

Mikrobielle Proteasen als Induktoren der antimikrobiellen Abwehr der Haut

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Gero Schmeling

Kiel,

Dezember 2005

Referent/in:.....
Koreferent :.....
Tag der mündlichen Prüfung :.....
Zum Druck genehmigt : Kiel, den.....

Der Dekan

für Merle und Johanna

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung	10
1.1 Die Haut als Barriere	11
1.2 Das System der angeborenen Immunität	12
1.3 Protease-aktivierbare, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	14
1.4 Ziele dieser Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Verwendete Chemikalien	21
2.2 Substanzen, Puffer und Lösungen für die Zellkultur:	21
2.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen	25
2.3.1 HaCaT – Zelllinie	25
2.3.2 Isolierung und Kultur primärer humaner Keratinozyten	26
2.3.3 NCI-H292-Zelllinie	27
2.3.4 Isolierung und Kultur primärer humaner Fibroblasten.....	28
2.4 Kollagenbeschichtung von Kulturflaschen, 6-Loch-Kulturplatten und Acht-Kammer-Objektträgern	28
2.5 Stimulation der Zellen	29
2.6 Präparation der Acht-Kammer-Deckgläser für die Fluoreszenzmikroskopie.....	29
2.7 Induktion und Messung des Ca ²⁺ -Influxes am Fluoreszenzmikroskop ..	30
2.8 Kultivierung von Pseudomonas aeruginosa ATCC 33348 (NCTC 11440) zur Herstellung von Kulturüberständen.	30
2.9 Fraktionierung des bakteriellen Kulturüberstandes mit Ultrafiltration ...	31

2.10 Resource Q-Anionenaustauschchromatographie	31
2.11 CM-Anionenaustauschchromatographie.....	32
2.12 Benzamidin-Affinitätschromatographie.....	32
2.13 N-p-Tosyl-Glycyl-Prolyl-Lysin-4-Nitroanilid (TGPLpNA)-Assay	33
2.14 Azocasein-Assay	33
2.15 Milch-Agarose-Assay	34
2.16 Verdau und Analyse der N-Terminalen Sequenzen der PARs	34
2.17 Semiquantitative RT-PCR	35
2.17.1 RNA-Isolierung	35
2.17.2 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	35
2.17.3 Reverse Transkription von RNA (cDNA- Synthese)	36
2.17.4 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion.....	36
2.17.5 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Stimulation des zellulären Ca²⁺-influx in HaCaT-Keratinocyten durch mikrobielle Proteasen.	38
3.2 Stimulation der mRNA-Expression von Zytokinen in HaCaT- Keratinocyten durch mikrobielle Proteasen.....	39
3.3 Untersuchungen zur Stimulation des zellulären Ca²⁺-Influx durch Subtilisin A.....	41
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kreuzdeaktivierung mit Subtilisin A und den PAR-Agonisten.....	45
3.5 Analyse des Kulturüberstandes von Pseudomonas	47
3.6 Ca²⁺-Influx und Zytokinstimulation	51
3.6.1 Stimulation des Ca ²⁺ -Influx durch PA-Protease IV	51

3.6.2	Zusammenfassung der Ergebnisse der Kreuzdeaktivierung mit PA-Protease-IV und den PAR-Agonisten	54
3.6.3	Rezeptordeaktivierung mit der Lysin-spezifischen Protease Plasmin.	55
3.6.4	Identifikation der Protease Pseudolysin.....	56
3.6.5	Inhibition der Induktion des Ca ²⁺ -Influxe durch Benzamidin und Phosphoramidon.....	57
3.6.6	Rezeptordeaktivierung mit Pseudolysin und Agonisten der PAR1-4 in Keratinozyten.....	58
3.6.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der Kreuzdeaktivierung mit Subtilisin A und den PAR-Agonisten.....	62
3.6.8	Versuche zur gegenseitigen Rezeptordeaktivierung mit Pseudolysin und den Agonisten der PAR1-4 in NCI-H-292-Zellen	64
3.6.9	Induktion des Ca ²⁺ -Influxe in Fibroblasten	67
3.6.10	Massenspektrometrische Analyse der durch Pseudolysin verdauten N-terminalen Sequenzen der PARs.....	69
3.6.11	Zytokinstimulation durch PA-Protease IV	70
3.6.12	Zytokinstimulation durch das mit Affinitätschromatographie gereinigte Protease IV-Präparat	72
3.6.13	Zytokinstimulation durch Pseudolysin in Keratinozyten	73
3.6.14	Stimulation der Proinflammatorischen Zytokine und antimikrobiellen Peptide durch die PAR-aktivierenden Peptide	75
3.7	Zytokinstimulation durch Pseudolysin in NCI-H-292-Zellen	76
4	Diskussion	77
4.1	Mikrobielle Proteasen können PAR aktivieren und induzieren Ca²⁺-Influx in Keratinozyten.....	77
4.2	Subtilisin A induziert Ca²⁺-Influx in Keratinozyten durch Aktivierung des PAR1	79
4.3	Die proteolytische Aktivität aus dem Kulturüberstand von Pseudomonas aeruginosa ist auf Pseudolysin und Protease IV zurückzuführen	81

4.4	Pseudolysin induziert Ca ²⁺ -Influx in Keratinozyten.....	84
4.5	Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden durch extrazelluläre Proteasen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
4.6	Induktion der Ca ²⁺ -Signaltransduktion in Keratinozyten durch die Pseudomonas aeruginosa Proteasen Pseudolysin und Protease IV.....	85
4.7	Pseudolysin desensitiviert PAR1, PAR2 und PAR4	86
4.8	Die proteolytische Beschädigung von PAR2 durch Pseudolysin verhindert nicht die Aktivierung durch Ligandenbindung.....	86
4.9	Die Aktivierung von PAR2 in Keratinozyten desensitiviert die PAR für die Signaltransduktion durch Pseudolysin	87
4.10	Protease IV reguliert die Signaltransduktion von Pseudolysin über PAR3 und seinen Liganden.....	87
4.11	Pseudolysin aktiviert Keratinozyten über PAR1 und PAR4.....	88
4.12	Die Induktion und Regulation PAR unterscheidet sich in Keratinozyten, Fibroblasten und Lungenepithelzellen	88
4.13	Pseudolysin induziert proinflammatorische Zytokine in NCI-H-292 Zellen	89
4.14	Bedeutung der unterschiedlichen Regulation der PARs in verschiedenen Zelltypen bei Infektionen durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
4.15	Zusammenfassende Darstellung der Pseudomonas Proteasen	90
5	Ausblick	91
6	Zusammenfassung.....	93
7	Abstract.....	94

8	Abkürzungsverzeichnis	96
9	Literaturverzeichnis	98
	Danksagung.....	105
	Erklärung.....	106
	Lebenslauf	107

1 Einleitung

Alle höheren Organismen stehen in einem Kontakt mit Mikroorganismen. Dabei reicht das Spektrum der Beziehung von der symbiotischen Beziehung über den Kommensalismus bis hin zum Kontakt mit parasitären oder pathogenen Keimen. Beim Menschen sind die Epithelien der Atemwege, des Verdauungstraktes und der Haut mit einer Flora aus unterschiedlichen Mikroorganismen besiedelt. Es wird hierbei eine residente von einer transienten Flora unterschieden. Erstere setzt sich vor allem aus wenigen apathogenen und fakultativ pathogenen Keimgruppen zusammen, welche die große Masse der Hautkeime ausmachen und keinen Raum für die Besiedlung durch weitere Keimarten lassen. Dadurch stellt die bakterielle Flora der Haut einen wichtigen Faktor des hauteigenen Schutzsystems dar. Hauptvertreter der residenten Flora sind koagulasenegative Staphylokokken, koryneforme Bakterien und Hefepilze. Des Weiteren kommen auch Mikrokokken und gramnegative Keime wie *Acinetobacter* sp., *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* und *Pseudomonas* sp. als passager residente Keime vor. Die transiente Hautflora wird durch die Umgebung bestimmt. Sie ist viel artenreicher als die residente Flora, jedoch von geringerer Quantität und ist nur Tage bis Wochen auf der Haut nachweisbar. Unter anderem sind Keime wie *Staphylococcus aureus*, Streptokokken, Neisserien und gramnegative Bakterien zu finden. Es kommen sowohl apathogene als auch fakultativ pathogene Keime vor. Fakultativ pathogene (opportunistische) Erreger sind von großer medizinischer Bedeutung für die infektionsbedingte Morbidität und Mortalität. Im Gegensatz zu obligat pathogenen Erregern, die Krankheitsprozesse weitgehend unabhängig von der Kondition des Immunsystems eines Individuums auslösen können, kolonisieren fakultativ pathogene Erreger häufig den Wirt und werden von dessen angeborenem Immunsystem kontrolliert. Kommt es durch Erkrankungen, Verletzungen oder anderen äußeren Schädigungen zu einer Schwächung der angeborenen Immunabwehr können diese Erreger den Wirt infizieren und schwerwiegende Erkrankungen auslösen.

1.1 Die Haut als Barriere

Die Haut des Menschen ist ein mehrschichtiges Organ, das die gesamte Körperoberfläche bedeckt. Sie übernimmt regulatorische Funktionen im Bezug auf Temperatur-, Salz- und Wasserhaushalt und spielt eine Rolle bei zahlreichen immunologischen Prozessen. Die Haut gliedert sich auf in die Subcutis, einem gefäßreichen lockeren Bindegewebe mit Fettzellen, das die Haut mit dem darunter gelegenen Gewebe verbindet und der Cutis, der Haut im engeren Sinne. Die Cutis gliedert sich wiederum in Dermis und Epidermis. Die Dermis besteht im Wesentlichen aus zwei Schichten, dem Stratum papillare und dem Stratum reticulare. Das Stratum papillare beherbergt in großer Zahl Zellen der Immunabwehr, wie Lymphozyten und Plasmazellen, außerdem auch viele Monozyten, Makrophagen und Mastzellen. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel. Sie besteht überwiegend aus Zellen, die im Laufe der Zeit keratinisieren und deshalb als Keratinozyten bezeichnet werden. Außerdem kommen noch Melanozyten (Pigmentzellen), Langerhans-Zellen (Makrophagozyten) und Merkelzellen (Tastzellen) vor. Von basal nach apikal gliedert sich die Epidermis in fünf Schichten. Das Stratum basale besteht aus zylindrischen bis hochprismatischen Zellen, die auf der Basalmembran, der Verbindung zwischen Dermis und Epidermis, ruhen. Auf das Stratum basale folgt das Stratum spinosum (Stachelzellschicht), in dem es zu einer Zunahme des Zellvolumens kommt. Es besteht aus zwei bis fünf Zelllagen. Daran schließt sich, mit einer Stärke von ein bis drei Zelllagen, das Stratum granulosum an, das durch basophile Keratohyalinkörperchen ausgezeichnet ist. Im oberen Teil des Stratum granulosum kommt es zu einer Abplattung der Zellen, Zellkerne und Organellen verschwinden. Durch eine erhöhte Permeabilität der Plasmamembran dringt Ca^{2+} in die Zelle ein und aktiviert die Transglutaminase. Diese verbindet durch Quervernetzung zahlreiche Proteine wie Loricrin, Involucrin, Filaggrin, Cystatin α , Elafin und SPR-Proteinen (SPR– small prolin-rich). Dieses führt zur Ausbildung einer verhornten Hülle an der Plasmamembran (Steven und Steinert, 1994). Die äußerste Schicht der Epidermis bildet das Stratum corneum (Hornschicht). Sie besteht aus einer Schicht von 10 bis 20 Zelllagen fest verbundener, plättchenförmiger und abgestorbener Keratinozyten. Die verhornten Zellhüllen bilden mit Keratinfilamenten eine amorphe Proteinmatrix, welche einen

mechanischen Schutz für die darunter liegenden Zellen vor Beschädigung und Austrocknung bietet. Dieser Vorgang der Ausdifferenzierung wird als terminale Differenzierung bezeichnet und dauert ca. 30 Tage. Die Haut, wie auch alle anderen der Außenwelt exponierten Epithelien, übernimmt eine Barrierefunktion gegen das Eindringen von Mikroorganismen in den Organismus. Diese Barrierefunktion besteht in physikalischer Hinsicht durch die Stratifizierung und Verhornung von Zellen, in chemischer Hinsicht durch den pH-Wert und Salzgehalt des Hautmilieus und in biologischer Hinsicht durch gesteigerte Proliferation mit anschließender Abschuppung sowie durch die Produktion antimikrobieller Proteine und proinflammatorischer Zytokine als eine Reaktion unter Kontrolle des angeborenen Immunsystems (innate immunity).

1.2 Das System der angeborenen Immunität

Im Laufe der Evolution hat sich die angeborene Immunität lange vor der adaptiven Immunität herausgebildet. So verfügt jedes mehrzellige Lebewesen über irgendeine Form der angeborenen Immunität. Primitive Organismen verfügen neben unspezifischen Schutzwallfunktionen (z.B. Chitin, Zellulose) im Wesentlichen über lösliche Defensine z.B. proteolytische Enzyme und bakteriostatisch wirkende Faktoren. Die Hauptaufgabe der Mechanismen eines Immunsystems ist es, die Integrität des Organismus gegen äußere pathogene Faktoren aufrechtzuerhalten. Dabei muss es die den Körper angreifenden, fremden Substanzen und Zellen erkennen und ausschalten, ohne dabei die körpereigenen, gesunden Strukturen anzugreifen. Die Unterscheidung zwischen "Eigen" und "Fremd" ist eine der wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems. Ein Hauptunterschied zwischen angeborener und adaptiver Immunität liegt in den Mechanismen, die sie verwenden, um Eigen von Fremd zu unterscheiden. Das adaptive Immunsystem wird durch zwei Klassen spezialisierter Zellen vertreten, den B- und T-Lymphozyten. Das Repertoire an Antigenerkennungsmechanismen in der Gesamtheit dieser Zellpopulation ist sehr groß, da durch den Prozess der somatischen Rekombination jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet wird. Die Größe und Vielfalt dieses Rezeptor-Repertoires erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass für ein spezifisches Antigen ein „passender“ Lymphozyt existiert, der auf Erkennung seines Antigens mit Aktivierung, Proliferation und

entsprechenden Effektorfunktionen antwortet. Dieser Prozess der Vermehrung und Differenzierung eines Lymphozyten nach seiner spezifischen Antigenerkennung, der klonale Selektion genannt wird, stellt die Hauptfunktion der adaptiven Immunabwehr dar. Eine klonale Expansion der Lymphozyten auf Antigenstimulation ist, zum Beispiel im Rahmen einer viralen Infektion notwendig, um eine effiziente Immunantwort zu generieren. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem werden die Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren, den PRR (pattern recognition receptors) vermittelt. Die Entwicklung dieser Rezeptoren stellt eine Anpassung an die Vielfalt der Mikroorganismen dar. Pathogene Keime werden an mikrobiell konservierten Strukturmerkmalen erkannt, die in bakteriellen Oberflächenmolekülen lokalisiert sind und als PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) bezeichnet werden. Zu den PRRs gehören verschiedene Rezeptorklassen wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, u.a. die sogenannten Toll-Like-Rezeptoren (TLRs), die homolog zu den ursprünglich bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifizierten Toll-Rezeptoren sind und von denen inzwischen 10 Familienmitglieder beim Menschen beschrieben sind. Die Aktivierung der Rezeptoren wird in biochemische Signale übersetzt, die zur Erregerabwehr und Aktivierung der adaptiven Immunität führen (Janeway und Medzhitov, 2002). Es kommt zur Expression und Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden und proinflammatorischen Zytokinen. Antimikrobielle Peptide dienen der direkten Erregerabwehr und proinflammatorische Zytokine führen zur Auslösung einer Entzündungsreaktion, die der Mobilisation des adaptiven Immunsystems dient. Studien im Wesentlichen aus den letzten 10 Jahren zeigten, dass Epithelien wie die menschliche Haut neben ihrer Funktion als physikalische und chemische Barriere auch eine „biochemische Barriere“ als Abwehrsystem besitzen, die zur Erhaltung der natürlichen Integrität beiträgt (Boman, 2000). Da die Effektorzellen der angeborenen und adaptiven Immunität im Blut zirkulieren und nicht direkt in den Epithelien lokalisiert sind, können nicht ausschließlich sie für die natürliche Resistenz der Epithelien gegen bakterielle Infektionen verantwortlich sein. Die Keratinozyten der Haut sind in der Lage proinflammatorische Zytokine und antimikrobielle Peptide zu bilden. Einige der antimikrobiellen Peptide werden konstitutiv exprimiert, wie Lysozym (Chen et al., 1986), das sich vor allem gegen Gram-positive Bakterien richtet, Phospholipase A2, die selektiv

auf Gram-negative Erreger wirkt (Schadow et al., 2001), SLPI („secretory leukocyte protease inhibitor“, Wiedow et al., 1998; Wingens et al., 1998) und humanes β -Defensin 1 (Ali et al., 2001).

Andere antimikrobielle Peptide können aber auch induziert werden wie das humane Beta-Defensin-2 (hBD-2) (Harder et al., 1997). Das hBD-2 wird besonders nach Kontakt mit Gram-negativen Bakterien und proinflammatorischen Stimuli in Epithelzellen gebildet. Die antimikrobielle Aktivität richtet sich gegen Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Es besteht jedoch keine Aktivität gegen Gram-positiven Erreger wie *Staphylococcus aureus*. Ein weiteres induzierbares antimikrobielles Peptid ist das hBD-3 in Keratinozyten mit einer antimikrobiellen Aktivität gegen Gram-positive wie Gram-negative Erreger (Harder et al., 2001). Als Induktoren für die Expression und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden kommen, neben den PAMP, auch mikrobielle extrazelluläre Proteasen in Frage. Keratinozyten exprimieren eine erst seit wenigen Jahren bekannte Klasse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Protease-aktivierbaren Rezeptoren (PAR).

1.3 Protease-aktivierbare, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) ist eine der größten proteinkodierenden Gen-Familien im Vertebratengenom. Es sind bereits über 1000 (ca. 1200) Mitglieder dieser Gruppe bekannt und es ist zu erwarten, dass in Zukunft noch zahlreiche weitere beschrieben werden. Die bekannten GPCR werden auf Grund von Sequenzhomologien, die diese vor allem in den sieben membrandurchspannenden Domänen aufweisen, in fünf Klassen eingeteilt. Die Klassen A und B stellen die zahlenmäßig größten Klassen dar und die meisten der bisher bekannten GPCR sind dort eingeordnet.

- Klasse A: Rodopsin ähnliche (u.a. muskarinische Acetylcholinrezeptoren, Endothelin, Bradykinin-, Dopamin-, Adreno-, Histamin-, Serotonin-, Angiotensin-, Adenosin-, Purinorezeptoren, Thrombin- bzw. Protease-aktivierte Rezeptoren, sowie die große Gruppe der olfaktorischen Rezeptoren)
- Klasse B: Sekretin-ähnliche (Calcitonin-, Glukagon-, Growth hormone-releasing Faktor, Sekretinrezeptoren u.a.)
- Klasse C: metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR I-III) ähnliche
- Klasse D: Pheromonrezeptoren
- Klasse E: cAMP Rezeptoren (Dictyostelium)

Definitionsgemäß interagieren GPCR, durch ihre spezifischen Liganden aktiviert, mit intrazellulären G-Proteinen und leiten so das extrazelluläre Signal ins Zellinnere weiter. Die strukturelle Organisation der GPCR hat große Ähnlichkeit mit der des Bakteriorhodopsins. Zwar fehlt dafür noch der direkte Beweis, aber es gibt eine Fülle von experimentellen Befunden, die diese Strukturähnlichkeit belegen. Bakteriorhodopsin gehört selbst nicht zur Gruppe der GPCR, wurde aber auf Grund seiner leichten Verfügbarkeit als „Prototyp“ GPCR-ähnlicher Proteine in seiner Ultrastruktur aufgeklärt. Wie Bakteriorhodopsin besitzen alle GPCR sieben hydrophobe, die Membran durchspannende, helikale Domänen. Konformationelle Veränderungen, die durch die Bindung eines Signalmoleküls am entsprechenden Rezeptor ausgelöst werden, führen zur Interaktion der intrazellulären Schleifen mit bestimmten G-Proteinen. G-Proteine bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten, den α -, β - und γ -Untereinheiten. Im nicht-aktiven Zustand ist an die α -Untereinheit des trimeren G-Proteinkomplexes GDP gebunden. Durch die Ligand/Rezeptor-Interaktion wird GDP gegen GTP ausgetauscht und der ternäre G-Proteinkomplex zerfällt in die aktivierte G_{α} -Untereinheit, die GTP gebunden hält, und die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit. Die G_{α} -Untereinheit

assoziiert ihrerseits mit Effektorenzymen, die dadurch aktiviert werden und zur Bildung von sekundären Botenstoffen führen. Auch die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit ist in der Lage spezifische Effektorsysteme zu aktivieren, was ebenfalls zur Bildung von „second messenger“ Molekülen (z.B. cAMP) oder zur direkten Aktivierung von Ionenkanälen (z.B. K^+ -Kanal) führen kann. Die Aktivierung der Effektorsysteme hält solange an, wie die Assoziation mit G_{α} -GTP besteht. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit wird das gebundene GTP zu GDP umgesetzt, was zur Dissoziation von G_{α} vom Effektor führt und dessen Aktivierung beendet. G_{α} -GDP reassoziert anschließend mit $G_{\beta\gamma}$ zum inaktiven trimeren G-Proteinkomplex, der damit für eine neue Aktivierung bereitsteht. Auf der Ebene der G-Proteine werden zahlreiche Regulationsmechanismen diskutiert, die durch GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP), „Regulatorproteine der G-Protein Signaltransduktion“ (RGS) und GTP-austauschfaktoren verwirklicht werden (Igishi et al., 1990; Iri et al., 1994; Helmreich und Hofmann, 1996; Mej, 1996; Rudolph et al., 1999). Zwei sehr wichtige Effektorsysteme der G-Proteinaktivierung sind das Adenylatcyclase-System (AC) und die Phospholipasen A, C und D (PLA, PLC, PLD), die zur Bildung der wichtigen „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat (durch PLC) und cAMP (durch AC), oder von Arachidonsäure (durch PLA₂) und Cholin (durch PLD) führen. Über Konzentrationsveränderungen der sekundären Botenstoffe DAG, cAMP bzw. Ca^{2+} , das durch Inositol-1,4,5-Triphosphat ($InsP_3$) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt wird, werden Ser/Thr-Proteinkinasen (PKA, PKC und Calmodulin-abhängige Protein Kinase II) aktiviert. Dies führt sowohl zu kurzfristigen Effekten, wie z.B. der „feed-back“-Hemmung der Rezeptoren, der Aktivierung oder Hemmung von Enzymen durch Phosphorylierung, als auch zu länger anhaltenden Wirkungen, wie z.B. Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose oder Anti-Apoptose. In der Familie der GPCR grenzen sich die Protease-aktivierbaren Rezeptoren, gegenüber den anderen GPCR, welche durch die Bindung von löslichen Liganden aktiviert werden, durch ihren einzigartigen Aktivierungsmechanismus ab. Protease-aktivierbare Rezeptoren werden durch die Hydrolyse der extrazellulären N-terminalen Sequenz an einer spezifischen Spaltstelle aktiviert. Durch die proteolytische Abspaltung eines N-terminalen Fragmentes entsteht eine neue N-terminale Sequenz mit Ligandenfunktion, die mit der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors interagiert und den Rezeptor aktiviert (Abb. 1).

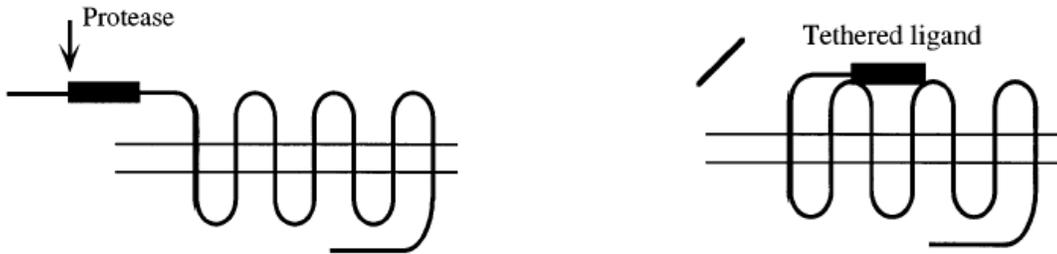
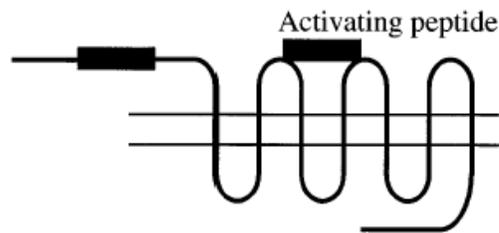
A**B**

Abb.1: Mechanismen der Rezeptoraktivierung Protease-aktivierbarer Rezeptoren

(A) Durch proteolytische Spaltung der N-terminalen Sequenz wird der gebundene Ligand freigesetzt und interagiert mit der zweiten extrazellulären Domäne des Rezeptors. (B) Aktivierung des Rezeptors durch die lösliche Form der aktivierenden Sequenz als lösliches Peptid. (modifiziert nach Dery et al., 1998)

Wie alle anderen GPCR sind die Protease-aktivierbare Rezeptoren mit zahlreichen Signaltransduktionswegen verbunden und können dadurch zahlreiche Zellfunktionen regulieren. Der PAR1 ist in dieser Hinsicht am besten erforscht. Er tritt mit zahlreichen G_α -Subtypen in Interaktion, unter Anderem mit G_{α_i} , $G_{\alpha_{12/13}}$ und G_{α_q} . Einer der Hauptwege verläuft über $G_{\alpha_{q11}}$. $G_{\alpha_{q11}}$ aktiviert PLC, wodurch InsP_3 generiert wird. Dieses führt zur Mobilisierung von Ca^{2+} und DAG. DAG aktiviert seinerseits die PKC. Zusammen mit Ca^{2+} aktiviert die PKC ihrerseits eine Reihe von Signalwegen, wie die MAPK-Kaskade oder die über Ca^{2+} -regulierter Proteinkinasen vermittelten Signalwege. Ein weiterer Weg wird über $G_{\alpha_{12/13}}$ vermittelt und führt zur Aktivierung des Rho-Kinase-Weges. Ein dritter Weg verläuft über G_{α_i} und führt durch Inhibition der Adenylatcyclase zur Unterdrückung

von cAMP. Außerdem ist der PAR1 über die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten mit zahlreichen anderen Signalwegen verbunden, wie dem der PI3-Kinase (Mitchell et al., 1990; Walker et al., 1998). Von besonderem Interesse sind auch die Verbindungen des PAR1 zum MAPK-Weg, die über mehrere Mechanismen bestehen können. Einige dieser Mechanismen können über die Aktivierung von Matrixmetalloproteasen verlaufen (Prenzel et al., 1999), welche EGF freisetzen, über den β -Arrestin/Src-Komplex (Sabri et al., 2002) über die Aktivierung der Ca^{2+} -regulierten Proteinkinase Pyk2 (Keogh et al., 2002) und über $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten unter Einbeziehung von PI3-Kinase und ras oder PKC und raf (s. Abb. 2). Weniger erforscht sind die vom PAR2 aktivierten Signalwege. Die Aktivierung von PAR2 mobilisiert $InsP_3$ und setzt Ca^{2+} frei. Deswegen ist es wahrscheinlich, dass die Signaltransduktion des PAR2 über $G_{\alpha q}$ verläuft. (Nystedt et al., 1994; Nystedt et al., 1995; Santulli et al., 1995; Bohm et al., 1996; Covera et al., 1997; Kong et al., 1997; Corvera et al., 1999). Die Signaltransduktion über PAR2 ist PTX-insensitiv, weshalb eine Signalvermittlung über $G_{\alpha i}$ unwahrscheinlich ist. Die MAPK ERK1 und 2 werden in hohem Maße aktiviert und in geringerem Ausmaß auch die p38 MAPK. Die c-jun-aminoterminal Kinase wird jedoch nicht aktiviert. (Belham et al., 1996; Yu et al., 1997; DeFea et al., 2000). Die Signaltransduktionswege der PAR3 und PAR4 sind noch weitgehend unbekannt.

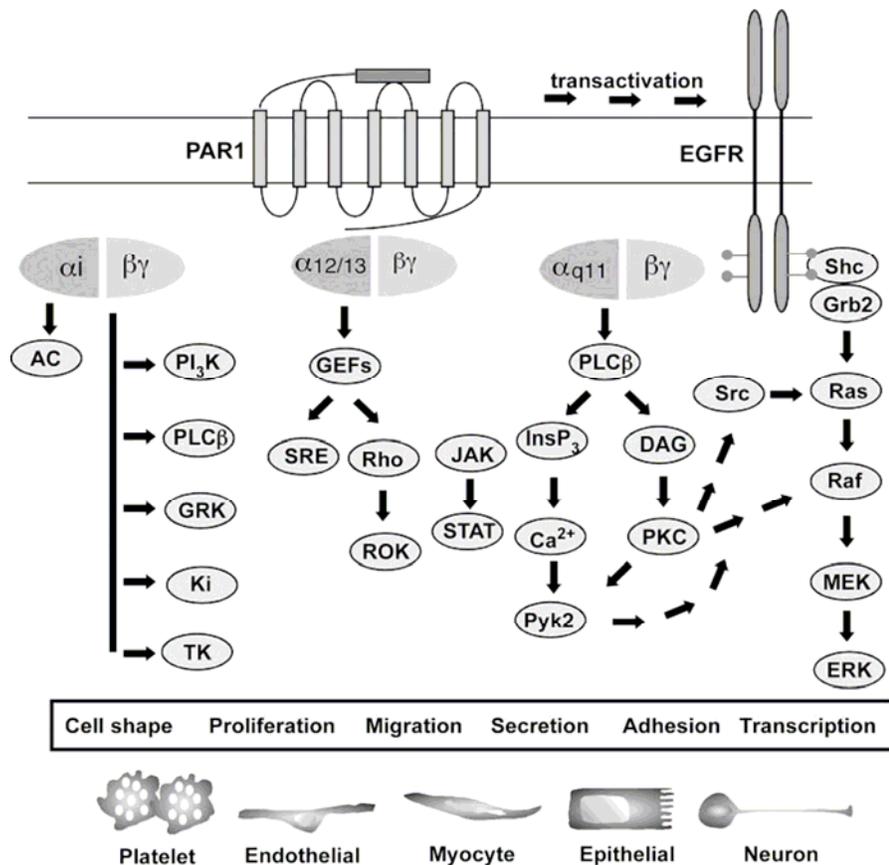


Abb. 2: Schema der für den PAR1 diskutierten Signaltransduktionswege nach Ossovskaya und Bunnett, (2004).

PAR1 aktiviert $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha 12/13}$ und $G_{\alpha q11}$. $G_{\alpha i}$ inhibiert die Adenylatcyclase und reduziert damit cAMP. $G_{\alpha 12/13}$ bindet an „Guanine-Nukleotid-Austauschfaktoren“ (GEFs) und aktiviert Rho, die Rho-Kinase (ROK) und „serum response elements“ (SRE). $G_{\alpha q11}$ aktiviert die Phospholipase C, die Inositoltriphosphat generiert. Dieses mobilisiert Ca^{2+} und Diacylglycerol (DAG), welche die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. PAR1 kann die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade durch die Transaktivierung des EGF-Rezeptors und weiter Mechanismen aktivieren. Die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten verbinden PAR1 mit weiteren Systemen, wie den G-Protein-Rezeptor-Kinasen (GRKs), Kaliumkanälen und Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Keratinocyten reagieren mit einer Abwehrreaktion, wenn sie mit Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen in Kontakt kommen. Es erfolgt häufig eine Produktion von antimikrobiellen Peptiden oder proinflammatorischen Zytokinen. Diese Produktion wird von bakteriellen Faktoren stimuliert die von Rezeptoren erkannt werden.

Die meisten Mikroorganismen sezernieren Proteasen. Da Protease-aktivierbare Rezeptoren auch auf Keratinozyten beschrieben werden, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob mikrobielle, extrazelluläre Proteasen in Epithelzellen der Haut eine antimikrobielle Abwehr stimulieren können. Die Aktivierung von Protease-aktivierbaren Rezeptoren induziert in den meisten Fällen einen Ca^{2+} -Einstrom aus internen Ca^{2+} -Speichern in das Cytosol, der mit einem Ca^{2+} -komplexierenden Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht und unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden kann. Anhand des stimulierten Ca^{2+} -Influges soll untersucht werden, ob Proteasen mikrobieller Herkunft Protease-aktivierbare Rezeptoren in Keratinozyten stimulieren können. Weiterhin soll untersucht werden, welche der Protease-aktivierbaren Rezeptoren an der Zellstimulation beteiligt sind. Die extrazellulären Proteasen des opportunistisch pathogenen Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* werden als Virulenzfaktoren angesehen, die in entzündlichen Erkrankungen der Lunge und des Auges eine verursachende Rolle spielen (Engel et al., 1998). Für *Pseudomonas aeruginosa* Mutanten, bei denen ein Protease-Gen deletiert war, wurde am Auge der Verlust der Pathogenität nachgewiesen. Deswegen soll aus zellfreien Kulturüberständen von *Pseudomonas aeruginosa* eine eventuell vorhandene proteolytische Aktivität isoliert und identifiziert werden. Die isolierte proteolytische Aktivität soll auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden einen Ca^{2+} -Influx in Keratinozyten zu stimulieren. Hierbei soll ebenfalls untersucht werden welche Rezeptoren an einer möglichen Stimulation beteiligt sind. Schließlich soll analysiert werden, ob Epithelzellen, die mit der proteolytischen Aktivität von *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert werden mit einer antimikrobiellen Abwehr in Form einer Expression von antimikrobiellen Peptiden und proinflammatorischen Zytokinen reagieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien für die Laufpuffer in der Flüssigkeitschromatographie wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Boehringer (Mannheim) bezogen.

Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich-ARK GmbH (Steinheim) und Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) bezogen.

Die PAR-aktivierenden Peptide und N-terminalen PAR-Sequenzen wurden von Prof. Dr. Hubert Kalbacher bei PANATecs in Tübingen synthetisiert.

2.2 Substanzen, Puffer und Lösungen für die Zellkultur:

Substanzen:

FCS	PAA, Pasching
L-Glutamat	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
bov. Kollagen Typ I	BD Biosciences, USA
FURA2-AM	Calbiochem, USA

Puffer:

PBS	PAA, Pasching
HBSS	PAA, Pasching

Nährlösungen:

DMEM

Cell Concepts, Umkirch

RPMI

Cell Concepts, Umkirch

Epi-Life

Cascade Biologics, USA

KBM

Cambrex, USA

Enzyme:

PCR-Polymerase-Kits:

Superscript reverse Transcriptase

Invitrogen, Karlsruhe

SYBR Premix Ex Taq-Polymerase

TaKaRa, Japan

Proteasen:

Endoprotease Glu-C

Sigma, Taufkirchen

Endoprotease Lys-C

Sigma, Taufkirchen

Plasmin

Sigma, Taufkirchen

Protease K

Sigma, Taufkirchen

Pseudolysin

Calbiochem, USA

Subtilisin A

Sigma, Taufkirchen

Thrombin

Sigma, Taufkirchen

Trypsin

Sigma, Taufkirchen

Substrate:

N-p-Tosyl-Glycyl-Prolyl-Lysin-4-Nitroanilid	Sigma, Taufkirchen
N-Succinyl-Alanyl-Alanyl-Prolin-Phenylalanyl-4-Nitroanilid	Sigma, Taufkirchen
Benzyl-oxycarbonyl-Glycyl-Prolyl-Arginin-4-Nitroanilid	Sigma, Taufkirchen
N-Methoxysuccinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Valin-4-Nitroanilid	Sigma, Taufkirchen
Azocasein	Sigma, Taufkirchen

Inhibitoren:

1'10'Phenanthrolin	Sigma, Taufkirchen
APMSF	Sigma, Taufkirchen
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
E64	Sigma, Taufkirchen
Phosphoramidon	Sigma, Taufkirchen
SBTI (Soyabohnentrypsininhhibitor)	Sigma, Taufkirchen
TLCK	Sigma, Taufkirchen

Filter für die Ultrafiltration:

PBMK Polyethersulfon, 300 kDa, 150 mm	Millipore, USA
YM30 regenerierte Cellulose, 30 kDa, 76 mm	Millipore, USA
YM3 regenerierte Cellulose, 3 kDa, 25 mm	Millipore, USA

Säulen für die Flüssigkeitschromatographie:

ResourceQ-Tricorn, 4,6/100 mm	Amersham, Schweden
HiTrap-CM-FF, 0,7/2,5 cm	Amersham, Schweden
HiTrap-Benzamidin-FF, 1,6/2,5 cm	Amersham, Schweden

PAR-Peptide:

PAR1-AP :	SLIGKV
PAR2-AP :	SFLLRN
PAR3-LIG :	TFRGAP
PAR4-AP :	GYPGQV

PAR1 N-terminale Sequenz : IQGTNRSSKGRSLIGKV

PAR2 N-terminale Sequenz : RPESKATNATLDPRSFLLRN

PAR3 N-terminale Sequenz : GMENDTNNLAKPTLPIKTFRGAP

PAR4 N-terminale Sequenz : GGTQTPSVYDESGSTGGGDDSTPSILPAPRGYPGQV

Oligonukleotide :

Elafin :	PPEL-F	CGTGGTGGTGTTCCTCATC
	PPEL-R	TTCAAGCAGCGGTTAGGG
GAPDH :	Ga1	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
	Ga2	CCAAGCCGAGCCACATCGCTC
hBD 2 :	HBD2-fA	CCAGCCATCAGCCATGAGGGT
	HBD2-rA	GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA
Interleukin-1 β :	IL-1 β F	CCAGCTACGAATCTCCGACCACCACTAC
	IL-1 β F	TGCTTGAGAGGTGCTGATGTACCAGTTG
Interleukin-8:	IL-8 Fwd	CTTTCAGAGACAGCAGAGCAC
	IL-8C Rev	ACTGTGAGGTAAGATGGTGCC
oligo (dT):	oligo (dT)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Psoriasisin:	Pso Vo F	TTCTTCTACTCGTGACGCTTC
	Pso Vo R	CTCTGCTTGTGGTAGTCTGTG
RNase-7:	S2-31	GGAGTCACAGCACGAAGACCA
	S2-33rev	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA
TNF- α :	TNF- α For	TCAGCTTGAGGGTTTGCTACAA
	TNF- α Rev	TCTGGCCCAGGCAGTCAGATC

2.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit CO₂-Begasung in 200 ml-Kulturgefäßen.

2.3.1 HaCaT – Zelllinie

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

HaCaT-Ursprungskulturen wurden von Prof. Fusenig (DKFZ, Heidelberg) bezogen.

Die Subkultivierung adhärent wachsender HaCaT-Zellen erfolgte bei 80-90 % Konfluenz, da diese Zellen in Kultur bei Erreichen der Konfluenz im Wachstum inhibiert werden (Crabtree et al., 1999). Zum Ablösen der adhärent wachsenden HaCaT-Zellen vom Kulturgefäßboden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 0,1%igen Trypsin-0,02 % EDTA-Lösung inkubiert. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug ca. 5 min. Das Ablösen der Zellen wurde durch mehrmaliges Klopfen an die Kulturflasche unterstützt. Dabei wurde fortwährend der Grad der Ablösung der Zellen mikroskopisch überprüft. Anschließend wurden 10 ml supplementiertes DMEM-Medium hinzugegeben, wobei die Trypsinaktivität durch das im fötalen Kälberserum (FCS) enthaltene α 1-Antitrypsin gestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde, mit 5 ml supplementiertem DMEM-Medium resuspendiert und anschließend zur weiteren Verwendung auf das entsprechend erforderliche Volumen verdünnt. Die Zellsuspension wurde in sterile Kulturflaschen zur Subkultivierung, in 6-Loch-Kultur-Platten für Stimulationsversuche oder in kollagenbeschichtete Acht-Kammer-Deckgläser für die Fluoreszenz-Mikroskopie ausgesät.

2.3.2 Isolierung und Kultur primärer humaner Keratinozyten

Humane Keratinozyten wurden aus frischen Vorhäuten isoliert, die bei entsprechenden Operationen anfielen. Nach dem Entfernen von Fett- und Bindegewebe wurden die Präparate in kleine Streifen (1-2 cm lang, 3-5 mm breit) geschnitten und zweimal in PBS gewaschen. Zur Lösung der Epidermis von der Dermis erfolgte anschließend eine Inkubation in 0,25%iger Trypsinlösung über Nacht bei 4 °C oder bei 37 °C für 1 h. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt und die Epidermis von der Dermis abgezogen. Die basalen Keratinozyten wurden durch vorsichtiges Abschaben von den übrigen Zellschichten gelöst. Diese Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren suspendiert und die Suspension bei 600 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde dann in supplementiertem EpiLife-Medium aufgenommen und in 200 ml Kulturflaschen überführt, die bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Die so gewonnenen

Keratinocyten konnten mit drei bis vier Passagen in Kultur gehalten werden, wobei die Zellen schon bei einer Konfluenz von 60% bis 80% passagiert wurden, um eine zu schnelle Ausdifferenzierung zu verhindern. Zum Ablösen der adhären wachsenden primären Keratinocyten vom Kulturgefäßboden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 0,1% Trypsin-0,02% EDTA-Lösung inkubiert. Nach 2-3 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Kulturgefäßboden abgelöst. Anschließend wurden 10 ml supplementiertes DMEM-Medium hinzugegeben und die Zellsuspension wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei 600 x g für 10 min zentrifugiert. Dann wurden die Zellen mit 5 ml supplementiertem EpiLife-Medium resuspendiert und anschließend zur weiteren Verwendung auf das entsprechend erforderliche Volumen verdünnt. Die Zellen wurden in sterile kollagenbeschichtete Kulturflaschen zur Subkultivierung, in 6-Loch-Kultur-Platten für Stimulationsversuche oder in kollagenbeschichtete Acht-Kammer-Deckgläser für die Fluoreszenz-Mikroskopie eingesät.

2.3.3 NCI-H292-Zelllinie

Die NCI-H292-Zelllinie ist eine humane mucoepidermoide Karzinom- Zelllinie aus der weiblichen Lunge. NCI-H292-Ursprungskulturen wurden von der „European Collection of Cell Cultures - EACC“ bezogen. Die Subkultivierung adhären wachsender NCI-H292-Zellen erfolgte bei 80-90 % Konfluenz. Um die adhären wachsenden NCI-H292-Zellen vom Kulturgefäßboden abzulösen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 3 min mit 5 ml einer 0,1%igen Trypsin-0,02 % EDTA-Lösung inkubiert. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug ca. 5 min. Das Ablösen der Zellen wurde durch mehrmaliges Klopfen an die Kulturflasche unterstützt. Dabei wurde fortwährend der Grad der Ablösung der Zellen mikroskopisch überprüft. Anschließend wurden 10 ml supplementiertes RPMI-Medium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 5 ml supplementiertem RPMI-Medium resuspendiert und anschließend zur weiteren Verwendung auf entsprechend erforderliche Volumen verdünnt.. Die Zellsuspension wurde in sterile Kulturflaschen zur Subkultivierung, in 6-Loch-Kultur-Platten für

Stimulationsversuche oder in kollagenisierte Acht-Kammer-Deckgläser für die Fluoreszenz-Mikroskopie eingesät.

2.3.4 Isolierung und Kultur primärer humaner Fibroblasten

Humane Fibroblasten wurden aus den bei der Keratinozytenpräparation anfallenden Bindegewebsresten kultiviert. Dazu wurden 2-3 mm² große Bindegewebsstücke auf den Boden einer 200 ml Kulturflasche geheftet. Die Flasche wurde bei 37°C für 24 h inkubiert. Dann wurden 10 ml supplementiertes DMEM-Medium hinzugegeben und die Kulturflasche wurde für weitere 5 - 10 Tage bis im Brutschrank inkubiert bis adhärent wachsenden, subkonfluente Fibroblasten unter dem Mikroskop sichtbar waren. Diese Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 0,1% Trypsin-0,02% EDTA-Lösung inkubiert. Nach 2-3 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Dann wurden 10 ml supplementiertes DMEM-Medium hinzugegeben, wobei die Trypsinaktivität durch das im fetalen Kälberserum enthaltene α 1-Antitrypsin gestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 600 x g für 10 min zentrifugiert. Anschliessend wurden die Zellen in 5 ml supplementiertem DMEM-Medium resuspendiert. und anschließend zur weiteren Verwendung auf entsprechend erforderliche Volumen verdünnt. Die Zellen wurden in sterile Kulturflaschen oder auf kollagenisierte Acht-Kammer-Deckgläser eingesät.

2.4 Kollagenbeschichtung von Kulturflaschen, 6-Loch-Kulturplatten und Acht-Kammer-Objektträgern

Epithelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle, die sich in vivo mit Strukturen der extrazellulären Matrix verbinden. Kulturgefäße aus Glas und sämtliche Gefäße in denen Keratinozyten kultiviert wurden mussten deshalb mit Kollagen beschichtet werden, um den Zellen ein adhärentes Wachstum zu ermöglichen.

Zur Beschichtung wurde eine Stammlösung von 3 mg/ml bovinem Kollagen Typ I zu 1% in 0,01M HCl gelöst. Mit dieser Lösung wurden die Kulturgefäße zu 25% befüllt und zur Inkubation 1-12 h bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die Gefäße zweimal mit PBS gewaschen und mit der Zellsuspension befüllt.

2.5 Stimulation der Zellen

Die zu stimulierenden Zellen wurden in Suspension vor Beginn eines Experimentes in 6-Loch-Kultur-Platten mit einem Volumen von 2 ml Suspension pro Kavität überführt (siehe oben). Um ausschließen zu können, dass im FCS enthaltene, undefinierte Faktoren die Stimulierbarkeit der Zellen beeinflussen, wurde das Zellmedium zwölf Stunden vor dem Versuch nach zweimaligem Waschen mit PBS durch FCS-freies Nährmedium ersetzt. Bei primären Keratinozyten war ein derartiger Medienaustausch nicht nötig, da hier serumfreies Medium verwendet wurde. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 80% stimuliert, da eine zu hohe Zelldichte die Stimulierbarkeit der Zellen negativ beeinflusste. Der Stimulus wurde in der gewünschten Konzentration in serumfreiem, supplementiertem Medium des jeweiligen Zelltyps gelöst.

2.6 Präparation der Acht-Kammer-Deckgläser für die Fluoreszenzmikroskopie

In die kollagenbeschichteten Acht-Kammer-Objektträger wurden pro Kammer 250 µl einer Zellsuspension gefüllt, die eine Zelldichte von 20% hatte. Die Objektträger wurden im Brutschrank 12 – 36 h bebrütet, bis zu einer Zelldichte von 50-70%. Bei der Kultivierung von primären Keratinozyten in Acht-Kammer-Objektträgern wurde mindestens acht Stunden vor der Messung der Ca^{2+} -Influx-Induktion das EpiLife-Medium durch supplementfreies KBM-Medium ersetzt, da das EpiLife-Medium Substanzen enthielt, welche die Messung der Ca^{2+} -Influx-Induktion gestört haben. Aus den mit Zellen bewachsenen Objektträgern wurde nach der Bebrütung das alte Nährmedium entfernt und die Kammern wurden mit je 125 µl Nährmedium befüllt, das den Ca^{2+} -komplexierenden Fluoreszenzfarbstoff FURA2-AM in einer Endkonzentration von 150 µM enthielt. Dann wurden die Zellen eine Stunde im Brutschrank bebrütet. Anschließend wurden die Kammern der Deckgläser mit 250 µl Nährmedium befüllt, das kein FURA2-AM enthielt und weitere 5 min inkubiert, um Reste des Farbstoffes zu entfernen, die nicht von den Zellen aufgenommen wurden. Danach wurden die Kammern der Objektträger zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 150 µl HBSS befüllt. Der Objektträger wurde für 15 – 20 min auf dem abgedunkelten

Objekttisch des Fluoreszenzmikroskops deponiert, bis zur Anpassung der Zellen an das neue Medium.

2.7 Induktion und Messung des Ca²⁺-Influxes am Fluoreszenzmikroskop

In die Kammern der Deckgläser wurden Stimuli zu den Zellen gegeben, die in 50 µl HBSS gelöst waren. Dann wurden alle 2 sec durch das Objektiv des Mikroskops, mit einer CCD-Kamera je ein Bild der Zellen bei einer Anregung mit 340 nm und bei einer Anregung mit 380 nm gemacht. Der Fluoreszenzfarbstoff FURA2-AM hat ein Fluoreszenzmaximum mit 512 nm bei einer Anregung mit 340 nm wenn er Ca²⁺-frei ist und im Komplex mit Ca²⁺ ein Fluoreszenzmaximum mit 512 nm bei einer Anregung mit 380 nm. Die aufgenommenen Bilder wurden zu je einer Filmsequenz der Anregungswellenlänge zusammengestellt. Mit dem Analyseprogramm TILL-Vision wurde eine Filmsequenz aus der Ratio der Fluoreszenz der bei 340 nm und 380 nm aufgenommenen Sequenzen erstellt. Die resultierende Fluoreszenzratio ist ein direktes Maß für die Konzentration des Ca²⁺ in der Zelle und wurde grafisch für die einzelnen Zellen analysiert und als Kurve gegen die Zeit dargestellt.

2.8 Kultivierung von Pseudomonas aeruginosa ATCC 33348 (NCTC 11440) zur Herstellung von Kulturüberständen.

Aus einer Glyzerinkultur wurden 10 µl in 10 ml TSB-Medium suspendiert und über 24 h in einem beheizbaren Wasserbad mit Schüttelvorrichtung bei 130 U/min und 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit einer Impföse auf TSB-Agar-Platten ausgestrichen, die über 24 Std. bei 37°C in einem Brutschrank bebrütet wurden. Zur Herstellung von 2000 ml Kulturüberstand wurden in Zentrifugenröhrchen mit einem Volumen von 50 ml mit je 10 ml 25%TSB-Medium befüllt und mit je einer Kolonie von den bewachsenen TSB-Agar-Platten beimpft. Diese Vorkulturen wurden wieder für 24 h im beheizten Wasserbad auf einem Schüttler mit 130 U/Min bei 37°C inkubiert. Die Vorkulturen wurden auf eine OD von 1,0 bei 578 nm eingestellt und in 2000 ml 25%TSB-Medium überführt. Mit diesem Kulturansatz wurden sterile Petrischalen mit einem Volumen von 500 ml zu 20% befüllt und über 24 h bei 37°C in Ruhe inkubiert.

Anschließend wurde die Bakterienkultur in 500 ml Zentrifugen-Gefäße abgefüllt und für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, mit 0,2 µm sterilfiltriert und bei -20°C eingefroren.

2.9 Fraktionierung des bakteriellen Kulturüberstandes mit Ultrafiltration

Der sterilfiltrierte Kulturüberstand wurde in einer Ultrafiltrationskammer mit 2000 ml Volumen und Magnetrührereinheit bei 300 U/min und 0,75 bar durch einen Polyethersulfon-Filter mit einer Porengröße von 300 kDa filtriert. Das >300 kDa Filtrationsretentat wurde mit 15 ml sterilem aqua dest. vom Filter gewaschen und in ein 15 ml Röhrchen abgefüllt. Das < 300 kDa-Filtrat wurde in einer Ultrafiltrationskammer mit 350 ml Volumen und Magnetrührereinheit bei 300 U/min und 4,5 bar durch einen Filter aus regenerierter Zellulose mit einer Porengröße von 30 kDa filtriert. Das 30-300 kDa Filtrationsretentat wurde mit 2,5 ml sterilem aqua dest. vom Filter gewaschen und in ein 15 ml Röhrchen abgefüllt. Das Filtrat wurde in sterile Flaschen mit 1000 ml Volumen abgefüllt. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre proteolytische Aktivität überprüft. Die proteolytisch aktive Fraktion von 30-300 kDa wurde mit hochauflösender Flüssigkeitschromatographie weiter verarbeitet.

2.10 Resource Q-Anionenaustauschchromatographie

Die Fraktion von 30-300 kDa wurde in einer Ultrafiltrationskammer mit 10 ml Volumen und Magnetrührereinheit bei 300 U/min und 4,5 bar durch einen Filter aus regenerierter Zellulose mit einer Porengröße von 3 kDa filtriert. Das Retentat von ca. 1,0 ml wurde mit 20 mM Tris-HCl-Puffer von pH 8,0 auf 10 ml aufgefüllt und resuspendiert und die Filtration wurde zweimal wiederholt. Das Retentat der letzten Filtration wurde mit 2,5 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer vom Filter gewaschen und mit 20 mM Tris-HCl-Puffer mit pH 8,0 als Laufpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min auf eine 1 ml Resource Q-Säule aufgetragen. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte in einem Gradienten von 0 M NaCl bis 1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8,0. Der Gradient hatte bei einer Flussrate von 1 ml/min eine Laufzeit von 30 min. Die eluierten Proteine wurden photometrisch bei 280 nm detektiert und in Fraktionen aufgefangen.

Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre proteolytische Aktivität überprüft und auf ihre Fähigkeit in HaCaT-Keratinocyten Ca^{2+} -Influx zu induzieren.

2.11 CM-Anionenaustauschchromatographie

Die Fraktion von 30-300 kDa wurde in einer Ultrafiltrationskammer mit 10 ml Volumen und Magnetröhreinheit bei 300 U/min und 4,5 bar durch einen Filter aus regenerierter Zellulose mit einer Porengröße von 3 kDa filtriert. Das Retentat wurde mit 10 ml 10 mM Ammonium-Acetat-Puffer, pH 5,8 resuspendiert und die Filtration wurde solange wiederholt, bis das Retentat einen pH von 5,8 erreicht hatte. Das Retentat der letzten Filtration wurde 10 mM Ammonium-Acetat-Puffer von pH 5,8 vom Filter gewaschen und mit diesem Puffer bei einer Flussrate von 1 ml/min auf eine 0,7/2,5 cm CM-Sepharose-Säule aufgetragen, die auf den pH 5,8 äquilibriert war. Nach dem Auftrag wurden die an die Säule gebundenen Proteine mit 10 mM Ammonium-Acetat-Puffer von pH 9.0 bei einer Flussrate von 1 ml/min von der Säule eluiert und in Fraktionen aufgefangen. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre proteolytische Aktivität überprüft und auf ihre Fähigkeit in HaCaT-Keratinocyten Ca^{2+} -Influx zu induzieren.

Die proteolytisch aktiven Fraktionen wurden zusammengefasst und durch einen Filter aus regenerierter Zellulose mit einer Porengröße von 3 kDa filtriert. Das Retentat wurde in HBSS-Puffer resuspendiert. Das Präparat wurde anhand seiner Substratspezifität und der Inhibierbarkeit mit spezifischen Inhibitoren analysiert. Weiterhin wurden mit dem Präparat Kreuzinhibitionsexperimente zur Induktion des Ca^{2+} -Influx in verschiedenen Zelltypen durchgeführt und die Fähigkeit Zytokine in Keratinocyten zu stimulieren wurde überprüft.

2.12 Benzamidin-Affinitätschromatographie

Die Fraktionen mit proteolytischer Aktivität aus der CM-Anionenaustauschchromatographie oder der Resource Q-Anionenaustauschchromatographie wurden zusammengefasst und in einer Ultrafiltrationskammer mit 10 ml Volumen und Magnetröhreinheit bei 300 U/min und 4,5 bar durch einen Filter aus regenerierter Zellulose mit einer Porengröße von 3 kDa filtriert. Das Retentat wurde mit 10 ml 20 mM

Tris-HCl-Puffer von pH 8,0 resuspendiert und die Filtration wurde zweimal wiederholt. Das Retentat der letzten Filtration wurde mit 2,5 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer vom Filter gewaschen und mit 20 mM Tris-HCl-Puffer mit pH 8,0 als Laufpuffer bei einer Flussrate von 0,2 ml/min auf eine 2,5 ml p-Aminobenzamidin-Agarose-Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen. p-Aminobenzamidin ist ein Proteaseninhibitor mit einer Affinität zur Pseudomonas Protease IV. Die Elution der an die Säule gebundenen Protease erfolgte mit einem Puffer von 20 mM Tris-HCl mit 1 M NaCl. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml aufgefangen deren proteolytische Aktivität mit dem Substrat N-p-Tosyl-Glycyl-Prolyl-Lysyl-4-Nitroanilid analysiert wurde.

2.13 N-p-Tosyl-Glycyl-Prolyl-Lysin-4-Nitroanilid (TGpNA)-Assay

Von den Probenlösungen der Fraktionen aus der Ultrafiltration und der Flüssigkeitschromatographie wurden 50 µl pro Kavität einer 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Dann wurden in jedes Loch 100 µl HBSS-Puffer zugegeben. Der Test wurde durch Zugabe von 50 µl einer 2 mM TGpNA-Messlösung in HBSS-Puffer zu jeder Kavität gestartet. In einem Plattenphotometer wurde der Substratumsatz anhand der Änderung der Absorption bei 405 nm gegen die Referenz von 620 nm gemessen. Über eine Dauer von 30 min erfolgte alle 5 min eine Messung. Die Freisetzung von 0,033 nmol 4-Nitroanilin verursachte eine Veränderung der Extinktion (ΔE) bei 405 nm von 0,1. Eine Unit für das Substrat N-p-Tosyl-Glycyl-Prolyl-Lysin-4-Nitroanilid wird durch den Quotienten $\Delta E / 0,33 \times \text{Min} = \text{micromolarer Umsatz TGpNA/min (U}_{\text{pNA}}$) definiert.

2.14 Azocasein-Assay

Von den Probenlösungen der Fraktionen aus der Ultrafiltration und der Flüssigkeitschromatographie wurden bei 4°C je 50 µl für die Inkubationszeiten 0, 24, 48, 72, 96 und 120 min in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Zu den Proben wurden je 250 µl eine 0,6% Azocaseinlösung in 200 mM Tris-SO₄ und 5 % Harnstoff gegeben. Die Proben wurden für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von

250 µl einer 10% Trichloressigsäure-Lösung gestoppt. Die Reaktionsgefäße wurden bei 20000 x g für 1 min zentrifugiert. Von dem Überstand wurden von jedem Ansatz 100 µl in eine Kavität einer 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Die Platte wurde bei 405 nm gegen die Referenz von 620 nm gemessen. Der Umsatz von 0,373 mg Azocasein verursachte eine Veränderung der Extinktion (ΔE) bei 405 nm von 0,1. Eine Unit für das Substrat Azocasein wird durch den Quotienten $\Delta E / 0,373 \times \text{min} = \text{Umsatz Azocasein/min}$ definiert.

2.15 Milch-Agarose-Assay

0,5 g Agarose wurden in 40 ml aqua dest. durch Erhitzen gelöst. Zu der Agaroselösung wurden 10 ml Milch (1,5% Fettanteil) gegeben. Die Milch-Agaroselösung wurde heiß auf Petrischalen in einer Dicke von 0,5 mm ausgegossen. Nach dem Erkalten wurden an markierten Stellen 5 –10 µl der auf proteolytische Aktivität zu analysierenden Lösungen gegeben. Die Milch-Agarose-Platte wurde für 2 h bei 37° inkubiert. An der Hofbildung um die markierten Stellen ließ sich die proteolytische Aktivität erkennen.

2.16 Verdau und Analyse der N-Terminalen Sequenzen der PARs

Die Peptide der N-terminalen PAR-Sequenzen wurden in aqua dest. in einer Ansatzgröße von 200µl zu einer Endkonzentration von 200 mM gelöst und mit Pseudolysin in einer Endkonzentration von 10 ng/ml für 30 sec. bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden für 10 sec. bei 70°C denaturiert und mit 200 µl 0,1% Trifluoracetat in aqua dest. aufgefüllt. Proben der Ansätze wurden anschließend in einer Reversed-Phase-Chromatographie mit einer RP18-Säule (4,6/250 mm) aufgetrennt. Die Peptidhaltigen Fraktionen wurden dann mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

2.17 Semiquantitative RT-PCR

2.17.1 RNA-Isolierung

Aus den kultivierten Keratinozyten wurde die Gesamt-RNA mittels „TRIzol.“-Reagenz gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

Zuerst wurde dazu das Stimulationsmedium entfernt, dann wurde pro Kavität einer 6-Loch-Platte 1 ml der „TRIzol.“-Lösung auf die Zellen gegeben. Das Ablösen und die Lyse der Zellen wurden durch wiederholtes Auf- und Abziehen mit einer Pipette unterstützt. Zu jeweils 1 ml dieses Zell-Lysats wurde nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur 200 µl Chloroform gegeben und für ca. 15 Sekunden gemischt. Die für 2-3 min inkubierten Proben wurden dann für 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die entstandene obere, wässrige Phase (ca. 500 µl) wurde von der unteren Chloroform-Phenol-Phase und der Interphase (mit Proteinen und anderen Zellbestandteilen) getrennt und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min bei 4 °C. Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurde das RNA-Präzipitat mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7500 x g für 5 min bei 4 °C). Das so entstandene RNA-Präzipitat konnte in 25 µl 25 %-Formamid-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.17.2 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 mittels eines UV-Detektors mit automatischer Quantifizierung durchgeführt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 41,2 µg/ml (Sambrook, 1989).

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

Proteinen liegt bei 280 nm. Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (E260/E280) lässt sich die Reinheit einer Nukleinsäureprobe bestimmen; er sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

2.17.3 Reverse Transkription von RNA (cDNA- Synthese)

Zur weiteren Analyse wurde die aus Zellen isolierte RNA mit einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Bei diesem Prozess wird die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase genutzt (Gallo, 1971), welches eine RNA-Matrize in einen komplementären DNA-Strang umschreibt (cDNA). Für einen Reaktionsansatz wurden 1 µg Gesamt-RNA und 2,5 µl Oligo(dT)-Primer (20 µM) mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 12 µl gebracht. Dieser Ansatz wurde für 10 min in einem Thermoblock auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben, und sofort auf Eis gestellt. Hinzugefügt wurden:

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

Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 °C (Anhybridisierung der Oligo(dT)-Primer und Synthese der cDNA). Anschließend wurde die Lösung zur Inaktivierung des Enzyms für 5 min auf 90 °C erhitzt. Die so gewonnene cDNA wurde bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert, nachdem die Probe mit 80 µl H₂O auf 100 µl Gesamtvolumen gebracht wurde.

2.17.4 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Kombination von reverser Transkription und Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, die Genexpression auf mRNA-Ebene zu untersuchen (Newton und Graham, 1994). Damit ist auch der Nachweis von mRNA-Molekülen möglich, die nur in geringer Konzentration in der Zelle vorhanden sind.

Nachdem die mRNA mittels einer reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben worden war, wurde diese in einer PCR-Analyse mit zwei genspezifischen Primern amplifiziert. In der PCR-Reaktion wurden Intron-überspannende Primer eingesetzt, um die Amplifikation von Verunreinigungen durch genomische DNA zu verhindern.

Zur Ermittlung eines internen Standards wurden Primer des Gens für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Sie codierten für ein spezifisches, 360 Bp großes Fragment des GAPDH-Gens, das als „Haushalts-Gen“ in Epithelzellen konstant exprimiert wird. Die PCR-Reaktionen erfolgten dabei unter Verwendung eines Realtime-Cyclers (Roche, Mannheim), der den Grad der Amplifizierung am Ende von jedem Zyklus photometrisch analysiert hat.

Dabei wurden 10 ng cDNA in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

3,6 µl	H ₂ O
5 µl	TaKaRa SYBR [®] Premix Ex Taq-Puffer/Enzym-Lösung
0,2 µl	vorwärts Primer (10 µM)
0,2 µl	rückwärts Primer (10 µM)

Anschließend konnten die relative Expression der mRNA, mittels zuvor erstellter Standardkurven für die spezifischen Gensequenzen, analysiert werden.

2.17.5 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Alle im Ergebnisteil dieser Arbeit abgebildeten Diagramme zu den Stimulationsexperimenten von Keratinozyten stellen repräsentative Beispiele für mehrfach durchgeführte unabhängige Versuche dar. Versuchsansätze, die in Wiederholungen abweichende oder keine reproduzierbaren Resultate lieferten, wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

3 Ergebnisse

3.1 Stimulation des zellulären Ca^{2+} -influx in HaCaT-Keratinocyten durch mikrobielle Proteasen.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle mikrobieller Proteasen als Induktoren der mikrobiellen Abwehr. Deshalb wurde untersucht, ob neben Proteasen aus Säugetieren (u.a. Thrombin und Trypsin), die als typische Agonisten der Protease-aktivierbaren Rezeptoren gelten, auch mikrobielle Proteasen in der Lage waren, einen Ca^{2+} -Influx in Keratinocyten zu stimulieren (Abb. 1). Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Keratinocyten mit den mikrobiellen Proteasen Subtilisin A von *Bacillus subtilis*, Protease K von *Titriachium album*, Endoprotease Lys-C von *Lysobacter enzymogenes* und die Endoprotease Glu-C (V8-Protease) von *Staphylococcus aureus* stimuliert. Subtilisin A und Protease K sind Serinproteasen und gehören zur Proteasenfamilie S8 (Subtilisinfamilie), deren Mitglieder unspezifisch hinter hydrophoben Resten spalten. Die Endoproteasen Lys-C und Glu-C sind ebenfalls Serinproteasen und gehören zur Proteasenfamilie S1 (Trypsin/Chymotrypsinfamilie). Die Endoprotease Lys-C spaltet bevorzugt hinter Lysin oder Arginin und die Endoprotease Glu-C spaltet bevorzugt hinter Glutamat. Bei der Stimulation des Ca^{2+} -Influxes in Keratinocyten zeigte sich, dass die Proteasen Ca^{2+} -Signale mit unterschiedlichen Ausprägungen induzierten (Abb.3). Subtilisin A induzierte ein Ca^{2+} -Signal, welches in seiner Dauer und Intensität dem Ca^{2+} -Signal, das von Trypsin induziert wird, sehr ähnlich ist. Die Protease K induzierte ein flaches, lang anhaltendes Signal. Die Endoprotease Lys-C produzierte ein zweiphasiges Signal und die Endoprotease Glu-C von *Staphylococcus aureus* induzierte keinen Ca^{2+} -Influx in Keratinocyten.

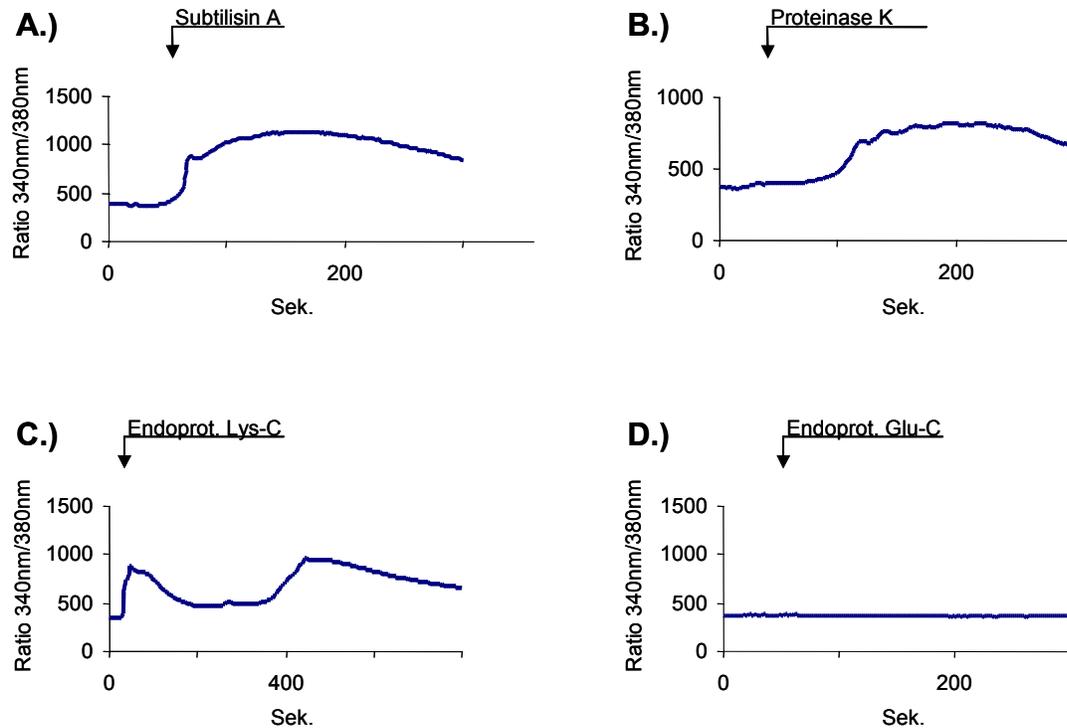


Abb. 3: Induktion des Ca^{2+} -Influxes in HaCaT-Keratinocyten durch mikrobielle Proteasen

Induktion des Ca^{2+} -Influxes in HaCaT-Keratinocyten durch (A) 2U Subtilisin A von *Bacillus subtilis* (1U = 60 μg), (B) 3U Protease K von *Tritirachium album* (1U = 100 μg), (C) 1U Endoprotease Lys-C von *Lysobacter enzymogenes* (1U = 1,7 μg), (D) 20U Endoprotease Glu-C (V8-Protease) von *Staphylococcus aureus* (1U = 25 μg). Die Position des Pfeils kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation der Protease. Das Volumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

3.2 Stimulation der mRNA-Expression von Zytokinen in HaCaT-Keratinocyten durch mikrobielle Proteasen.

Die mikrobiellen Proteasen Subtilisin A, Protease K, Endoprotease Lys-C und die Endoprotease Glu-C wurden zur Stimulation der mRNA-Expression von Zytokinen in HaCaT-Keratinocyten eingesetzt. Analysiert wurde die Expression der mRNA von IL1 β , IL8, TNF α und hBD2 (Abb. 4). Die mRNA-Expression von IL1 β wurde überwiegend von den Proteasen der Subtilisinfamilie Subtilisin A und Protease K stimuliert. Die Protease K induzierte im Vergleich zu den anderen Proteasen die höchste mRNA-Expression von

IL8, TNF α und hBD2. Die Endoprotease Glu-C induzierte die mRNA-Expression der analysierten Zytokine nur in geringem Ausmaß.

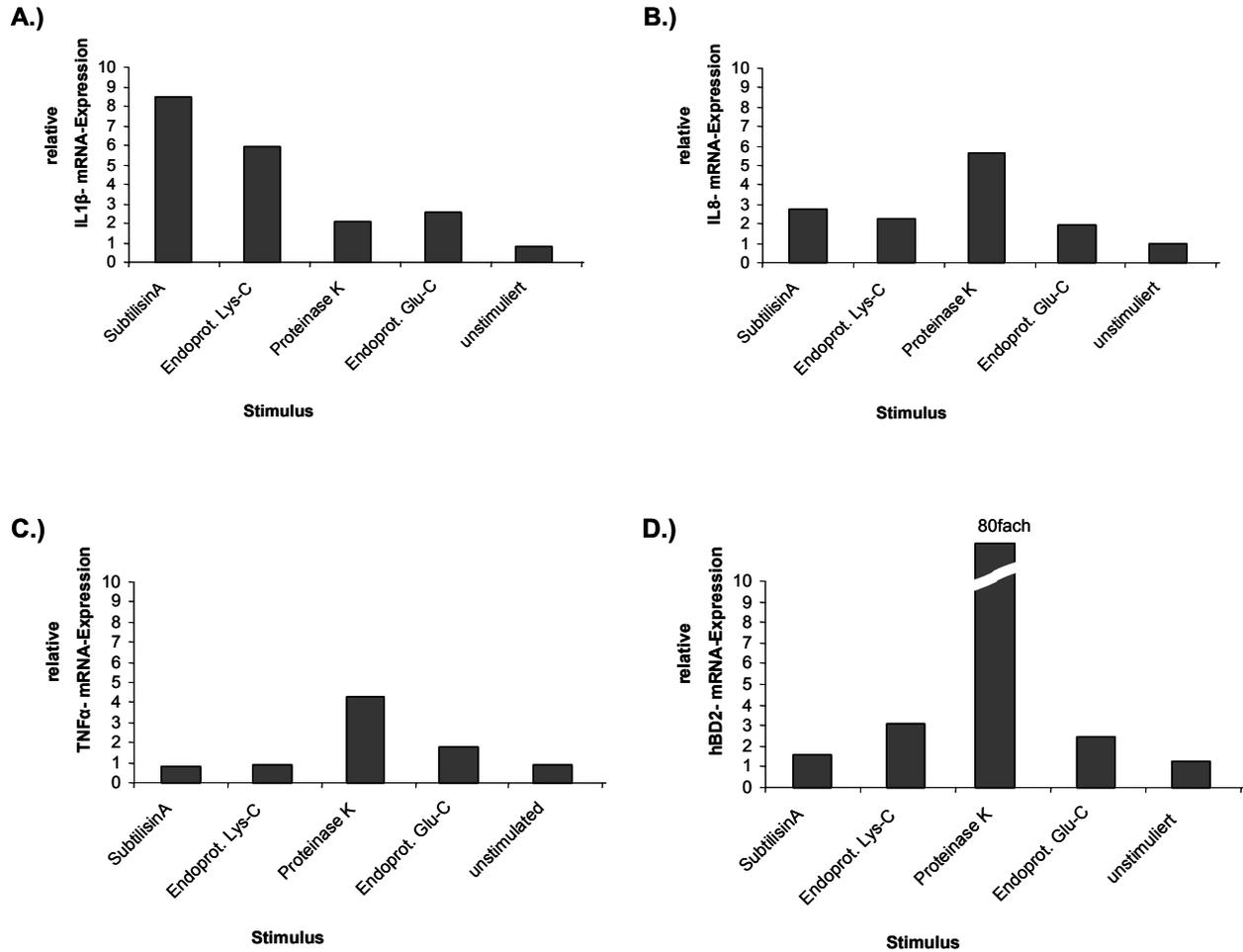


Abb. 4: Stimulation der mRNA-Expression von IL1 β , IL8, TNF α und hBD2 in HaCaT-Keratinozyten durch bakterielle Proteasen

Stimulation der mRNA-Expression in HaCaT-Keratinozyten durch 2 U Subtilisin A von *Bacillus subtilis* (1U = 60 μ g), 3 U Protease K von *Titriachium album* (1U = 100 μ g), 1 U Endoprotease Lys-C von *Lysobacter enzymogenes* (1U = 1,7 μ g) und 20 U Endoprotease Glu-C (V8-Protease) von *Staphylococcus aureus* (1U = 25 μ g). Stimuliert wurde die mRNA-Expression von IL1 β (A), IL8 (B), TNF α (C) und hBD2 (D). Die Stimulationszeit betrug 6 h. Das Volumen des Stimulationsansatzes betrug 1 ml. Die aus den Ansätzen isolierte mRNA wurde in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Transkripte wurden mit spezifischen Primern mit einer Real-Time-PCR amplifiziert. Die Amplifikation der spezifischen Transkripte ist im Verhältnis zu der Amplifikation der Transkripte der GAPDH-mRNA dargestellt.

3.3 Untersuchungen zur Stimulation des zellulären Ca^{2+} -Influx durch Subtilisin A

Die Protease Subtilisin A des nicht-pathogenen Bakteriums *Bacillus subtilis* wurde für Untersuchungen an HaCaT-Keratinocyten ausgewählt, um auf diesem Weg einen Hinweis auf die Rezeptoren zu erhalten, die durch eine mikrobielle Protease aktiviert werden. Bei der Stimulation des Ca^{2+} -Influxes in HaCaT-Keratinocyten, die vorher mit Pertussis-Toxin (PTX) oder Cholera-Toxin (CTX) inkubiert wurden, zeigte sich, dass der von Subtilisin A induzierte Ca^{2+} -Influx insensitiv gegenüber diesen Toxinen war (Abb.5).

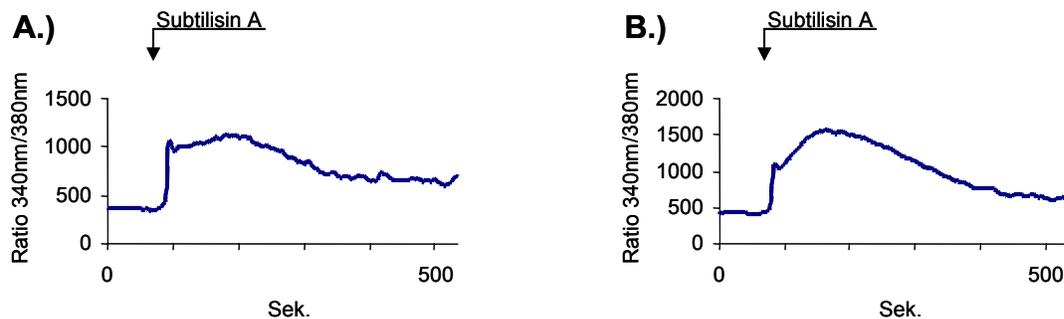


Abb. 5: Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch 180 μg Subtilisin A in HaCaT-Keratinocyten nach Vorbehandlung mit Pertussis- oder Cholera toxin

Vorbehandlung mit (A) Pertussis-Toxin (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oder (B) Cholera-Toxin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Subtilisin A. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

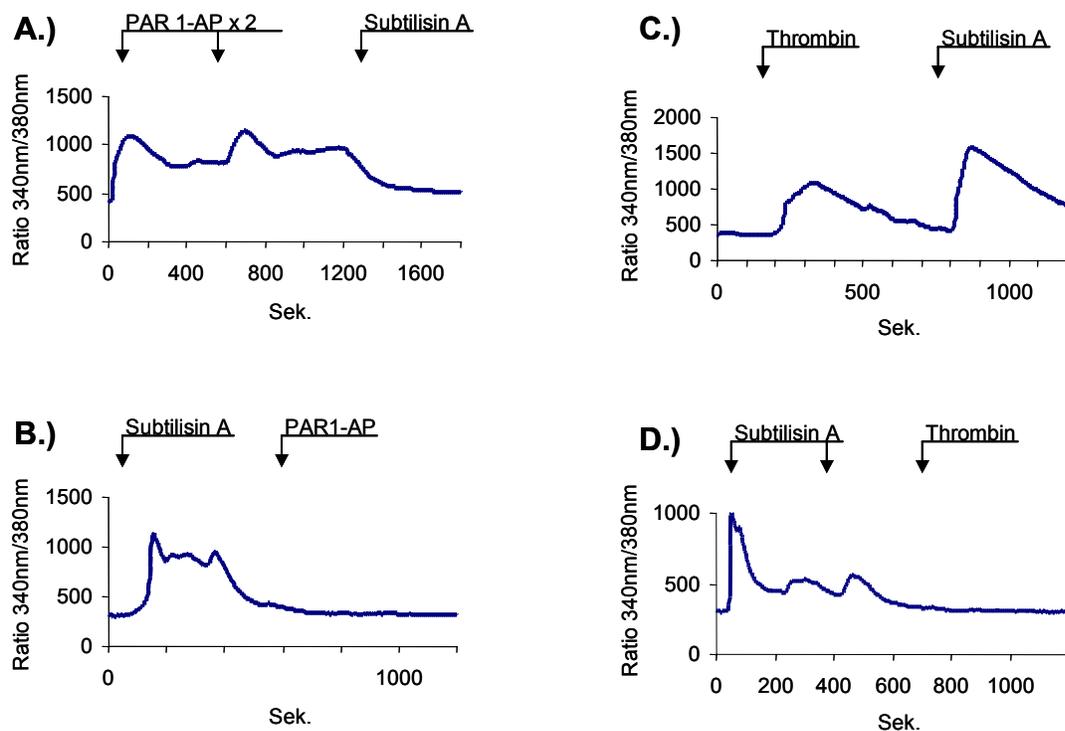


Abb. 6: Kreuzdeaktivierung des Subtilisin A-Signals durch ein PAR1-aktivierendes Peptid (PAR1-AP) und Thrombin.

(A) Induktion des Ca^{2+} -Influsses durch 180 μg Subtilisin A in HaCaT-Keratinocyten nach der zweimaligen vorangehende Stimulation der Zellen durch Applikation des PAR1-AP zu einer EK von 20 μM . (B) Induktion des Ca^{2+} -Influsses durch Applikation des PAR1-AP zu einer EK von 20 μM nach der vorangehenden Stimulation der Keratinocyten mit 180 μg Subtilisin A. (C) Induktion des Ca^{2+} -Influsses durch 180 μg Subtilisin A in HaCaT-Keratinocyten nach der vorangegangenen Stimulation der Zellen durch Applikation von 25 μg Thrombin. (D) Induktion des Ca^{2+} -Influsses in HaCaT-Keratinocyten durch 25 μg Thrombin nach der vorangegangenen Stimulation der Keratinocyten mit 180 μg Subtilisin A. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Eine Stimulation der Keratinocyten mit Subtilisin A, nach der vorangehenden Induktion des Ca^{2+} -Influsses mit einem PAR1-aktivierenden Peptid (PAR1-AP), induzierte keinen weiteren Ca^{2+} -Influx (Abb. 6 A). Die Applikation von Subtilisin A führte zu einer Beendigung des Ca^{2+} -Signals in der Zelle. Nach der vorangehenden Stimulation der Zellen mit Subtilisin A wurde anschließend kein Ca^{2+} -Signal durch das PAR1-AP induziert. Eine vorangehende Stimulation der Keratinocyten mit dem PAR1-Agonisten Thrombin verhinderte eine nachträgliche Stimulation der Zellen mit Subtilisin A. Eine

vorangehende Stimulation der Zellen mit Subtilisin A inhibierte eine anschließende Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch Thrombin nicht.

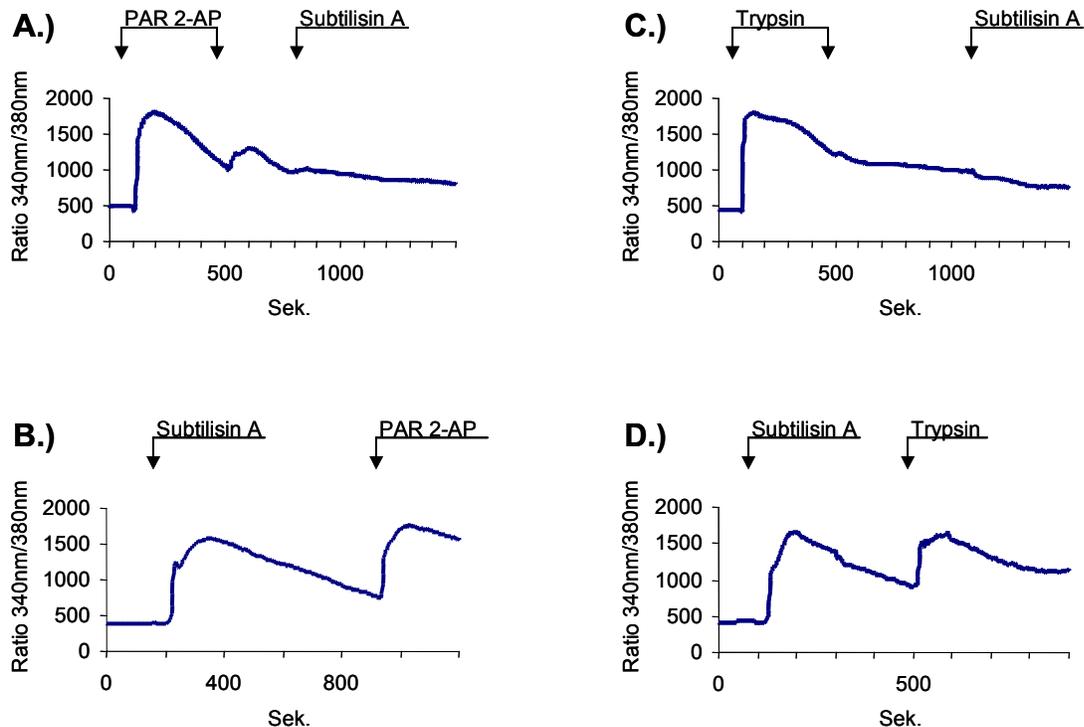


Abb.7: Kreuzdeaktivierung des Subtilisin A-Signals durch ein PAR2-aktivierendes Peptid (PAR2-AP) und Trypsin

(A) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch 180 μg Subtilisin A in HaCaT-Keratinocyten nach der zweimaligen vorangegangenen Stimulation der Zellen durch Applikation des PAR2-AP zu einer EK von 40 μM . (B) Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch Applikation des PAR2-AP zu einer EK von 20 μM nach der vorangehenden Stimulation der Keratinocyten mit 180 μg Subtilisin A. (C) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch 180 μg Subtilisin A in HaCaT-Keratinocyten nach der vorangehende Stimulation der Zellen durch Applikation von 100 μg Trypsin. (D) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influxes in HaCaT-Keratinocyten durch 100 μg Trypsin nach der vorangehende Stimulation der Keratinocyten mit 180 μg Subtilisin A. Die Position des Pfeils kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation der Induktoren. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Nach der vorangehenden Stimulation der Keratinocyten mit dem PAR2-AP oder dem PAR2-Agonisten Trypsin, wurde in den Keratinocyten, durch die nachfolgende Stimulation mit Subtilisin A, kein Ca^{2+} - Influx induziert (Abb.7 A, C). Die Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch das PAR2-AP oder durch Trypsin wurde durch eine vorangehende Stimulation mit Subtilisin A nicht verhindert (Abb.7 B, D).

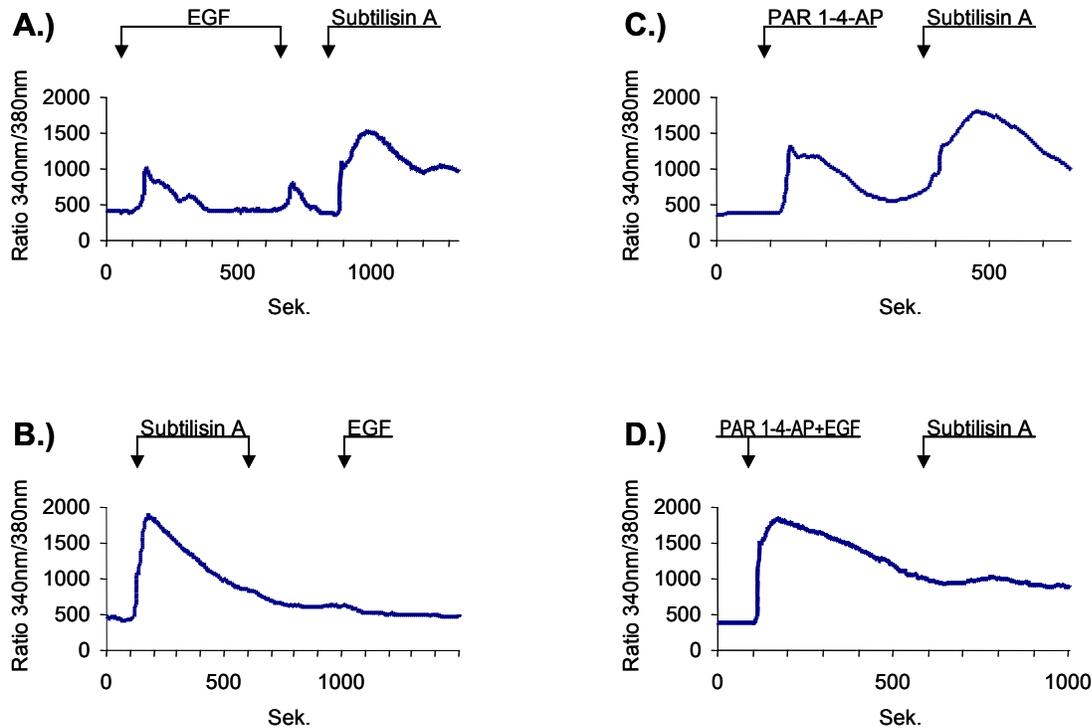


Abb.8: Kreuzdeaktivierung des EGF-Signals durch Subtilisin A und des Subtilisin A-Signals durch eine Kombination aller PAR-AP mit EGF

(A) Induktion des Ca^{2+} -Influges durch 180 μg Subtilisin A in HaCaT-Keratinocyten nach vorangegangener Stimulation der Zellen durch zweimalige Applikation des EGF (Endkonzentration 0,01 μM). (B) Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Applikation EGF (Endkonzentration 0,01 μM) nach vorangegangener Stimulation der Keratinocyten mit 180 μg Subtilisin A. (C) Induktion des Ca^{2+} -Influges durch 180 μg Subtilisin A in HaCaT-Keratinocyten nach vorangegangener Stimulation der Zellen durch Applikation der PAR1-4-APs in Kombination. (D) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influges durch 180 μg Subtilisin A nach vorangegangener Stimulation der Zellen durch Applikation der PAR1-4-AP und EGF in Kombination. Die Positionen der Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Applikation der Induktoren. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Nach der vorausgehenden Stimulation der Keratinocyten mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF, induzierte die anschließende Stimulation der Zellen mit Subtilisin A einen Ca^{2+} -Influx (Abb. 8 A). Keratinocyten, die vorher mit Subtilisin A stimuliert wurden, ließen sich anschließend nicht mehr durch EGF zum Ca^{2+} -Influx stimulieren (Abb. 8 B). Eine Kombination der PAR1-4-APs verhinderte nicht eine nachfolgende Stimulation der Zellen durch Subtilisin A (Abb. 8 C), obwohl Subtilisin A nach einer Prästimulation der Zellen mit dem PAR2-AP kein Ca^{2+} -Signal induziert (Abb.7.A) Nach einer Kombination der PAR1-4-APs und dem EGF wurde eine nachfolgende Stimulation des Ca^{2+} -Influges durch Subtilisin A verhindert (Abb.8 D).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kreuzdeaktivierung mit Subtilisin A und den PAR-Agonisten

PAR1-Agonisten: Durch eine Vorinkubation der Zellen mit den Agonisten des PAR1 wird ein nachfolgendes, durch Subtilisin A stimuliertes Signal gehemmt. Eine Vorinkubation mit Subtilisin A hemmt nur ein nachfolgendes, durch das PAR1-AP stimuliertes Signal.

PAR2-Agonisten: Durch eine Vorinkubation der Zellen mit den Agonisten des PAR2 wird ein nachfolgendes, durch Subtilisin A stimuliertes Signal gehemmt. Eine Vorinkubation mit Subtilisin A hemmt die nachfolgenden, durch die PAR2-Agonisten stimulierten Signale nicht.

EGF: Eine Vorinkubation der Zellen mit EGF inhibiert nicht die nachfolgende Stimulation der Zellen durch Subtilisin A. Eine Prästimulation mit Subtilisin A inhibiert ein nachfolgendes durch EGF stimuliertes Signal.

Agonisten in Kombination: Eine Vorinkubation der Zellen mit einer Kombination aus allen PAR-APs inhibiert nicht die nachfolgende Stimulation der Zellen durch Subtilisin A. Eine nachfolgende Stimulation der Zellen durch Subtilisin A wird durch eine Kombination aus allen PAR-AP und dem EGF inhibiert.

Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Versuche zur gegenseitigen Rezeptordeaktivierung zusammen.

Tabelle 1 : Zusammenfassung der Ergebnisse der Kreuzdeaktivierungsversuche mit Subtilisin A und den PAR1- und PAR2-Agonisten und EGF

In der Spalte „**Prästimulation**“ werden die Agonisten angezeigt, mit denen in den Keratinozyten durch Vorinkubation ein Ca^{2+} Signa- ausgelöst wurde. Die Spalte „**Stimulation**“ enthält die Agonisten mit denen im Anschluß an die Vorinkubation versucht wurde in den gleichen Keratinozyten ein daran anschließendes Ca^{2+} -Signal auszulösen. Die Spalte „**Inhibition der Stimulation**“ zeigt durch ein (+) die erfolgte Inhibition des zweiten Signals, wenn die Zellen kein zweites Mal stimuliert werden konnten und durch ein (-) die erfolgte Auslösung eines zweite Ca^{2+} -Signals und damit die nicht erfolgte Inhibition einer nachträglichen Stimulation an.

Prästimulation :	Stimulation :	Inhibition der Stimulation : + =Inhibition, - = keine Inhibition
PAR1-AP	Subtilisin A	+
Subtilisin A	PAR1-AP	+
Thrombin	Subtilisin A	+
Subtilisin A	Thrombin	-
PAR2-AP	Subtilisin A	+
Subtilisin A	PAR2-AP	-
Trypsin	Subtilisin A	+
Subtilisin A	Trypsin	-
EGF	Subtilisin A	-
Subtilisin A	EGF	+
PAR-1-4-AP	Subtilisin A	-
PAR-1-4-AP + EGF	Subtilisin A	+

3.5 Analyse des Kulturüberstandes von *Pseudomonas*

Die Aktivierung der Protease-aktivierbaren Rezeptoren führt über Inositol-1,4,5-Triphosphat zu einem Ca^{2+} -Influx aus den internen Reservoirs, wie das endoplasmatische Reticulum, in das Zytosol. Deshalb wurden die ultrafiltrierten Fraktionen des Kulturüberstandes von *Pseudomonas aeruginosa* auf ihre Fähigkeit überprüft einen Ca^{2+} -Influx in Keratinozyten zu stimulieren (Abb.9). Dabei zeigte sich, dass von den Fraktionen <30 kDa, 30-300 kDa und > 300 kDa, die Fraktion von 30-300 kDa das stärksten Ca^{2+} -Signal in Keratinozyten stimulierte (Abb. 9 B).

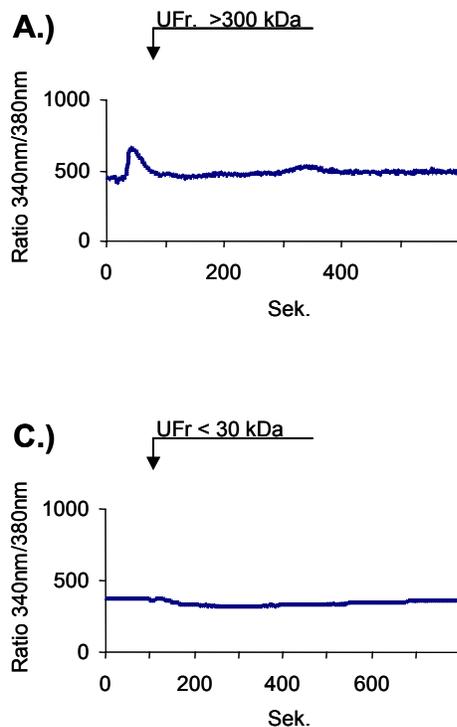


Abb. 9: Induktion des Ca^{2+} -Influxes in durch die Fraktionen aus der Ultrafiltration

Stimulation von HaCaT-Keratinozyten durch Zugabe von je 50 μl der jeweiligen Fraktion aus der Ultrafiltration zu 150 μl Puffervolumen über den Zellen in der Deckgläserkammer: (A) >300 kDa; (B) 30 –300 kDa; (C) <30 kDa. Die Positionen der Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Zugabe der Induktoren. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Die 30-300 kDa-Fraktion wurde zunächst mit einer Resource Q-Anionenaustauscher-Säule in einem NaCl-Gradienten aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mit dem chromogenen Substraten N-Succinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Phenylalanin-4-Nitroanilid (Cysteinproteasen, Papain, Chymotrypsin und Cathepsin G), Benzyl-Oxycarbonyl-Glycyl-Prolyl-Arginin-4-Nitroanilid (Serinproteasen, Thrombin, Trypsin), N-Methoxysuccinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Valin-4-Nitroanilid (Elastasen) und Tosyl-Glycyl-

Prolyl-Lysin-4-Nitroanilid (Serinproteasen, Plasmin) analysiert, mit denen eine Eingrenzung der Familienzugehörigkeit der Proteasen erlaubt werden (Abb.10). Dabei konnte bei den Fraktionen 11 bis 15 eine proteolytische Aktivität festgestellt werden, es wurde jedoch nur das plasminspezifische Substrat Tosyl-Glycyl-Prolyl-Lysin-p-Nitroanilid umgesetzt (Abb.10 D).

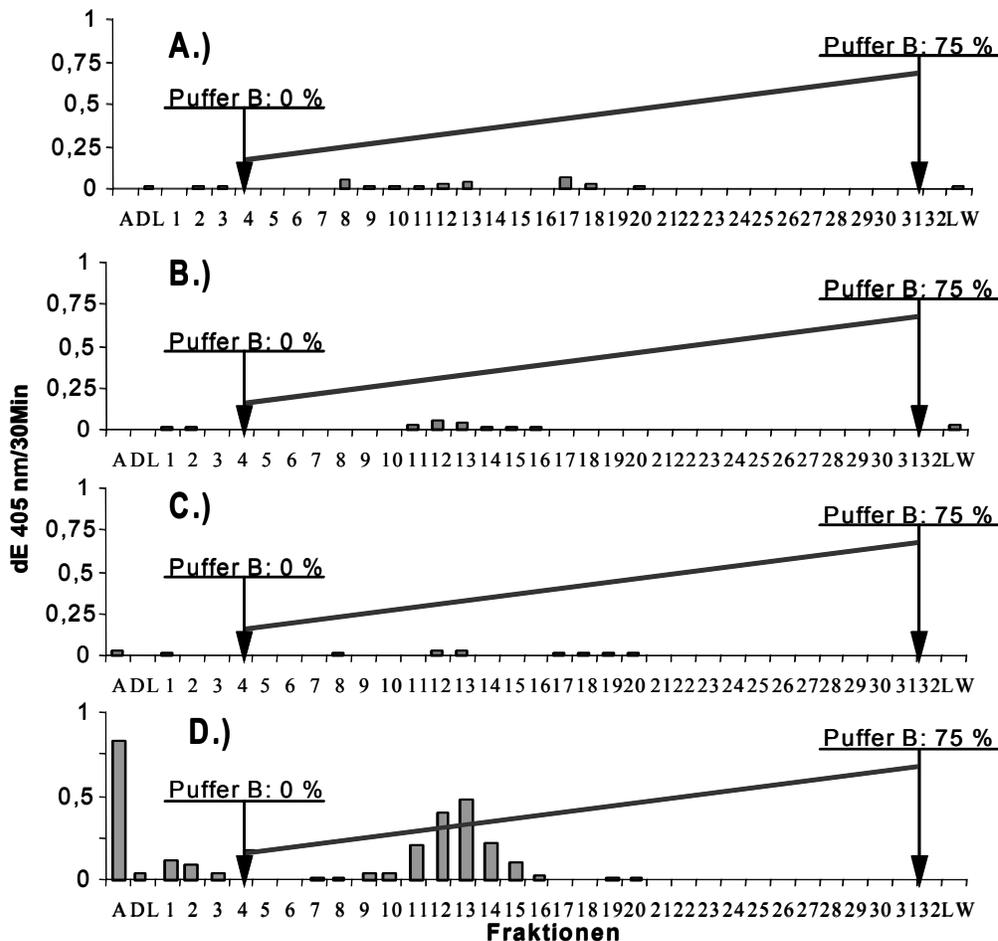


Abb. 10: Proteolytische Aktivität in *Pseudomonas aeruginosa*-Überständen nach Anionenaustausch-Chromatographie.

Analyse der proteolytischen Aktivität der Fraktionen nach Resource Q-Chromatographie mit spezifische Substraten (A) N-Succinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Phenylalanin-4-Nitroanilid (Chymotrypsin und Cathepsin G), (B) Benzyl-oxycarbonyl-Glycyl-Prolyl-Arginin-4-Nitroanilid (Serinproteasen, spez. Thrombin), (C) N-Succinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Valin-4-Nitroanilid (Elastasen) und (D) Tosyl-Glycyl-Prolyl-Lysin-4-Nitroanilid (Serinproteasen, spez. Plasmin). Es wurde die Veränderung der Farbreaktion innerhalb von 30 min bei 405 nm gemessen.

Der Einsatz der Fraktionen als Stimuli für den Ca^{2+} -Influx in Keratinozyten zeigte, dass die Fraktionen mit einer Lysin-spezifischen proteolytischen Aktivität auch den intrazellulären Ca^{2+} -Influx stimulierten (Abb.11).

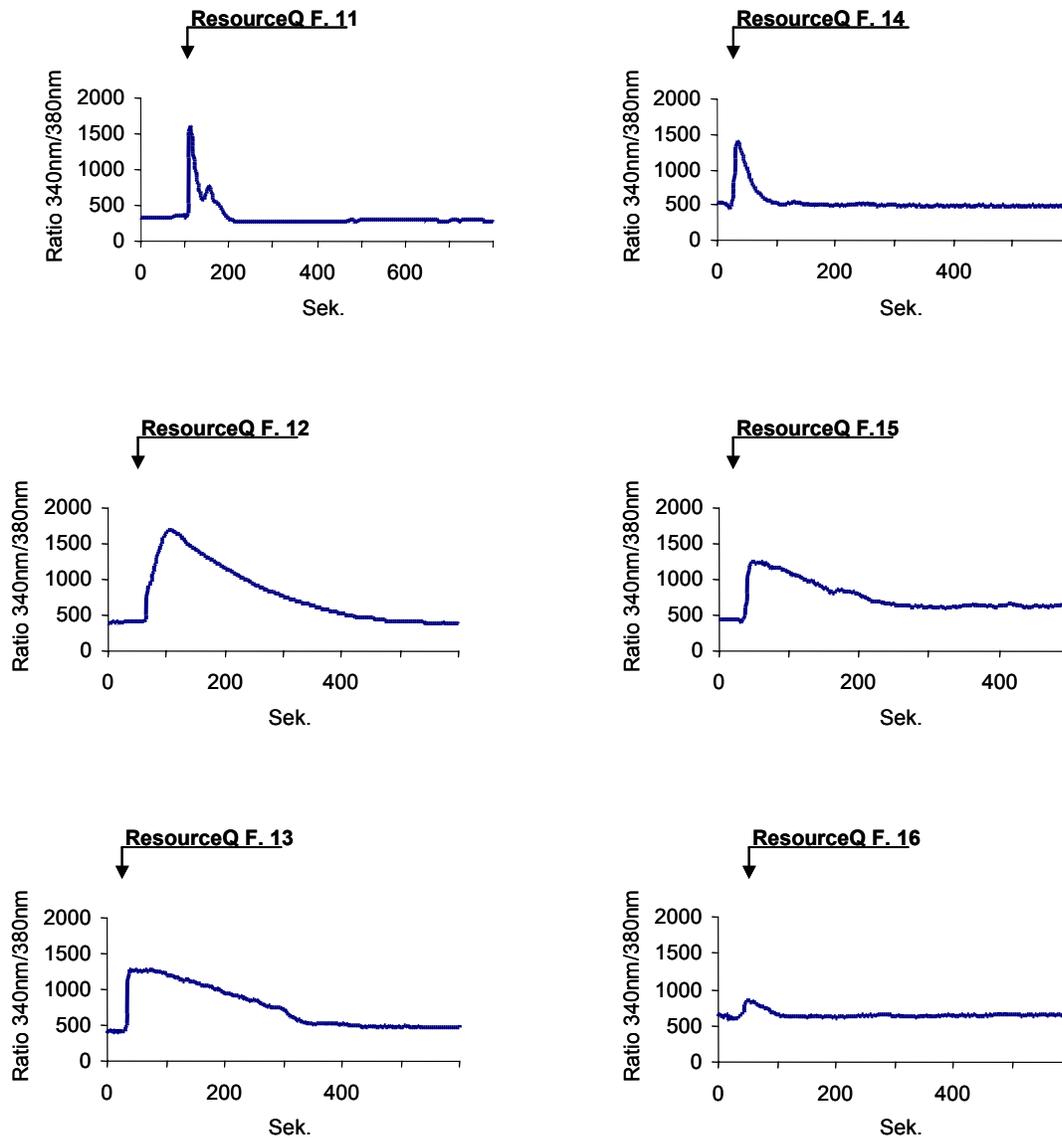


Abb. 11: Stimulation des Ca^{2+} -Influxes durch die proteolytisch aktiven Fraktionen aus der Resource Q-Chromatographie

Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch je 20 μl aus den jeweiligen Fraktionen 11-16 der Resource Q-Chromatographie. Die Positionen der Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Zugabe der Induktoren. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 170 μl .

Die Analyse der aktiven Fraktionen aus der Auftrennung durch die Resource Q-Säule zeigte, dass 3,2 % der Lysin-spezifischen proteolytischen Gesamtaktivität aus dem Rohüberstand isoliert werden konnten (s. Abb.12). Auf einem 10% SDS-Gel zeigten sich erhebliche Verunreinigungen durch andere Proteine. Durch die Auftrennung der 30 - 300 kDa-Fraktion durch eine CM-Kationentauscher-Säule mit einer pH-Stufe von pH 5.8 auf pH 9.0, konnten ein Präparat von höherer Reinheit erzielt werden. Die proteolytisch aktiven Fraktionen wurden zu dem Präparat „PA-Protease IV“ zusammengefasst. Auf diesem Weg wurden 16% - 20% der Lysin-spezifischen proteolytischen Gesamtaktivität isoliert.

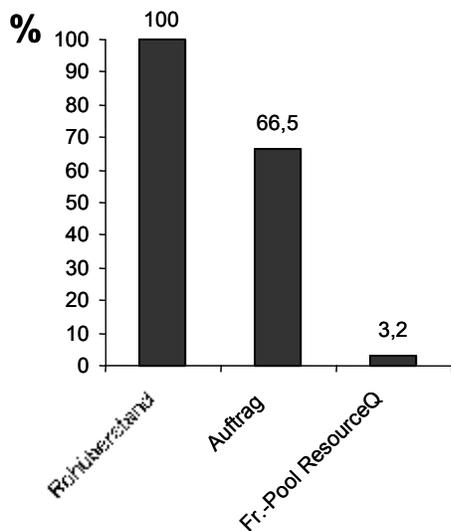


Abb.12 : Ausbeute der Proteolytische Aktivität in der Resource Q -Chromatographie

Ausbeute der proteolytischen Gesamtaktivität in Prozent aus der Aufreinigung mit einer Resource Q Anionentauscher-Matrix im Gradienten von 0-2M NaCl in 10 mM Tris-Puffer.

Die mit der CM-Chromatographie gereinigte proteolytische Aktivität wurde mit einer p-Aminobenzamidin-Affinitätschromatographie-Säule im Gradienten von 0-2M NaCl in 10 mM Tris-Puffer weiter aufgereinigt. p-Aminobenzamidin ist ein spezifischer Inhibitor für die Pseudomonas-Protease IV. Dieser Reinigungsschritt erbrachte eine Ausbeute von 3,4% der Gesamtaktivität (s. Abb. 13)

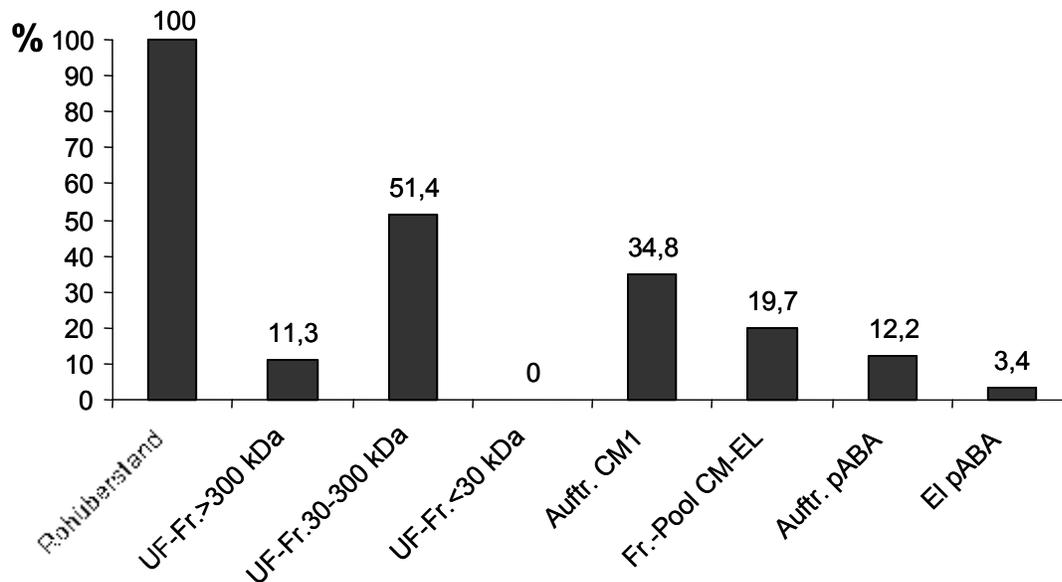


Abb.13: Ausbeute der proteolytischen Aktivität in der CM-Kationenaustauschchromatographie und der Affinitätschromatographie

Ausbeute der proteolytischen Gesamtaktivität in Prozent aus der Aufreinigung mit einer CM-Kationenaustauscher-Matrix mit einer pH-Stufe von pH 5,8 auf pH 9,0 in 10 mM Ammoniumacetat-Puffer in der CM-Säule und der anschliessenden Aufreinigung im Gradienten von 0-2M NaCl in 10 mM Tris-Puffer mit einer p-Aminobenzamidin-Affinitätschromatographie Säule.

3.6 Ca²⁺-Influx und Zytokinstimulation

3.6.1 Stimulation des Ca²⁺-Influx durch PA-Protease IV

Das Lysin-spezifisch proteolytisch aktive Präparat (PA-Protease IV) aus der Auftrennung mit der CM-Kationenaustauscher-Säule wurde als Induktor für den Ca²⁺-Influx in Keratinozyten eingesetzt. Dabei wurden Versuche zur gegenseitigen Rezeptordeaktivierung mit den Agonisten des PAR1- und des PAR2-Rezeptors gemacht. Protease-aktivierbare Rezeptoren werden nach ihrer Aktivierung von der Zelle abgebaut. Die Zelle ist dann für einige Stunden nicht mehr durch die Agonisten des betroffenen Rezeptors aktivierbar. Wenn nach der vorangehenden Stimulation durch den Agonisten eines bestimmten PAR-Rezeptors die Induktion des Ca²⁺-Influsses durch einen zweiten Stimulus ausbleibt, ist dieses ein Hinweis auf die Nutzung des gleichen Rezeptors.

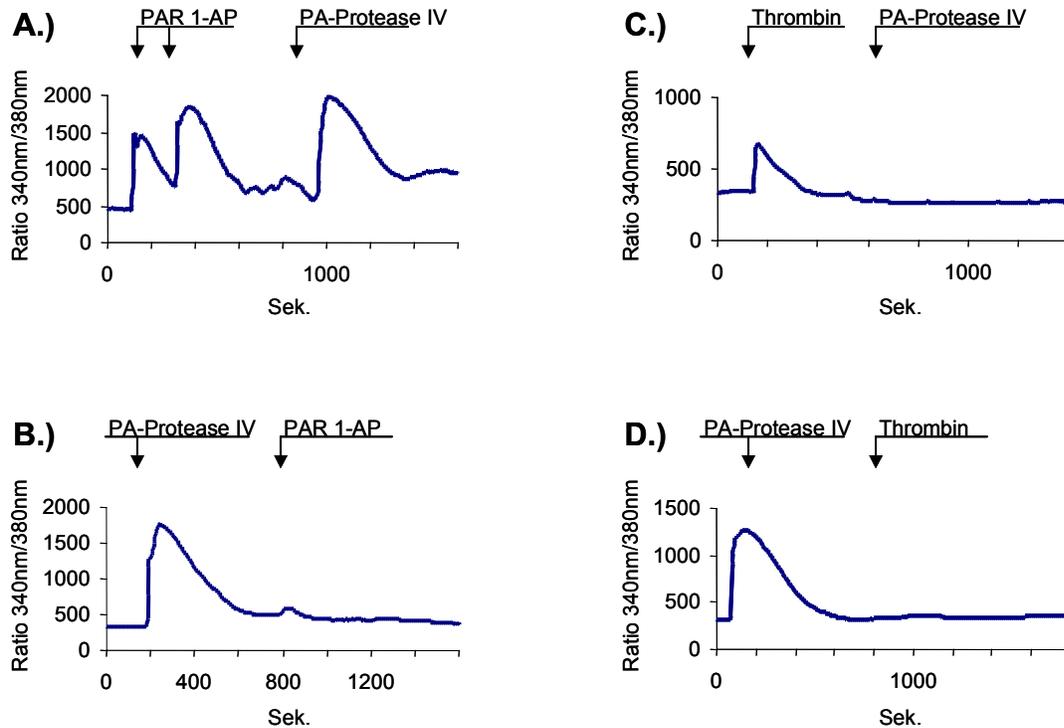


Abb. 14: Kreuzdeaktivierung des Protease IV-Signals durch ein PAR1-aktivierendes Peptid (PAR1-AP) und Thrombin.

(A) Stimulation des Ca^{2+} -Influges durch 20 U_{pNA} PA-Protease IV in Keratinozyten nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch zweimalige Applikation des PAR1-AP zu einer EK von 20 μM . (B) Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Applikation des PAR1-AP zu einer EK von 20 μM nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit 20 U_{pNA} PA-Protease IV. (C) Induktion des Ca^{2+} -Influges durch 20 U_{pNA} PA-Protease IV in Keratinozyten nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch Applikation von 25 μg Thrombin. (D) Induktion des Ca^{2+} -Influges in HaCaT-Keratinozyten durch 25 μg Thrombin nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit 20 U_{pNA} PA-Protease IV. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Nach einer vorangehenden Stimulation von Keratinozyten mit dem PAR1-AP, induzierte das Präparat PA-Protease IV einen Ca^{2+} -Influx (Abb.15 A). Durch die Prästimulation mit den PAR1-Agonisten Thrombin wurde eine anschließende Stimulation des Ca^{2+} -Influges durch PA-Protease IV gehemmt (Abb.15 C). Die Prästimulation der Keratinozyten mit PA-Protease IV verhinderte eine Induktion des Ca^{2+} -Influges durch die Agonisten des PAR1-Rezeptors, dem PAR1-AP und Thrombin (Abb. 15 B, D). Nach der Prästimulation mit dem PAR2-AP konnte PA-Protease IV keinen weiteren Ca^{2+} -Influx induzieren (Abb. 16 A). Die Prästimulation der Keratinozyten mit PA-Protease IV beeinflusste nicht die nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Influges durch das PAR2-AP (Abb.16 B). Die

vorangehende Stimulation des Ca^{2+} -Influx durch Trypsin inhibierte eine nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Influx durch das Lysin-spezifische proteolytisch aktive Präparat (Abb.16 C). Trypsin konnte nach der Stimulation des Ca^{2+} -Influxes durch PA-Protease IV einen weiteres Ca^{2+} -Signal induzieren (Abb. 16 D).

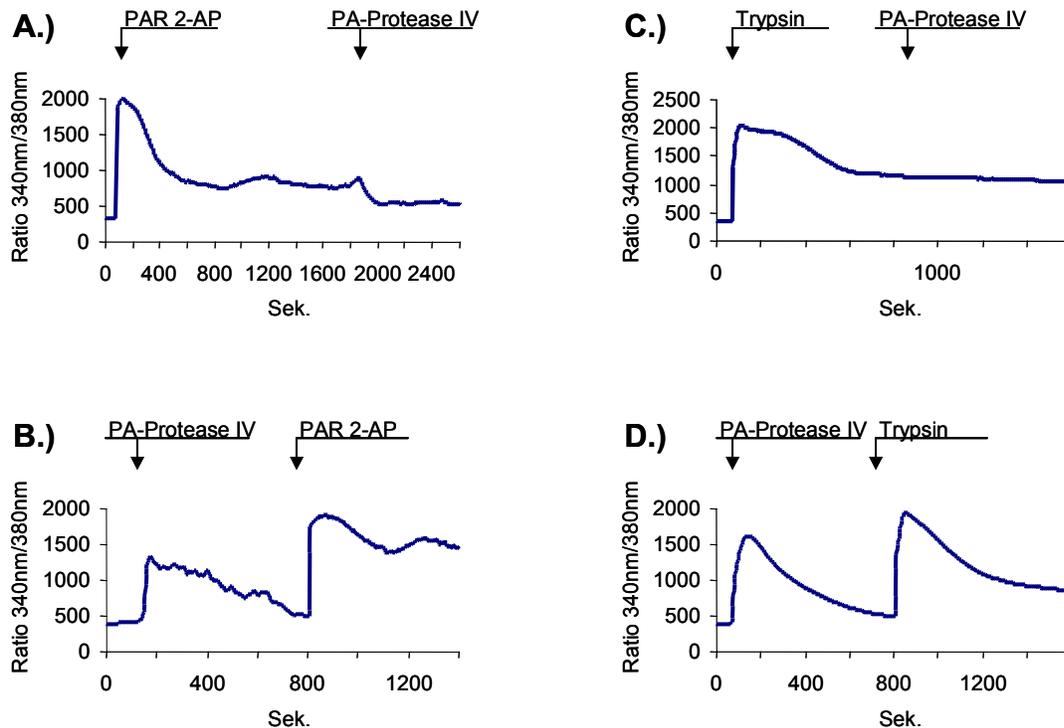


Abb.15: Kreuzdeaktivierung des Protease IV-Signals durch ein PAR2-aktivierendes Peptid (PAR2-AP) und Trypsin.

(A) Versuchte Stimulation des Ca^{2+} -Influxes durch 20 U_{pNA} PA-Protease IV in Keratinozyten nach der vorangehende Stimulation der Zellen durch das PAR2-AP zu einer EK von 20 μM . (B) Stimulation des Ca^{2+} -Influxes durch Applikation des PAR2-AP zu einer EK von 20 μM nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit 20 U_{pNA} PA-Protease IV. (C) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch 20 U_{pNA} PA-Protease IV in Keratinozyten nach der vorangehende Stimulation der Zellen durch Applikation von Trypsin zu einer EK von 10 $\mu\text{g/ml}$. (D) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influxes in Keratinozyten durch Trypsin zu einer EK von 10 $\mu\text{g/ml}$ nach der vorangehende Stimulation der Keratinozyten mit 20 U_{pNA} PA-Protease IV. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

3.6.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kreuzdeaktivierung mit PA-Protease-IV und den PAR-Agonisten

PAR1-Agonisten: Durch Vorinkubation der Zellen mit der PA-Protease-IV wird ein nachfolgendes, durch die beiden Agonisten des PAR1 Thrombin und PAR1-AP stimuliertes Signal gehemmt. Nur die Vorinkubation mit Thrombin hemmt ein nachfolgendes, durch die PA-Protease IV stimuliertes Signal.

PAR2-Agonisten: Durch Vorinkubation der Zellen mit den Agonisten des PAR2 wird ein nachfolgendes, durch die PA-Protease IV stimuliertes Signal gehemmt. Eine Vorinkubation mit der PA-Protease IV hemmt die nachfolgenden, durch die PAR2-Agonisten stimulierten Signale nicht.

Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Versuche zur gegenseitigen Rezeptordeaktivierung zusammen.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der gegenseitigen Rezeptordeaktivierung mit den PAR1- und PAR2-Agonisten und PA-Protease IV auf Keratinozyten

In der Spalte „**Prästimulation**“ werden die Agonisten angezeigt, mit denen in den Keratinozyten durch Vorinkubation ein Ca^{2+} Signal ausgelöst wurde. Die Spalte „**Stimulation**“ enthält die Agonisten mit denen im Anschluss an die Vorinkubation versucht wurde in den gleichen Keratinozyten ein daran anschließendes Ca^{2+} -Signal auszulösen. Die Spalte „**Inhibition der Stimulation**“ zeigt durch ein (+) die erfolgte Inhibition des zweiten Signals, wenn die Zellen kein zweites Mal stimuliert werden konnten und durch ein (-) die erfolgte Auslösung eines zweite Ca^{2+} -Signals und damit die nicht erfolgte Inhibition einer nachträglichen Stimulation an.

Prästimulation :	Stimulation :	Inhibition der Stimulation : + =Inhibition, - = keine Inhibition
PAR1-AP	PA-Protease IV	-
PA-Protease IV	PAR1-AP	+
Thrombin	PA-Protease IV	+
PA-Protease IV	Thrombin	+
PAR2-AP	PA-Protease IV	+
PA-Protease IV	PAR2-AP	-
Trypsin	PA-Protease IV	+
PA-Protease IV	Trypsin	-

3.6.3 Rezeptordeaktivierung mit der Lysin-spezifischen Protease Plasmin

Die proteolytische Aktivität des Präparates PA-Protease IV hatte eine Spezifität für Lysyl-Carboxyl-Bindungen. Deswegen wurden die Versuche zur gegenseitigen Rezeptordeaktivierung mit humanem Plasmin durchgeführt, da diese Protease ebenfalls Lysyl-Carboxyl-Bindungen spalten kann. Dabei zeigte sich, dass eine Prästimulation mit Plasmin ebenso die nachfolgende Induktion eines Ca^{2+} -Signals durch PA-Protease IV inhibierte, wie die Prästimulation mit der PA-Protease IV ein nachfolgendes, durch Plasmin induziertes Signal, inhibierte (Abb. 17).

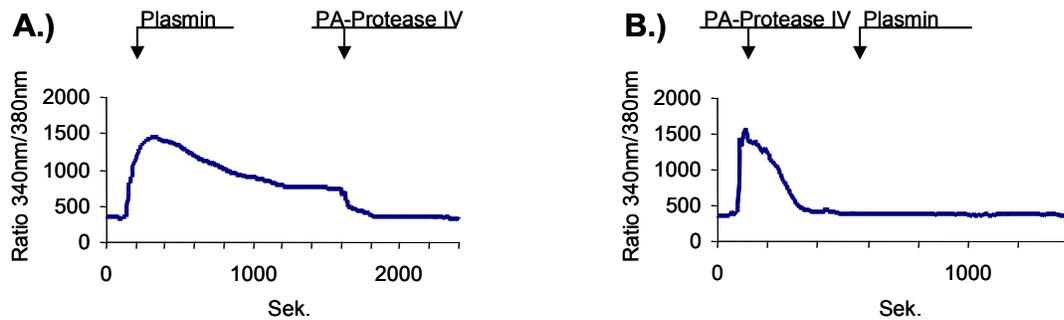


Abb.16: Gegenseitige Kreuzdeaktivierung des Ca^{2+} -Signals durch Protease IV und Plasmin.

(A) Versuchte Stimulation des Ca^{2+} -Influxes durch 20 U_{pNA} PA-Protease IV in Keratinozyten nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch Applikation 50 μg humanem Plasmin. (B) Stimulation des Ca^{2+} -Influxes durch die Applikation von 50 μg humanem Plasmin nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit 20 U_{pNA} PA-Protease IV.

3.6.4 Identifikation der Protease Pseudolysin

Die Lysin-spezifische proteolytische Aktivität des Präparats PA-Protease IV deutete auf die Aktivität der Protease IV von *Pseudomonas aeruginosa* hin, die durch N α -p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethyl-Keton (TLCK) inhibiert werden kann. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die bisher beobachteten Befunde durch die Verunreinigungen des Präparats durch andere Proteine hervorgerufen wurden, sollte die proteolytische Aktivität mit TLCK (100 μM) inhibiert werden. Nachdem die Lysin-spezifische proteolytische Aktivität inhibiert war, zeigte das Präparat weiterhin eine Ca^{2+} -Influx-induzierende Aktivität. Weitere Untersuchungen mit Milch-Agarose-Gelen zeigten eine Kaseinolytische Aktivität, die durch 1-10-Phenantrolin und Phosphoramidon zu inhibieren war, jedoch nicht durch SBTI und TLCK (Abb. 18 A) Dieser Befund deutete auf die Aktivität der Protease Pseudolysin (LasB-Pseudomonas Elastase) hin.

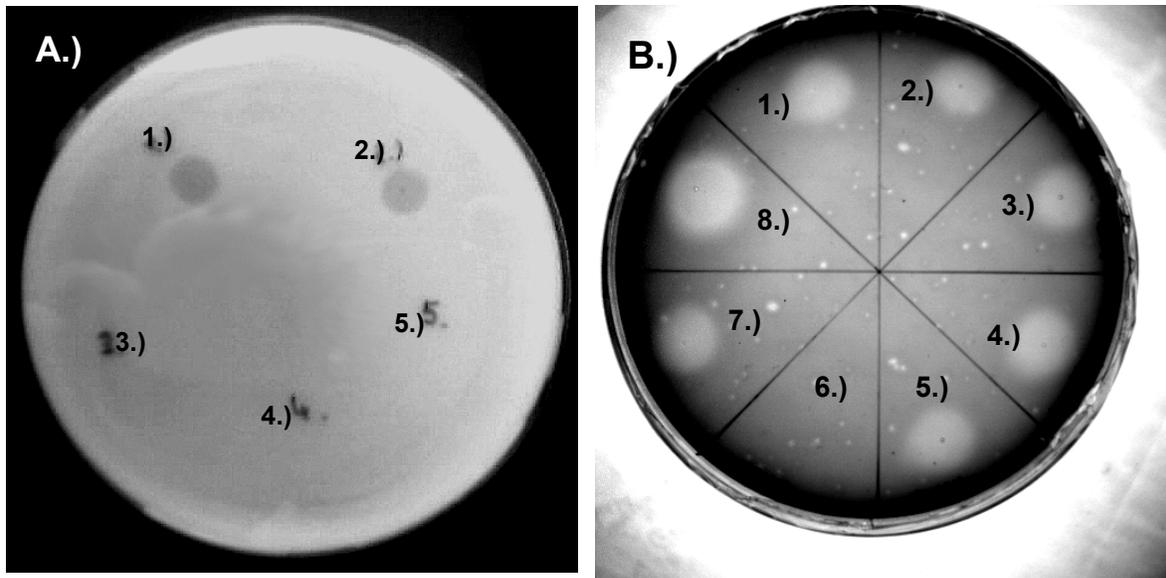


Abb.17: Inhibitionsversuche mit dem Präparat PA-Protease IV und verschiedenen Proteaseinhibitoren auf Milchagarose

Das mit TLCK behandelte und diafiltrierte Präparat PA-Protease IV wurde mit folgenden Inhibitoren zusammen auf eine Milch-Agarose-Platte gegeben: (A) 1.) PA-Protease IV +TLCK ohne weiteren Inhibitor, und mit 2.) SBTI, 3.) 1'10'Phenanthrolin, 4.) Phosphoramidon und 5.) HBSS-Pufferleerwert. (B) 1.) EDTA, 2.) SBTI, 3.) E64 4.) Pepstatin 5.) APMSF 6.) HBSS-Pufferleerwert und 7.) TLCK

3.6.5 Inhibition der Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Benzamidin und Phosphoramidon

Das Präparat PA-Protease IV wurde vor der Stimulation des Ca^{2+} -Influges Keratinozyten mit 20 mM Benzamidin, als Inhibitor für die Protease IV oder mit 2 μM Phosphoramidon, als Inhibitor für Pseudolysin, für 15 Min inkubiert. Das mit Benzamidin vorinkubierte Präparat konnte einen Ca^{2+} -Influx induzieren. Das Präparat das mit Phosphoramidon behandelt wurde konnte keinen Ca^{2+} -Influx induzieren (Abb. 19).

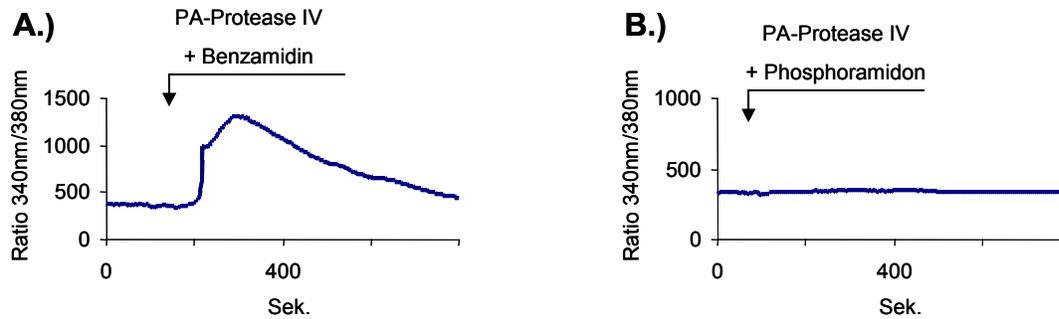


Abb.18: Stimulation des Ca^{2+} -Influges durch PA-Protease IV in Keratinozyten, die mit Proteaseinhibitoren vorbehandelt wurden

(A) Versuchte Stimulation des Ca^{2+} -Influges durch 20 U_{pNA} PA-Protease IV in Keratinozyten nach der vorangehenden Inkubation des Präparates mit Benzamidin zu einer EK von 20 mM. **(B)** Stimulation des Ca^{2+} -Influges durch Applikation von 20 U_{pNA} PA-Protease IV nach der vorangehenden Inkubation des Präparates mit Phosphoramidon zu einer EK von 2 μM .

3.6.6 Rezeptordeaktivierung mit Pseudolysin und Agonisten der PAR1-4 in Keratinozyten

Die Prästimulation von Keratinozyten mit dem PAR1-AP führte zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Signals, das anschließend durch Pseudolysin induziert werden konnte (Abb. 20 A). Eine Prästimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin beeinflusste die anschließende Induktion des Ca^{2+} -Influges durch das PAR1-AP oder den PAR1-Agonisten Thrombin nicht (Abb. 20 B,C). Nach einer Prästimulation der Zellen mit Thrombin konnte Pseudolysin anschließend kein Ca^{2+} -Signal induzieren (Abb. 20 D).

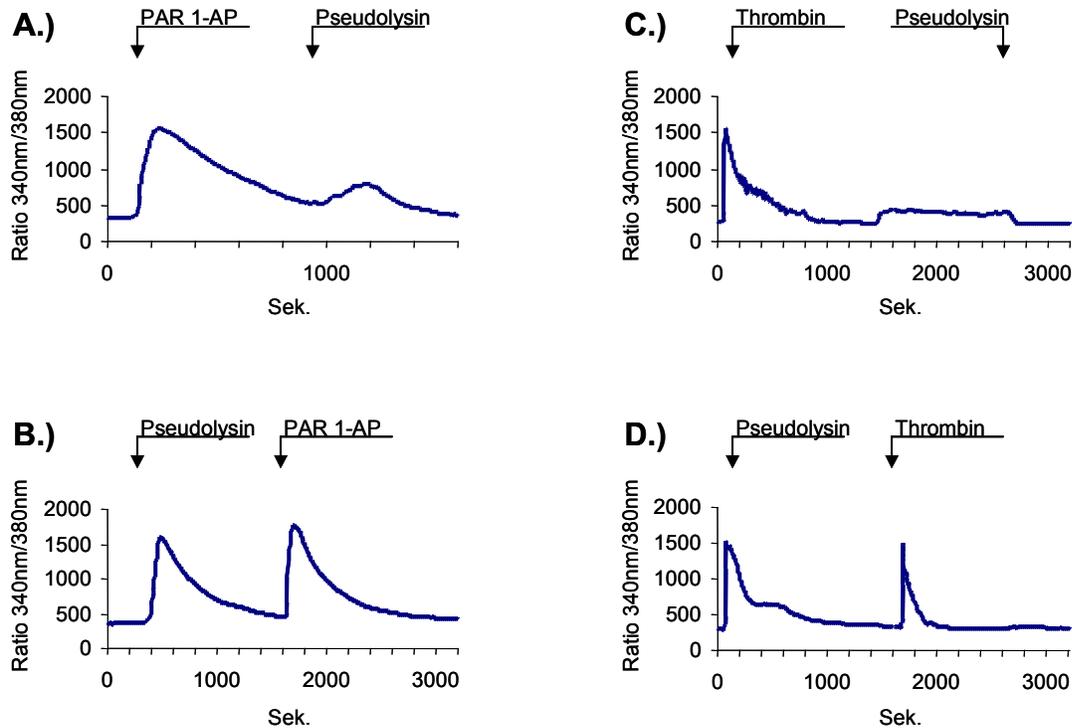


Abb.19: Kreuzdeaktivierung des Pseudolysin-Signals durch ein PAR1-aktivierendes Peptid (PAR1-AP) und Thrombin.

- A)** Stimulation des Ca^{2+} -Influges in Keratinozyten durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$ nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch das PAR1-AP zu einer EK von 10 μM .
- B)** Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Applikation des PAR1-AP zu einer EK von 10 μM nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$.
- C)** Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$ in Keratinozyten nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch Applikation von 25 μg Thrombin.
- D)** Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influges Keratinozyten durch 25 μg Thrombin nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Eine Prästimulation der Keratinozyten mit dem PAR2-AP und dem PAR2-Agonisten Trypsin inhibierte die Induktion eines nachfolgenden durch Pseudolysin stimulierten Signals (Abb. 21 A, C). Die Stimulation eines Ca^{2+} -Signals durch das PAR2-AP wurde durch eine Prästimulation mit Pseudolysin nicht verhindert (Abb. 21 B). Die Induktion eines Ca^{2+} -Signals durch Trypsin wurde durch eine Prästimulation mit Pseudolysin inhibiert (Abb. 21 C)

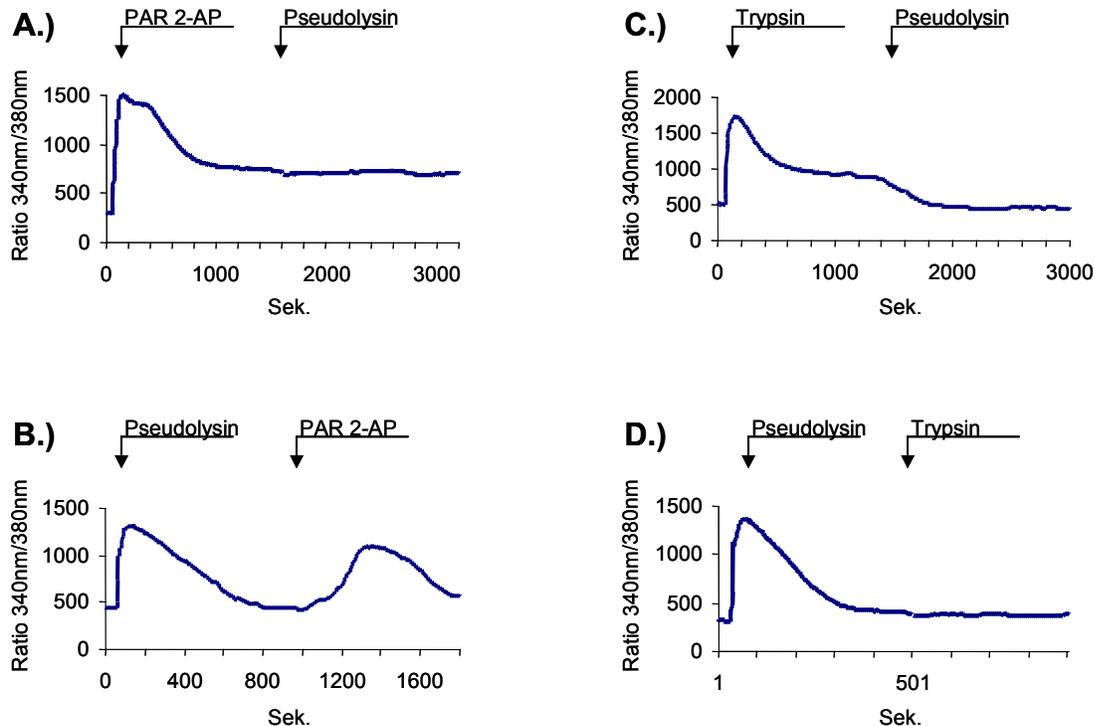


Abb. 20: Kreuzdeaktivierung des Pseudolysin-Signals durch ein PAR2-aktivierendes Peptid (PAR2-AP) und Trypsin

(A) Versuchte Stimulation des Ca^{2+} - Influxes in Keratinozyten mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$ nach der vorangehende Stimulation der Zellen durch das PAR2-AP zu einer EK von 10 μM . (B) Stimulation des Ca^{2+} - Influxes durch Applikation des PAR2-AP zu einer EK von 10 μM nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$. (C) Versuch der Induktion des Ca^{2+} - Influxes durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$ in Keratinozyten nach der vorangehende Stimulation der Zellen durch Applikation von Trypsin zu einer EK von 10 $\mu\text{g/ml}$. (D) Versuch der Induktion des Ca^{2+} - Influxes in Keratinozyten durch Trypsin zu einer EK von 10 $\mu\text{g/ml}$ nach der vorangehende Stimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Zusätzlich wurden mit dem PAR3-AP und dem PAR4-AP in einer Endkonzentration von 20 μM Versuche zur Rezeptordeaktivierung durchgeführt. Die Prästimulation der Keratinozyten mit einer Kombination aus dem PAR1-AP und dem PAR3-AP verhinderte nicht die nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch Pseudolysin (Abb. 22 B). Eine Prästimulation der Zellen mit einer Kombination aus dem PAR3-AP und dem PAR4-AP reduzierte das nachfolgend durch Pseudolysin induzierte Ca^{2+} -Signal (Abb. 23 C). Die Prästimulation der Zellen mit einer Kombination aus dem PAR1-AP, dem PAR3-AP und

dem PAR4-AP verhinderte die nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Pseudolysin (Abb. 23 D).

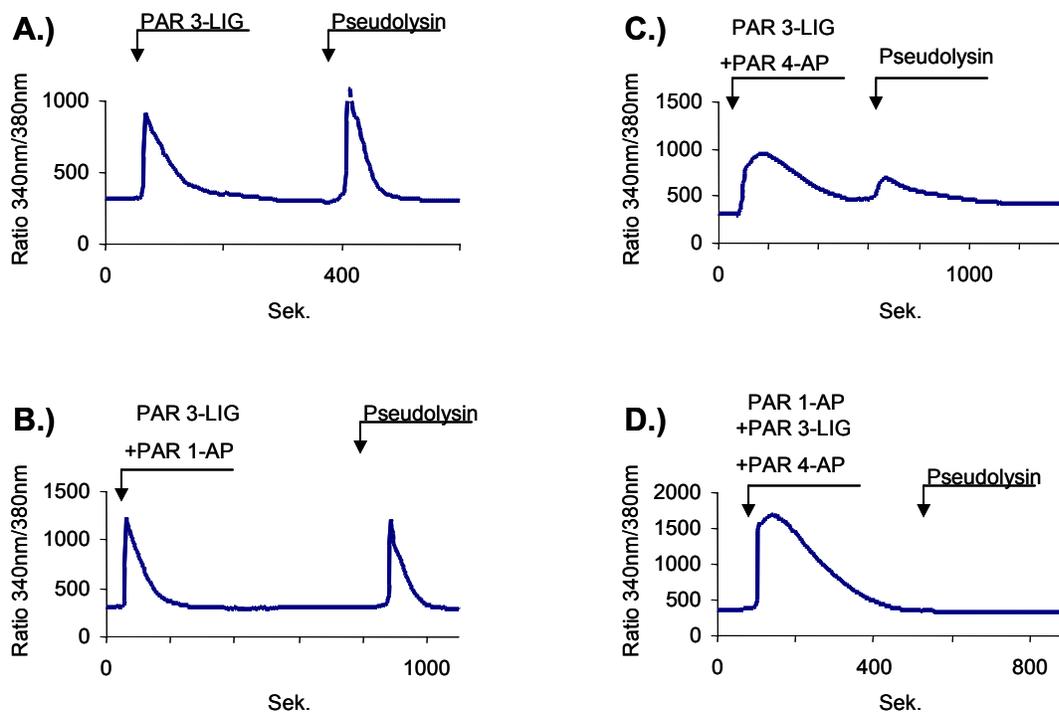


Abb. 21: Kreuzdeaktivierung des Pseudolysin-Signals durch Kombinationen der aktivierenden Peptide des PAR1, des PAR3 und des PAR4.

(A) Stimulation des Ca^{2+} -Influges in Keratinozyten durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch das PAR3-AP zu einer EK von 20 μM . (B) Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Applikation von Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit einer Kombination aus dem PAR1-AP zu einer EK von 10 μM und dem PAR3-AP zu einer EK von 20 μM . (C) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Keratinozyten nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch eine Kombination aus dem PAR3-AP in einer EK von 20 μM und dem PAR4-AP in einer EK von 20 μM . (D) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influges Keratinozyten durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit einer Kombination aus dem PAR1-AP in einer EK von 10 μM , dem PAR3-AP in einer EK von 20 μM und dem PAR4-AP in einer EK von 20 μM . Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

3.6.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kreuzdeaktivierung mit Subtilisin A und den PAR-Agonisten

PAR1-Agonisten: Durch eine Vorinkubation der Zellen mit Pseudolysin wird ein nachfolgendes, durch die beiden Agonisten des PAR1 Thrombin und PAR1-AP stimuliertes Signal gehemmt. Die Vorinkubation mit Thrombin hemmt nicht ein nachfolgendes, durch die PA-Protease IV stimuliertes Signal. Die Vorinkubation mit dem PAR1-AP reduziert die Signalstärke des durch Pseudolysin anschließend induzierten Signals.

PAR2-Agonisten: Durch eine Vorinkubation der Zellen mit den Agonisten des PAR2 wird ein nachfolgendes, durch Pseudolysin stimuliertes Signal gehemmt. Eine Vorinkubation mit Pseudolysin hemmt die nachfolgenden, durch die PAR2-Agonisten stimulierten Signale nicht.

PAR3-AP: Eine Vorinkubation der Zellen mit dem PAR3-AP inhibiert nicht die nachfolgende Stimulation der Zellen durch Pseudolysin. Eine Prästimulation mit Pseudolysin inhibiert ein nachfolgendes, durch das PAR3-AP stimuliertes Signal.

Agonisten in Kombination: Eine Vorinkubation der Zellen mit einer Kombination aus den PAR3- und PAR4-APs reduziert die Signalstärke des durch Pseudolysin anschließend induzierten Signals. Eine Vorinkubation der Zellen mit einer Kombination aus den PAR1-, PAR3- und PAR4-APs inhibiert die nachfolgende Stimulation der Zellen durch Pseudolysin.

Die nachfolgende Tabelle 3 fasst diese Ergebnisse gegenseitigen Rezeptordeaktivierung mit Pseudolysin und den PAR1-4-Agonisten zusammen.

Tabelle 3:
Zusammenfassung der Ergebnisse der gegenseitigen
Rezeptordeaktivierung mit den PAR1- und PAR2-Agonisten und PA-
Protease IV auf Keratinozyten

In der Spalte „**Prästimulation**“ werden die Agonisten angezeigt, mit denen in den Keratinozyten durch Vorinkubation ein Ca^{2+} Signal ausgelöst wurde. Die Spalte „**Stimulation**“ enthält die Agonisten mit denen im Anschluß an die Vorinkubation versucht wurde in den gleichen Keratinozyten ein daran anschließendes Ca^{2+} -Signal auszulösen. Die Spalte „**Inhibition der Stimulation**“ zeigt durch ein (+) die erfolgte Inhibition des zweiten Signals, wenn die Zellen kein zweites Mal stimuliert werden konnten und durch ein (-) die erfolgte Auslösung eines zweite Ca^{2+} -Signals und damit die nicht erfolgte Inhibition einer nachträglichen Stimulation an.

Prästimulation :	Poststimulation :	Inhibition der Poststimulation : + =Inhibition, - = keine Inhibition
PAR1-AP	Pseudolysin	Signalreduktion
Pseudolysin	PAR1-AP	+
Thrombin	Pseudolysin	-
Pseudolysin	Thrombin	+
PAR2-AP	Pseudolysin	+
Pseudolysin	PAR2-AP	-
Trypsin	Pseudolysin	+
Pseudolysin	Trypsin	+
PAR3-AP	Pseudolysin	-
Pseudolysin	PAR3-AP	+
PAR3+4-AP	Pseudolysin	Signalreduktion
PAR1,3+4-AP	Pseudolysin	+

3.6.8 Versuche zur gegenseitigen Rezeptordeaktivierung mit Pseudolysin und den Agonisten der PAR1-4 in NCI-H-292-Zellen

An den mucoepidermoiden NCI-H292-Zelllinie wurden Stimulationsversuche durchgeführt, um die, in den Versuchen an Keratinozyten erhobenen Befunde mit den Befunden aus Zellen des Lungenepithels zu vergleichen. Eine Prästimulation von NCI-H-292-Zellen mit dem PAR1-AP verhinderte nicht die nachfolgende Induktion eines Ca^{2+} -Signals durch Pseudolysin (Abb. 24 A). Das PAR1-AP konnte nach einer Prästimulation mit Pseudolysin ein Ca^{2+} -Signal induzieren (Abb. 24 B). Nach einer Prästimulation mit Thrombin induzierte Pseudolysin ein Ca^{2+} -Signal und Thrombin induzierte ein Ca^{2+} -Signal nach einer Prästimulation mit Pseudolysin, jedoch unterschieden sich die prästimulatorischen Signale von den stimulatorischen Signalen des jeweiligen Induktors (Abb. 24 C, D). Bei der Prästimulation produzierten beide Induktoren ein oszillierendes Signal und in der nachfolgenden Stimulation erzeugten beide Stimuli einen einzelnen Signalimpuls.

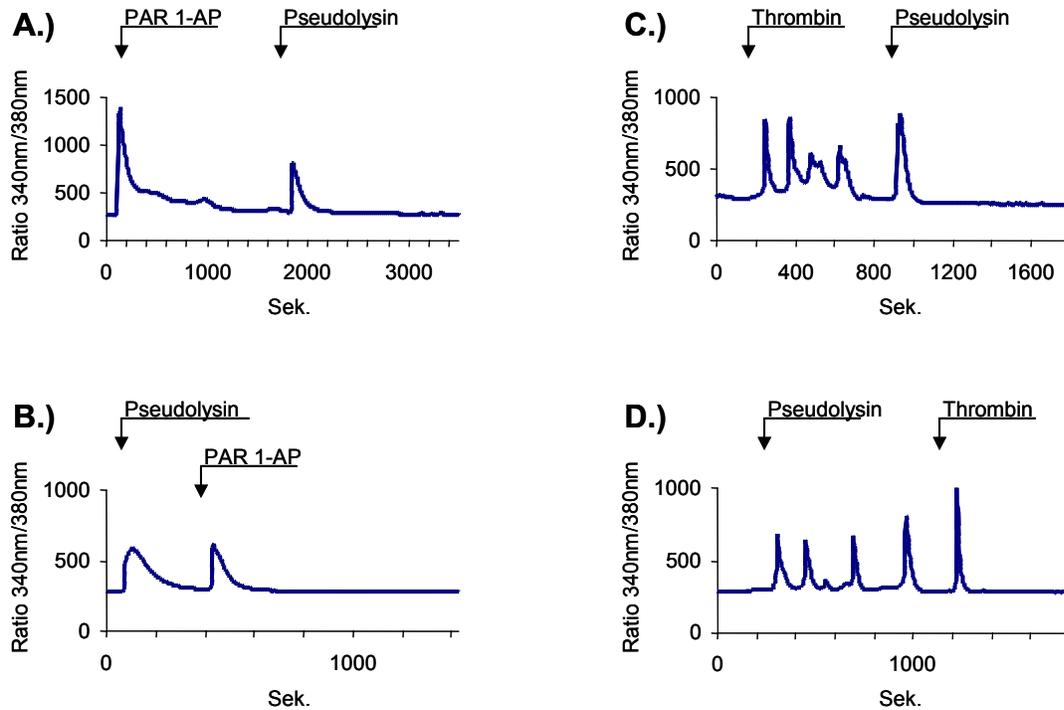


Abb. 22.: Kreuzdeaktivierung des Pseudolysin-Signals in NCI-H-292 durch ein PAR1-aktivierendes Peptid (PAR1-AP) und Thrombin.

(A) Stimulation des Ca^{2+} -Influges in NCI-H-292-Zellen durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch das PAR1-AP zu einer EK von 10 μM . (B) Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Applikation des PAR1-AP zu einer EK von 10 μM nach der vorangehenden Stimulation der NCI-H-292-Zellen mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (C) Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in NCI-H-292-Zellen nach der vorangehenden Stimulation der Zellen durch Applikation von 25 μg Thrombin. (D) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influges NCI-H-292-Zellen durch 25 μg Thrombin nach der vorangehenden Stimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Die Prästimulation der NCI-H-292-Zellen mit dem PAR2-AP oder dem PAR2-Agonisten Trypsin inhibierte die nachfolgende Induktion eines Ca^{2+} -Signals durch Pseudolysin (Abb. 25 A,C). Eine Prästimulation mit Pseudolysin verhinderte nicht eine nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Signals durch das PAR2-AP oder Trypsin (Abb. 25 B, D).

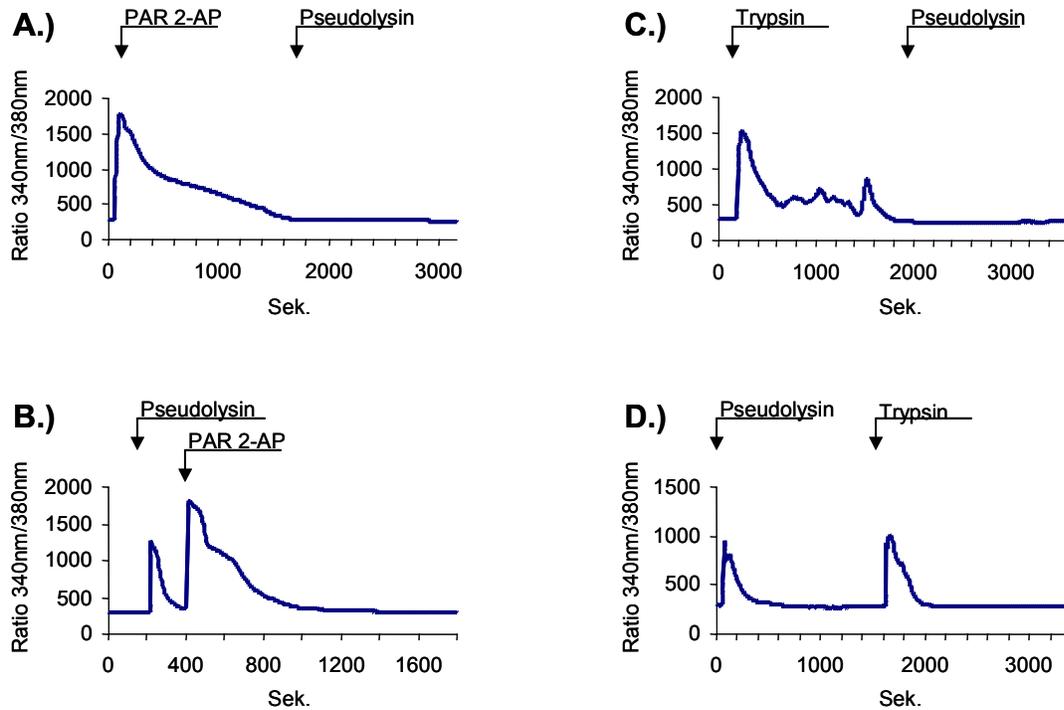


Abb.23: Kreuzdeaktivierung des Pseudolysin-Signals in NCI-H-292 durch ein PAR2-aktivierendes Peptid (PAR2-AP) und Trypsin.

(A) Versuchte Stimulation des Ca^{2+} -Influges in NCI-H-292-Zellen mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$ nach der vorangehende Stimulation der Zellen durch das PAR2-AP zu einer EK von 10 μM . (B) Stimulation des Ca^{2+} -Influges durch Applikation des PAR2-AP zu einer EK von 10 μM nach der vorangehenden Stimulation der NCI-H-292-Zellen mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$. (C) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$ in NCI-H-292-Zellen nach der vorangehende Stimulation der Zellen durch Applikation von Trypsin zu einer EK von 10 $\mu\text{g/ml}$. (D) Versuch der Induktion des Ca^{2+} -Influges in NCI-H-292-Zellen durch Trypsin zu einer EK von 10 $\mu\text{g/ml}$ nach der vorangehende Stimulation der NCI-H-292-Zellen mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Der PAR3-AP induzierte kein Ca^{2+} -Signal in unbehandelten NCI-H-292-Zellen (Abb. 26 A). Nach einer Inkubation der Zellen mit einem Antikörper gegen den EGF-Rezeptor war der PAR3-AP in der Lage ein Ca^{2+} -Signal zu induzieren (Abb. 26 B). Eine Prästimulation mit Pseudolysin inhibierte eine nachfolgende Signalinduktion durch EGF.

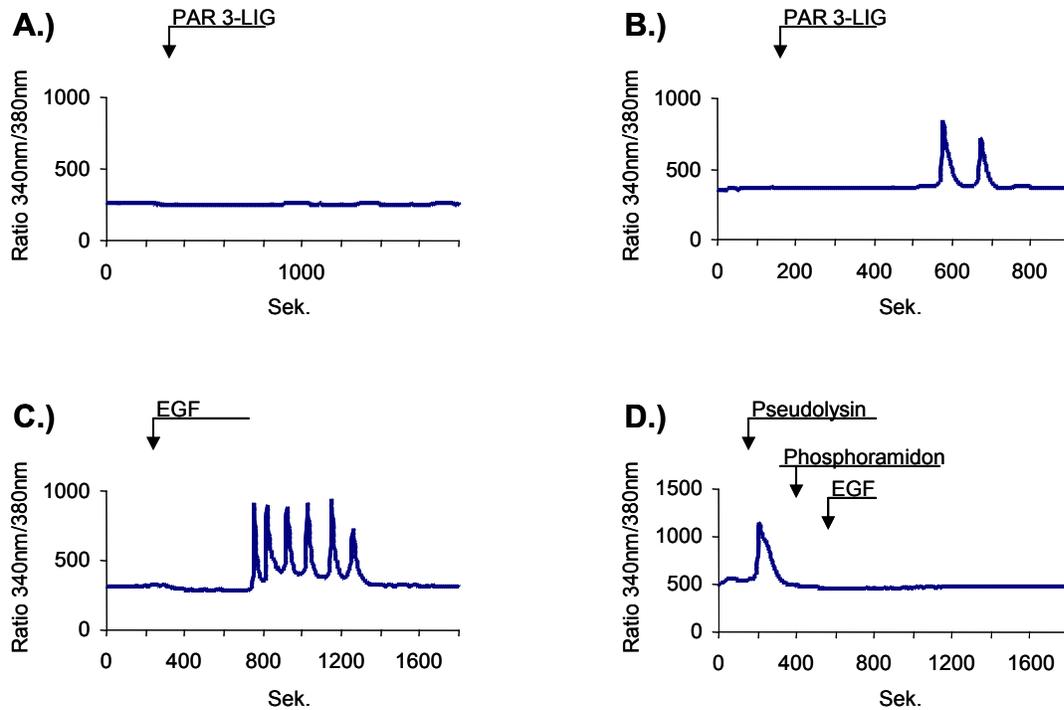


Abb. 24: Stimulation des Ca^{2+} -Influges in NCI-H-292-Zellen unter Berücksichtigung MAPK-Kaskade aktivierender Rezeptoren.

(A) Der PAR3-AP induzierte in einer EK von 20 μM in unbehandelten NCI-H-292 Zellen kein Ca^{2+} -Signal. (B) Nach einer Inkubation der Zellen mit einem Antikörper gegen den EGF-Rezeptor wurde durch den PAR3-AP ein Signal induziert. (C) Induktion eines Ca^{2+} -Signals durch 100 $\mu\text{g/ml}$ EK des EGF. (D) Nach einer Prästimulation mit Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$ induziert EGF kein Signal. Um eine proteolytische Spaltung des EGF durch Pseudolysin auszuschließen wurde zu dem Ansatz Phosphoramidon in einer EK von 2mM gegeben. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

3.6.9 Induktion des Ca^{2+} -Influges in Fibroblasten

An Fibroblasten wurden Versuche zur Stimulation des Ca^{2+} -Influges mit den PAR-Agonisten und den Proteasen Pseudolysin und Protease IV durchgeführt, um das Ca^{2+} -Signalverhalten in verschiedenen Zelltypen zu vergleichen. Thrombin induzierte in Fibroblasten ein steil ansteigendes Ca^{2+} -Signal das in weniger als 200 sec. wieder abfiel (Abb. 27 A) Das PAR1-AP produzierte ein Ca^{2+} -Signal von geringerer Intensität, aber längerer Dauer als jenes von Thrombin (Abb. 27 B). Trypsin induzierte in Fibroblasten ein zweiphasiges Ca^{2+} -Signal. Zunächst erfolgte ein steiler Anstieg des Ca^{2+} -Signals das innerhalb von 200 sec. wieder abfiel (Abb. 27 C). Dann folgte nach etwa 600 sec. ein länger andauerndes oszillierendes Signal. Das Ca^{2+} -Signal, das durch

das PAR2-AP induziert wurde, bestand aus einem initialen, steil ansteigendem und schnell abfallenden Signal, dem ein oszillierendes Signal folgte.

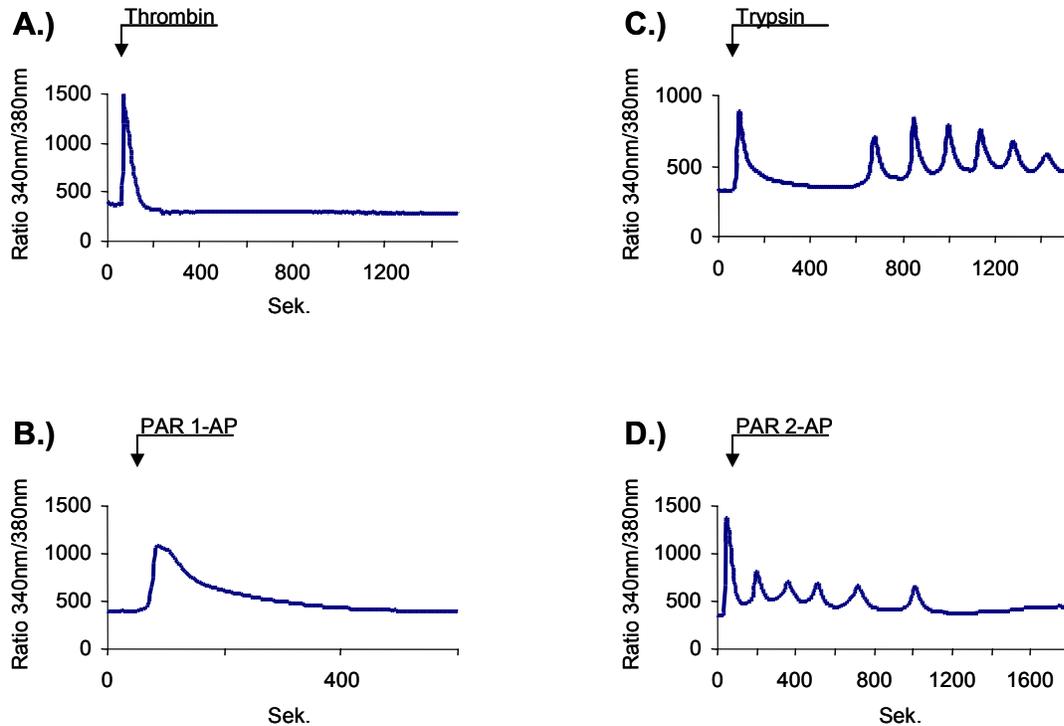


Abb.25: Induktion des Ca^{2+} -Influxes in Fibroblasten durch die Agonisten des PAR1 und des PAR 2

(A) Induktion des Ca^{2+} -Influxes in Fibroblasten durch 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thrombin, (B) das PAR1-AP in einer EK von 10 μM , (C) Trypsin in einer EK von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und (D) das PAR2-AP in einer EK von 10 μM . Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

Die aktivierenden Peptide des PAR3 und des PAR4 induzierten auf Fibroblasten kein Signal. Die Proteasen Pseudolysin und Protease IV von *Pseudomonas aeruginosa* induzierten ebenfalls keinen Ca^{2+} -Influx in Fibroblasten (Abb. 28).

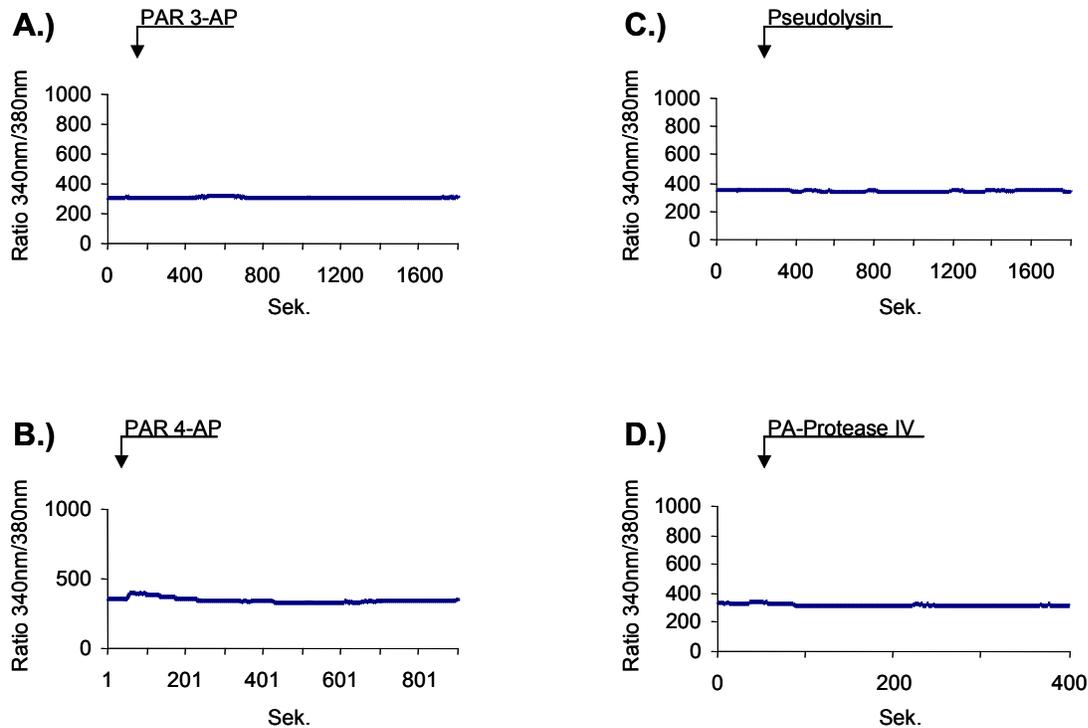


Abb.26: Versuch der Induktion eines Ca^{2+} -Influxes in Fibroblasten durch die aktivierenden Peptide des PAR3 und des PAR 4 und den Proteasen Pseudolysin und Protease IV von *Pseudomonas aeruginosa*

(A) Induktion des Ca^{2+} -Influxes in Fibroblasten durch PAR3-AP in einer EK von 20 μM , (B) das PAR4-AP in einer EK von 20 μM , (C) durch Pseudolysin in einer EK von 25 $\mu\text{g/ml}$ und (D) 20 U_{pNA} PA-Protease IV. Die Position der Pfeile kennzeichnet den Zeitpunkt der Applikation des Induktors. Das Endvolumen des Stimulationsansatzes betrug 200 μl .

3.6.10 Massenspektrometrische Analyse der durch Pseudolysin verdauten N-terminalen Sequenzen der PARs

Die N-terminalen Sequenzen der PAR1-4 wurden mit Pseudolysin verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Die N-terminale Sequenz des PAR1 wurde so hydrolysiert, dass daraus eine Aktivierung des PAR1 resultiert. Die N-terminalen Sequenzen des PAR2 und des PAR3 wurden nicht hydrolysiert. Die N-terminale Sequenz des PAR4 wurde hydrolysiert, jedoch war die Hydrolyse nicht in der Nähe der Signalsequenz (s. Abb. 29)

PAR1: RPESKATNATLDPRS^V**FLLRN**

PAR2: IQGTNRSSKGR**SLIGKV**

PAR3: GMENDTNNLAKPTLPIK**TFRGAP**

PAR4: GGTQTPSVYDESGSTGGDDSTP^VSILPAPRG**GYPGQV**

Abb.27: Massenspektrometrische Analyse der durch Pseudolysin verdauten N-terminalen Sequenzen der PAR1-4

Die N-terminalen Sequenzen der PARs sind im Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren dargestellt. Die aktivierenden Peptidsequenzen wurden fettgedruckt dargestellt. Die identifizierten Spaltstellen wurden durch eine „^V“-Markierung gekennzeichnet.

3.6.11 Zytokinstimulation durch PA-Protease IV

Das CM-Präparat PA-Protease IV wurde zur Stimulation von HaCaT-Keratinocyten verwendet. Dabei wurde durch die quantitative Analyse der mRNA untersucht ob Zytokine und antimikrobiellen Peptide durch die Lysin-spezifische proteolytische Aktivität aus dem Pseudomonas-Kulturüberstand induziert wurden. Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit 2 U_{pNA}/ ml der proteolytischen Aktivität stimuliert. Die Stimulation der Keratinocyten mit PA-Protease IV induzierte die Expression der mRNA der proinflammatorischen Zytokine TNF α auf das 95-fache, IL1 β auf das 75-fache und IL 8 auf das 140-fache relativ zur Expression der GAP-DH-mRNA. Die Expression der mRNA der untersuchten antimikrobiellen Peptide wurde beim hBD2 um das 13,5-fache, bei Elafin 7-fach und bei der RNase 7 8-fach relativ zur Expression der GAPDH-mRNA stimuliert. Die Stimulation der Zytokine ließ sich durch Zugabe von Benzamidin, einem spezifischen Inhibitor für die Protease IV, hemmen (s. Abb.30)

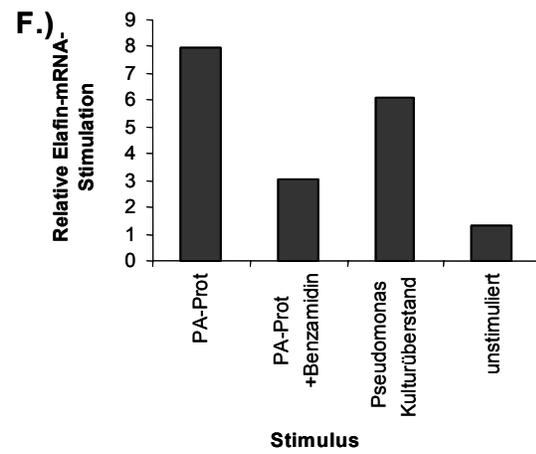
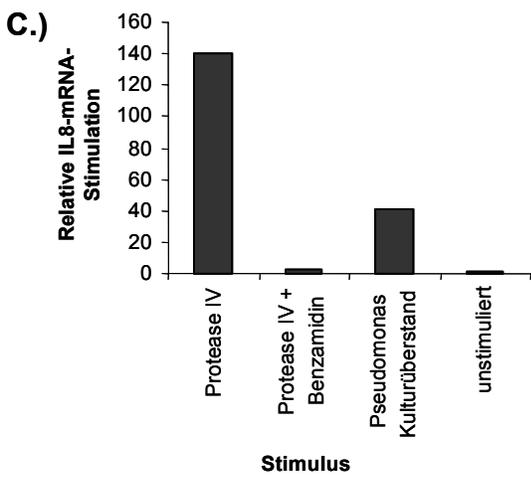
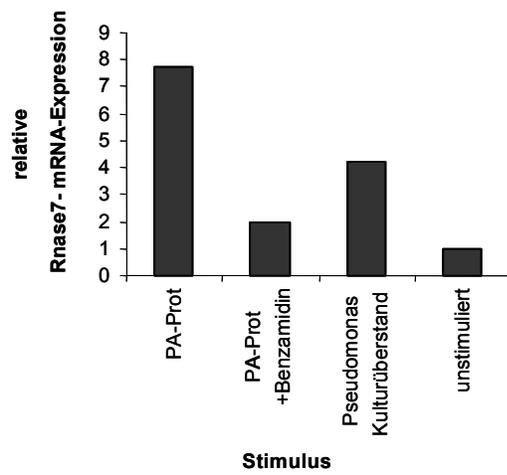
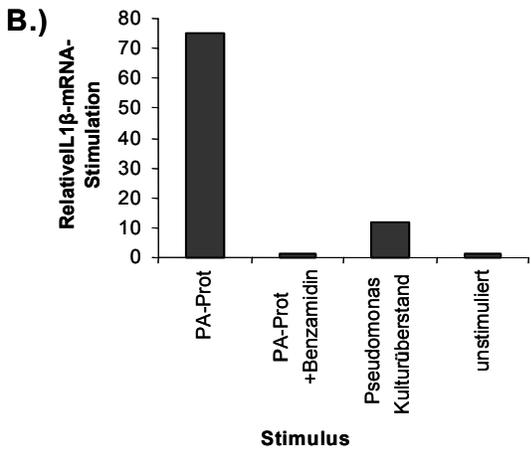
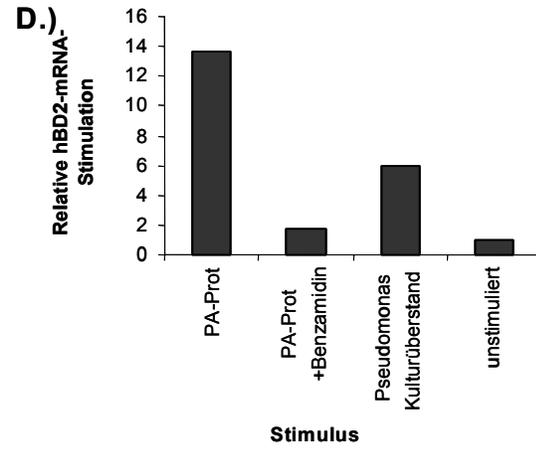
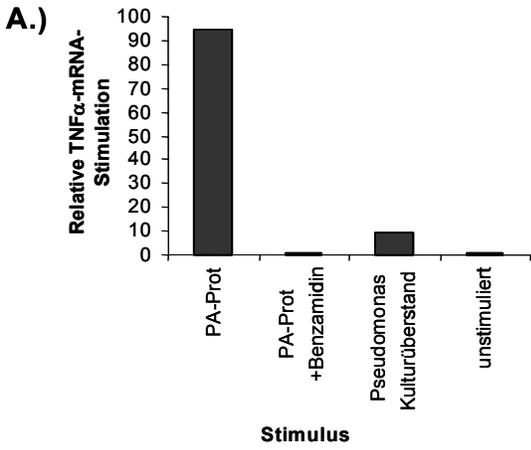


Abb.28: Stimulation der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden in Keratinozyten durch das Protease IV-Präparat aus der CM-Kationenaustausch-Chromatographie

Induktion der mRNA-Expression in Keratinozyten durch 2 U_{pNA} PA-Protease IV. Die Stimulation wurde durch den Protease IV-Inhibitor gehemmt. (A) mRNA-Expression von TNF α , (B) mRNA-Expression von IL1 β , (C) mRNA-Expression von IL8, (D) mRNA-Expression von hBD2, (E) mRNA-Expression von Rnase7, (F) mRNA-Expression von Elafin. Die Stimulationszeit betrug 6 h. Das Volumen des Stimulationsansatzes betrug 1 ml. Die aus den Ansätzen isolierte mRNA wurde in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Transkripte wurden mit spezifischen Primern mit einer Real-Time-PCR amplifiziert. Die Amplifikation der spezifischen Transkripte ist im Verhältnis zu der Amplifikation der Transkripte der GAPDH-mRNA dargestellt.

3.6.12 Zytokinstimulation durch das mit Affinitätschromatographie gereinigte Protease IV-Präparat

Weitere Stimulationsversuche wurden mit dem, aus der Affinitätschromatographie erhaltenen Präparat an Keratinozyten vorgenommen. Dabei stellte sich heraus, dass die Intensität der mRNA-Expression erheblich nachließ. Von der mRNA der proinflammatorischen Zytokine wurden nur noch die Expression der mRNA von TNF α (7-fach) und IL8 (10-fach) in signifikanten Maßen stimuliert. Von den antimikrobiellen Peptiden wurde nur noch die mRNA-Expression des hBD2 (5-fach) stimuliert (s. Abb. 31).

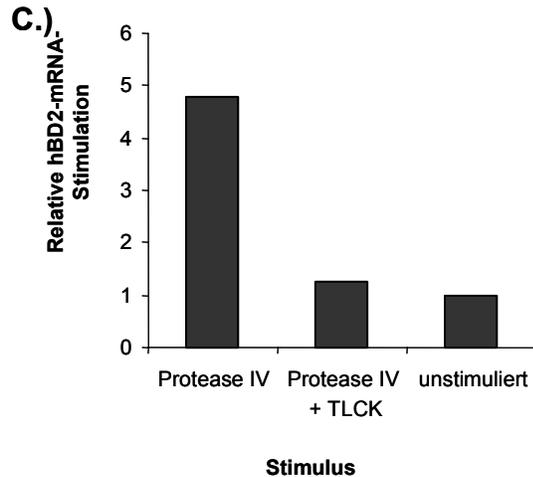
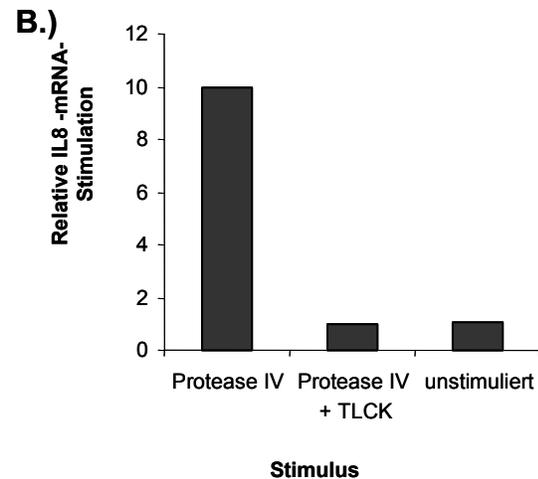
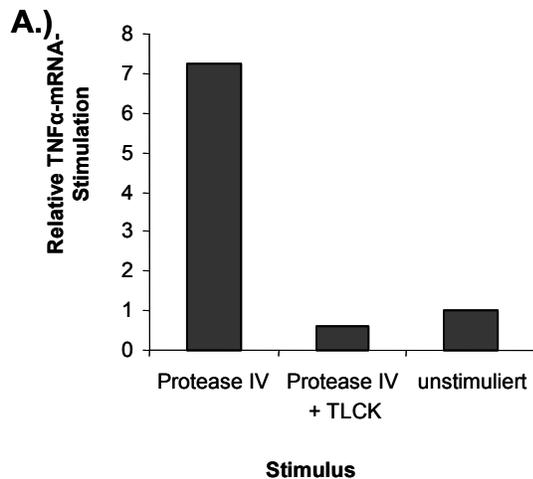


Abb. 29: Stimulation der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden in Keratinozyten durch das Protease IV-Präparat aus der Affinitätschromatographie

Induktion der mRNA-Expression in Keratinozyten durch 2 U_{pNA} Präparates aus der Affinitätschromatographie. Die Stimulation wurde durch den Protease IV-Inhibitor TLCK gehemmt. (A) mRNA-Expression von TNF α , (B) mRNA-Expression von IL8, (C) mRNA-Expression von hBD2, Die Stimulationszeit betrug 6 h. Das Volumen des Stimulationsansatzes betrug 1 ml. Die aus den Ansätzen isolierte mRNA wurde in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Transkripte wurden mit spezifischen Primern mit einer Real-Time-PCR amplifiziert. Die Amplifikation der spezifischen Transkripte wurde im Verhältnis zu der Amplifikation der Transkripte der GAPDH-mRNA dargestellt.

3.6.13 Zytokinstimulation durch Pseudolysin in Keratinozyten

Nachdem die Aktivität von Pseudolysin als weitere proteolytische Aktivität identifiziert wurde, sollte der Anteil, den Pseudolysin an der Zytokinstimulation hat, analysiert werden. Durch die Stimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin wurde die Expression der mRNA der proinflammatorischen Zytokine TNF α um das 6,8-fache und IL 8 um das 3,8-fache relativ zur Expression der GAPDH-mRNA induziert. Von den untersuchten

antimikrobiellen Peptiden wurde die Expression der mRNA des hBD2 um das 3-fache und außerdem von Psoriasin um das 3,3-fache stimuliert (Abb. 32).

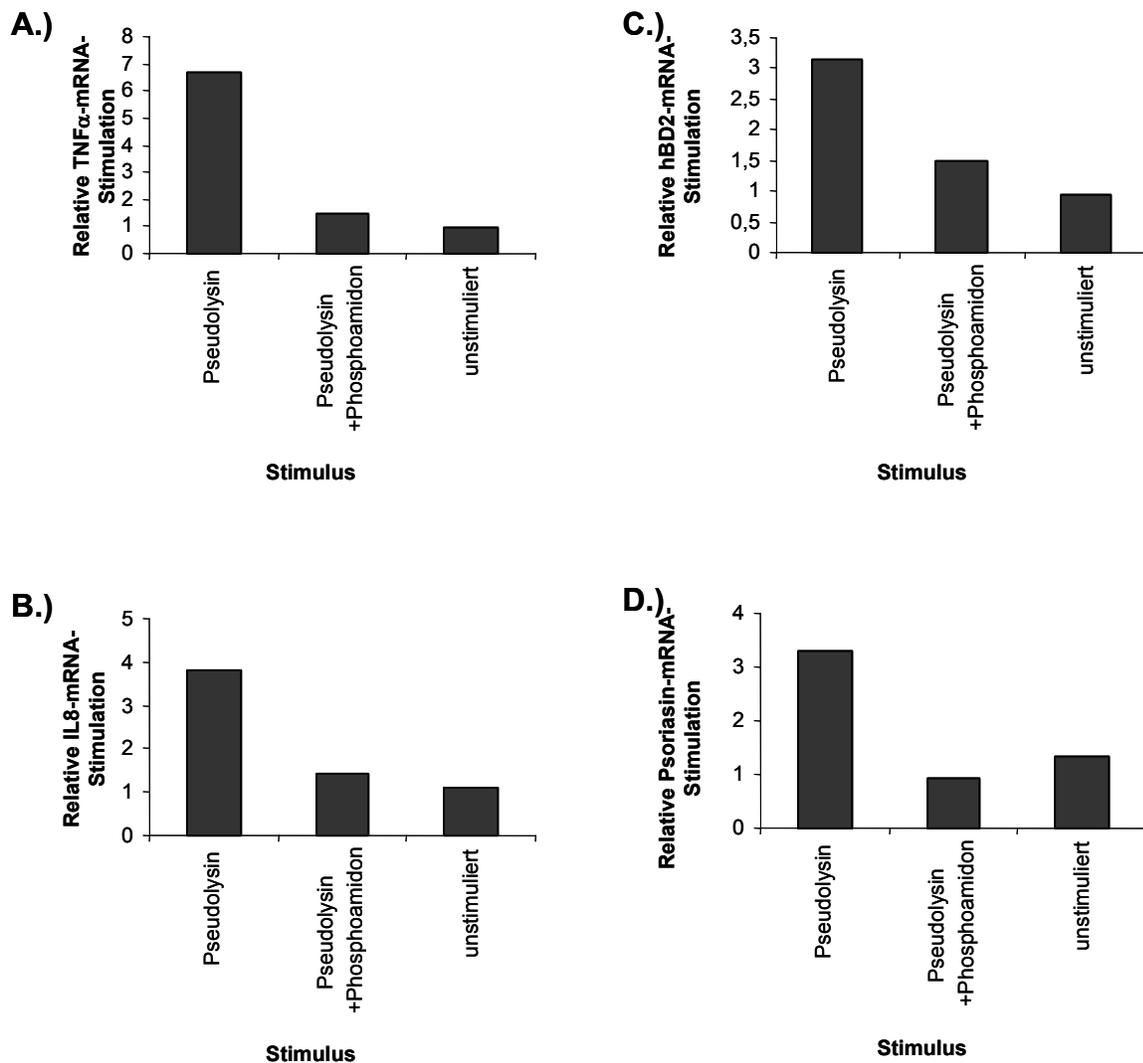


Abb. 30: Stimulation der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden in Keratinozyten durch Pseudolysin

Stimulation der mRNA-Expression in Keratinozyten durch Applikation Pseudolysin zur EK von 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Die Stimulation wurde durch den Proteaseinhibitor Phosphoramidon gehemmt. Stimulation der mRNA-Expression von (A) TNF α , (B) von IL8, (C) von hBD2 und (D) von Psoriasin. Die Stimulationszeit betrug 6 h. Das Volumen des Stimulationsansatzes betrug 1 ml. Die aus den Ansätzen isolierte mRNA wurde in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Transkripte wurden mit spezifischen Primern mit einer Real-Time-PCR amplifiziert. Die Amplifikation der spezifischen Transkripte ist im Verhältnis zu der Amplifikation der Transkripte der GAPDH-mRNA dargestellt.

3.6.14 Stimulation der Proinflammatorischen Zytokine und antimikrobiellen Peptide durch die PAR-aktivierenden Peptide

Durch die Stimulation von Keratinozyten mit den aktivierenden Peptiden der PARs sollte analysiert werden, welche Zytokine durch die PARs induziert werden. Die mRNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF α wird durch das PAR1-AP 4,2-fach, durch das PAR2-AP 8,4-fach, durch das PAR3-AP 2,1-fach und durch das PAR4-AP 1,7-fach stimuliert (Abb. 33 A). Die mRNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL8 wird durch das PAR1-AP 2,5-fach, durch das PAR2-AP 4,6-fach, durch das PAR3-AP 1,7-fach und durch das PAR4-AP 1,4-fach stimuliert (Abb. 33 B). Die mRNA-Expression der antimikrobiellen Peptide wurde durch die Stimulation der Keratinozyten mit den PAR-aktivierenden Peptiden nicht induziert.

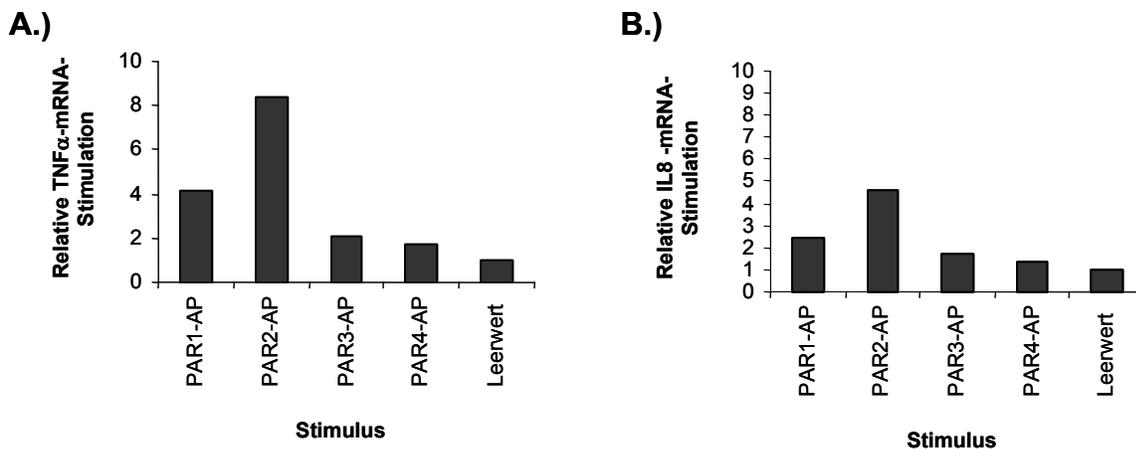


Abb. 31: Stimulation der mRNA-Expression von TNF α und IL8 in HaCaT – Keratinozyten durch die PAR-aktivierenden Peptide

Stimulation der mRNA-Expression in HaCaT – Keratinozyten durch 10 μ M des PAR1-AP und des PAR2-AP sowie 20 μ M des PAR3-AP und des PAR4-AP. Stimuliert wurde die mRNA-Expression von TNF α (A) und IL8h (B). Die Stimulationszeit betrug 6 h. Das Volumen des Stimulationsansatzes betrug 1 ml. Die aus den Ansätzen isolierte mRNA wurde in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Transkripte wurden mit spezifischen Primern mit einer Real-Time-PCR amplifiziert. Die Amplifikation der spezifischen Transkripte ist im Verhältnis zu der Amplifikation der Transkripte der GAPDH-mRNA dargestellt.

Die mRNA-Expression der antimikrobiellen Peptide hBD2, Rnase7 und Psoriasin wurde durch die Stimulation der Keratinozyten mit den aktivierenden Peptiden der PARs nicht stimuliert (Abb. 34).

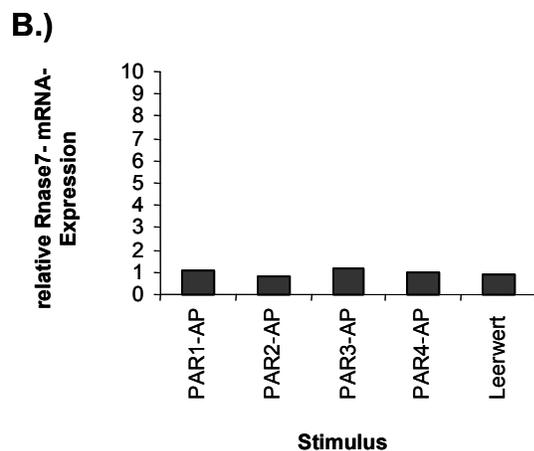
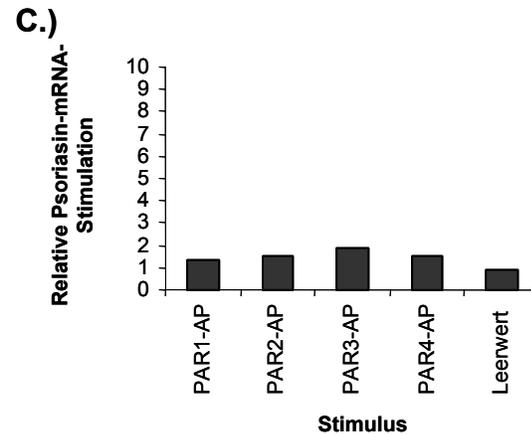
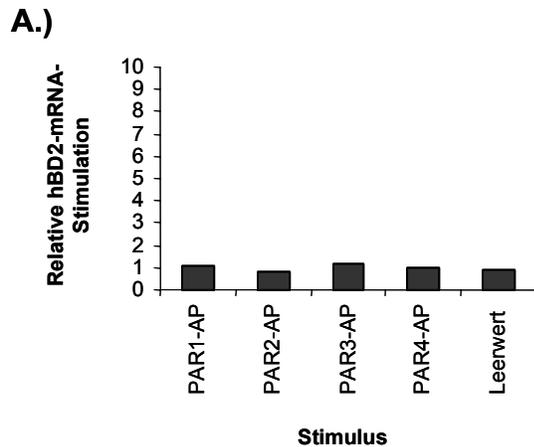


Abb. 32: Stimulation der mRNA-Expression von hBD2, Rnase7 und Psoriasisin in HaCaT – Keratinozyten durch die PAR-aktivierenden Peptide

Stimulation der mRNA-Expression in HaCaT – Keratinozyten durch 10µM des PAR1-AP und des PAR2-AP sowie 20 µM des PAR3-AP und des PAR4-AP. Stimuliert wurde die mRNA-Expression von hBD2 (A), Rnase7 (B) und Psoriasisin(C). Die Stimulationszeit betrug 6 h. Das Volumen des Stimulationsansatzes betrug 1 ml. Die aus den Ansätzen isolierte mRNA wurde in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Transkripte wurden mit spezifischen Primern mit einer Real-Time-PCR amplifiziert. Die Amplifikation der spezifischen Transkripte ist im Verhältnis zu der Amplifikation der Transkripte der GAPDH-mRNA dargestellt.

3.7 Zytokinstimulation durch Pseudolysin in NCI-H-292-Zellen

Um die Zytokinstimulation durch Pseudolysin in Keratinozyten mit der Zytokinstimulation in anderen Epithelien vergleichen zu können, wurden NCI-H-292-Zellen mit Pseudolysin stimuliert. Dabei wurde nur eine Stimulation der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL8 festgestellt (Abb. 35).

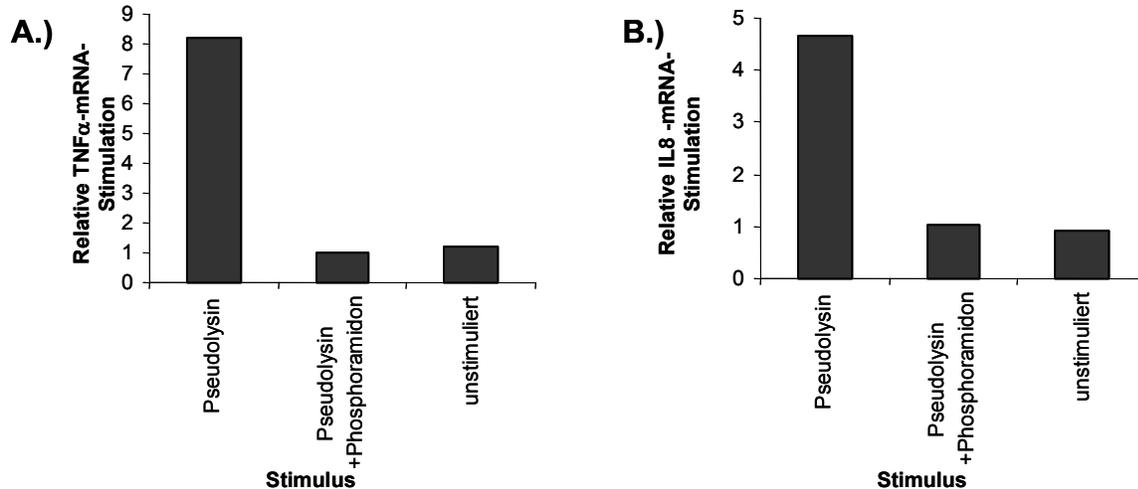


Abb. 33: Stimulation der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden in NCI-H-292-Zellen durch Pseudolysin

Stimulation der mRNA-Expression NCI-H-292-Zellen durch Applikation von Pseudolysin zur EK von 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Die Stimulation wurde durch den Proteaseinhibitor Phosphoramidon gehemmt. Stimulation der mRNA-Expression von (A) TNF α und (B) von IL8, Die Stimulationszeit betrug 6 h. Das Volumen des Stimulationsansatzes betrug 1 ml. Die aus den Ansätzen isolierte mRNA wurde in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Transkripte wurden mit spezifischen Primern mit einer Real-Time-PCR amplifiziert. Die Amplifikation der spezifischen Transkripte ist im Verhältnis zu der Amplifikation der Transkripte der GAPDH-mRNA dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Mikrobielle Proteasen können PAR aktivieren und induzieren Ca²⁺-Influx in Keratinozyten

Der biologische Aspekt der Barrierefunktion der Haut des Menschen in Form des angeborenen Immunsystems unterliegt der Kontrolle und Regulation durch Rezeptoren und deren nachfolgenden Signalkaskaden. Epithelzellen verfügen über Protease-aktivierbare Rezeptoren, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden und deren Stimulation im Verlauf der Signaltransduktion zu einem intrazellulären Ca²⁺-Influx führt. Das Vorhandensein von Rezeptoren, die von Proteasen aktiviert werden können, stellt eine wichtige Perspektive für die Betrachtung von mikrobiellen, extrazellulären Proteasen dar, welche die Möglichkeit einer direkten Induktion von zellulären Abwehrreaktionen

über Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion beinhaltet. Die klassischen Agonisten für die PARs sind, neben den aus der N-terminalen Aktivierungssequenz entwickelten aktivierenden Peptiden, die Proteasen Thrombin für PAR1, PAR3 und PAR4 und Trypsin für PAR2 und PAR4 (MacFarlane et al., 2001). Inzwischen haben neuere Arbeiten gezeigt, dass eine Reihe von endogenen körpereigene Proteasen ebenso in der Lage sind die PAR zu aktivieren. So konnte gezeigt werden, dass PAR2 auch durch die humane Protease3 aus neutrophilen Granulozyten, die humane Mastzell-Tryptase, die humane Leukozyten-Elastase und durch Cathepsin G sowie durch die Gewebe und Koagulationsfaktoren Xa und VIIa aktiviert werden kann (Selak, 1994; Molino et al., 1994; Mirza et al., 1997; Sambrano et al., 1999; Camerer et al., 2000; Chung et al., 2004; Ossovskaya und Bunnett, 2004; Uehara et al., 2004). PAR1 kann durch Faktor Xa und Granzyme A aktiviert werden, ein modifizierter PAR1 wird durch Mastzell-Chymase aktiviert und PAR4 durch Cathepsin G (Sambrano et al., 1999; Ossovskaya und Bunnett, 2004). Vor dem Hintergrund dieser Arbeit ist es von Bedeutung, dass auch exogene Proteasen PARs aktivieren können. So wurde beobachtet, dass die Proteasen aus Milbenextrakten Der p 1, Der p 3 und Der p 9 sowie Proteasen aus *Blattella germanica* PAR2 aktivieren (Sun et al., 2001; Asokanathan et al., 2002; Hong et al., 2004). Auch Proteasen von Mikroorganismen können PAR aktivieren. Dieses wurde für die Arginin spezifische Cystein-Protease RgbP und andere Gingipaine aus *Porphyromonas gingivalis* gezeigt (Lourbakos et al., 2001a; Lourbakos et al., 2001b; Chung et al., 2004). Weiterhin wurde die Interaktion von Thermolysin mit PAR2 beobachtet (Ubl et al., 2002). Die Stimulation von HaCaT-Keratinocyten mit verschiedenen mikrobiellen Proteasen zeigte (vgl. Abb.:3) dass weitere mikrobielle Proteasen wie Subtilisin A von *Bacillus subtilis*, Proteinase K von *Trichothium album* und Endoprotease Lys-C von *Lysobacter enzymogenes* einen intrazellulären Ca^{2+} -Influx in Keratinocyten induzieren konnten, andere Proteasen, wie die Endoprotease Glu-C (V8-Protease) von *Staphylococcus aureus* und die Protease IV von *Pseudomonas aeruginosa* induzierten hingegen keinen Ca^{2+} -Influx. Proteasen mikrobiellen Ursprungs wurden bisher, in Hinblick auf ihre destruktive Natur als proteindegradierende Enzyme, als Virulenzfaktoren definiert. Untersuchungen mikrobieller Proteasen beschränkten sich derzeit zu einem großen Teil auf die Analyse der Degradation humaner Stütz- und Plasmaproteine und den daraus resultierenden pathogenen Effekten (Twining et al.,

1993; Tang et al., 1996; Kessler et al., 1997). Ein aktiver Eingriff von mikrobiellen Proteasen über die PAR in die zelluläre Signaltransduktion in den Epithelzellen der Haut wurde bisher in nur geringem Maße untersucht. Die Induktion des Ca^{2+} -Influx durch mikrobielle Proteasen zeigt, dass diese eine Signaltransduktion in Keratinozyten aktivieren können. Somit werden mikrobielle Proteasen als Faktoren dargestellt, die der Zelle das Erkennen einer mikrobiellen Besiedelung und die Einleitung von Abwehrmaßnahmen ermöglichen.

4.2 Subtilisin A induziert Ca^{2+} -Influx in Keratinozyten durch Aktivierung des PAR1

Von den mikrobiellen Proteasen, die einen intrazellulären Ca^{2+} -Influx induzierten wurde die Protease Subtilisin A ausgewählt, um mit Experimenten der gegenseitigen Rezeptordeaktivierung zu untersuchen welche Rezeptoren an der Induktion des Ca^{2+} -Signals durch Subtilisin A beteiligt sind. Hierbei wird davon ausgegangen, dass ein aktivierter Rezeptor von der Zelle internalisiert und abgebaut wird und die Zelle über einen bestimmten Zeitraum nicht über diesen Rezeptorweg stimuliert werden kann (Hoxie et al., 1993; MacFarlane et al., 2001). Als Antagonisten für Subtilisin A wurden die für den PAR1-Signalweg spezifischen Stimuli Thrombin und das PAR1-AP und Trypsin und das PAR2-AP für den PAR2-Signalweg verwendet. Weiterhin wurden Prästimulationen mit einer Kombination der PAR-APs mit und ohne EGF (epidermal growth factor) vorgenommen. Die Liganden des EGF-Rezeptors sind in zahlreiche Signalprozesse eingebunden (Brachmann et al., 1989; Wong et al., 1989; Higashiyama et al., 1991). In vielen Fällen werden diese durch eine Metalloprotease aktiviert (Dong et al., 1999), die auch eine Schlüsselfunktion für die Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch verschiedene GPCRs einnimmt (Prenzel et al., 1999; Gschwind et al., 2003; Lemjabbar et al., 2003). Bei der Stimulation der Keratinozyten mit den PAR-APs stellte sich heraus, das PAR1 und PAR2 in diesen Zellen nicht deaktiviert werden, wenn sie mit den PAR-spezifischen aktivierenden Peptiden stimuliert werden. Sowohl PAR1 als auch PAR2 waren, nach einer vorangehenden Aktivierung durch ihre spezifischen Peptid-Liganden, unmittelbar danach nochmals aktivierbar. Eine Prästimulation der Keratinozyten mit dem PAR1-AP verhinderte eine nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -

Influxes durch Subtilisin A. Die Stimulation der Zellen mit Thrombin verhindert ein nachfolgend induziertes Ca^{2+} -Signal durch Subtilisin A nicht. Durch die Prästimulation der Zellen mit Subtilisin A wird eine nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Signals durch das PAR1-AP und durch Thrombin verhindert. Dieser Befund zeigt, dass der PAR1 in die Signaltransduktion durch Subtilisin A involviert ist. Die Tatsache, dass Thrombin ein nachfolgendes Ca^{2+} -Signal durch Subtilisin A nicht verhindert, deutet darauf hin, dass neben dem PAR1 weitere Rezeptoren an der Signaltransduktion durch Subtilisin A beteiligt sind. Von den vier bekannten PARs wird nur der PAR2 von Thrombin nicht proteolytisch aktiviert. Die Prästimulation der Zellen mit den PAR2-Agonisten Trypsin und PAR2-AP unterdrückt die nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Signals durch Subtilisin A. Eine Prästimulation mit Subtilisin A verhindert eine nachfolgende Stimulation durch die PAR2-Agonisten jedoch nicht. Der Befund, dass der PAR2-Ligand PAR2-AP nach der Stimulation der Zellen durch Subtilisin A ein weiteres Ca^{2+} -Signal auslösen kann zeigt, dass der PAR2, sofern er von Subtilisin A aktiviert oder beschädigt wird anschließend nicht deaktiviert ist. Die Aktivierung des PAR2 durch seine Agonisten führt aber zu einer Deaktivierung oder Desensitivierung des Signaltransduktionsweges von Subtilisin A. Die Prästimulation der Keratinozyten mit einer Kombination aus den aktivierenden Peptiden für PAR1, PAR2, PAR3 und PAR4 verhinderte eine anschließendes Ca^{2+} -Signal durch Subtilisin A nicht, obwohl ein Prästimulation mit dem PAR2-AP allein das nachfolgende Signal durch Subtilisin A verhinderte. Die Kombination der PAR1- und PAR4-AP und des PAR2-stimulierenden PAR3-AP mit dem PAR2-AP hebt die Desensitivierung durch die Aktivierung des PAR2 auf. Eine Prästimulation mit der Kombination aus allen PAR-AP und zusätzlichem EGF verhindert wiederum eine nachfolgende Stimulation mit Subtilisin A. Von PAR2 ist bekannt, dass durch ihn einige Kinasen der MAPK-Kaskade (ERK1/2, p38) aktiviert werden und andere nicht (c-jun-terminale Kinase) (Kanke et al., 2000; Sabri et al., 2000). Möglicherweise werden durch vollständige oder teilweise Aktivierung der MAPK-Kaskade GPCR-regulierende oder desensitivierende Proteine aktiviert (Trejo, 2003; Ossovskaya und Bunnett, 2004). Die Stimulation mit dem PAR4-AP oder dem unspezifisch PAR1- und PAR2-aktivierenden PAR3-AP scheint diese, durch das PAR2-AP induzierte Desensitivierung aufzuheben, während EGF zusammen mit dem PAR2-AP diese wieder etabliert. Die Prästimulation mit EGF allein inhibiert eine nachfolgende Stimulation durch Subtilisin A nicht, jedoch

wird durch eine Prästimulation mit Subtilisin A eine nachfolgende Stimulation der Zelle mit EGF inhibiert. Aus diesen Befunden lässt sich für Subtilisin A die Aktivierung der Keratinozyten über den PAR1 ableiten. Da die Aktivierung durch Subtilisin A insensitiv gegenüber PTX und CTX ist, nutzt sie vermutlich $G_{\alpha q11}$, wodurch einerseits InsP_3 und Ca^{2+} mobilisiert werden, andererseits wird der EGF-Rezeptor transaktiviert und die MAPK-Kaskade aktiviert (Ossovskaya und Bunnett, 2004). Diese Stimulation kann durch Aktivierung des PAR2, der ebenfalls in die MAPK-Kaskade eingreift, inhibiert werden. Da die Aktivierung von PAR2 nicht die Signalstimulation durch Thrombin oder das PAR1-AP über PAR1 inhibiert (eigene Beobachtung), muss der Aktivierungsmechanismus von Subtilisin A sich von dem des Thrombin unterscheiden. Dieser Unterschied könnte in einer voneinander Abweichenden Spaltung der N-terminalen Domäne des Rezeptors durch Subtilisin A oder Thrombin liegen und einer daraus resultierenden veränderten Affinität des Liganden, die über die Nutzung des G_{α} -Subtyps und der angeschlossenen Signalwege entscheidet (McLaughlin et al., 2005) oder in der Nutzung weiterer PAR durch Subtilisin A, die regulierend in die Signaltransduktion eingreifen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Prästimulation mit dem PAR1-AP nicht nur die Stimulation durch Subtilisin A inhibiert, sondern dass auch die nachfolgende Subtilisin A Applikation zu einer Terminierung des auslaufenden PAR1-Signals führt. Die Befunde aus den Experimenten mit Subtilisin A deuten darauf hin, dass der allgemein postulierte Mechanismus der Signalterminierung durch Internalisierung und Abbau des Rezeptors (MacFarlane et al., 2001) die Regulation PAR-vermittelter Signale nur unzureichend erklärt. Vielmehr scheint die Aktivierbarkeit und Desensitivierung der Rezeptoren über die intrazellulären Signaltransduktionswege reguliert zu werden.

4.3 Die proteolytische Aktivität aus dem Kulturüberstand von *Pseudomonas aeruginosa* ist auf Pseudolysin und Protease IV zurückzuführen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass Proteasen mikrobieller Herkunft unter Beteiligung der PARs in die Signaltransduktion von Keratinozyten eingreifen sollten die Proteasen von hautrelevanten Organismen untersucht werden. Hierfür wurde der gramnegative Organismus *Pseudomonas aeruginosa* ausgewählt. *Pseudomonas aeruginosa* ist ein

opportunistisch humanpathogener Organismus der die Infektion von Wunden, Atem- und Harnwegen sowie Lungenentzündung Sepsis und Herzerkrankungen verursachen kann. Besonders gefährdet sind Patienten mit der Erbkrankheit Mukoviszidose, bei denen Lungenentzündungen durch *Pseudomonas aeruginosa* die häufigste Todesursache ist (Yu et al., 1996). *Pseudomonas aeruginosa* ist einer der häufigsten Erreger bei nosokomialen Infektionen (Cunha, 2002). Bei Gesunden Individuen ist *Pseudomonas aeruginosa* in der kommensalen Flora zu finden, ohne dass es zu Infektionen führt. *Pseudomonas* sezerniert mehrere extrazelluläre Proteasen, von denen einige als Virulenzfaktoren dargestellt werden konnten, die Stützproteine des Gewebes und Plasmaproteine wie Immunglobuline, α -Proteaseinhibitoren, Koagulations- und Komplementfaktoren degradieren können (Schultz und Miller, 1974; Morihara et al., 1979; Johnson et al., 1982; Doring et al., 1981; Doring et al., 1984; Twining et al., 1993; Tang et al., 1996; Kessler et al., 1997). Eine mögliche Funktion der Proteasen von *Pseudomonas aeruginosa* als Induktoren in der Signaltransduktion von Epithelzellen wurde bisher nicht untersucht. In der Literatur wurden bisher vier extrazellulären Proteasen beschrieben die von *Pseudomonas aeruginosa* sezerniert werden.

Staphylolysin (LasA) ist eine β -lytische Metalloendopeptidase die bevorzugt Gly-C-Bindungen spaltet und durch 1,10-Phenanthrolin gehemmt werden kann (Kessler und Ohman, 2004b).

Pseudolysin (LasB) gehört zu den zinkabhängigen Metallopeptidasen die bevorzugt nach hydrophoben Resten gefolgt von Leu, Phe, Ile, oder Val spalten. Pseudolysin kann durch 1,10-Phenanthrolin und Phosphoramidon inhibiert werden (Kessler und Ohman, 2004a).

Aeruginolysin gehört zu den Metalloproteasen und spaltet bevorzugt vor hydrophoben Resten. Inhibitoren für Aeruginolysin sind SBTI und 1,10-Phenanthrolin (Wallach, 2004).

Protease IV gehört zu den Serinproteasen und spaltet bevorzugt Lys-C- und Arg-C-Bindungen. Protease IV lässt sich durch TLCK und Benzamidin inhibieren (Engel et al., 1998).

Der Rohüberstand einer Kultur von *Pseudomonas aeruginosa* induziert einen Ca^{2+} -Influx in Keratinozyten. Weiterhin lässt sich eine proteolytische Aktivität gegenüber dem Lys-C-spezifischen chromogenen Substrat Tosyl-Glycyl-Prolyl-Lysyl-4-Nitroanilin und Casein nachweisen, während andere chromogene Substrate nicht hydrolysiert wurden. Die weitere Analyse des Rohüberstandes in der Flüssigkeitschromatographie zeigte, dass die Fraktionen in denen eine Lys-C-spezifische proteolytischen Aktivität nachweisbar war auch diejenigen waren, die in Keratinozyten Ca^{2+} -Influx induzierten. Die Lys-C-spezifische proteolytischen Aktivität verweist auf die mögliche Aktivität der Lys-C/Arg-C-spezifischen Pseudomonas Protease IV (Engel et al., 1998; Caballero et al., 2001). Die Bedeutung der Lys-C/Arg-C-spezifischen Aktivität für diese Arbeit begründet sich in dem Umstand, dass PAR1, PAR2 und PAR4 zu ihrer Aktivierung hinter einem Arginin gespalten werden und PAR3 hinter einem Lysin. Untersuchungen zur Kreuzdeaktivierung mit den PAR-typischen Agonisten in Keratinozyten zeigten, dass PA-Protease IV mit dem PAR1 interagiert und der PAR2 unbeeinflusst bleibt. Weitere Kreuzdeaktivierungsexperimente mit verschiedenen Ca^{2+} -Influx induzierenden Proteasen zeigten, dass humanes Plasmin und die Endoprotease Lys-C von *Lysobacter enzymogenes* durch Prästimulation die nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Signal durch PA-Protease IV hemmen, ebenso wie PA-Protease IV durch Prästimulation eine nachfolgende Signalstimulation durch diese Proteasen verhindert. Diese gegenseitige Inhibition weist auf ein Rezeptorsystem hin, das von diesen drei Proteasen gleichermaßen genutzt wird. Der Umstand, dass Plasmin und die Endoprotease Lys-C eine Spaltspezifität für Lys-C haben deutete abermals auf die Aktivität der Protease IV in dem Präparat PA-Protease IV hin. Die Lys-C-spezifische Aktivität der Fraktionen deutete zunächst auf die Protease IV als Induktor des Ca^{2+} -Influxes in Keratinozyten hin. Nach der Inhibition der Lys-C-spezifischen Aktivität mit TLCK induzierte das Präparat jedoch weiterhin einen Ca^{2+} -Influx. Außerdem war weiterhin eine hydrolytische Aktivität gegenüber Casein nachweisbar, die unempfindlich gegenüber SBTI und TLCK war, aber mit 1,10-Phenanthrolin und Phosphoramidon inhibiert werden konnte. Die Hemmbarkeit der proteolytischen Aktivität des HPLC-Präparates mit 1,10-Phenanthrolin und Phosphoramidon, die Resistenz gegenüber SBTI und TLCK sowie die Fähigkeit Casein zu degradieren grenzte die Pseudomonas Elastase Pseudolysin gegenüber den anderen Pseudomonas Proteasen ab. Ein Präparat, das mit Phosphoramidon gehemmt

wurde, zeigte weiterhin eine Lys-C-spezifische proteolytische Aktivität, konnte aber keinen Ca^{2+} -Influx in Keratinozyten induzieren. Daraus folgte, dass sich die Aktivität des das Präparates PA-Protease IV aus zwei verschiedenen proteolytische Aktivitäten zusammensetzte, von denen eine Aktivität der Protease IV zuzuordnen war und die andere Aktivität der Pseudomonas Elastase Pseudolysin.

4.4 Pseudolysin induziert Ca^{2+} -Influx in Keratinozyten

Die weitere Analyse der Ca^{2+} -Influxinduktion der einzelnen Proteasen Pseudolysin und Protease IV erbrachte den Befund, dass die Protease IV allein keinen Ca^{2+} -Influx in Keratinozyten induzierte und die Ca^{2+} -Mobilisation in Keratinozyten auf die Protease Pseudolysin zurückzuführen war, da sie mit Phosphoramidon hemmbar war. In den Versuchen zur Kreuzdeaktivierung zeigte sich jedoch ein unterschiedliches Verhalten zwischen dem Einsatz von Pseudolysin allein und der kombinierten proteolytischen Aktivität von Pseudolysin und Protease IV in dem Präparat PA-Protease IV. Die Versuche zur Zytokinstimulation in Keratinozyten zeigten ebenfalls eine signifikante Veränderung in der Intensität der Induktion der mRNA-Expression zwischen der Stimulation durch Pseudolysin allein und in Kombination mit der Protease IV in dem Präparat PA-Protease IV.

4.5 Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden durch extrazelluläre Proteasen von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Reaktionen des angeborenen Immunsystems sind ein wichtiger Faktor der Barrierefunktion der Haut. Zu ihnen gehören die Induktion proinflammatorischer Zytokine, welche über Entzündungsprozesse eine antimikrobielle Abwehr aktivieren und das adaptive Immunsystem induzieren und die Expression und Aktivierung von antimikrobiellen Peptiden, welche an vorderster Linie pathogene Mikroorganismen bekämpfen. In vorangehenden Arbeiten (Harder et al., 2000) konnte gezeigt werden, dass Rohüberstände und Bakterien in hohem Maße die Expression der mRNA von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden in Epithelzellen der Haut induzieren. Diese Aktivität wurde bisher überwiegend pathogen assoziierten Molekülen

zugeschrieben. In welchem Maße extrazelluläre mikrobielle Proteasen an dieser Induktion beteiligt sind wurde bisher nur vereinzelt untersucht. An den Epithelien der Mundhöhle konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität von *Porphyromonas gingivalis*, über die Signalwege der PAR, IL6 und hBD2 induziert (Lourbakos et al., 2001; Chung et al., 2004). Weiterhin wurde auch beschrieben, dass Mutanten von *Porphyromonas gingivalis*, bei denen einzelne Proteasen deletiert waren, nur noch eine Zytokininduktion zu 16% -67% aufwiesen und Mutanten, bei denen zwei Proteasen deletiert waren induzierten nur noch zu 0,1% bis 16% (Chung et al., 2004). In Stimulationsversuchen mit Keratinozyten bewirkten Pseudolysin und die Protease IV als alleinige Stimuli eine moderate Steigerung mRNA-Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL8 und des antimikrobiellen Peptids hBD2. Die in dem Präparat PA-Protease IV zusammengefasste Aktivität der beiden Proteasen bewirkte eine Stimulation der proinflammatorischen Zytokine und antimikrobiellen Peptide, die um das 10- bis 100-fache höher war als die der einzelnen Proteasen. Eine evtl. Beteiligung von LPS an der Induktion ließ sich durch Zugabe des Endotoxinhemmstoffes Polymyxin-B ausschließen. Die Induktion der proinflammatorischen Zytokine und der antimikrobiellen Peptide konnte außerdem durch Protease IV spezifische Inhibitoren reduziert werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine Kooperation der Proteaseaktivitäten bei der Stimulation von Keratinozyten durch Pseudolysin und Protease IV schließen. Das Präparat PA-Protease IV zeigte in Keratinozyten einen stimulatorischen Effekt auf die Expression der mRNA von proinflammatorischen Zytokinen und von antimikrobiellen Peptiden. In den Stimulationsversuchen wurden TNF α 95-fach und IL8 80-fach induziert. Außerdem stimulierte PA-Protease IV, im Gegensatz zu den einzelnen Proteasen Pseudolysin und Protease IV, auch noch das proinflammatorische Zytokin IL1 β und in geringen Maßen die antimikrobielle Peptide Psoriasin, RNase7 und Elafin.

4.6 Induktion der Ca²⁺-Signaltransduktion in Keratinozyten durch die Pseudomonas aeruginosa Proteasen Pseudolysin und Protease IV

In den Kreuzdeaktivierungsexperimente an Keratinozyten zeigten sich Unterschiede in dem Stimulationsverhalten von Pseudolysin als alleiniger Stimulus für den Ca²⁺-Influx und dem Präparat PA-Protease IV mit der kombinierten Aktivität von Pseudolysin und

Protease IV. Durch diese Unterschiede lassen sich die Intensitätsunterschiede bei der Stimulation der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine und antimikrobiellen Peptide erklären. Die differentielle Stimulation des Rezeptorgefüges der PAR durch einzelne Proteasen oder das kooperative Zusammenwirken der verschiedenen proteolytischen Aktivitäten ermöglicht es, auf der zellulären Ebene der angeborenen Immunität, eine fremde proteolytische Aktivität eines pathogenen Organismus von der körpereigener oder kommensaler Proteasen zu unterscheiden (Chung et al., 2004).

4.7 Pseudolysin desensitiviert PAR1, PAR2 und PAR4

Eine Prästimulation der Keratinozyten mit Trypsin deaktiviert PAR1, PAR2 und PAR4. Sowohl Pseudolysin als auch PA-Protease IV können in Keratinozyten, nach einer Prästimulation mit Trypsin, kein nachfolgendes Ca^{2+} -Signal induzieren. Thrombin deaktiviert bei einer Prästimulation den PAR1, den PAR3 und den PAR4. Die Prästimulation von Keratinozyten mit Thrombin unterdrückte eine nachfolgende Ca^{2+} -Influxinduktion durch Pseudolysin und PA-Protease IV. Eine Prästimulation von Keratinozyten mit Pseudolysin inhibiert die anschließende Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Trypsin, daraus folgt, dass die Stimulation mit Pseudolysin den PAR1, den PAR2 und den PAR4 deaktivieren oder desensitivieren muss. Die Prästimulation mit Pseudolysin inhibiert nicht die nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Influges durch Thrombin. Da Pseudolysin den PAR1 und den PAR4 deaktiviert, muss Thrombin die nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Influges durch die Aktivierung des PAR3 stimulieren.

4.8 Die proteolytische Beschädigung von PAR2 durch Pseudolysin verhindert nicht die Aktivierung durch Ligandenbindung

Das PAR1-AP induziert nach einer Prästimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin ein Ca^{2+} -Signal. Die massenspektrometrische Analyse des Verdaus der N-terminalen Sequenzen der PARs zeigte, dass Pseudolysin die N-terminale Sequenz des PAR1 in einer Form schneidet, welche die Aktivierung des Rezeptors zulässt. Da das PAR1-AP auch den PAR2 aktivieren kann (Blackhart et al., 1996) und der PAR1 bei einer Prästimulation mit Pseudolysin durch proteolytische Aktivierung deaktiviert wurde, muss

PAR1-AP die Zellen über den PAR2 stimulieren. Das bedeutet, dass Pseudolysin den PAR2 in einer Weise beschädigt, die eine proteolytische Aktivierung verhindert, aber eine Aktivierung durch Ligandenbindung zulässt. Dadurch wird auch erklärt, dass auch das PAR2-AP nach einer Prästimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin die Zellen aktivieren kann.

4.9 Die Aktivierung von PAR2 in Keratinozyten desensitiviert die PAR für die Signaltransduktion durch Pseudolysin

Weil die Signalinduktion durch Pseudolysin in Keratinozyten durch Prästimulation mit Thrombin inhibiert wird, kann man daraus schließen, dass Pseudolysin keine Signale über den PAR2 induziert, denn Thrombin deaktiviert PAR1, PAR3 und PAR4, nicht aber den PAR2 (Böhm et al., 1998). Eine Prästimulation der Keratinozyten mit dem PAR2-AP inhibiert eine nachfolgende Induktion des Ca^{2+} -Influxes durch Pseudolysin und durch PA-Protease IV. Das PAR2-AP aktiviert ausschließlich den PAR2, deshalb muss die Inhibition der Signalinduktion von Pseudolysin unterhalb der Rezeptorebene durch Aktivierung von desensitivierenden Proteinen, wie G-Protein-Rezeptor-Kinasen oder Arrestinen (Trejo, 2003) hervorgerufen werden könnten.

4.10 Protease IV reguliert die Signaltransduktion von Pseudolysin über PAR3 und seinen Liganden

Die Prästimulation von Keratinozyten mit Pseudolysin unterdrückt nicht die anschließende Signaltransduktion durch Thrombin, da Thrombin die Zellen über den PAR3 aktivieren kann. Erfolgt die Prästimulation der Keratinozyten mit Pseudolysin und Protease IV gemeinsam als Präparat PA-Protease IV, wird die nachfolgende Induktion eines Ca^{2+} -Signals durch Thrombin inhibiert. Nach der Prästimulation der Keratinozyten mit dem PAR1-AP wird die Ca^{2+} -Mobilisation durch die nachfolgende Stimulation mit Pseudolysin reduziert. Diese Reduktion wird aufgehoben, wenn die nachfolgende Stimulation durch Pseudolysin und Protease IV gemeinsam als Präparat PA-Protease erfolgt. Die Reduktion der Ca^{2+} -Mobilisation ist auch dann aufgehoben, wenn die Prästimulation der Keratinozyten mit einer Kombination aus dem PAR1-AP und dem PAR3-AP erfolgt. Der PAR3-AP aktiviert unspezifisch PAR1 und PAR2 (Hansen et al.,

2004). Das bedeutet möglicherweise, dass Protease IV den PAR3-Liganden freisetzt und durch die unspezifische Aktivierung des PAR2 oder durch proteolytische Aktivierung des PAR3 die Signalinduktion durch Pseudolysin unterstützt. Erfolgt die Prästimulation der Keratinozyten mit einer Kombination aus dem PAR3-AP und dem PAR4-AP, wird die nachfolgende Ca^{2+} -Mobilisation durch Pseudolysin wieder abgeschwächt.

4.11 Pseudolysin aktiviert Keratinozyten über PAR1 und PAR4

Eine Prästimulation von Keratinozyten mit Plasmin unterdrückt die nachfolgende Induktion eines Ca^{2+} -Signals durch Pseudolysin. Wenn die Zellen vorher mit Pseudolysin stimuliert werden, wird die nachfolgende Signalinduktion durch Plasmin ebenfalls unterdrückt. Plasmin deaktiviert PAR1 und aktiviert die Zellen über den PAR4 (Quinton et al., 2004). Eine Prästimulation mit einer Kombination aus dem PAR1-AP, dem PAR3-AP und dem PAR4-AP inhibiert die nachfolgende Induktion eines Ca^{2+} -Influges durch Pseudolysin. Daraus lässt sich ableiten, dass Pseudolysin Keratinozyten über PAR1 und PAR4 aktiviert.

4.12 Die Induktion und Regulation PAR unterscheidet sich in Keratinozyten, Fibroblasten und Lungenepithelzellen

Die Experimente zur Induktion des Ca^{2+} -Influges in Fibroblasten und NCI-H 292 zeigten Unterschiede in der Ausprägung der Signale und der Reaktion auf die Agonisten. Die prägnantesten Unterschiede waren bei den Fibroblasten zu beobachten. Lediglich das PAR1-AP erzeugte ein Ca^{2+} -Influxsignal in Fibroblasten und NCI-H-292 Zellen, das in seiner Ausprägung mit denen vergleichbar war, welche von PAR1-AP in Keratinozyten generiert wurden. Das durch das PAR2-AP generierte Ca^{2+} -Influxsignal unterschied sich in allen drei Zelltypen. In Keratinozyten bestand das Signal aus einem steilen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration mit einem anschließenden, andauernden, sich abflachenden Plateau. In Fibroblasten und NCI-H-292-Zellen war statt des Plateaus ein Oszillieren zu beobachten und die Signale fielen insgesamt kürzer aus. In NCI-H-292 Zellen erzeugte das PAR2-AP einen Ca^{2+} -Einstrom, der doppelt so stark war wie der aller anderen Ca^{2+} -Influx-induzierenden Stimuli. Auch die von Trypsin, Thrombin, und Pseudolysin generierten Signale unterschieden sich in den drei Zelltypen in Dauer und

Ausprägung. Pseudolysin stimulierte in Fibroblasten keinen Ca^{2+} -Influx. Bei Experimenten zur Kreuzdeaktivierung in NCI-H-292 Zellen zeigte sich, dass eine Prästimulation mit Thrombin ein nachfolgendes Signal durch Pseudolysin nicht inhibierte, wie dieses in Keratinozyten der Fall ist. Interessant waren auch die Unterschiede in der Signalausprägung von Thrombin und Pseudolysin als Prästimulatoren im Vergleich zu der Signalausprägung von Thrombin und Pseudolysin als sukzessive Stimuli. In der Prästimulation generierten sowohl Thrombin als auch Pseudolysin ein oszillierendes Signal und als nachfolgende Stimuli generierten beide Proteasen einen einzelnen kurzen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration. Der PAR3-AP und das PAR4-AP induzierten in Fibroblasten und NCI-H-292 Zellen keinen Ca^{2+} -Influx. Jedoch konnte der PAR3-AP in NCI-H-292 Zellen ein Ca^{2+} -Influx-Signal generieren, nachdem diese mit einem Antikörper gegen den $\text{TGF}\alpha$ behandelt wurden. Dieses ist ein Hinweis auf die Beteiligung der MAPK-Kaskade, bei der Regulation der PAR in Lungenepithelzellen. Die vorangehenden Beobachtungen zeigen auf, dass die Induzierbarkeit und Regulation der PAR zellspezifisch ist.

4.13 Pseudolysin induziert proinflammatorische Zytokine in NCI-H-292 Zellen

Bei der molekularbiologischen Analyse der Stimulation von NCI-H-292 Zellen mit Pseudolysin zeigte sich, dass Pseudolysin vor allem die mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL8 und $\text{TNF}\alpha$) induziert. Die Expression von antimikrobiellen Peptiden konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Stimulation der Zellen mit den vier PAR-APs zeigte sich, dass mRNA-Expression von IL8 durch das PAR1-AP induziert werden kann und die mRNA-Expression von $\text{TNF}\alpha$ durch das PAR4-AP. Diese Beobachtung ist deshalb überraschend, weil das PAR4-AP in NCI-H-292 Zellen keinen Ca^{2+} -Influx induziert. Eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung von verschiedenen Proteinkinasen durch PAR wurde schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. So wird die p44/42 MAPK durch Plasmin Ca^{2+} -unabhängig über den PAR1 in Fibroblasten aktiviert (Usha et al., 2002). In Blutplättchen wurde eine Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen beobachtet, die durch ein PAR1-AP stimuliert wurde, welches keinen Ca^{2+} -Influx induzierte (Negrescu et al., 1995). Für Epithelzellen der Haut wurde beschrieben, dass zwei der wichtigsten MAPK, die ERK

und die p38 MAPK, Ca²⁺-unabhängig aktiviert werden, während der NFκB-Signalweg über InsP₃ und Ca²⁺ reguliert wird.

4.14 Bedeutung der unterschiedlichen Regulation der PARs in verschiedenen Zelltypen bei Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa löst in gesunden Organismen nur selten Infektionen in der Haut aus (ca. 50 % der Menschen sind Träger dieses Bakteriums). Infektionen der Lunge mit *P. aeruginosa* sind bedeutend häufiger. Hautinfektionen mit *P. aeruginosa* entwickeln sich vor allem dann, wenn die Kontinuität der Haut bzw. Schleimhaut unterbrochen ist. So führen Infektionen von großflächigen Brandwunden mit diesem Erreger immer noch in 60 % aller Fälle zum Tod des Patienten (Richard et al., 1994). Die hier dargestellten Unterschiede in den Reaktionen von Keratinozyten, Fibroblasten und Lungenepithelzellen auf die Stimulation mit einer Protease von *P. aeruginosa* können eine Ursache dafür aufzeigen, warum *P. aeruginosa* in offenen Wunden und in der Lunge häufiger zu Infektionen führt als auf der intakten Haut. Lediglich Keratinozyten exprimierten die antimikrobiellen Peptide hBD2, Elafin und Rnase 7 als Reaktion auf die proteolytische Aktivität von *P. aeruginosa*. In NCI-H-292 Zellen als Epithelzellen der Lunge konnte nur die Expression von proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden. Das würde erklären, dass *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge wesentlich häufiger zu Entzündungen führt als auf der Haut. Dieser Sachverhalt ist besonders für Personen mit einer geschwächten Immunabwehr von Bedeutung, wie für Personen, die an Mukoviszidose leiden. Bei diesen Menschen sind Lungenentzündungen, die durch *Pseudomonas* hervorgerufen wurden, die häufigste Todesursache.

4.15 Zusammenfassende Darstellung der *Pseudomonas* Proteasen

Die vorliegenden Befunde zeigen eine neue Eigenschaft der Protease Pseudolysin von *Pseudomonas aeruginosa* auf. Pseudolysin ist ein mikrobieller Faktor der Keratinozyten zu antimikrobiellen Abwehrleistungen stimuliert. Bisher wurden die Proteasen von *Pseudomonas aeruginosa* als Virulenzfaktoren mit Gewebe-schädigenden Auswirkungen beschrieben (Engel et al., 1998). Die Analyse der Versuche zur

gegenseitigen Rezeptordeaktivierung zeigen auf, dass Pseudolysin Keratinozyten über den PAR1 und den PAR4 stimuliert und in den Zellen einen Ca^{2+} -Influx induziert. Infolgedessen wird die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL8 und der antimikrobiellen Peptide hBD2 und Psoriasin stimuliert. Dabei erfolgt die Induktion der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine, über den PAR1, denn in Stimulationsversuchen mit den PAR-APs wurde diese nur durch das PAR1-AP oder das PAR2-AP stimuliert (s.Abb. 31). Diese Versuche zeigten auch, dass die mRNA-Expression der antimikrobiellen Peptide nicht durch die Aktivierung eines einzelnen PAR stimuliert wird. Vermutlich wird die mRNA-Expression der antimikrobiellen Peptide durch die gleichzeitige Aktivierung des PAR1 und des PAR4 durch Pseudolysin stimuliert oder auf indirektem Weg über TNF α (Harder et al., 2000). Die bisher wenig untersuchte Protease IV stimuliert ebenfalls die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide. Im Gegensatz zum Pseudolysin induziert die Protease IV aber keinen Ca^{2+} -Influx. Die Versuche zur gegenseitigen Rezeptordeaktivierung deuten auf eine Beteiligung des PAR3 in der durch die Protease IV induzierten Signaltransduktion. Werden die Proteasen Pseudolysin und Protease IV gleichzeitig als Stimuli eingesetzt fällt die antimikrobielle Antwort um ein vielfaches Intensiver aus. Vermutlich wird es durch die differentielle Stimulation des Rezeptorgefüges der PARs durch einzelnen Proteasen oder das kooperative Zusammenwirken der verschiedenen proteolytischen Aktivitäten ermöglicht, dass auf der zellulären Ebene der angeborenen Immunität, die fremde proteolytische Aktivität eines pathogenen Organismus von der Aktivität körpereigener oder kommensaler Proteasen unterschieden werden kann, wie es auch schon in anderen Arbeiten formuliert wurde (Chung et al., 2004).

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mikrobielle Proteasen in der Haut eine antimikrobielle Abwehr induzieren. Diese Induktion wird über G-Protein-gekoppelte, Protease-aktivierbare Rezeptoren vermittelt und unterliegt einer Regulation, die auf der zellulären Ebene die Unterscheidung zwischen der nicht-pathogenen Aktivität körpereigener Proteasen, den Proteasen von Kommensalen und der Aktivität von

Proteasen pathogener Mikroorganismen ermöglicht. Anhand der PAR, die durch die Proteasen, die ein pathogener Organismus sezerniert, aktiviert oder desensitiviert werden entsteht ein Profil der proteolytischen Aktivität, welches diese Unterscheidung ermöglicht. Dieses Prinzip wurde an der Haut, erstmals in dieser Arbeit untersucht. Eine weitere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der durch *Porphyromonas* Proteasen induzierten, antimikrobiellen Abwehr in den Epithelien des Mundraumes. Die Untersuchung weiterer proteolytischer Profile von anderen pathogenen und kommensalen Mikroorganismen und deren Auswirkung auf die Systeme der angeborenen Immunität muss weiter verfolgt werden. Die Signalwege, die durch die PAR und andere GPCR aktiviert werden und die Verbindungen zwischen diesen Signalwegen sind noch nicht in hinreichendem Maße aufgeklärt. Das Gleiche gilt für die Interaktionen der Rezeptoren untereinander. Dennoch gibt es in dieser und anderen Arbeiten zahlreiche Evidenzen, die darauf hindeuten, dass zwischen den PAR, ebenso wie zwischen allen anderen GPCR, Interaktionen stattfinden, welche die Funktionalität im Einzelnen beeinflussen und regulierende Funktionen entfalten. Dadurch wird die Unterscheidung verschiedener proteolytischer Aktivitäten von Bakterien ermöglicht. Die klassische Betrachtungsweise eines Rezeptors, seines Liganden und einer möglichen generierten Funktion erweist sich als nicht ausreichend, da Rezeptoren und ihre Signalwege als Teile eines vernetzten Systems zahlreichen weiteren Effektoren ausgesetzt sind. Für die, durch die PAR vermittelte, antimikrobielle Abwehr bedeutet dieses, dass ebenso die Einflüsse anderer Erkennungs- und Abwehrsysteme, wie den „Pattern-Recognition-Rezeptoren“ in die zukünftigen Untersuchungen mit einbezogen werden müssen. Im Anbetracht einer Zunahme der Multiresistenzen von Erregern wie *Pseudomonas aeruginosa* sind diese Erkenntnisse Weiterentwicklung einer Infektionsabwehr notwendig.

6 Zusammenfassung

Die Epithelien der Atemwege, des Verdauungstraktes und der Haut sind mit einer Flora aus verschiedenen Mikroorganismen besiedelt. Obwohl neben apathogenen Keimen auch fakultativ pathogenen Keime vorhanden sind, kommt es nur selten zu Infektionen. Die Haut des Menschen als Organ der angeborenen Immunität hat neben ihrer Wirkung als chemische und physikalische Barriere auch eine Funktion als biochemische Barriere. Die Epithelzellen der Haut können antimikrobielle Peptide und proinflammatorische Zytokine synthetisieren. Die Bildung der antimikrobiellen Peptide und proinflammatorischen Zytokine wird über Rezeptoren induziert, die in der Lage sind mikrobielle Faktoren zu erkennen. Extrazelluläre Proteasen mikrobieller Herkunft sind mögliche Faktoren, die von den Zellen erkannt werden. Die Epithelzellen der Haut, wie Keratinozyten, exprimieren Protease-aktivierbare Rezeptoren (PARs), deren Aktivierung die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} als „second messenger“ induziert. Anhand der Induktion des Ca^{2+} -Influges und der Stimulation der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Keratinozyten von verschiedenen mikrobiellen Proteasen aktiviert werden. Aus den zellfreien Kulturüberständen von *Pseudomonas aeruginosa* wurde die proteolytische Aktivität der Protease IV und des Pseudolysin (LasB) isoliert und zur Stimulation des Ca^{2+} -Influges und der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden in Keratinozyten eingesetzt. Pseudolysin induziert dabei einen Ca^{2+} -Influx über PAR1 und PAR4 in den Keratinozyten, während die Protease IV keinen Ca^{2+} -Influx induziert. Beide Proteasen von *P. aeruginosa* induzieren jedoch die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL8. Die Protease IV stimuliert außerdem die mRNA-Expression des antimikrobiellen Peptids hBD2 und Pseudolysin stimuliert die mRNA-Expression der antimikrobiellen Peptide hBD2 und Psoriasin. Stimulationsversuche mit aktivierenden Peptiden der PARs haben gezeigt, dass nur die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine über den PAR1 und den PAR2 stimuliert wird. Die mRNA-Expression der antimikrobiellen Peptide wird in Keratinozyten auf indirektem Weg, z.B. durch TNF α stimuliert. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die beiden Proteasen in Kombination eine wesentlich höhere mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und

antimikrobiellen Peptiden induzieren, als wenn die Proteasen als einzelne Stimuli eingesetzt werden. Die Unterschiede in der Rezeptoraktivierung zwischen der einzelnen Protease und der Kombination der Proteasen ermöglichen somit auf der zellulären Ebene eine Unterscheidung zwischen der Aktivität körpereigener Proteasen und der Aktivität der Proteasen pathogener Organismen. In vergleichenden Untersuchungen an anderen Zellsystemen, wie Fibroblasten und Lungenepithelzellen, zeigte sich, dass die Induktion der antimikrobiellen Abwehrmechanismen durch die Proteasen von *Pseudomonas aeruginosa* erheblich geringer ausfiel. Dieser Befund liefert eine Erklärung für die höhere Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge und für die ungünstige Heilungsprognose von Wundinfektionen durch *Pseudomonas aeruginosa*. Mikrobielle Proteasen sind somit ein bedeutender Faktor für die Erkennung und Abwehr von mikrobiellen Infektionen in der Haut.

7 Abstract

The epithelia of the respiratory tract, the digestive tract and the skin are populated by a variety of microorganisms. Although there are apathogen as well as facultative pathogen bacteria, infections rarely occur. Additional to the function as physical and chemical barrier, human skin, as an organ of the innate immunity system, also offers biochemical barrier functions. Epithelial cells of the skin have the ability to express antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines. The expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines is mediated by receptors, capable to recognize microbial factors. Extracellular proteases from microbial sources are possible factors for the recognition by the cells. Epithelial cells of the skin, like keratinocytes, express protease-activated receptors (PARs). Activation of the PARs leads to intracellular mobilization of the second messenger Ca^{2+} . Based upon the induction of intracellular Ca^{2+} -influx and the stimulation of the mRNA-expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines, it could be demonstrated in this work, that keratinocytes are activated by a variety of microbial proteases. The proteases pseudolysin and protease IV were isolated from cellfree supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* and used for stimulation of Ca^{2+} -influx and the mRNA-expression of antimicrobial peptides and proinflammatory

cytokines in keratinocytes. Pseudolysin induces Ca^{2+} -influx by activating PAR1 and PAR4, while no Ca^{2+} -mobilisation was observed by the activity of protease IV. Nevertheless both proteases induced the mRNA-expression of the proinflammatory cytokines TNF α and IL8. Furthermore the mRNA-expression of the antimicrobial peptide hBD2 was induced by protease IV and the mRNA-expression of the antimicrobial peptides hBD2 and psoriasin was induced by pseudolysin. Stimulations, done with PAR-activating peptides revealed, that only the mRNA-expression of proinflammatory cytokines is induced by PAR1 and PAR2. The mRNA-expression of antimicrobial peptides in keratinocytes was possibly induced indirectly by factors like TNF α . Further investigations showed, that both proteases acting in combination caused a significant higher mRNA-expression of proinflammatory cytokines and antimicrobial peptides as each protease did, when used as a single stimulus. Thus, the differential activation of receptors by single proteases in contrast to proteases acting in combination facilitate a differentiation between the activity of endogen proteases and the activity of proteases from external sources. Comparison studies with cells like fibroblasts and epithelial cells of the respiratory tract recovered, that the stimulation of antimicrobial defence mechanisms by the proteases of *Pseudomonas aeruginosa* was less noticeable here as compared in keratinocytes. These observations could explain, why the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung is much higher than in the skin and why chronic wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* have inauspicious chances for healing. Thus, microbial proteases offer a critical factor for detection and defence of microbial infections of the skin.

8 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
APMSF	p-Amidinophenylmethansulfonyl-Fluorid
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
CTX	Choleratoxin
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	"epidermal growth factor" epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
FCS	"fetal-calf-serum" , fetales Kälberserum
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	„G-protein-coupled-receptor“ G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HaCaT	Immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie
hBD	humanes β -Defensin
HBSS	„Hank's buffered saline solution“
IL8	Interleukin 8
InsP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
KBM	Keratinozyten Basis Medium
kDa	kilo Dalton
MALDI-TOF	"matrix-assisted-laser-desorption/ionisation-time of flight" Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisations Massenspektrometrie

MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
p38	Mitogen aktivierte Proteinkinase
PAMP	"pathogen associated molecular pattern" Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PAR	Protease-aktivierbarer Rezeptor
PAR-AP	Protease-aktivierbarer Rezeptor-aktivierendes-Peptid
PBS	"phosphate buffered saline"
PKA/C	Proteinkinase A/C
PLA, -C, -D	Phospholipase A,C,D
PRR	"pattern-recognition-receptor"
PTX	Pertussistoxin
PyK2	"proline-rich-tyrosine-kinase"
ras	G-Protein-GTPase
raf	Serin/Threonin-Kinase
RGS	Regulatorproteine der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Rosswell-Park-Memorial-Institute-Medium
RT-PCR	"reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction"
SBTI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
sp.	Spezies
SPR	"small-proline-rich-protein"
Src	Tyrosin-Kinase
TGF	"transforming-growth-factor"
TLCK	Tosyl-Leucyl-Chloromthyl-Keton
TLR	"Toll-like-receptor"
TNF	Tumornekrosefaktor
TSB	trypsiniertes Sojabohnenextrakt-Medium

9 Literaturverzeichnis

Ali R.S., Falconer A., Ikram M., Bissett C.E., Cerio R., Quinn A.G. (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* 117: 106-111

Aragay A., Ruiz-Gomez A., Penela P., Sarnago S., Elorza A., Jimenez-Sainz M., Mayor J.F. (1998). G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. *FEBS Lett.* 430: 37-40

Asokanathan N., Graham P.T., Stewart D.J., Bakker A.J., Eidne K.A., Thompson P.J., Stewart G.A. (2002). House Dust Mite Allergens Induce Proinflammatory Cytokines from Respiratory Epithelial Cells: The Cysteine Protease Allergen, Der p 1, Activates Protease-Activated Receptor (PAR)-2 and Inactivates PAR-1. *J. Immunol.* 169, 4572-4578

Belham C.M., Tate R.J., Scott P.H., Pemberton A.D., Miller H.R., Wadsworth R.M., Gould G.W., Plevin, R. (1996). Trypsin stimulates proteinase-activated receptor-2-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinases. *Biochem. J.* 320: 939-946

Blackhart B.D., Emilsson K., Nguyen D., Teng W., Martelli A.J., Nystedt S., Sundelin J., Scarborough R. M. (1996). Ligand Cross-reactivity within the Protease-activated Receptor Family *J. Biol. Chem.* 271: 16466-16471

Boman, H.G. (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* 173: 5-16.

Bohm S.K., Kong W., Bromme D., Smeekens S.P., Anderson D.C., Connolly A., Kahn M., Nelken N.A., Coughlin S.R., Payan D.G., Bunnett N.W. (1996). Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem. J.* 314: 1009-1016

Bohm S.K., McConalogue K., Kong W., Bunnett N.W. (1998). Proteinase-Activated Receptors: New Functions for Old Enzymes. *News Physiol. Sci.* 13: 231-240

Brachmann R., Lindquist P.B., Nagashima M., Kohr W., Lipari T., Napier M., Derynck R. (1989). Transmembrane TGF- α precursors activate EGF/TGF- α receptors. *Cell* 56: 691-700

Bunemann M., Lee K.B., Pals-Rylaarsdam R., Roseberry A.G., Hosey M.M. (1999). Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Ann. Rev. Physiol.* 61: 169-192

Caballero A.R., Moreau J.M., Engel L.S., Marquart M.E., Hill J.M., O'Callaghan R.J. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal. Biochem.* 290: 330-337

Camerer E., Huang W., Coughlin S. R. (2000). Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *PNAS* 97: 5255-5260

- Cao T.T., Mays R.W., von Zastrow M.**(1998). Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 273: 24592-24602
- Chen V.L., France D.S., Martinelli G.P.** (1986). De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells. *J. Invest Dermatol.* 87: 585-587
- Chung W.O., Hansen S.R., Rao D., Dale B. A.**(2004). Protease-Activated Receptor Signaling Increases Epithelial Antimicrobial Peptide Expression. *J. Immunol.* 173: 5165-5170
- Corvera C.U., Dery O., McConalogue K., Bohm S.K., Khitin L.M., Caughey G.H., Payan D.G., Bunnett N.W.** (1997). Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J. Clin. Invest.* 100: 1383-1393
- Corvera C.U., Dery O., McConalogue K., Gamp P., Thoma M., Al-Ani B., Caughey G.H., Hollenberg M.D., Bunnett N.W.** (1999). Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *J. Physiol.* 517: 741-756
- Coughlin S.R.** (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11023-11027
- Cunha B.A.** (2002). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. *Semin. Respir. Infect.* 17: 231-239
- DeFea K.A., Zalevsky J., Thoma M.S., Dery O., Mullins R.D., Bunnett N.W.** (2000). Beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinaseactivated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell. Biol.* 148: 1267-1281
- Döring G., Obernesser H.-J., Botzenhart K.** (1981). Effect of two purified proteases on human immunoglobulins IgG, IgA and secretory IgA. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Reihe A* 249: 89-98
- Döring G., Dalhoff A., Vogel O., Brunner H., Droge U., Botzenhart K.** (1984). In vivo activity of proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model. *J. Infect. Dis.* 149: 532-537
- Dong, J., Opresko L.K., Dempsey P.J., Lauffenburger D.A., Coffey R.J., Wiley H.S.** (1999). Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6235–6240
- Engel L.S., Hill J.M., Caballero A.R., Green L.C. und O'Callaghan R.J.** (1998). Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 273: 16792-16797
- Ferguson S.S., Zhang J., Barak L.S., Caron M.G.** Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. (1998). *Life Sci.* 62: 1561-1565
- Garrington T.P., Johnson, G.L.** (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 211-218
- Gschwind A., Hart S., Fischer O.M., Ullrich A.** (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* 22: 2411–2421

Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder J.M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861

Harder J., Meyer-Hoffert U., Teran L.M., Schwichtenberg L., Bartels J., Maune S., Schroder J.M. (2000). Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 22: 714-721

Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder J.M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276: 5707-5713

Helmreich E.J., Hofmann K.P. (1996). Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer. *Biochem. Biophys. Acta* 1286: 285-322

Higashiyama S., Abraham J.A., Miller J., Fiddes J.C., Klagsbrun M. (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251: 936-939

Hong J.H., Lee S., Kim K., Yong T., Seo J.T., Sohn M.H., Shin D.M. (2004). German cockroach extract activates protease-activated receptor 2 in human airway epithelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 315-319

Hoxie J.A., Ahuja M., Belmonte E., Pizarro S., Parton R., Brass L.F. (1993). Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 13756-13763

Iiri T., Herzmark P., Nakamoto J.M., van Dop C., Bourne H.R. (1994). Rapid GDP release from Gs alpha in patients with gain and loss of endocrine function. *Nature* 371: 164-168

Igishi T., Fukuhara S., Patel V., Katz B.Z., Yamada K.M., Gutkind J.S. (1999). Divergent signaling pathways link focal adhesion kinase to mitogen- activated protein kinase cascades. Evidence for a role of paxillin in c- Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J. Biol. Chem.* 274: 30738-30746

Janeway C.A. Jr., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216

Johnson D.A., Carter-Hamm B., Dralle W.M. (1982). Inactivation of human bronchial mucosal proteinase inhibitor by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126: 1070-1073

Keogh R.J., Houliston R.A., Wheeler-Jones C.P. (2002). Thrombin-stimulated Pyk2 phosphorylation in human endothelium is dependent on intracellular calcium and independent of protein kinase C and Src kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 1001-1008

Kessler E., Safrin M., Abrams W.R., Rosenbloom J., Ohman, D.E. (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J. Biol. Chem.* 272: 9884-9889

Kessler E., Ohman D.E. (2004a). Staphylolysin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn (Barrett,A.J., Rawlings,N.D. & Woessner,J.F. eds), p.401-409, Elsevier, London

Kessler E., Ohman D.E. (2004 b) Staphylolysin. In Handbook of Proteolytic Enzymes, 2 edn (Barrett,A.J., Rawlings,N.D. & Woessner,J.F. eds), p.1001-1003, Elsevier, London

Kong W., McConalogue K., Khitin L.M., Hollenberg M.D., Payan D.G., Bohm S.K., Bunnett N.W. (1997).Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 8884–8889

Lemjabbar H., Li D., Gallup M., Sidhu S., Drori E., Basbaum C. (2003). Tobacco smoke-induced lung cell proliferation mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme and amphiregulin. J. Biol. Chem. 278: 26202–26207

Lourbakos A., Yuan Y., Jenkins A.L., Travis J., Andrade-Gordon P., Santulli R., Potempa J., Pike R.N. (2001a). Activation of protease-activated receptors by gingipains from Porphyromonas gingivalis leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. Blood 97: 3790-3797

Lourbakos A., Potempa J., Travis J., D'Andrea M.R., Andrade-Gordon P., Santulli R., Mackie E. J., Pike R.N. (2001b). Arginine-Specific Protease from Porphyromonas gingivalis Activates Protease-Activated Receptors on Human Oral Epithelial Cells and Induces Interleukin-6 Secretion. Infect. Immun. 69: 5121-5130

Luttrell L.M., Della Rocca G.J., van Biesen T., Luttrell D.K., Lefkowitz R.J. (1997). Gbg subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. J. Biol. Chem. 272: 4637-4644

MacFarlane S.R., Seatter M.J., Kanke T., Hunter G.D., Plevin R. (2001). Proteinase-activated receptors. Pharmacol. Rev. 53: 245–282

McLaughlin J.N., Shen L., Holinstat M., Brooks J.D., DiBenedetto E., Hamm H.E. (2005). Functional Selectivity of G Protein Signaling by Agonist Peptides and Thrombin for the Protease-activated Receptor-1. J. Biol. Chem. 280: 25048-25059

Malapert M., Guizouarn H., Fievet B., Jahns R., Garcia-Romeu F., Motais R., Borgese F. (1997). Regulation of Na⁺/H⁺ antiporter in trout red blood cells. J. Exp. Biol. 200: 353-560

Meij J.T. (1996). Regulation of G protein function: implications for heart disease. Mol. Cell. Biochem. 157: 31-38

Mirza H., Schmidt V.A., Derian C.K., Jesty J., Bahou WF. (1997). Mitogenic Responses Mediated Through the Proteinase-Activated Receptor-2 Are Induced by Expressed Forms of Mast Cell alpha or beta-Tryptases. Blood 90: 3914-3922

Mitchell C.A, Jefferson A.B., Bejcek B.E., Brugge J.S., Deuel T.F., Majerus P.W. (1990). Thrombin-stimulated immunoprecipitation of phosphatidylinositol 3-kinase from human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9396–9400

Molino M., Barnathan R., Numeror R., Clark J., Dreyer M., Cumashi A., Hoxie J., Schechter N., Woolkalis M., Brass L. (1997). Interactions of Mast Cell Tryptase with Thrombin Receptors and PAR-2. J. Biol. Chem. 272: 74043–4049

Morihara K., Tsuzuki H., Oda K. (1979). Protease and elastase of Pseudomonas aeruginosa: inactivation of human plasma a-proteinase inhibitor. Infect. Immun. 24: 188-193

- Neary J.T., Kang Y., Bu Y., Yu E., Akong K., Peters C.M.** (1999). Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J. Neurosci* 19: 4211-4220
- Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J.** (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9208–9212
- Nystedt S., Emilsson K., Larsson A.K., Strombeck B., Sundelin J.** (1995). Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur. J. Biochem.* 232: 84–89
- Oakley R.H., Laporte S.A., Holt J.A., Barak L.S., Caron M.G.** (1999). Association of b-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 274: 32248-32257
- Ossovskaya V.S., Bunnett N.W.** (2004). Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Physiol. Rev.* 84: 579–621
- Prenzel N., Zwick E., Daub H., Leserer M., Abraham R., Wallasch C., Ullrich A.** (1999). EGF receptor transactivation by G-proteincoupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHBEGF. *Nature* 402: 884–888
- Quinton T. M., Kim S., Derian C.K., Jin J., Kunapuli S. P.** (2004). Plasmin-mediated Activation of Platelets Occurs by Cleavage of Protease-activated Receptor 4. *J. Biol. Chem.* 279: 18434-18439
- Rudolph M.G., Weise C., Miroid S., Hillenbrand B., Bader B., Wittinghofer A., Hardt W.D.** (1999) Biochemical analysis of SopE from *Salmonella typhimurium*, a highly efficient guanosine nucleotide exchange factor for RhoGTPases. *J. Biol. Chem.* 274: 30501-30509
- Sabri A., Short J., Guo J., Steinberg S.F.** (2002). Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes. *Circ. Res.* 91: 532–539
- Sambrano G.R., Huang W., Faruqi T., Mahrus S., Craik C., Coughlin S.R.** (1999). Cathepsin G Activates Protease-activated Receptor-4 in Human Platelets. *J. Biol. Chem.* 275: 6819–6823
- Santulli R.J., Derian C.K., Darrow A.L., Tomko K.A., Eckardt A.J., Seiberg M., Scarborough R.M., Andrade-Gordon P.** (1995). Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9151–9155
- Schadow A., Scholz-Pedretti K., Lambeau G., Gelb M.H., Furstenberger G., Pfeilschifter J., Kaszkin, M.** (2001). Characterization of group X phospholipase A(2) as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA. *J. Invest. Dermatol.* 116: 31-39
- Schultz D. R., Miller K.D.** (1974). Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect. Immun.* 10: 128-135

- Selak M. A.** (1994). Cathepsin G and thrombin: evidence for two different platelet receptors. *Biochem. J.* 1994 297: 269-275
- Steven A.C., Steinert, P.M.** (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J. Cell Sci.* 107: 693-700
- Sun G., Stacey M.A., Schmidt M., Mori L., Mattoli S.** (2001). Interaction of Mite Allergens Der P3 and Der P9 with Protease-Activated Receptor-2 Expressed by Lung Epithelial Cells. *J. Immunol.* 167: 1014-1021
- Tang H.B., Dimango E., Brian M.J., Gambello M.J., Iglewski B.J., Goldberg J.B., Prince A.** (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.* 64: 37-43
- Tian J., Karin M.** (1999). Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J. Biol. Chem.* 274: 15173-15180
- Trejo J.** (2003). Protease-Activated Receptors: New Concepts in Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling and Trafficking. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 437-442
- Twining S.S., Kirschner S.E., Mahnke, L.A., Frank, D.W.** (1993). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 2699-2712
- Ubl J.J., Vohringer C., Reiser G.** (1998). Co-existence of two types of [Ca²⁺]_i-inducing protease-activated receptors (PAR-1 and PAR-2) in rat astrocytes and C6 glioma cells. *Neuroscience* 86: 597-609
- Ubl J.J., Grishina Z.V., Sukhomlin T.K., Welte T., Sedehizade F., Reiser G.** (2002). Human bronchial epithelial cells express PAR-2 with different sensitivity to thermolysin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282: L1339-L1348
- Uehara A., Muramoto K., Imamura T., Nakayama T., Potempa J., Travis J., Sugawara S., Takada H.** (2005). Arginine-Specific Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* Stimulate Production of Hepatocyte Growth Factor (Scatter Factor) through Protease-Activated Receptors in Human Gingival Fibroblasts in Culture. *J. Immunol.* 175: 6076-6084
- Walker T.R., Moore S.M., Lawson M.F., Panettieri R.A. Jr., Chilvers E.R.** (1998). Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol. Pharmacol* 54:1007-1015
- Wallach, J.** Aeruginolysin. (2004). In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn (Barrett,A.J., Rawlings,N.D. & Woessner,J.F. eds), p.582-584, Elsevier, London
- 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

Wingens M., van Bergen B.H., Hiemstra P.S., Meis J.F., Vlijmen-Willems I.M., Zeeuwen P.L., Mulder J., Kramps H.A., van Ruissen F., Schalkwijk J. (1998). Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 111: 996-1002

Wong S.T., Winchell L.F., McCune B.K., Earp H.S., Teixido J., Massague J., Herman B., Lee D.C. (1989). The TGF-alpha precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells, leading to signal transduction. *Cell* 56: 495–506

Yu Z., Ahmad S., Schwartz J.L., Banville D., Shen S.H. (1997). Proteintyrosine phosphatase SHP2 is positively linked to proteinase-activated receptor 2-mediated mitogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 7519–7524

Yu H., Boucher J.C., Hibler N.S., Deretic V. (1996). Virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* lacking the extreme- stress sigma factor AlgU (sigmaE). *Infect. Immun.* 64: 2774-2781

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Oliver Wiedow danke ich für die Vergabe des Themas der vorliegenden Arbeit und für seine Anregungen und Ratschläge während der Durchführung.

Herrn Prof. Prof. Dr. Knut J. Heller von der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel und Frau Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit vom Institut für allgemeine Mikrobiologie der CAU Kiel gilt mein besonderer Dank für die Bereiterklärung zur Begutachtung dieser Arbeit.

Die Herstellung der sterilen Rohüberstände wurde von der Labortechnischen Assistentin Fr. Sylvia Voss am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel vorgenommen.

Herrn Dr. Joachim Bartels und Frau Stephanie Neunzig danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Frau Birge Bargmann danke ich für die Unterstützung bei der HPLC.

Ich möchte mich bei allen anderen Mitarbeitern und Kollegen bedanken, die diese Arbeit mit Rat und Tat unterstützt habe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Nadja Linke, die mich während der Zeit ihrer Beschäftigung im SFB in vielerlei Hinsicht entlastet hat.

Erklärung

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

Kiel, den 21.12. 2005

Veröffentlichungen:

Meyer-Hoffert U, Rogalski C, Seifert S, Schmeling G, Wingertzahn J, Proksch E, Wiedow O., „**Trypsin induces epidermal proliferation and inflammation in murine skin.**“
Exp Dermatol. 2004 Apr;13(4):234-41.

Vortrag:

G. Schmeling, L. Schwichtenberg, O. Wiedow „Protease IV from *Pseudomonas aeruginosa* induces human beta-defensin 2 and interleukin 8 in keratinocytes“ **XXXI. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung 6.02. - 28.02.2004 in Dresden.**

Poster & Vortrag:

G. Schmeling, O. Wiedow „***Pseudomonas aeruginosa* Protease IV induces proinflammatory mediators and antibiotic peptides in keratinocytes**“ Symposium des SFB 617 „International Congress on Molecular Mechanisms of Epithelial Defense“ June 11 –13, 2004 Kiel

Vortrag: 27. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen 26. 11. 2004, Forschungszentrum Borstel

Poster:

G. Schmeling, O. Wiedow „Bacterial proteases with Lys-C specificity activate Protease-Activated-Receptor 1 (PAR1) pathway in keratinocytes“ **Poster: XXXII. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung 03.03. - 05.03.2005 in Innsbruck**

Lebenslauf

Name: Schmeling

Vorname: Gero, Martin

Geburtstag und -ort: 21.02.1967 in Schleswig

Staatsangehörigkeit: - deutsch -

Familienstand: Verheiratet mit
Sandra Schmeling, geb. Schulz
Fachkrankenschwester für Psychiatrie

Kinder: Merle (geb. 04.08.2000)
Johanna (geb. 05.11.2001)

Eltern: Marga Schmeling, geb. Lorenzen
Krankenschwester i. R.
Gerhard Schmeling
Techn. Angestellter i. R.

Schulbildung: 1973: Einschulung „Danneverk-Schule“ in Schleswig
1974 – 1977: Grundschule „Schule Nord“ in Schleswig
1977 – 1984 : Realschule „Bruno-Lorenzen-Schule“ in Schleswig
1984 – 1988 : Fachgymnasium wirtschaftlicher Zweig an der Kreisberufsschule in Schleswig

Berufsweg: 1988 – 1989:Praktikum in der Altenpflege:
Altenwohn- und Pflegeheim „Kloster zum hlg. Geist“ in Flensburg
1989 – 1991:Ausbildung zum Krankenpflegehelfer
Fachklinik für Kinder und Jugendpsychiatrie Schleswig
1991 – 2002 Krankenpflegehelfer im Zentrum für Nervenheilkunde des Universitätsklinikums Kiel

Studium: 1993 – 2002 Biologie/Diplom an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
Thema der Diplomarbeit.: **Funktion der NusA- und NusG- Homologa in Archaea**

Promotionsarbeit: 2002 – 2005 an der Dermatologie des Universitätsklinikums Kiel
Thema der Dissertation: **Mikrobielle Proteasen als Induktoren der antimikrobiellen Abwehr der Haut.**

