuchen. Durch Datenbankanalysen haben wir allerdings festgestellt, dass es weder von RNase 7, noch von RNase 8 Orthologe in der Maus gibt und somit keine „knock-out“-Mäuse generierbar sind.

Auch im Gastrointestinaltrakt, wo ein direkter Kontakt der Schleimhaut mit der Bakterienflora eine ständige Abwehr potenziell infektiöser Erreger erfordert, spielen antimikrobielle Proteine eine wichtige Rolle. Die Darmepithelien exprimieren und sezernieren die Alpha-Defensine HD-5 und HD-6 sowie das Beta-Defensin hBD-1 (O'Neil et al., 1999). Die Bedeutung der Defensine in der Schleimhautbarriere verdeutlicht eine Studie, bei der gezeigt werden konnte, dass Mäuse mit einem Defekt in der Prozessierung der Defensine im Darm empfänglicher für eine Infektion oral verabreichter Pathogene wie etwa *Salmonella typhimurium* sind (Wilson et al., 1999). In einer weiteren Arbeit konnte demonstriert werden, dass transgene Mäuse, die zusätzlich das humane Defensin HD-5 in den Panethzellen exprimieren, deutlich länger nach einer Infektion mit *Salmonella typhimurium* überleben als Wildtyp-Tiere (Salzman et al., 2003).

Die Bedeutung der Beta-Defensine konnte auch die Arbeitsgruppe um T. Ganz demonstrieren, indem eine hBD-2-überexprimierende Tumor-Zelllinie in Maushaut implantiert wurde. Nach Injektion von *E. coli*-Kulturen in die transplantierten Zellen, waren in den mit hBD-2-transfizierten Zellen weniger lebende *E. coli* detektierbar (Huang et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass RNase 7 eines der dominierenden antimikrobiellen Proteine in den Überständen kultivierter primärer Keratinozyten darstellt. Diese Beobachtung legt nahe, dass RNase 7 ein wichtiges antimikrobielles Protein der primären Keratinozyten ist. Nach Vorinkubation der Keratinozyten-Überstände mit RNase 7-neutralisierenden Antikörpern war eine Reduktion der antimikrobiellen Aktivität der Überstände zu beobachten. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass RNase 7 einen wichtigen Bestandteil der antimikrobiellen Abwehr von Keratinozyten darstellt. In Hautwaschungen hautgesunder Probanden konnten wir weiterhin zeigen, dass RNase 7 sezerniert wird. Verschiedene Probanden wiesen an unterschiedlichen Lokalisationen keine RNase 7-Sekretion auf. Gesamt gesehen zeigte sich eine große Variabilität, die sich durch die Stimulierbarkeit von RNase 7 erklären ließe: je nach Bakterienbesiedlung, die bei jedem Menschen unterschiedlich

ist, werden unterschiedliche Mengen an RNase 7 sezerniert. Um auch die *in vivo*-Relevanz von RNase 7 zu prüfen, soll nun in weiteren Versuchen untersucht werden, ob die menschliche Haut nach Vorinkubation mit den neutralisierenden RNase 7-Antikörpern verminderte antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* oder *S. aureus* aufweist.

Einen weiteren wichtigen Hinweis in Bezug auf die physiologische Relevanz von RNase 7 brachte eine in dieser Arbeit generierte, polyklonale stabile HaCaT-Keratinocyten-Zelllinie, die RNase 7 überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zelllinie RNase 7 nahezu vollständig in den Überstand sezerniert. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Datenbankanalysen, welche ergaben, dass die RNase 7-Aminosäuresequenz eine N-terminale Signalsequenz besitzt, die für die Sezernierung von RNase 7 verantwortlich zu sein scheint. Die Sekretion von RNase 7 ist ein weiterer Hinweis darauf, dass eine der Hauptfunktionen von RNase 7 die extrazelluläre Abwehr von Mikroorganismen sein könnte. Diese Hypothese wird auch durch immunhistochemische Untersuchungen gestützt, die ergeben haben, dass RNase 7 verstärkt in den äußeren Schichten der Epidermis exprimiert wird, also dort, wo der erste Kontakt mit Mikroorganismen stattfindet. Es muss nun nachfolgend untersucht werden, ob die Kulturüberstände RNase 7-überexprimierender Zellen auch erhöhte antimikrobielle Aktivität aufweisen.

4.7 Einsatz antimikrobieller Proteine als Therapeutika

Antibiotika sind niedermolekulare, organische Substanzen, die von Mikroorganismen produziert werden und entweder andere Mikroorganismen abtöten oder deren Wachstum inhibieren (American Heritage Stedman's Medical Dictionary, 2004). Viele Mikroorganismen sind allerdings in der Lage, Enzyme zu produzieren, welche die Wirkung antimikrobieller Substanzen aufheben können. Diese Antibiotikaresistenzen könnten in naher Zukunft ein großes Problem darstellen, da Ärzten dann unter Umständen keine effektiven Therapien mehr zur Bekämpfung bakterieller Infektionen zur Verfügung stehen. Es wird geschätzt, dass in den USA die Hälfte aller *S. aureus*-Stämme, die in vielen medizinischen Einrichtungen gefunden werden, gegenüber Antibiotika wie Methicillin resistent sind (Segreti, 2005). Daher sollte der Fokus der nächsten Jahre auf die Entwicklung alternativer Antibiotika gerichtet sein. Idealerweise sollten diese Substanzen natürlichen Ursprungs sein und einen weiten

Bereich antimikrobieller Aktivität aufweisen. Zudem sollten sie einfach herzustellen sein und keine Resistenzen induzieren. Antimikrobielle Proteine mit tierischem Ursprung könnten dabei eine effektive Alternative zu konventionell verwendeten Antibiotika für therapeutische Zwecke sein (Hancock und Chapple, 1999). Erste Versuche in dieser Richtung haben eine limitierte Resistenz der antimikrobiellen Proteine gegenüber den getesteten Bakterienstämmen gezeigt. (Zasloff, 2002). Diese Merkmale machen antimikrobielle Proteine zu einem vielversprechenden Arsenal an Substanzen, die die konventionellen Antibiotika ergänzen bzw. ersetzen könnten. Die Beobachtung, dass RNase 7 auch hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber multiresistenten Erregern wie Vancomycin-resistenten Enterokokken und MRSA aufweist, wirft die Frage auf, ob sich dieses Molekül zur Therapie von Infektionserkrankungen eignen könnte. Auch hBD-3 ist hochaktiv gegen Gram-positive Erreger wie *S. aureus* (Harder et al., 2001). Es zeigte sich dabei, dass im Gegensatz zu herkömmlichen Antibiotika auch nach 30 Inkubations-Passagen von *S. aureus* mit subletalen Konzentrationen an hBD-3 noch keine resistenten Bakterien nachweisbar waren (Jürgen Harder, persönliche Mitteilung). Offenbar ist es für die Bakterien nicht ohne weiteres möglich, ihre Struktur derartig zu ändern, dass hBD-3 nicht mehr wirken kann. Neuere Untersuchungen konnten allerdings zeigen, dass *E. coli* und *P. fluorescens* nach Kultivierung mit subletalen Dosen des Magainin-Analogons Pexiganan nach 600-700 Generationen Resistenzen ausgebildet haben (Perron et al., 2005). Somit sind weitere Studien erforderlich, um zu klären, ob antimikrobielle Proteine durch vermehrte Anwendung zu einer Resistenzentwicklung bei Mikroorganismen führen könnten.

Im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz von RNase 7 war es wichtig zu klären, ob das antimikrobielle Protein die Integrität eukaryotischer Zellen beeinflusst. Dafür wurden humane Erythrozyten über einen Zeitraum von 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an RNase 7 inkubiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch hohe Konzentrationen bis zu 400 µg/ml RNase 7 nicht zur Lyse von Erythrozyten führen. Es ist außerdem bekannt, dass hohe Konzentrationen RNase 7 (200 µg/ml) für primäre Keratinozyten keine zytotoxischen Eigenschaften aufweisen (Harder und Schröder, 2002). Weiterhin ist beschrieben worden, dass die Anwesenheit von NaCl in physiologischen Konzentrationen verschiedene antimikrobielle Proteine hemmen kann (Tam et al., 2002). Es wird vermutet, dass die elektrostatische Interaktion der Ladungen von antimikrobiellen Proteinen mit der

Zellmembran von Mikroorganismen ein salzempfindlicher Prozess ist, der auch Einfluss auf die Spezifität der antimikrobiellen Proteine nehmen kann. Um die biologische Relevanz der antimikrobiellen Aktivität von RNase 7 unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde der Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen auf die antimikrobielle Wirksamkeit von RNase 7 analysiert. RNase 7 führte dosisabhängig bei allen analysierten Salzkonzentrationen zu einer Abtötung von *E. coli* und *S. aureus*. Der Salzgehalt der Hautoberfläche liegt je nach Messmethode bei ca. 10 mM NaCl, während Schweiß etwa 60 mM NaCl enthält (Grice et al., 1975). Auch bei diesen Salzkonzentrationen wurden 100 % der KBE von *E. coli* und *S. aureus* durch RNase 7 abgetötet. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass RNase 7 auch im physiologischen pH-Bereich der Haut (5,4-5,9; Braun-Falco und Korting, 1986) antimikrobiell aktiv ist. Diese Daten demonstrieren, dass RNase 7 auch unter physiologischen Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen auf der Haut eine höchst effektive antimikrobielle Wirkung besitzt.

Da RNase 7 nicht salz- und pH-abhängig ist, keine Hämolyse von Erythrozyten bewirkt und auch gegen multiresistente Erreger wie Enterokokken aktiv ist, wird jetzt versucht, die rekombinante Expression zu optimieren, um RNase 7 in großer Menge herzustellen. Hohe Mengen an RNase 7 werden benötigt, um die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 *in vivo* testen zu können und um zu prüfen, ob sich RNase 7 als Therapeutikum einsetzen lässt.

5. Zusammenfassung

Obwohl die menschliche Haut permanent einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen ausgesetzt ist, kommt es erstaunlicherweise nur selten zu Infektionen. An dieser natürlichen Resistenz der Haut ist neben der physikalischen Barriere auch eine „chemische Barriere“ beteiligt. Diese basiert u. a. auf der Wirkung diverser konstitutiv exprimierter und induzierbarer antimikrobieller Proteine (AMP). Zu diesen AMP gehört die von unserer Arbeitsgruppe in Vorarbeiten aus *Stratum corneum*-Extrakten gesunder Haut isolierte RNase 7. Da über die Bedeutung von RNase 7 für die angeborene Immunabwehr wenig bekannt war, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Regulation und die Expression von RNase 7 in Keratinozyten und ihre antimikrobiellen Eigenschaften im Detail untersucht.

Auf Transkriptions- und Translationsebene konnte RNase 7 als eines der dominierenden AMP der Haut identifiziert werden. Für die hohe basale Grundexpression von RNase 7 ist das einzige Intron des RNase 7-Gens essentiell. Obwohl hohe Mengen an RNase 7 konstitutiv von primären Keratinozyten produziert werden, lässt sich die Expression durch Stimulation mit Kulturüberständen verschiedener Bakterien noch weiter steigern.

Zur funktionellen Charakterisierung wurde RNase 7 in großen Mengen benötigt und sollte daher rekombinant hergestellt werden. Um das Protein in *E. coli* produzieren zu können, musste eine besondere Strategie gewählt werden, da RNase 7 für *E. coli* toxisch ist. Dieses gelang in Form eines nicht-toxischen Fusionsproteins, welches nach Abspaltung des N-terminalen Fusionsabschnittes der nativen RNase 7 vergleichbare antimikrobielle Eigenschaften und Ribonuklease-Aktivität besaß.

RNase 7 konnte als eines der aktivsten AMP des Menschen identifiziert werden, mit einem weiten Spektrum an Aktivität, auch gegen multiresistente Erreger, insbesondere gegenüber Vancomycin-resistenten Enterokokken. Um Hinweise auf den möglichen antimikrobiellen Wirkmechanismus zu erhalten, wurde durch gezielte Mutation von zwei Aminosäuren rekombinante RNase 7 ohne Ribonuklease-Aktivität generiert. Mittels dieser Mutante konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 nicht auf der Ribonuklease-Aktivität basiert.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit RNase 7-spezifische, polyklonale Antikörper generiert, durch die erstmalig eine Analyse der RNase 7-Proteinexpression möglich wurde. Mittels ELISA-Analysen wurde RNase 7 als eines

der dominierenden AMP in den Kulturüberständen von primären Keratinozyten identifiziert. Die Inhibition von RNase 7 durch die Antikörper und die daraus resultierende Abnahme der antimikrobiellen Aktivität der Keratinozytenüberstände, demonstriert die funktionelle Bedeutung von RNase 7 als AMP der Keratinozyten. Immunhistologische Untersuchungen ergaben, dass RNase 7 verstärkt von den äußeren Schichten der Epidermis exprimiert wird. Dies konnte auch durch die Detektion von RNase 7 in Waschlösungen der Haut bestätigt werden. Vergleichende Analysen ergaben, dass die RNase 7-Konzentration in Waschlösungen der Haut von Psoriasis-Patienten erhöht ist. Läsionale Haut dieser Patienten weist trotz hoher Bakterienbesiedlung auffallend wenig Infektionen auf. Dieses Phänomen könnte durch die erhöhte Expression von AMP, wie z. B. RNase 7 erklärt werden.

Eine weitere Ribonuklease, RNase 8, weist 78 % Sequenzidentität zu RNase 7 auf. Dennoch wurde überraschenderweise beschrieben, dass ein RNase 8-Fusionsprotein keine antimikrobielle Aktivität zeigt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit RNase 8 rekombinant hergestellt, der Fusionsabschnitt abgespalten und das Protein hinsichtlich antimikrobieller Aktivität analysiert. Im Gegensatz zu den Literaturdaten konnte hohe antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene, auch multiresistente Erreger festgestellt werden. Weiterhin wurde erstmalig die RNase 8 cDNA aus primären Keratinozyten kloniert, und es konnte gezeigt werden, dass die RNase 8 mRNA-Expression in Keratinozyten durch Überstände von *Pseudomonas aeruginosa* induziert wird.

Die potente antimikrobielle Aktivität von RNase 7 und RNase 8 sowie die hohe konstitutive Expression von RNase 7 in Keratinozyten lassen vermuten, dass antimikrobielle Ribonukleasen eine wichtige Bedeutung für die kutane Infektionsabwehr besitzen. Die hier vorliegenden Ergebnisse bilden somit eine wichtige Grundlage für zukünftige therapeutische Ansätze. Hier ist zu untersuchen, ob sich AMP wie RNase 7 und RNase 8 bzw. deren gezielte Induktion zur Prophylaxe und Therapie von Infektionserkrankungen eignen. Dies scheint insbesondere vor dem Hintergrund der Resistenzzunahme von Bakterien gegenüber konventionellen Antibiotika von wichtiger klinischer Relevanz.

6. Summary

Although permanently exposed to various potentially pathogenic microorganisms, human skin is surprisingly highly resistant against infections. In addition to its physical barrier function the skin provides a chemical barrier based on the production of constitutively as well as inducibly expressed antimicrobial proteins (AMPs). In previous work, RNase 7 was isolated from *stratum corneum* extracts and was identified as a new AMP of healthy human skin. To gain more insight into the role of RNase 7 in cutaneous innate immunity, the regulation and expression of RNase 7 in keratinocytes as well as its antimicrobial characteristics were analysed in detail.

This work revealed RNase 7 as one of the predominant AMPs of the skin both on transcriptional and translational level. The single intron of the RNase 7 gene was found to be essential for the high basal gene expression of RNase 7. Despite the high constitutive expression level of RNase 7, its expression can be further induced by stimulation with different bacterial supernatants.

To perform a functional characterisation of RNase 7, a sufficient amount of the protein is necessary. Given that the AMP RNase 7 is toxic for *E. coli*, a non-toxic RNase 7 fusion protein was generated and expressed within this host. After purification and subsequent removal of the N-terminal fusion part, the recombinant RNase 7 showed antimicrobial properties as well as ribonuclease activity comparable to its native form. RNase 7 was identified as one of the most potent human AMP, containing a broad spectrum of antimicrobial activity even towards multiresistant pathogens, especially Vancomycin resistant *Enterococci*. To analyse the role of the ribonuclease activity for the antimicrobial activity of RNase 7, a recombinant RNase 7 protein with impaired ribonuclease but potent antimicrobial activity was generated by site directed mutagenesis. This revealed that ribonuclease activity is not necessary for antimicrobial activity of RNase 7.

Monitoring the protein expression of RNase 7 was a further aim of this study. Therefore, an RNase 7 specific polyclonal antibody was generated and an ELISA was established. This allowed the identification of RNase 7 as one of the predominant AMPs in cultured supernatants of keratinocytes. Blocking the antimicrobial activity of RNase 7 with the specific antibody revealed a distinct

decrease in antimicrobial activity of the keratinocyte-derived supernatants, highlighting the functional importance of RNase 7 as an AMP in keratinocytes.

Immunohistological studies revealed that RNase 7 is predominantly expressed in the outer layers of the epidermis. RNase 7 was also detected in washing solutions of the skin, especially in those derived from psoriatic patients. Despite high bacterial density found on the surface of psoriatic skin, psoriasis patients suffer fewer cutaneous infections than would be expected. This effect might be due to an increased expression of RNase 7 and other AMPs in psoriatic skin.

Another Ribonuclease was previously described and termed RNase 8. Although RNase 8 shares 78 % amino acid identity with RNase 7, a recombinant expressed RNase 8 fusion protein was reported to be without antimicrobial activity. However, in this study recombinant generated RNase 8 was identified as an AMP highly active against different bacteria, including multiresistant pathogens. For the first time the RNase 8 gene was cloned from primary keratinocytes. Furthermore, RNase 8 mRNA expression in primary keratinocytes was induced upon stimulation with supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* cultures.

The potent antimicrobial activity of RNase 7 and RNase 8 as well as the high constitutive RNase 7 expression in keratinocytes suggest that antimicrobial ribonucleases contribute significantly to cutaneous antimicrobial defense. The results shown here provide an important basis for future therapeutic approaches. Further studies have to explore whether AMPs such as RNase 7 and RNase 8 and their artificial induction might be useful in prophylaxis and therapy of infectious diseases. This is of fundamental clinical interest, especially with regard to the increasing resistance to conventional antibiotics.

7. Literaturverzeichnis

Aly R, Maibach HI, Shinefield HR, Strauss WG. 1972. Survival of pathogenic microorganisms on human skin. *J Invest Dermatol* 58: 205-210.

Anfinsen CB, Redfield RR, Choate WL, Page J, Carroll WR. 1954. Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem* 207: 201-210.

Badet J. 1999. Angiogenin, a potent mediator of angiogenesis. Biological, biochemical and structural properties. *Pathol Biol* 47: 345-351.

Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, Corcoran S, Fry L. 2003. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 148: 670-679.

Barra D, Simmaco M. 1995. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol* 13: 205-209.

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. 1995. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368: 331-335.

Boman HG. 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173: 5-16.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771.

Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL. 2005. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125: 9-13.

Braun-Falco O, Korting HC. 1986. Normal pH value of human skin. *Hautarzt* 37: 126-129.

Bujard H, Gentz R, Lanzer M, Stueber D, Mueller M, Ibrahim I, Haeuptle MT, Dobberstein B. 1987. A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol* 155: 416-433.

Carreras E, Boix E, Rosenberg HF, Cuchillo CM, Nogues MV. 2003. Both aromatic and cationic residues contribute to the membrane-lytic and bactericidal activity of eosinophil cationic protein. *Biochemistry* 42: 6636-6644.

De Y, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 192: 1069-1074.

- Diamond G, Zasloff M, Eck H, Basseur M, Maloy WL, Bevins CL. 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.
- Diaz BV, Lenoir MC, Ladoux A, Frelin C, Demarchez M, Michel S. 2000. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem* 275: 642-650.
- Domachowske JB, Dyer KD, Adams AG, Leto TL, Rosenberg HF. 1998. Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res* 26: 3358-3363.
- Elias PM. 2005. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 125: 183-200.
- Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. 1993. *Dermatology in general medicine*. McGraw-Hill, New York.
- Fleming A. 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc Roy Soc Ser B* 93: 306-317.
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8998-9002.
- Gallo RC. 1971. Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* 234: 194-198.
- Gallo RL, Nizet V. 2003. Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 3: 402-409.
- Ganz T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 710-720.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76: 1427-1435.
- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. 1998. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1371-1414.
- Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 6: 57-64.
- Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. 1986. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3146-3150.
- Gordon S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111: 927-930.

- Graham ML, Corey R, Califf R, Phillips H. 1986. Isotretinoin and *Staphylococcus aureus* infection. A possible association. *Arch Dermatol* 122: 815-817.
- Grice K, Sattar H, Casey T, Baker H. 1975. An evaluation of Na⁺, Cl⁻ and pH ion-specific electrodes in the study of the electrolyte contents of epidermal transudate and sweat. *Br J Dermatol* 92: 511-518.
- Hancock RE, Chapple DS. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1317-1323.
- Handen JS, Rosenberg HF. 1997. Intronic enhancer activity of the eosinophil-derived neurotoxin (RNS2) and eosinophil cationic protein (RNS3) genes is mediated by an NFAT-1 consensus binding sequence. *J Biol Chem* 272: 1665-1669.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387: 861.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. 2001. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276: 5707-5713.
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM. 2004. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 123: 522-529.
- Harder J, Schröder JM. 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277: 46779-46784.
- Harder J, Schröder JM. 2005a. Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy* 86: 22-41.
- Harder J, Schröder JM. 2005b. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol* 77: 476-486.
- Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. 2003. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 120: 379-389.
- Henseler T, Christophers E. 1995. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 32: 982-986.
- Hetru C, Troxler L, Hoffmann JA. 2003. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infect Dis* 187 Suppl 2: S327-S334.
- Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE. 1997. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 159: 5550-5559.
- Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. 2003. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 4: 269-273.

- Howell MD, Jones JF, Kisich KO, Streib JE, Gallo RL, Leung DY. 2004. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J Immunol* 172: 1763-1767.
- Huang GT, Zhang HB, Kim D, Liu L, Ganz T. 2002. A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities in vivo. *Hum Gene Ther* 13: 2017-2025.
- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9436-9440.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.
- Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M. 2002. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 30: 185-194.
- Klenha J, Krs V. 1967. Lysozyme in mouse and human skin. *J Invest Dermatol* 49: 396-399.
- Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 111: 1665-1672.
- Kunkel TA. 1992. DNA replication fidelity. *J Biol Chem* 279: 16895-16898.
- Lehrer RI. 2004. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2: 727-738.
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11: 105-128.
- Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ. 1989. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol* 142: 4428-4434.
- Lewin B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York.
- Leyden JJ, James WD. 1987. Staphylococcus aureus infection as a complication of isotretinoin therapy. *Arch Dermatol* 123: 606-608.
- Lindl T, Bauer J. 1994. *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Love JM, Gudas LJ. 1994. Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 6: 825-831.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.

- Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett* 486: 185-190.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Murray PJ. 2005. NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr Opin Immunol* 17: 352-358.
- Newton CR, Graham A. 1994. PCR. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Ng DC, Shafae S, Lee D, Bikle DD. 2000. Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem* 275: 24080-24088.
- Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I. 2002. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 106: 20-26.
- Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjamas V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL. 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414: 454-457.
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276: 4812-4818.
- O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. 1999. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 163: 6718-6724.
- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 347: 1151-1160.
- Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T. 2003. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 74: 180-182.
- Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. 1999. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341: 501-513.
- Ouellette AJ, Greco RM, James M, Frederick D, Naftilan J, Fallon JT. 1989. Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. *J Cell Biol* 108: 1687-1695.
- Pfahl M. 1993. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* 14: 651-658.
- Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Szell M, Beer Z, Bata-Csorgoo Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozy A, Kemeny L. 2003. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 15: 721-730.

- Pivarcsi A, Kemeny L, Dobozy A. 2004. Innate immune functions of the keratinocytes. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 51: 303-310.
- Pungercar J, Anderluh G, Macek P, Franc G, 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.
- Rieg S, Steffen H, Seeber S, Humeny A, Kalbacher H, Dietz K, Garbe C, Schittek B. 2005. Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J Immunol* 174: 8003-8010.
- Rosenberg HF. 1995. Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity. *J Biol Chem* 270: 7876-7881.
- Rosenberg HF, Domachowske JB. 1999. Eosinophils, ribonucleases and host defense: solving the puzzle. *Immunol Res* 20: 261-274.
- Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422: 522-526.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24: 104-108.
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379.
- Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C. 2001. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2: 1133-1137.
- Schröder JM. 1999. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 57: 121-134.
- Schröder JM, Harder J. 1999. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 645-651.
- Schule R, Rangarajan P, Yang N, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Verma IM, Evans RM. 1991. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6092-6096.
- Schwichtenberg L. 2003. Die Bedeutung Pathogen-assoziiierter Moleküle bei der Induktion epithelialer antimikrobieller Proteine und proinflammatorischer Zytokine. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Segreti J. 2005. Efficacy of current agents used in the treatment of Gram-positive infections and the consequences of resistance. *Clin Microbiol Infect* 11 Suppl 3: 29-35.

- Singh G, Rao DJ. 1978. Bacteriology of psoriatic plaques. *Dermatologica* 157: 21-27.
- Smyth DR, Mrozkievicz MK, McGrath WJ, Listwan P, Kobe B. 2003. Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci* 12: 1313-1322.
- Song PI, Park YM, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparidze N, Armstrong CA, Ansel JC. 2002. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* 119: 424-432.
- Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60-89.
- Tam JP, Lu YA, Yang JL. 2002. Correlations of cationic charges with salt sensitivity and microbial specificity of cystine-stabilized beta -strand antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 277: 50450-50456.
- Tang X, Nakata Y, Li HO, Zhang M, Gao H, Fujita A, Sakatsume O, Ohta T, Yokoyama K. 1994. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 22: 2857-2858.
- Tiffany HL, Handen JS, Rosenberg HF. 1996. Enhanced expression of the eosinophil-derived neurotoxin ribonuclease (RNS2) gene requires interaction between the promoter and intron. *J Biol Chem* 271: 12387-12393.
- Valore EV, Ganz T. 1997. Laboratory production of antimicrobial peptides in native conformation. *Methods Mol Biol* 78: 115-131.
- Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schröder JM, Harder J. 2005. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem*.
- Weinberg AN, Swartz MN. 1993. Bacterial diseases with cutaneous involvement. In: Fitzpatrick TB, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. *Dermatology in general medicine*. McGraw-Hill, New York.
- Wiedow O, Schröder JM, Gregory H, Young JA, 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, Christophers E. 1998. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 904-909.
- Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286: 113-117.

Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulegue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W. 2003. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8880-8885.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525-528.

Yasuda S, Wada S, Arao Y, Kogawa M, Kayama F, Katayama S. 2004. Interaction between 3' untranslated region of calcitonin receptor messenger ribonucleic acid (RNA) and adenylate/uridylate (AU)-rich element binding proteins (AU-rich RNA-binding factor 1 and Hu antigen R). *Endocrinology* 145: 1730-1738.

Yazdanbakhsh M, Tai PC, Spry CJ, Gleich GJ, Roos D. 1987. Synergism between eosinophil cationic protein and oxygen metabolites in killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 138: 3443-3447.

Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA. 1986. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 321: 613-616.

Zaiou M, Gallo RL. 2002. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med* 80: 549-561.

Zasloff M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5449-5453.

Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF. 2002. RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic Acids Res* 30: 1169-1175.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ACN | Acetonitril |
| AMP | Antimikrobielles Protein |
| AP-1 | Transkriptions-Aktivierungsprotein 1 |
| <i>aqua dest.</i> | Destilliertes Wasser |
| ATCC | „American Type Culture Collection“ |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| cDNA | „mRNA complementary DNA“ = komplementäre DNA |
| CF | Cystische Fibrose |
| cy5 | Cyaninfarbstoff 5 |
| Da | Dalton |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | „Dulbecco’s modified Eagle’s medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | „desoxyribonucleic acid“ = Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| dNTP | Desoxynukleosid-triphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | „Enzyme-linked immunosorbent assay“ |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> = und andere |
| FCS | „Fetal calf serum“ = fetales Kälberserum |
| g | Erdbeschleunigung |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GSP | Genspezifischer Primer |
| h | Stunde |
| HaCaT | „Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes“ |
| hBD | Humanes Beta-Defensin |
| HCl | Salzsäure |
| HPLC | „High performance liquid chromatography“ = Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie |
| kDa | Kilo-Dalton |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| kb | Kilo Basenpaare |
| KBE | Koloniebildende Einheiten |
| KLH | „Keyhole limpet hemocyanin“ |
| LB-Medium | Luria Bertani-Medium |
| LD ₉₀ | Letale Dosis 90 % |
| M | Molar (mol/l) |
| MR | Methicillin-resistent |
| MRSA | Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> |
| min | Minute |
| mRNA | „messenger RNA“ |
| NCTC | „National Collection of Type Cultures“ |

| | |
|----------|---|
| nm | Nanometer |
| OD | Optische Dichte |
| PAMP | „Pathogen associated molecular pattern“ |
| PBS | „Phosphat buffered saline“ |
| PCR | „Polymerase chain reaction“ = Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Paul-Ehrlich-Gesellschaft |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Azetat |
| PRR | „Pathogen recognition receptor“ |
| RA | Retinsäure |
| RACE | „Rapid amplification of cDNA ends“ |
| RNA | „Ribonucleic acid“ = Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| s. | siehe |
| s | Sekunde |
| SDS | Sodium (Natrium)-dodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Std. | Standard |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Azetat-EDTA |
| TBS | „Tris-buffered saline“ |
| TE | Tris-EDTA |
| TLR | „Toll-like“ Rezeptor |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TSB | „Tryptic soy broth“ |
| U | Unit |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UTR | Untranslatierte Region |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VRE | Vancomycin-resistent |
| (v/v) | Volumen pro Volumen |
| (w/v) | Gewicht pro Volumen |
| ∞ | Unendlich |

Symbole des Einbuchstabencodes für Aminosäuren:

| | | | |
|------------------|-------------|-------------|--------------|
| A Alanin | G Glycin | M Methionin | S Serin |
| C Cystein | H Histidin | N Asparagin | T Threonin |
| D Asparaginsäure | I Isoleucin | P Prolin | V Valin |
| E Glutaminsäure | K Lysin | Q Glutamin | W Tryptophan |
| F Phenylalanin | L Leucin | R Arginin | Y Tyrosin |

Symbole für den Nukleinsäurecode:

| | |
|------------------|------------------|
| A Desoxyadenin | C Desoxycytidin |
| G Desoxyguanosin | T Desoxythymidin |

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. J.-M. Schröder und Herrn Dr. Jürgen Harder für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. K. J. Heller danke ich herzlich für sein Interesse und die offizielle Betreuung dieser Arbeit.

Ein ganz großer Dank geht an Kerstin Schultz, die mich gerade in der letzten Zeit meiner Doktorarbeit bei der praktischen Arbeit sehr unterstützt hat.

Für den Spaß bei der Laborarbeit, die entspannte Atmosphäre und die vielen Tipps und Hilfeleistungen möchte ich mich ganz herzlich bei Britta, Claudia N., Eske, Felix, Hauke, Heilwig, Kerstin, Manfred, Michael, Regine, Stephie, Uli und Zhihong bedanken. Außerdem möchte ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik für die freundliche Unterstützung danken.

Weiterhin gilt mein Dank Jutta, Anke, Claudia M. und Marlies für die Unterstützung bei der Durchführung von HPLC und Westernblots.

Bei Thorsten Marezky bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit während der Doktorarbeit und auch für die „lernintensive Zeit“. Für das aufmerksame Durchsehen der Doktorarbeit danke ich Ulrich Gerstel und Jan Wulbrandt.

Ein besonders lieber Dank gilt Ali, der gerade in den letzten Monaten sehr viel Geduld und Verständnis aufbrachte und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir die Möglichkeit zum Studium gegeben haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Bente Maïke Rudolph
Geburtsdatum: 20.07.1977
Geburtsort: Neumünster
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Derzeitige Anschrift: Alsenstr. 25, 24118 Kiel

Schulbildung

1983-1987 Rudolf-Tonner-Grundschule, Neumünster
1987-1996 Integrierte Gesamtschule Neumünster, Abschluss: Abitur

Weiterer Bildungsweg

1996-2002 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Aug. 1998 Biologie-Vordiplom (Zoologie, Botanik, Physik, Chemie)
Aug. 2002 Biologie-Diplom (Mikrobiologie, Biochemie, Zoologie)
Jun. 2001-Aug. 2002 Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie an der CAU (Prof. Dr. P. Schönheit), Thema: „Enzyme des Zuckerstoffwechsels in hyperthermophilen Archaea: Klonierung, Expression und Charakterisierung der Glucose-6-Phosphat Isomerase aus *Methanococcus jannaschii*“
seit Aug. 2002 Beginn der Doktorarbeit an der Hautklinik der CAU (Prof. Dr. J.-M. Schröder; offizielle Betreuung durch Prof. Dr. K. Heller), Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung antimikrobieller Ribonukleasen für die epitheliale Infektionsabwehr“

Bente Rudolph

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder ganz, noch zum Teil an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie wurde, abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Kiel, den

Bente Rudolph

Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

B. Rudolph, J.D. Monden, S. Schubert, J.-M. Schröder and J. Harder (2004): Characterization of the skin-derived antimicrobial protein RNase 7. Arch Dermatol Res 295(8-9):P85 (Abstract)

B. Rudolph, J.D. Monden, S. Schubert, J.-M. Schröder and J. Harder (2004): Analysis of antimicrobial activity and gene regulation of the skin-derived RNase 7. J Invest Dermatol 123(2):A207 (Abstract)

B. Rudolph and J. Harder (2005): Identification of RNase 8 as an antimicrobial protein. Arch Dermatol Res 296(9):P152 (Abstract)

B. Rudolph, R. Podschun and J. Harder (2005): RNase 8: A novel human antimicrobial protein. J Invest Dermatol 125(3):A255 (Abstract)

B. Rudolph and J. Harder (2006): The role of RNase 7 in the defence system of human primary keratinocytes. Arch Dermatol Res (Abstract, im Druck)