

***In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur
Bedeutung der β -Defensine 3 und 14 in der
kutanen Erregerabwehr der Maus**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Kerstin Hinrichsen

Dezember 2008

Referent/in:.....

Korreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Summary	3
2. EINLEITUNG	5
3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
4. MATERIAL UND METHODEN	13
4.1 Material	13
4.1.1 Materialien, Chemikalien, Agenzien.....	13
4.1.2 Allgemein verwendete Puffer.....	13
4.1.3 Oligonukleotide.....	13
4.1.4 Mikroorganismen.....	14
4.1.5 Plasmide.....	15
4.1.6 Herstellung von Bakterienüberständen.....	15
4.1.7 Mauslinien.....	16
4.1.7.1 BALB/c-Mäuse.....	16
4.1.7.2 EFAD-SKH-1-Mäuse.....	16
4.2 Methoden	16
4.2.1 Arbeiten an Versuchstieren.....	16
4.2.1.1 Haltungsbedingungen und Züchtung von Labormäusen.....	16
4.2.1.2 Narkotisierung und Sektion der Mäuse.....	17
4.2.1.3 Akute Barrierestörung an BALB/c-Mäusen.....	17
4.2.1.4 Chronische Barrierestörung an SKH-1-Mäusen.....	18
4.2.1.5 Infektion der Haut von BALB/c-Mäusen mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
4.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	18
4.2.2.1 Isolierung und Kultivierung primärer Keratinozyten.....	18
4.2.2.2 Stimulation von primären murinen Keratinozyten.....	19
4.2.2.3 Kollagenbeschichtung von Zellkulturplatten.....	19
4.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	20
4.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
4.2.3.1.1 Amplifikation der zu klonierenden Gene.....	20
4.2.3.1.2 Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR)	21
4.2.3.2 Agarosegelelektrophorese.....	23
4.2.3.3 Restriktionshydrolyse von DNA.....	23
4.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	24
4.2.3.5 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	24

4.2.3.6	Transformation.....	25
4.2.3.7	Langzeitlagerung von Bakterien.....	25
4.2.4	Rekombinante Expression in <i>E. coli</i>	26
4.2.4.1	Struktur von Expressionsvektoren.....	26
4.2.4.2	Rekombinante Expression.....	26
4.2.5	Chromatographische Aufreinigung von Proteinen.....	27
4.2.5.1	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i>	27
4.2.5.2	C ₈ -Umkehrphasen-HPLC.....	27
4.2.5.3	C ₄ -Umkehrphasen-HPLC.....	28
4.2.5.4	Gewinnung von Proteinen der gesunden Maushaut.....	29
4.2.5.5	C ₂ /C ₁₈ -Umkehrphasen-HPLC.....	29
4.2.5.6	Trypsinverdau.....	30
4.2.6	Proteinanalytik.....	30
4.2.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
4.2.6.2	Aufschluss eukaryotischer Zellen.....	31
4.2.6.3	Quantitative Proteinbestimmung.....	31
4.2.6.4	Westernblot.....	32
4.2.6.5	ELISA.....	32
4.2.6.6	Immunhistochemische Färbung.....	33
4.2.6.7	Massenspektrometrie.....	34
4.2.6.7.1	Elektrospray-Inonisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS)	34
4.2.6.7.2	Nanoelektrospray-Inonisierungs-Massenspektrometrie (NS-ESI-MS)	35
4.2.7	Antimikrobielle Aktivität.....	36
4.2.7.1	Mikrodilutionstest.....	36
4.2.8	Generierung eines polyklonalen mBD14-Antikörper aus Ziege.....	36
4.2.8.1	Immunisierung.....	36
4.2.8.2	Aufreinigung des mBD14-Antiserums.....	37
4.2.8.3	Biotinylierung.....	38
4.2.9	Genexpression in Epithelzellen und Organen der Maus.....	38
4.2.9.1	RNA-Isolierung.....	38
4.2.9.2	Reverse Transkription (RT) von RNA.....	39
4.2.9.3	<i>Real time</i> -RT-Polymerase-Kettenreaktion.....	39
 5. ERGEBNISSE.....		 41
5.1 Murines β-Defensin 14.....		41
5.1.1	Charakterisierung des mBD14-Gens.....	41
5.1.1.1	mBD14 besitzt große Homologie zu hBD3.....	41
5.1.1.2	mBD14 hat eine Signalsequenz.....	41
5.1.2	Funktionelle Charakterisierung von mBD14.....	42

5.1.2.1	Rekombinante Expression von mBD14.....	42
5.1.2.2	Antimikrobielle Aktivität von mBD14.....	46
5.1.2.2.1	mBD14 zeigt ein breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität.....	46
5.1.2.2.2	Die antimikrobielle Aktivität von mBD14 ist Salz- und pH-abhängig.....	47
5.1.3	Herstellung polyklonaler mBD14-Antikörper.....	48
5.1.3.1	Etablierung eines mBD14-ELISAs.....	52
5.1.4	Regulation der mBD14-Genexpression.....	53
5.1.4.1	mBD14-mRNA wird in Haut und einigen anderen Geweben exprimiert.....	53
5.1.4.2	<i>In vitro</i> -Induktion von mBD14.....	54
5.1.4.2.1	Induktion von mBD14 durch Bakterienüberstände.....	54
5.1.4.2.2	Induktion von mBD14 durch PMA.....	57
5.1.4.2.3	IFN- γ aber nicht IL1- β & TNF- α induzieren die mBD14- mRNA-Expression in primären Keratinozyten.....	57
5.1.4.2.4	TGF- α induziert die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten.....	58
5.1.4.3	mBD14 wird in gesunder Maushaut exprimiert.....	60
5.1.4.4	<i>In vivo</i> -Induktion von mBD14.....	61
5.1.4.4.1	mBD14 wird durch eine akute Barrierestörung der Maushaut induziert.....	61
5.1.4.4.2	mBD14 wird durch eine chronische Barrierestörung der Maushaut induziert.....	63
5.1.4.4.3	mBD14 wird durch eine Infektion der Maushaut mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> induziert.....	66
5.2	Murines β-Defensin 3.....	67
5.2.1	Regulation der mBD3-Genexpression.....	67
5.2.1.1	mBD3-mRNA wird in Haut und wenigen anderen Geweben exprimiert.....	67
5.2.1.2	<i>In vitro</i> -Induktion von mBD3.....	68
5.2.1.2.1	Induktion von mBD3 durch Bakterienüberstände.....	68
5.2.1.2.2	Induktion von mBD3 durch PMA.....	69
5.2.1.2.3	IFN- γ , IL1- β und TNF- α induzieren die mBD3-mRNA Expression in.....	70
5.2.1.3	mBD3 wird in gesunder Maushaut kaum exprimiert.....	72
5.2.1.4	<i>In vivo</i> -Induktion von mBD3.....	73
5.2.1.4.1	mBD3 wird durch eine akute Barrierestörung der Maushaut induziert.....	73

5.2.1.4.2	mBD3 wird durch eine chronische Barrierestörung der Maushaut induziert.....	75
5.3	Isolierung neuer antimikrobieller Proteine der Maushaut.....	77
5.3.1	Funktionelle Charakterisierung von OBP1a und NPSOBP1b.....	83
5.3.1.1	Rekombinante Expression von OBP1a.....	83
5.3.1.2	Rekombinante Expression von NPSOBP1b.....	86
5.3.1.3	Herstellung polyklonaler OBP1a-Antikörper.....	87
6.	DISKUSSION.....	88
6.1	Antimikrobielle Proteine der Haut.....	88
6.2	Charakterisierung der murinen β -Defensine 3 und 14.....	90
6.2.1	mBD14 ist das Mausortholog zu hBD3.....	90
6.2.2	Regulation von mBD3 und mBD14.....	92
6.2.3	Rekombinantes mBD14 kann in <i>Escherichia coli</i> produziert werden.....	95
6.2.4	mBD14 besitzt eine potente antimikrobielle Aktivität.....	96
6.2.5	mBD14 besitzt eine Rolle in der Wundheilung.....	98
6.3	Wird die Maushaut durch Lipocaline gegen Bakterien geschützt?	101
7.	LITERATUR.....	104
8.	ANHANG.....	121
8.1	Abbildungen und Tabellen.....	121
8.1.1	Abbildungsverzeichnis.....	121
8.1.2	Tabellenverzeichnis.....	123
9.	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	124
9.1	Publikationen.....	124
9.2	Poster.....	124
ABKÜRZUNGEN.....		125
DANKSAGUNG.....		127
LEBENS LAUF.....		128
ERKLÄRUNG.....		129

1. Zusammenfassung

Die Haut ist ständig einer Vielzahl potentiell pathogener Mikroorganismen ausgesetzt. Es kommt jedoch ausgesprochen selten zu Infektionen. Für die natürliche Resistenz der Haut ist neben der physikalischen Barriere auch eine chemische Barriere aus konstitutiv exprimierten und induzierbaren antimikrobiellen Peptiden verantwortlich. Die Proteinfamilie der β -Defensine hat große Bedeutung für den Schutz der Haut gegen eindringende Mikroorganismen. Insbesondere das induzierbare Protein β -Defensin 2 (hBD2) ist wichtig für den Schutz der Epithelien vor Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Das β -Defensin 3 (hBD3) besitzt ein breiteres antimikrobielles Wirkungsspektrum und ist außerordentlich wirksam gegen Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie gegen Gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*. Zudem scheinen beide Moleküle eine Rolle in der Wundheilung zu spielen. Die humanen β -Defensine stehen aufgrund ihrer Bedeutsamkeit im Mittelpunkt vieler Studien, über die murinen β -Defensine ist jedoch verhältnismäßig wenig bekannt. Da Mausmodelle für Analysen der *in vivo* Relevanz antimikrobieller Peptide unbedingt notwendig sind, ist es sehr wichtig die homologen Moleküle zu den humanen β -Defensine zu finden.

Sequenzanalysen ergaben, dass das murine β -Defensin 3 (mBD3) ein strukturelles Ortholog zu hBD2 ist. Funktionelle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass mBD3 ebenfalls ein funktionelles Ortholog zu hBD2 ist, so war es in primären Keratinozyten zum Teil durch die gleichen Zytokine induzierbar.

Das besondere Augenmerk dieser Arbeit lag jedoch in der funktionellen und vergleichenden Charakterisierung von murinem β -Defensin 14 (mBD14), welches sich in Sequenzanalysen zu 69 % identisch mit hBD3 erwiesen hatte. Auch mBD14 war in primären Keratinozyten durch die gleichen Zytokine (IFN γ , IL-1 β , TNF α) und Wachstumsfaktoren (TGF α) wie hBD3 induzierbar. Zudem wurde es *in vivo* durch verschiedene Arten der Barrierestörung induziert. Es ist bekannt, dass hBD3 ebenfalls durch Mikrowunden der Haut induziert werden kann.

Zur funktionellen Charakterisierung von mBD14 wurden große Mengen Protein benötigt. Daher sollte das Protein rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt werden. Eine spezielle Strategie ermöglichte die rekombinante Herstellung. Da mBD14 für das Bakterium toxisch ist, wurde es als nicht-toxisches Fusionsprotein hergestellt.

mBD14 zeigte eine sehr potente, breite antimikrobielle Aktivität, die sowohl in ihrem Wirkspektrum, als auch in den LD₉₀-Werten der Aktivität von mBD3 sehr ähnlich war.

Für weiterführende funktionelle Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit mBD14-spezifische, polyklonale Antikörper generiert, durch die erstmalig eine Analyse der mBD14-Proteinexpression ermöglicht wurde. In immunhistologischen Färbungen und *real time*-PCR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mBD14 bereits von gesunder Maushaut in moderaten Konzentrationen konstitutiv gebildet wird, und dass die Expression durch Störungen der Hautbarriere induziert werden kann. Auch mBD3 zeigte in Barriere-gestörter Haut eine verstärkte Expression.

Die β -Defensine haben eine sehr große Bedeutung dafür, die Epithelien nach Eindringen von Mikroorganismen zu schützen. Für den Schutz gesunder Haut sind andere antimikrobielle Peptide entscheidend. Es ist bekannt, dass das S100-Protein Psoriasin konstitutiv von Keratinozyten gebildet und freigesetzt wird. Man kann es in relativ hohen Konzentrationen auf der Haut nachweisen. Hier verhindert es eine Besiedelung der Haut mit dem Darmbakterium *Escherichia coli*. Sequenzanalysen ergaben, dass es im Genom der Maus kein Gen mit einer großen strukturellen Homologie zu Psoriasin gibt. Da aber auch die Haut von Mäusen vor dem Darmkeim geschützt ist, denn auch hier treten fast nie Infektionen auf, muss es in der Maus zumindest ein funktionelles Homolog zu Psoriasin geben. In Flüssigkeiten von Maushautwaschungen konnten zwei dominierende Proteine nachgewiesen und identifiziert werden. Es handelte sich hierbei um Mitglieder der *odorant-binding* Proteinfamilie. Die *odorant-binding* Proteine sind Strukturverwandte der Lipocaline, welche zum Teil antimikrobiell wirksam sind. Erste antimikrobielle Testungen zeigten eine antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli*. Um weitere funktionelle Untersuchungen und vor allem weitere antimikrobielle Testungen zu ermöglichen, sollten auch diese beiden Proteine rekombinant hergestellt werden.

Der Vergleich der verschiedenen antimikrobiellen Peptide von Mensch und Maus ist für die Nutzung der Maus als Modellorganismus in *in vivo* Versuchen essentiell. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich die murinen β -Defensine 3 und 14 als strukturelle und funktionelle Homologe der humanen β -Defensine 2 und 3. Zudem konnten zwei potentielle Funktionshomologe des humanen Psoriasins gefunden werden. Diese Ergebnisse stellen eine gute Basis dar, *in vivo* Experimente an Mäusen zu ermöglichen und somit die Rolle der antimikrobiellen Peptide besser verstehen zu lernen.

1.1 Summary

Skin is constantly exposed to a variety of potentially pathogenic microorganisms but skin infections rarely occur. Besides the chemical barrier the natural resistance of the skin is due to a chemical barrier of antimicrobial peptides. The protein family of β -Defensins is of great importance for the protection of the skin against invading microorganisms. For the protection of the epithelia against Gram-negative bacteria like *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* β -Defensin 2 (hBD2) is important in particular. β -Defensin 3 (hBD3) has a more broad-spectrum antimicrobial activity. It is extraordinarily efficient against Gram-negative bacteria like *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and against Gram-positive bacteria like *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. In addition to their antimicrobial activity these molecules seem to play a role in wound healing too. Due to their significance human β -Defensins are objects of many studies but relatively little is known about mouse β -Defensins. For the analysis of the *in vivo* relevance of antimicrobial peptides mouse models are essential, therefore it is important to find the homologous peptides of human β -Defensins.

Sequence analyses have shown that mouse β -Defensin 3 (mBD3) is a structural ortholog to hBD2. Functional studies in this work could show, that mBD3 is a functional ortholog to hBD2 too. In stimulation experiments mBD3 expression could be induced by the same cytokines like hBD2.

The focus of this work, however, was on the functional and comparable characterization of mouse β -Defensin 14 (mBD14), whose sequence is to 69 % identical with the sequence of hBD3. In primary keratinocytes mBD14 and hBD3 were inducible by the same cytokines (IFN γ , IL-1 β , TNF α) and growth factors (TGF α). Moreover, mBD14 expression was *in vivo* induced by different grades of barrier disruption. Expression of hBD3 is also known to be induced by micro-wounding of the skin.

For functional characterization big amounts of mBD14 protein were needed. Hence the protein should be produced recombinantly in *Escherichia coli*. A special technique allowed for the recombinant production. As mBD14 is toxic for the bacterium the peptide was generated as an intoxic fusion protein.

mBD14 showed a very potent and broad antimicrobial activity, which was similar to the activity of hBD3 in the spectrum of activity and also in the amounts of LD₉₀.

Specific, polyklonal mBD14 antibodies were generated. These antibodies for the first time offer the possibility to analyze the protein expression of mBD14. Immunohistological staining

demonstrated that mBD14 is produced constitutively in healthy mouse skin in moderate levels and that its expression could be induced by disruption of the skin barrier. It was shown that mBD3 expression was upregulated in barrier-disrupted skin too.

β -Defensins are of great importance for the protection of the epithelia after an invasion of microorganisms. As regards the protection of healthy skin other antimicrobial peptides are crucial. It is known that the S100 protein psoriasin is constitutively expressed and released by human keratinocytes. Relatively high concentrations can be found on the skin. Here it avoids colonization with the gut bacterium *Escherichia coli*. Sequence analysis revealed that there is no gene in the mouse genome with a big structural homology to psoriasin. Since there are only infrequent infections of mouse skin with this gut bacterium, mice must have at least one functional ortholog. In liquid of skin washing of healthy mice two main peptides were found and identified. These proteins belong to the odorant-binding protein family. Odorant-binding proteins are structurally related to lipocalins which are known to possess antimicrobial activity. Initial experiments indicated that the odorant-binding proteins are active against *Escherichia coli* too. For further experiments and for examining the antimicrobial activity in detail these two proteins were also produced in a recombinant way.

The comparison of antimicrobial peptides of man and mouse is of great importance for using the mouse as a model organism *in vivo*. This project was able to show that mBD3 and mBD14 are structural and functional orthologs to hBD2 and 3. Furthermore two potentially functional homologs of human psoriasin in mouse were found. These results represent a good basis for *in vivo* experiments in mice aimed at examining the role of antimicrobial peptides.

2. Einleitung

Menschliche Epithelien werden ständig mit Mikroorganismen konfrontiert. Auch die Haut als große Kontaktfläche des Menschen zu seiner Umwelt ist ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien wie Streptokokken, Staphylokokken und Propionibakterien, ausgesetzt (Hahn et al., 1999). Einige dieser Mikroorganismen sind potentiell pathogen (Hahn et al., 1999) und finden auf der menschlichen Haut zum Teil gute Wachstumsbedingungen wie Wärme, Feuchtigkeit, Mineralien und Nährstoffe. Bei gesunden Menschen treten jedoch nur sehr selten Infektionen durch Mikroorganismen auf, was die Vermutung nahe legt, dass die Haut einen Schutz gegen pathogene Mikroorganismen besitzt (Fitzpatrick et al., 1993). Früher dachte man, dass diese natürliche Abwehr auf die physikalische Barriere der Haut aus Horn- und Lipidschicht, niedrigem pH-Wert (Fischer, 1959) und freien Fettsäuren (Miescher, 1960) zurückzuführen ist. Mit der Zeit stellte sich jedoch heraus, dass für die Abwehr von Mikroorganismen noch weitere Faktoren benötigt werden (Weinberg & Schwartz, 1993).

Es wurde eine Reihe von Effektorzellen zur Abwehr von Infektionen entdeckt. Neutrophile Granulozyten sind Effektorzellen, die der Abwehr von Bakterien und Pilzen dienen. Eosinophile Granulozyten dienen der Parasitenabwehr. Natürliche Killerzellen können virusinfizierte Zellen erkennen. Makrophagen können Pathogene phagozytieren und auf ihrer Oberfläche anderen Zellen präsentieren. Die T- und B-Lymphozyten gehören ebenfalls zu diesen Effektorzellen und sind Teil des adaptiven Immunsystems. Phagozyten, wie neutrophile oder eosinophile Granulozyten, zirkulieren im Blut und werden durch Botenstoffe wie Zytokine in entzündete Epithelien rekrutiert. Das zeigt, dass diese Effektorzellen normalerweise nicht in den Epithelien zu finden sind und daher nicht primär für die natürliche Resistenz der Epithelien gegen fortlaufend drohende Infektionen verantwortlich sein können.

Von großer Bedeutung ist, dass Epithelien wie die menschliche Haut eine chemische Barriere aus epithelialen antimikrobiellen Peptiden besitzen (Boman, 2000). Bereits 1922 wies Alexander Fleming in menschlichem Nasensekret auftretende antimikrobielle Aktivität nach, welche später auf Lysozym zurückgeführt wurde (Fleming, 1922). Zahlreiche Studien der letzten Jahre weisen darauf hin, dass die chemische Barriere von größter Bedeutung für den Erhalt der Integrität von Epithelien ist. Hierbei wird insbesondere den antimikrobiellen Peptiden als phylogenetisch alten Effektormolekülen eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunität zugesprochen (Schröder, 1999).

Antimikrobielle Peptide sind meist kleine, kationische Moleküle, die alle die Eigenschaft besitzen, das Wachstum von Mikroorganismen zu inhibieren. Sie sind ein wichtiger Teil der angeborenen Immunität und können ein breites Spektrum von Bakterien, Pilzen und Viren abtöten. Zudem können diese Moleküle als Chemoattraktoren die Mechanismen der zellulären und adaptiven Immunantwort beeinflussen (Braff et al., 2005). Eine sehr große Rolle spielen antimikrobielle Peptide in der Immunität von wirbellosen Organismen. Diese Tiere besitzen kein adaptives Immunsystem und sind dennoch in der Lage, sich effektiv gegen eine Invasion von Mikroorganismen zu schützen. Hierfür produzieren sie ein breites Spektrum an antimikrobiell wirksamen Substanzen. So produzieren Muscheln zum Beispiel antimikrobielle Peptide, wie Defensine, Mytiline, Myticine und Mytimicine (Mitta et al., 2000). Auch die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* besitzt ein großes Repertoire antimikrobieller und antimykotischer Proteine aus sieben verschiedenen Familien (Attacine, Cecropine, Defensine, Dipericine, Drosocine, Drosomycine und Metchnikowine; Hetru et al., 2003).

Weitere Untersuchungen belegten, dass auch Vertebraten antimikrobielle Peptide besitzen. Bereits 1987 konnte in der Haut von Fröschen das Vorkommen zweier antimikrobieller Peptide, der Magainine, nachgewiesen werden (Zasloff, 1987). In weiteren Untersuchungen wurden viele andere antimikrobielle Peptide in Froschhaut entdeckt, was die Vermutung nahe legt, dass antimikrobielle Proteine in der natürlichen Resistenz der Amphibienhaut eine große Rolle spielen (Barra & Simmaco, 1995).

Eine sehr wichtige Gruppe der antimikrobiellen Proteine sind die **Defensine**, welche zuerst im Jahr 1985 von Tomas Ganz beschrieben wurden (Ganz et al., 1985). Zurzeit gibt es vier Untergruppen: α -Defensine (auch *human neutrophil peptides* = HNPs), β -Defensine, θ -Defensine und Insektendefensine (Ganz & Lehrer, 1995; Lehrer & Ganz, 2002).

α -Defensine wurden zuerst in neutrophilen Granulozyten von Kaninchen und Meerschweinchen entdeckt und danach auch im Menschen (Ganz et al., 1990). Es handelt sich hierbei um sehr kleine (3-4 kDa) Moleküle mit einer charakteristischen Anordnung von sechs intramolekularen Disulfidbrücken (Lehrer et al., 1993). Sie weisen eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien und Pilze auf (Ganz et al., 1985). Man vermutet, dass α -Defensine wie andere antimikrobielle Proteine mit amphiphilem Charakter in der Lage sind, Poren in der Zellmembran von Bakterien zu bilden und die Mikroorganismen auf diese Weise abzutöten (Lehrer, 2004). Der Befund, dass α -Defensine in Darmepithelien der Maus exprimiert werden, war das erste Indiz dafür, dass antimikrobielle Peptide die Epithelien von

Säugern vor Infektionen schützen (Ouellette et al., 1989). Auch die humanen Darmepithelien exprimieren α -Defensine (Jones & Bevins, 1992). Dass Defensine auch die menschliche Haut schützen, wurde mit der Isolierung eines β -Defensins, dem humanen β -Defensin 2, aus Hautschuppen von Psoriasispatienten, sowie durch seine antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien und durch die Stimulation seiner mRNA-Produktion *in vitro* durch Bakterien bewiesen (Harder et al., 1997).

β -Defensine wurden erstmals 1991 mit der Entdeckung des Defensins TAP (Tracheales antimikrobielles Peptid) im Epithel der Rinderluftröhre beschrieben (Diamond et al., 1991). Bei der Strukturuntersuchung fiel auf, dass die sechs Disulfidbrücken anders geknüpft sind als in den bisher bekannten HNPs, wodurch sich eine veränderte Tertiärstruktur ergibt. Mann definierte daher eine neue Defensin-Klasse, die β -Defensine. Nur wenige Jahre später konnte aus Rinderzunge das zweite β -Defensin LAP (Linguales antimikrobielles Peptid) isoliert werden (Schonwetter et al., 1995). Das dritte β -Defensin wurde schließlich in Epithelien des Rinderdarms gefunden (*enteric beta defensin* = EBD; Tarver et al., 1998). Das erste beschriebene humane β -Defensin war das humane β -Defensin 1 (hBD1), welches im Urin nachgewiesen und mittels Blutfiltration extrahiert werden konnte (Bensch et al., 1995; Zucht et al., 1998).

Kurz danach wurde die Isolierung von humanem **β -Defensin 2** (hBD2) aus den Hautschuppen von Psoriasispatienten beschrieben (Harder et al., 1997). hBD2 besitzt eine außerordentlich hohe Wirksamkeit gegen Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, sowie gegen die Hefe *Candida albicans* (Harder et al., 1997; Hiratsuka et al., 1998; Singh et al., 1998). Allerdings vermag es Gram-positive Erreger wie *Staphylococcus aureus* nicht effektiv abzutöten, hier wirkt es lediglich bakteriostatisch (Harder et al., 1997).

Das gemeinsame Strukturmerkmal der **β -Defensine** sind drei immer gleich verknüpfte intramolekulare Disulfidbrücken, welche den Molekülen eine charakteristische Tertiärstruktur geben. Die Verknüpfung erfolgt immer zwischen dem ersten und dem fünften, dem zweiten und dem vierten, sowie dem dritten und dem sechsten Cystein der Peptidkette (Tang & Selsted, 1993). Untersuchungen belegen, dass die korrekte Formierung der Disulfidbrücken nicht notwendig für die antimikrobielle Aktivität der β -Defensine ist (Yang et al., 1999). Allerdings verlieren die β -Defensine ihre chemotaktischen Fähigkeiten, wenn die Disulfidbrücken nicht korrekt oder gar nicht geknüpft sind (Yang et al., 1999). Humane β -Defensine mit korrekter Faltung wirken chemotaktisch auf unreife dendritische Zellen und T-Gedächtnis-Zellen, indem sie direkt den CCR6 (*chemokine C-C motif receptor 6*) binden

und aktivieren (Yang et al., 1999). Auch α -Defensine haben wie β -Defensine chemotaktische Eigenschaften (Territo et al., 1989; Chertov et al., 1996), so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Defensine ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen.

Humanes **β -Defensin 3** (hBD3) wurde erstmalig 2001 beschrieben und analog zu hBD2 aus Psoriasisshautschuppenextrakten isoliert (Harder et al., 2001). Es handelt sich hierbei um ein kleines Peptid mit einer Masse von 5154,59 Da und 45 Aminosäuren (Harder et al., 2001). Die Nettoladung des Peptides ist mit +11 stark positiv, so dass es zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit negativ geladenen Bakterienmembranen kommen kann. Gezeigt wurde dies unter anderem an biophysikalischen Rekonstitutionsmembranen, wo hBD3 die Bildung transienter Läsionen in der Membran verursacht (Böhling et al., 2006). Die Struktur von hBD3 wurde im Jahre 2002 durch NMR-Untersuchungen aufgeklärt (Schibli et al., 2002). Die Expression von hBD3-mRNA wurde auf einem niedrigen Level in vielen Geweben nachgewiesen. Die stärkste Expression ist jedoch in der Haut sowie in den Geweben des Aerodigestivtraktes (hier insbesondere in Tonsillen) und im Uterus gefunden (Harder et al., 2001). Im Gegensatz zu hBD2 besitzt hBD3 eine außerordentlich hohe Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* (Harder et al., 2001; Sahly et al., 2003). Es erwies sich sogar als Breitbandantibiotikum und vermag sowohl Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae*, als auch Gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* abzutöten (Sahly et al., 2003). Auch multiresistente Staphylokokken und Vancomycin-resistente Enterokokken werden von hBD3 bereits in relativ geringen Konzentrationen effektiv abgetötet (Harder et al., 2001; Maisetta et al., 2006). Auch für die antimikrobielle Aktivität von hBD3 ist die korrekte Verbindung der Disulfidbrücken nicht entscheidend, lediglich seine chemotaktischen Eigenschaften sind von den intramolekularen Verknüpfungen abhängig (Yang et al., 1999; Wu et al., 2003). Neuere Untersuchungen widerlegen allerdings diese Ergebnisse, so konnten Taylor et al. zeigen, dass die chemotaktische Aktivität von murinem β -Defensin 14 (mBD14) nicht von der Paarung der Disulfidbrücken, sondern vielmehr von dem schieren Vorhandensein des fünften Cysteins der Polypeptidkette abhängig ist (Taylor et al., 2008).

Mäuse werden bevorzugt als Modellorganismen für die Grundlagenforschung und für die Untersuchung von Krankheiten des Menschen gewählt, weil zwischen den beiden Organismen große Homologien bestehen, und weil Mäuse einfach zu halten sind und relativ kurze Generationszeiten haben. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse für das

Studium des jeweiligen Orthologes der humanen β -Defensine 2 und 3 verwendet. Es gibt einige Unterschiede zwischen Mensch und Maus in Hinblick auf die Expression und die Biologie der Defensine, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Zuerst soll hier erwähnt werden, dass in den Neutrophilen der Maus keine α -Defensine zu finden sind (Eisenhauer & Lehrer, 1992). Man findet diese jedoch im Dünndarm, genauer in den Paneth-Zellen der Krypten, weshalb sie auch als Kryptine bezeichnet werden. Maus-Paneth-Zellen produzieren neben den Kryptinen ein ganzes Repertoire von so genannten *cryptdin related sequence peptides*, die nach Dimerbildung antimikrobiell aktiv werden (Hornef et al., 2004). Dass die α -Defensine eine große Bedeutung in der antimikrobiellen Abwehr spielen wurde eindrucksvoll mit der Generierung von *knock out*-Mäusen gezeigt, welchen das Gen für Matrilysin (*cryptdin processing enzyme*), der Matrix-Metallo-Protease 7, fehlt. Durch das Fehlen von Matrilysin akkumulieren in den Paneth-Zellen der Mäuse die Propeptide, es fehlen jedoch aktive α -Defensine. Bringt man in diese Tiere orale Bakterien ein, überleben wesentlich mehr dieser Bakterien, und sie richten einen größeren Schaden an (Wilson et al., 1999). Mäuse, die genetisch so verändert wurden, dass sie zusätzlich ein humanes α -Defensin (α -Defensin 5) in ihrem Darm exprimieren, waren sehr viel weniger sensibel für orale Infektionen mit *Salmonella typhimurium* (Salzman et al., 2003).

Maus- β -Defensine wurden bis heute nicht isoliert. Die Anzahl der im Genom der Maus gefundenen β -Defensin-Gene übersteigt die des Menschen jedoch bei Weitem (Hughes, 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass murines β -Defensin 1 (mBD1, Ortholog zu hBD1) und murines β -Defensin 3 (mBD3, Ortholog zu hBD2) in einigen Epithelien wie der Luftröhre exprimiert werden und an der Abwehr von eindringenden Mikroorganismen beteiligt sind (Bals et al., 1998; Bals et al., 1999). Im Jahr 2002 wurde eine Maus vorgestellt, in der das mBD1-Gen ausgeschaltet war. Diese Tiere haben eine signifikant größere Anzahl an *Staphylococcus aureus*-Keimen in ihren Harnblasen als ihre Wildtypverwandten (Morrison et al., 2002).

mBD3 ist wahrscheinlich das am besten und am intensivsten untersuchte murine β -Defensin, was nicht verwunderlich ist, da es von allen β -Defensinen mit über 40 % identischen Aminosäuren die größte Homologie zu hBD2 aufweist. Rekombinant oder synthetisch hergestelltes mBD3 besitzt eine salzabhängige antimikrobielle Aktivität gegen *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Bals et al., 1999; Burd et al., 2002). Es wird berichtet, dass eine sehr geringe basale Expression von

mBD3 in einigen Epithelzellen nachgewiesen werden konnte (Bals et al., 1999), was in anderen Studien jedoch nicht bestätigt wurde (Burd et al., 2002). Eigene Untersuchungen zeigten, dass sich die mRNA-Expression in kultivierten Keratinozyten und unstimulierten Hautproben sowie auch die Proteinexpression von mBD3 in gesunder, unstimulierter Maushaut meist an der Nachweisgrenze befand, wenn es überhaupt detektiert werden konnte. mBD3 wirkt wie hBD2 und andere β -Defensine über die Bindung von CCR6 chemotaktisch auf unreife dendritische Zellen (Biragyn et al., 2001). Die Expression von mBD3 kann durch Kontakt mit bakteriellen Zellwandbestandteilen und lebenden Bakterien induziert werden. Bereits 1999 konnte in ersten Infektionsstudien eine Induktion der mBD3-mRNA-Expression nach Einflößung von *Pseudomonas aeruginosa* in die Atemwege von Mäusen beobachtet werden (Bals et al., 1999). Drei Jahre später zeigte eine andere Gruppe in einem *Escherichia coli*-Peridontitis-Modell nach 24 Stunden eine erhöhte mRNA-Expression (Burd et al., 2002). Auch durch eine orale Infektion mit *Candida albicans* (Schofield et al., 2004) und durch eine mykobakterielle Infektion (Rivas-Santiago et al., 2006) konnte eine Stimulation der mBD3-mRNA- bzw. der Protein-Expression hervorgerufen werden. Zudem können bakterielle Lipopeptide die Expression von mBD3-mRNA *in vitro* in Keratinozyten hoch regulieren (Sumikawa et al., 2006). All diese Experimente lassen vermuten, dass mBD3 als induzierbares antimikrobielles Peptid eine große Rolle spielt. Auch zu dem Signalweg, über den eine Induktion von mBD3 stattfindet könnte gibt es erste Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von mBD3 in Keratinozyten *in vitro* mit bakteriellen Lipopeptiden über den TLR2/Myd88-Signalweg läuft. Des Weiteren konnte die gleiche Arbeitsgruppe zeigen, dass Myd88 in Keratinozyten *in vivo* eine wichtige Rolle im Schutz vor *Staphylococcus aureus*-Infektionen spielt (Sumikawa et al., 2006).

Zu Beginn dieser Arbeit war über das murine β -Defensin 14 (mBD14) noch nichts veröffentlicht. Als das Interesse an hBD3 aufgrund seiner Breitband-antibiotischen Wirksamkeit, insbesondere der potenten Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und gegen einige resistente Bakterien immer größer wurde, stieg auch das Interesse das homologe β -Defensin in der Maus zu finden. Eine BLAST-Suche zeigte eine sehr große Homologie für mBD14, 69 % der Aminosäuren des maturen Proteins sind identisch (Hinrichsen et al., 2008). Der hohe Grad der Homologie ist im Vergleich zwischen den humanen und den murinen β -Defensinen einmalig, kein anderes murines β -Defensin besitzt eine derart große Homologie zu seinem humanen Ortholog. Wir konnten zeigen, dass mBD14-mRNA wie hBD3 in vielen Geweben, wie Harnblase, Tonsillen, Thymus, Haut und Zunge exprimiert wird (Hinrichsen et al., 2008). Erst im Verlauf dieser Doktorarbeit wurden zwei Untersuchungen zu mBD14

veröffentlicht. Die erste Gruppe konnte zeigen, dass rekombinantes mBD14 antimikrobiell aktiv gegen *Escherichia coli* ist, nicht jedoch gegen *Staphylococcus aureus* (Röhrl et al., 2008). Die zweite Gruppe zeigte mit synthetischen mBD14 eine sehr potente antimikrobielle Aktivität sowohl gegen *Pseudomonas aeruginosa* als auch gegen *Staphylococcus aureus* (Taylor et al., 2008) im Gegensatz zu den vorangegangenen Ergebnissen von Röhrl und seiner Arbeitsgruppe. Da die Gruppe um Röhrl jedoch ein 37 kDa-großes mBD14-Fusionsprotein für die antimikrobiellen Test eingesetzt hat, sollten die Diskrepanzen zwischen beiden Ergebnissen nicht überbewertet werden. Mit einer Reihe von veränderten mBD14-Peptiden konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* nicht nur unabhängig vom Vorhandensein der drei intramolekularen Disulfidbrücken ist, sondern auch vom Vorhandensein der sechs Cysteine. Ein Peptid, in dem alle Cysteine durch Alanine ersetzt waren, zeigte eine unverändert potente antimikrobielle Aktivität (Taylor et al., 2008). Beide Gruppen zeigten, dass mBD14 chemotaktische Eigenschaften hat. Die Gruppe von Röhrl zeigte, dass mBD14 chemotaktisch auf HEK293-Zellen, die den murinen CCR6 tragen, wirkt (Röhrl et al., 2008). Taylors Gruppe fand zudem heraus, dass die Chemotaxis nicht abhängig von der Verbindung der Disulfidbrücken ist. Sie oxidierten und reduzierten alle sechs Cysteine von mBD14, und das Peptid zeige trotzdem seine chemotaktischen Eigenschaften. Wurden jedoch alle Cysteine durch Alanine ausgetauscht, war die Chemotaxis verschwunden. Durch den Austausch einzelner Cysteine durch Alanine stellten sie fest, dass das Vorhandensein des fünften Cysteins der Polypeptidkette alleine zu einer Rekonstruktion der chemotaktischen Aktivität des Proteins führt (Taylor et al., 2008). Interessanterweise wirkt mBD14 auch chemotaktisch auf frisch isolierte murine residente peritoneale Zellen, die keinen CCR6 tragen. Demnach muss es mindestens einen weiteren Rezeptor geben, der die Chemotaxis von mBD14 vermitteln kann (Röhrl et al., 2008). Man fand heraus, dass die mRNA-Expression von mBD14 *in vitro* in kultivierten *bone marrow derived cells* (BMDCs) durch TLR-Agonisten wie LPS, Poly I:C und CpG induziert werden kann (Röhrl et al., 2008). In einer murinen Lungenzelllinie konnte die selber Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen mBD14 und dem *nucleotide binding oligomerization domain containing* (NOD) 2-Rezeptor nachweisen. Hier zeigte sie mit einem Luziferase-Reporter-Gen-Testsystem, dass mBD14 durch Aktivierung von NOD2 induziert wird (Röhrl et al., 2008).

3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die murinen Orthologe der humanen β -Defensine 2 und 3 - murines β -Defensin 3 und 14 - bezüglich ihrer funktionellen Homologie zu den humanen β -Defensinen zu untersuchen. Hierfür sollte insbesondere die Regulation der Genexpression in primären Keratinozyten untersucht werden. Zudem sollte die Rolle der beiden β -Defensine in der kutanen Abwehr der Maus untersucht werden. In *in vivo* Studien sollte die Stimulierbarkeit der β -Defensine in der Maushaut nach verschiedenen Graden einer Störung der Hautbarriere ermittelt werden, um mögliche Rollen der β -Defensine in der Wundheilung zu untersuchen. Weitere *in vivo* Studien sollten zur Untersuchung der Regulation nach einer bakteriellen Infektion der Haut vorgenommen werden. mBD14 sollte zudem auf antimikrobielle Aktivität untersucht werden und das Wirkungsspektrum von mBD14 als antimikrobielles Protein untersucht und mit dem von hBD3 verglichen werden. Um Einblicke in die Protein-Expression von mBD14 zu erhalten, sollte ein polyklonaler Antikörper hergestellt werden, für den unterschiedliche Proteinexpressionsuntersuchungsmethoden (ELISA, Immunhistochemie, Westernblot) etabliert werden sollten. Da für diese Vorhaben sehr viel Protein zur Verfügung stehen musste, sollte mBD14 rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Materialien, Chemikalien, Agenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Agenzien bei den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Dreieich) erworben. Zellkultur-Zubehör und Plastikwaren wurden bei den Firmen Nunc (Wiesbaden) und Sarstedt (Nümbrecht), Medien und Medienzusätze bei der Firma Cascade Biologics (Portland, USA) bezogen.

4.1.2 Allgemein verwendete Puffer

PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 8,4 mM Na₂HPO₄

PBS-T: PBS mit 0,1 % Tween 20

10 mM Natriumphosphat-Puffer: 3 mM NaH₂PO₄, 7 mM Na₂HPO₄, pH 7,3

Spezielle Puffer werden in der jeweiligen Methodenbeschreibung gesondert aufgeführt.

4.1.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Primersequenz 5' → 3'	RE
<u>rekombinante Expression:</u>		
mBD14 SUMO3.s	TACCGGTCTCCAGGTTTCCTACCAAAAACCCTCCGA	<i>BsaI</i>
mBD14 SUMO3.as	GCGTGGATCCTTACTACTTCTTCTTTTCGGCAGC	<i>BamHI</i>
mBD14 pET-32.s	ACTGAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGTTCC TACCAAAAACCCTCC	<i>BglIII</i>
mBD14 pET-32.as	ATTTGCGGGCGCCTACTTCTTCTTTTCGGCAGC	<i>NotI</i>
OBP1a SUMO3.s	TACCGGTCTCCAGGTGCGATGGAAGGACCATGGA	<i>BsaI</i>
OBP1a SUMO3.as	GCGTGGATCCTTATCATTTCAGGACAGTAATCTGTA	<i>BamHI</i>
NPSOBP1b SUMO3.s	TACCGGTCTCCAGGTCATGATCATCTGAGTTACA AG	<i>BsaI</i>
NPSOBP1b SUMO3.as	GCGTGGATCCTTACTCTGGACAGGTATCTTCATG	<i>BamHI</i>
<u>Sequenzierung und Kolonie-PCR:</u>		
T7 term short	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	-
T7 Terminator	TAATACGACTCACTATAGGG	-

Bezeichnung	Primersequenz 5' → 3'	RE
pJET1.2.f	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	-
pJET1.2.r	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	-
RT-PCR:		
Oligo(dT)	(T) ₁₈	-
real time-RT-PCR:		
mBD1.s	GGTGTGGCATTCTCACAAG	-
mBD1.as	TTTACAATCCATCGCTCGTC	-
mBD3.s	GTCAGATTGGCAGTTGTGGA	-
mBD3.as	GCTAGGGAGCACTTGTTTGC	-
mBD14.s	TCTTGTCTTGGTGCCTGCT	-
mBD14.as	CGACCGCTATTAGAACATCGAC	-
mGAPDH.s	TGTCCTACCCCAATGTGT	-
mGAPDH.as	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	-

Tabelle 4.1: Verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen der für die Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen (RE) sind fett gedruckt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

4.1.4 Mikroorganismen

Stamm	Referenz
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 17759
<i>Burkholderia stabilis</i>	NCTC 13011
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299 VRE
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	ESBL 4 (klinisches Isolat)
<i>Escherichia coli</i> Top10F'	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Novagen, Madison, USA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Va 6201/2000 multiresistent (klinisches Isolat)
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33593 MRSA
<i>Staphylococcus aureus</i>	klinisches Isolat
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12344

Tabelle 4.2: Verwendete Bakterien- und Hefestämme. VRE = Vancomycin-resistente Enterokokken, ESBL = *Extended Spectrum β -Lactamase*, MR = Methicillin-resistent, SA = *Staphylococcus aureus*.

4.1.5 Plasmide

PCR-Produkt	Plasmid	Referenz	Insertgröße [bp]
mBD14	pSUMO3	LifeSensors Inc. (Malvern, USA)	204
mBD14	pET-32a	Novagen (Madison, USA)	204
OBP1a	pSUMO3	LifeSensors Inc. (Malvern, USA)	444
NPSOBP1b	pSUMO3	LifeSensors Inc. (Malvern, USA)	456

Tabelle 4.3: Verwendete PCR-Produkte und deren Zielplasmide. Die für die Generierung der PCR-Produkte eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. bp = Basenpaare.

4.1.6 Herstellung von Bakterienüberständen

Für die Herstellung von Bakterienüberständen wurden Kulturen der Bakterien zu je 8 mL hergestellt und über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden für eine Vorkultur 8 mL TSB (*tryptic soy broth*)-Medium mit 80 μ L aus der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm so lange geschüttelt, bis sich bei 600 nm eine optische Dichte (OD_{600}) von etwa 1 eingestellt hatte. Danach wurden 3,6 mL EpiLife-Medium (Cascade Biologics, Portland, USA) ohne antibiotische Zusätze in einer Petrischale mit 400 μ L aus der Vorkultur angeimpft und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 8000 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert, durch einen 0,45 μ M Sterilfilter (Filtropur S 0,45, Sarstedt, Nürnbrecht) gegeben und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert. Als Kontrolle wurden 3,6 mL EpiLife-Medium mit 400 μ L TSB-Medium ohne Bakterien für die gleiche Zeit inkubiert und auch weiter wie die Bakterienprobe behandelt.

4.1.7 Mauslinien

4.1.7.1 BALB/c-Mäuse

Bei BALB/c-Mäusen (Charles River, Sulzfeld) handelt es sich um einen Inzuchtstamm mit Albinismus. Die Mäuse haben eine weiße Fellfarbe durch unpigmentierte Haare und rote Augen.

4.1.7.2 EFAD-SKH-1-Mäuse

Der SKH-1-Mausstamm (Nomenklatur: Crl:SKH1-Hr^{hr}) wurde ursprünglich vom Temple Universitätskrankenhaus in Philadelphia von einem kommerziellen Tierverkäufer in New York erworben und wurde weitergezüchtet. Die SKH-1-Mäuse gehen auf einen nicht charakterisierten und nicht reinrassigen Mäusestamm zurück. Seit 1986 ist dieser Stamm käuflich bei Charles River (Sulzfeld) erhältlich. Die Mäuse sind immunkompetent. Haarlosigkeit und die Rückführbarkeit auf einen Albinohintergrund gelten als spezielle Merkmale. Für Dermatologen sind SKH-1-Mäuse als Versuchstiere besonders geeignet, da die vor Hautversuchen anstehende Rasur und somit auch Hautirritationen durch diese bei diesen Tieren entfällt.

Bei strikter Fütterung von SKH-1-Mäusen mit einer von essentiellen Fettsäuren freien Diät (*essential fatty acid free diet* = EFAD) entwickeln diese Tiere eine chronische Störung der Hautbarriere (Feingold et al., 1986).

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten an Versuchstieren

4.2.1.1 Haltungsbedingungen und Züchtung von Labormäusen

Die Mäuse wurden einzeln oder in Gruppen von bis zu sechs Tieren auf Kleintierstreu in transparenten Polycarbonatkäfigen (ca. 40 x 20 x 15) mit einer Drahtabdeckung aus rostfreiem Edelstahl gehalten. Als Versteckmöglichkeit, zum Nestbau und zur Beschäftigung dienten grober Zellstoff und Papprollen. Während der Versuchphasen wurde die Einstreu gegen Zellstoff ausgetauscht, um Verunreinigungen des Verbandsmaterials zu vermeiden. Die

Tiere erhielten konventionelles Nagerfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Leitungswasser *ad libitum*, die Temperatur wurde möglichst konstant bei 22 °C gehalten. Die Beleuchtungsdauer betrug über das ganze Jahr 12 Stunden.

Die durchgeführten Versuche wurden durch den Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holsteins genehmigt.

4.2.1.2 Narkotisierung und Sektion der Mäuse

Zur Rasur und Versuchsdurchführung wurden die Mäuse mit einer Inhalationsnarkose narkotisiert und für die Dauer der Behandlungen in Narkose gehalten. Die Abdeckung der in den Infektionsversuchen behandelten Areale erfolgte durch Metallplättchen (Finn Chamber 8 mm, SmartPractice Finland Oy, Tuusula, Finnland) sowie semiokklusiven Folien (Comfeel-Plus, Coloplast, Hamburg) und selbstklebendem, medizinischen Pflaster (Durapore, 3M, USA) zur Fixierung. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Genickbruch unter Diethylethernarkose. Organe und Gewebe wurden direkt im Anschluss an die Tötung entnommen, augenblicklich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 80 °C gelagert.

4.2.1.3 Akute Barrierestörung an BALB/c-Mäusen

Die akute Störung der Hautbarriere wurde durch wiederholtes *tape stripping* der Maushaut mit transparentem Klebeband (TesaFilm, tesa AG, Hamburg) erreicht, wodurch Zellen des *Stratum corneums* entfernt wurden (Jensen et al., 1999). Hierfür wurden männliche BALB/c-Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen etwa 24 Stunden vor Versuchsbeginn rasiert (siehe 4.2.5.4) und im Anschluss eine Flanke so lange mit Bekleben und Abziehen (*tape stripping*) von transparentem Klebeband behandelt, bis sich ein 20- bis 30-fach-erhöhter transepidermaler Wasserverlust (*transepidermal water loss* = TEWL) eingestellt hatte. Der TEWL wurde mit einem Gerät (Tewameter TM210) der Firma Courage & Khazaka (Köln) bestimmt. Die unbehandelte Flanke diente als Kontrolle. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Tiere getötet, die Haut aus dem behandeltem Areal und aus dem Kontrollareal entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung und Untersuchung bei – 80 °C gelagert.

4.2.1.4 Chronische Barrierestörung an SKH-1-Mäusen

Für die Untersuchung der Expression von β -Defensinen in Maushaut mit einer chronischen Störung der Hautbarriere wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Meingassner vom Novartis Forschungsinstitut (Wien, Schweiz) Hautproben von EFAD-Mäusen zur Verfügung gestellt.

4.2.1.5 Infektion der Haut von BALB/c-Mäusen mit *Pseudomonas aeruginosa*

Für die Infektion der BALB/c-Haut wurden die Flanken der Tiere am Tag vor dem Beginn des Versuches rasiert. Es wurde eine Schüttelkultur von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in LB-Medium angesetzt und bei 200 rpm und 37 °C inkubiert, bis sich bei 600 nm eine optische Dichte von 0,2 eingestellt hatte. In dieser Kultur wurde die Keimzahl bestimmt, indem serielle Verdünnungen in LB-Medium hergestellt und auf LB-Agarplatten ausplattiert wurden. Die Konzentration betrug bei einer OD₆₀₀ von 0,2 etwa 2×10^7 koloniebildende Einheiten/mL. Aus dieser logarithmisch wachsenden Kultur wurden direkt 10 μ L auf die rasierte Mausflanke aufgetragen. Nach kurzer Einwirkzeit wurde das Areal mit einem Metallplättchen (Finn Chamber 8 mm, SmartPractice Finland Oy, Tuusula, Finnland), sowie semiokklusiven Folien (Comfeel-Plus, Coloplast, Hamburg) und selbstklebendem medizinischen Pflaster (Durapore, 3M, USA) zur Fixierung abgedeckt. Ein Kontrollareal wurde mit der gleichen Menge sterilem LB-Medium behandelt und ebenfalls auf dieselbe Weise abgedeckt. Nach sechs Stunden wurde die Maus getötet und die Haut des mit Bakterien behandelten Areals sowie die Haut des Kontrollareals entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung und Untersuchung bei – 80 °C gelagert.

4.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

4.2.2.1 Isolierung und Kultivierung primärer muriner Keratinozyten

Murine Keratinozyten wurden aus der Haut neugeborener (Alter 1 bis 2 Tage) BALB/c-Mäuse gewonnen. Hierfür wurde die Haut der Tiere nach Abtrennen von Extremitäten, Kopf und Schwanz abgezogen und von Fett- und Bindegewebe befreit. Zur Trennung von Epidermis und Dermis wurde die Haut bei Raumtemperatur für drei Stunden in Dispase II (Dispase II, Roche Diagnostics, Schweiz, 1:5 in Kulturmedium) inkubiert. Nach Abziehen der Epidermis wurde diese sorgfältig mit einem Skalpell zerkleinert und in einer 0,25 %

Trypsin/0,1 % EDTA-Lösung (GIBCO, Eggenstein) für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde unter Verwendung des Stempels einer 10 mL-Einwegspritze durch ein 40 µm-Zellsieb (BD Bioscience, Bedford, USA) gerieben und zum Abstoppen der Reaktion direkt in 1 mL einer 1 mg/mL Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor-Typ I-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gegeben. Nach einer Pelletierung der Zellen bei 1500 g bei 4 °C für fünf Minuten wurden diese in vorgewärmten EpiLife-Medium (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, Cascade Biologics, Portland, USA) resuspendiert und direkt in kollagenisierten 6-Lochplatten (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Es wurde alle zwei Tage ein Austausch des Kulturmediums vorgenommen.

4.2.2.2 Stimulation von primären murinen Keratinozyten

Für alle Stimulationsexperimente wurden primäre murine Keratinozyten in 6-Lochplatten verwendet. Die Stimulation erfolgte bei ca. 90 % Zellkonfluenz. Hierfür wurde der jeweilige Stimulus in der gewünschten Konzentration in EpiLife-Medium zu den Zellen gegeben. Unmittelbar nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Als Stimuli kamen Überstände von Bakterienkulturen, verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen sowie der Phorbol ester Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA, 40 ng/mL) zum Einsatz. Im Ergebnisteil werden Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.2.2.3 Kollagenbeschichtung von Zellkulturplatten

Keratinozyten produzieren Adhäsionsproteine, welche sie *in vivo* mit Strukturen der extrazellulären Matrix, mit benachbarten Keratinozyten und mit der Basalmembran verbinden. Um den Keratinozyten *in vitro* ihre natürliche Wachstumsform zu ermöglichen, wurden Zellkulturschalen vor der Aussaat mit Kollagen ausgekleidet. Kollagen ist ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Basalmembran und bietet Verankerungspunkte für die Adhäsionsproteine der Keratinozyten. So wird *in vitro* ein optimales adhärentes Wachstum möglich.

Zur Beschichtung wurde Rinderkollagen Typ I (BD Bioscience, Bedford, USA) mit 0,1 M Salzsäure verdünnt (1:100) und in die Löcher der Zellkulturplatten gegeben. Nach einer

einstündigen Inkubation bei 37 °C und zweimaligem Waschen mit PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) wurden die Platten direkt für die Aussaat von frisch isolierten Keratinozyten verwendet oder konnten bis zur Verwendung für längere Zeit trocken gelagert werden.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR, Mullins et al., 1986) stellt die enzymatische Vermehrung eines definierten DNA-Abschnitts *in vitro* dar, der zwischen zwei flankierenden DNA-Sequenzen liegt. Lediglich die Sequenzen dieser flankierenden DNA-Abschnitte müssen bekannt sein, damit Oligonukleotide synthetisiert werden können, welche sich an die entsprechenden Sequenzen anlagern können. Zur Amplifikation der Ziel-DNA werden zwei kurze Oligonukleotidprimer eingesetzt, welche sich gegenläufig an antiparallele DNA-Stränge anlagern. Neben den Primern, die im Überschuss zugegeben werden, werden außerdem Desoxynukleosid-5'-triphosphate (dNTPs) und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt. Die PCR wurde für die Amplifikation der zu klonierenden Gene, sowie zur Überprüfung von Plasmiden auf ein insertiertes PCR-Produkt verwendet. Die Reaktionen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 20 oder 50 µL in einem Thermocycler (PTC-200 Thermal Cycler, MJ Research, San Francisco, USA) durchgeführt. Die PCR beinhaltet drei Phasen: Denaturierung, Primeranlagerung und Kettenverlängerung. Primeranlagerungstemperatur und Kettenverlängerungszeit wurden in Abhängigkeit von den vom Hersteller angegebenen Schmelzpunkten (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) und der Länge der zu erwartenden Produkte variiert. Zur Optimierung der Primeranlagerungs-temperatur wurde, wenn nötig, eine Gradienten-PCR (Mastercycler ep Gradient, Eppendorf, Hamburg) zur gleichzeitigen Testung verschiedenen Temperaturen vorgenommen. Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

4.2.3.1.1 Amplifikation der zu klonierenden Gene

Für die Amplifikation von Genen für deren Klonierung in Expressionsvektoren kam die *Pfu*-DNA-Polymerase (PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla, USA) zum Einsatz. Diese stammt aus *Pyrococcus furiosus* und hat im Gegensatz zur *Taq*-DNA-

Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* eine 3' → 5'-Exonuklease-aktivität. Diese ermöglicht ein „Korrekturlesen“ (= *proof reading activity*) der eingefügten Nukleotide und bei falscher Paarung ein Entfernen dieser. Die Genauigkeit der DNA-Synthese wird somit erhöht (Kunkel, 1992). Das Reaktionsvolumen der *Pfu*-PCRs betrug jeweils 50 µL und setzte sich folgendermaßen zusammen:

5,0	µL	10 x cloned <i>Pfu</i> reaction Buffer
1,5	µL	dNTPs (10 mM)
1,0	µL	genspezifischer Vorwärtsprimer (10 µM)
1,0	µL	genspezifischer Rückwärtsprimer (10 µM)
5,0	µL	cDNA
35,0	µL	H ₂ O
1,5	µL	<i>Pfu</i> -Polymerase

Für die PCR-Reaktionen wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

95 °C	5 min	
<hr/>		
94 °C	30 s	
xx °C	30 s	30-35 x
<hr/>		
72 °C	1-3 min	
72 °C	10 min	
4 °C	≥ 5 min	

4.2.3.1.2 Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR)

Einige aus der Transformation (siehe 4.2.3.6) hervorgegangenen Bakterienkolonien wurden ausgewählt, um die enthaltenen Plasmide auf insertierte PCR-Produkte mit korrekter Länge zu überprüfen. Da man hierfür nicht zuvor die Plasmid-DNA aus den Bakterien isolieren muss, sondern eine kleine Menge einer Kolonie direkt von der Agarplatte in den PCR-Ansatz gibt, wird diese Methode auch Kolonie-PCR genannt. Durch Verwendung eines Vektorprimers in Vorwärts- bzw. Rückwärts-Richtung und eines genspezifischen Primers in Rückwärts- bzw. Vorwärts-Richtung kommt es nur beim Vorhandensein der chimären Gensequenz in korrekter Orientierung zur Amplifikation eines Fragmentes. In der elektrophoretischen Auftrennung (siehe 4.2.3.2.) zeigen sich positive Klone mit Fragmenten

aus der Summe des gewünschten PCR-Produktes und der Größe der vom Vektorprimer eingeschlossenen Vektorsequenz auf. Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die zur Selektion verwendeten Primer.

Für die Kolonie-PCR kommt die Polymerase I aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) zum Einsatz. Auch dieses Enzym ist hitzebeständig und ermöglicht ein Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94 °C, wodurch DNA denaturiert werden kann. Ihm fehlt zwar die 3'→5'-Exonukleaseaktivität, es arbeitet jedoch schneller als die *Pfu*-Polymerase.

Das Reaktionsvolumen der Kolonie-PCRs betrug jeweils 20 µL und setzte sich folgendermaßen zusammen:

2,0	µL	10 x PCR Gold Buffer
1,6	µL	MgCl ₂ -Lösung (25 mM)
0,4	µL	dNTPs (10 mM)
0,4	µL	vektorspezifischer Vorwärtsprimer bzw. Rückwärtsprimer (10 µM)
0,4	µL	genspezifischer Rückwärtsprimer bzw. Vorwärtsprimer (10 µM)
15,1	µL	H ₂ O
0,1	µL	<i>Taq</i> -Polymerase (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Foster City, USA)

Für die Kolonie-PCR-Reaktionen wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

95 °C	9 min	
<hr/>		
94 °C	1 min	
xx °C	30 s	30 x
<hr/>		
72 °C	1 min	
72 °C	3 min	
4 °C	≥ 5 min	

4.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Mittels der Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Die Auftrennung erfolgte in 1-2 %igen (w/v) Agarosegelen. Die jeweilige Menge Agarose wurde durch Aufkochen mit TAE-Puffer gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C mit Ethidiumbromid (10 mg/mL) versetzt (Endkonzentration: 0,5 µg/mL) und in eine horizontale Gießvorrichtung (Horizon 11 · 40, Life Technologies, Karlsruhe) gegossen. Die Konzentration der Gele betrug 2 % Agarose, lediglich für Produkte, die größer als 250 Basen waren, wurden 1 %ige Gele eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit DNA-Auftragungspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte für 45 bis 90 Minuten bei 100 V (ca. 60 mA) in TAE-Puffer. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in die DNA interkaliert und bei 266 nm detektiert werden kann. Die Gele wurden mit einer BioDoc-Fotodokumentationsanlage (Biometra, Göttingen) digital dokumentiert und wenn notwendig aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll.

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA)

DNA-Auftragungspuffer: 0,1 M EDTA, 50 % Glycerin (v/v), 1 % Bromphenolblau (w/v), 1 % Xylencyanol (w/v), 0,1 % SDS (w/v)

4.2.3.3 Restriktionshydrolyse von DNA

Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt) wurden verwendet um DNA sequenzabhängig zu hydrolysieren. Die Spaltprodukte wurden in der Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht, analysiert und gegebenenfalls ausgeschnitten. Nach der Extraktion aus dem Gel wurden sie direkt für Ligationen (siehe 4.2.3.4) eingesetzt. Als Parameter für die Spaltungen wurden die Herstellerangaben eingehalten und die mitgelieferten Puffer eingesetzt.

4.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet. Dieses Enzym bildet Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxy-Enden des Vektors und den 5'-Phosphatenden. Alle Ligationen erfolgten in einem Volumen von 10 µL. Vektor und Insert wurden im Verhältnis 1:3 eingesetzt, es wurde jeweils 1 U der T4-DNA-Ligase zugesetzt. Die Berechnung des Verhältnisses erfolgte unter Einbeziehung der Größen von Vektor und Insert. Die Inkubation erfolgte für acht Stunden bei 16 °C oder für eine Stunde bei 25 °C. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz bereitet, der lediglich Vektor-DNA enthielt, um die Effizienz der Ligation abschätzen zu können (Religation). Die Ligationsansätze wurden direkt zur Transformation eingesetzt.

4.2.3.5 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien

Für die Transformation wurden die *E. coli*-Stämme Top10F' (Invitrogen, Groningen, Niederlande) und BL21(DE3)pLysS (Novagen, Madison, USA) verwendet. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1000 g und 4 °C. Es wurden 5 mL LB-Medium (für BL21(DE3)pLysS mit Zusatz von 34 µg/mL Chloramphenicol) mit 50 µL einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und ca. 250 rpm inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurde 1 µL in 60 mL LB-Medium (für BL21(DE3)pLysS mit Zusatz von 34 µg/mL Chloramphenicol) überführt und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis sich eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 eingestellt hatte. Die Zellen wurden 20 Minuten auf Eis gestellt, 15 Minuten pelletiert, anschließend in 30 mL eiskaltem TBS resuspendiert und erneut 10 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 30 mL eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, 20 Minuten auf Eis gestellt und ein letztes Mal für 10 Minuten pelletiert. Nach Resuspendierung in 3 mL CaCl₂-Lösung, und einstündiger Inkubation auf Eis und Zugabe von 750 µL Glycerin wurden die transformationskompetenten Zellen in Portionen von 50 µL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

LB-Medium: 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4 mit NaOH

TBS: 0,1 M NaCl, 5 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 7,0 mit HCl

CaCl₂: 0,1 M CaCl₂, 5 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 7,0 mit HCl

4.2.3.6 Transformation

Transformationen von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen erfolgten in Anlehnung an das Protokoll von Tang und Mitarbeitern (Tang et al., 1994). Es wurde 1 µL Ligationsansatz oder Plasmid-DNA aus einer Plasmid-Minipräparation (NucleoSpin Plasmid QuickPure, Macherey-Nagel, Düren) mit 9 µL H₂O vermischt und zu 50 µL der auf Eis stehenden kompetenten Bakteriensuspension (Top10F', Invitrogen, Groningen, Niederlande bzw. BL21(DE3)pLysS, Novagen, Madison, USA) gegeben, vermischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad folgte eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde 500 µL LB-Medium zugesetzt und die Bakterien für 90 Minuten bei 37 °C im Schüttelinkubator (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg) bei 600 rpm inkubiert. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden jeweils 100 µL und 300 µL der Bakteriensuspensionen auf LB-Agarplatten mit dem für das jeweilig eingesetzte Plasmid selektiven Antibiotikum (50 µg/mL Carbenicillin, 34 µg/mL Chloramphenicol, 15 µg/mL Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienklone wurden über eine Kolonie-PCR (siehe 4.2.3.1.2) auf das korrekte Plasmid geprüft. Für das Plasmid positive Klone wurden in 3 mL LB-Medium mit Zusatz der entsprechenden Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C bei ca. 200 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden direkt zur analytischen Plasmidisolierung (NucleoSpin Plasmid QuickPure, Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt, welche nach Herstellerangaben vorgenommen wurde.

4.2.3.7 Langzeitlagerung von Bakterien

Die Langzeitlagerung von Bakterienkulturen erfolgte in Glycerin bei – 80 °C. Hierfür wurden 800 µL Bakteriensuspensionen aus frischen Übernachtskulturen zu 200 µL Glycerin gegeben, gründlich durchmischt und sofort auf Eis gestellt. Es erfolgte eine schnelle Überführung auf – 80 °C.

4.2.4 Rekombinante Expression in *E. coli*

4.2.4.1 Struktur der Expressionsvektoren

Für die Expression von mBD14 kam der Vektor pET-32a (Novagen, Madison, USA) zum Einsatz, für die Expression von OBP1a und NPSOBP1b wurde der Vektor pSUMO3 (LifeSensors Inc., Malvern, USA) verwendet. Beide Vektoren ermöglichen die Herstellung eines rekombinanten Fusionsproteins, welches N-terminal einen sogenannten „His-Tag“ trägt. Dieser besteht aus sechs aufeinander folgenden Histidinen, welche durch ihre hohe Affinität zu Nickel die Aufreinigung der Fusionsproteine über Nickel-Affinitätssäulen ermöglichen. Der Fusionsabschnitt des Fusionsprotein kann mittels der Enterokinase (pET-32a) bzw. der SUMO-Protease 2 (pSUMO3) abgespalten werden.

Die für die Klonierung in die Expressionsvektoren verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die Primer amplifizieren die für die nativen Proteine codierenden Genabschnitte. Für die Klonierung in den Vektor pET-32a beinhalten die Primer zusätzlich Sequenzen für Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *BglII* und *NotI*, sowie die Erkennungssequenz für die Enterokinase. Die Primer für die Klonierung in den Vektor pET-32a enthalten Sequenzen für Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *BsaI* und *BamHI*. Für die PCRs mit den genspezifischen Primern wurde murine cDNA verwendet.

Nach erfolgreicher Klonierung wurde die Plasmid-DNA zur Kontrolle der korrekten Basenabfolge und des korrekten Leserasters sequenziert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

4.2.4.2 Rekombinante Expression

Die Expression aller Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Dieser Stamm trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors. Sowohl im Expressionsvektor pET-32a, als auch in pSUMO3 stehen die klonierten Gene unter Kontrolle der T7-Transkription (Studier & Moffat, 1986; Studier et al., 1990). In beiden Vektoren wird die Transkription der klonierten Gene durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) induziert.

Für die Expression wurden 10 mL LB-Medium mit Zusatz der jeweiligen Antibiotika (pET-32a: 50 μ g/mL Carbenicillin, 34 μ g/mL Chloramphenicol; pSUMO3: 15 μ g/mL Kanamycin, 34 μ g/mL Chloramphenicol) direkt aus der Glycerinkultur der entsprechenden Klone angeimpft und über Nacht bei 37 °C und ca. 200 rpm inkubiert. Aus der Übernachtskultur

wurden 250 mL LB-Medium inklusive Antibiotika auf eine OD₆₀₀ von 0,02 angeimpft und bei 37 °C und ca. 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Dann erfolgte die Induzierung der Genexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Nach weiterer dreistündiger Inkubation wurden die Zellen bei 3000 g für drei Minuten zentrifugiert. Bis zur weiteren Aufreinigung wurden die Pellets bei – 20 °C gelagert.

4.2.5 Chromatographische Aufreinigung von Proteinen

4.2.5.1 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli*

Das Pellet aus der Proteinexpression wurde in 2,5 mL LEW-Puffer (Protino Ni Resin, Macherey-Nagel, Düren) resuspendiert und die Zellen mit Ultraschall lysiert (8 x 10 Impulse mit 60 % Leistung; Sonoplus GM70, Bandelin Elektronik, Berlin). Das Lysat wurde für 30 Minuten bei 15500 g und 4 °C pelletiert, der Überstand durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µM (Sarstedt, Nürnberg) gegeben und über eine Nickelaffinitätssäule (Protino Ni Resin, Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

In der proteinhaltigen Lösung wurde mit 5 % Trifluoressigsäure ein pH-Wert von 2 bis 3 eingestellt, die Lösung erneut über einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µM (Sarstedt, Nürnberg) gegeben und zur Trennung der Proteine über eine C₈-Umkehrphasen-HPLC (siehe 4.2.5.2) gegeben.

4.2.5.2 C₈-Umkehrphasen-HPLC

Die aus der Nickelaffinitätssäule erhaltenen His-Tag-Fusionsproteine wurden in einer C₈-Umkehrphasen-HPLC weiter aufgereinigt. Es wurde eine präparative Nucleosil 300-7 C₈-Säule (Macherey-Nagel, Düren) und eine HPLC-Anlage mit UV/VIS-Detektor (LC-10AT VP; SPD-10A VP, Shimadzu, Duisburg) verwendet. Die Proteine wurden über die Absorption ihrer Peptidbindungen bei 215 nm detektiert und manuell fraktioniert. Zur Trennung wurde ein Gradient von Puffer A zu Puffer B durchlaufen. Die Flussrate betrug 3 mL/min. Nach Äquilibration der Säule mit 10 % Puffer B und weiteren fünf Minuten 10 % Puffer B nach Probenauftragung folgte ein linearer Gradient zu 60 % Puffer B in 25 Minuten und zu 100 % Puffer B in fünf Minuten. Es folgten fünf Minuten 100 % Puffer B zum Lösen

der am stärksten an die Säule gebundenen Proteine. Bis zur weiteren Analyse wurden die Fraktionen bei -20 °C gelagert.

Puffer A: 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in H_2O

Puffer B: 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in 100 % Acetonitril

Die resultierenden Proteinfractionen wurden über SDS-PAGE (siehe 4.2.6.1) und über Massenspektrometrie-Analyse (siehe 4.2.6.7.1) auf das Vorhandensein der rekombinanten Fusionsproteine überprüft. Fraktionen korrekter Größe wurden anschließend lyophilisiert (Alpha 2-4 LSC, Christ, Osterode am Harz) und die N-terminalen Fusionsteile abgespalten.

Für die Proteolyse des mBD14-Fusionsproteins im pET-32a-System wurde 1 mg Fusionsprotein in 1 mL EK_{Max} -Puffer gelöst, 1 u einer Endoproteinase (Enterokinase, Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C im Inkubator verdaut. Es folgte ein sofortiges Stoppen der Reaktion durch die Zugabe 5 %iger Trifluoressigsäure und einer pH-Wert-Einstellung auf 2-3. Nachdem die Lösung über einen Sterilfilter (Sarstedt, Nümbrecht) mit einer Porengröße von $0,45\text{ }\mu\text{M}$ filtriert wurde, erfolgte eine weitere Aufreinigung mit einer C_4 -Umkehrphasen-HPLC.

Für die Proteolyse der pSUMO3-Fusionsproteine wurde 1 mg Fusionsprotein in 5 mL PBS mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) gelöst und 20 u SUMO-Protease 2 (LifeSensors, Malvern, USA) zugegeben. Der Verdau erfolgte bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln für drei Wochen und einer weiteren vierwöchigen Lagerung bei 4 °C . Anschließend wurde die Probe wie oben beschrieben für die C_4 -Umkehrphasen-HPLC vorbereitet.

EK_{Max} -Puffer: 500 mM Tris, 10 mM CaCl_2 , pH 8,0 mit HCl

4.2.5.3 C_4 -Umkehrphasen-HPLC

Die Aufreinigung der verdauten Fusionsproteine erfolgte mit C_4 -Umkehrphasen-HPLC. Hierfür wurde eine analytische C_4 -Säule (Jupiter 5u C4 300A, Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Die Flussrate betrug $0,5\text{ mL/min}$. Die Proteine wurden über die Absorption ihrer Peptidbindungen bei 215 nm detektiert und manuell fraktioniert. Zur Trennung wurde ein Gradient von Puffer A zu Puffer B durchlaufen. Nach Äquilibrierung der Säule mit 10 % Puffer B und Auftragen der Probe folgte ein linearer Gradient zu 40 % Puffer B in zehn Minuten, zu 70 % Puffer B in 20 Minuten und zu 100 % Puffer B in zehn Minuten. Es folgten

fünf Minuten Puffer B zum Lösen der am stärksten an die Säule gebundenen Proteine. Bis zur weiteren Analyse wurden die Fraktionen bei -20 °C gelagert.

Die Überprüfung der vollständigen und korrekten Abspaltung der Fusionsteile von den rekombinanten Produkten erfolgte im Massenspektrometer (QTOF II, Micromass, Milford, USA).

Puffer A: 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in H_2O

Puffer B: 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in 100 % Acetonitril

4.2.5.4 Gewinnung von Proteinen der gesunden Maushaut

Um feststellen zu können, welche Proteine auf der Maushaut vorhanden sind und welche von ihnen antimikrobielle Aktivität zeigen, wurde die Haut der Flanken von BALB/c-Mäusen unterschiedlichen Alters und Geschlechts in Diethylethernarkose alle zwei Tage mit 10 mM Natriumphosphat-Puffer gespült. Zuvor mussten die Mäuse rasiert werden, um eine Hautspülung zu ermöglichen. Hierfür wurde zuerst das Fell grob mit einem Langhaarschneider entfernt und im Anschluss mit einem Einmal-Nassrasierer rasiert. Wenn nötig wurde die Rasur wiederholt. Auf jeder Maus wurden sechs Punkte mit einer Fläche von $0,79\text{ cm}^2$ gespült. Die Spülflüssigkeit wurde vereinigt und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C gelagert.

Zur Aufkonzentrierung der Proteine wurde die Waschflüssigkeit (ca. 350 mL) über Ultrafiltration mit einer Amicon YM3-Membran (Amicon Corp., Danvers, USA) auf ca. 2 mL eingeeengt.

Die Trennung der Proteine erfolgte über eine C_2/C_{18} -Umkehrphasen-HPLC (siehe 4.2.5.5).

4.2.5.5 C_2/C_{18} -Umkehrphasen-HPLC

Die C_2/C_{18} -Umkehrphasen-HPLC zur Auftrennung der Proteine aus den Maushautspülungen wurde unter Verwendung einer SMART-System-Anlage (Pharmacia, Freiburg) vorgenommen. Es kam als Trennsäule eine $\mu\text{RPC C}_2/\text{C}_{18}$ SC 2.1/10 (Pharmacia, Freiburg) zum Einsatz. Die Proteine wurden durch ihre Absorption bei 215, 254 und 280 nm manuell fraktioniert. Für die Trennung wurde ein Gradient von Puffer A zu Puffer B mit einer Durchflussrate von $100\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ durchlaufen. Zu Beginn wurde die Säule mit Puffer A äquilibriert, gefolgt von einem linearem Gradienten bis 25 % Puffer B nach 10 Minuten, 70 %

Puffer B nach 30 Minuten und 100 % Puffer B nach zehn Minuten. Die gesammelten Proteinfractionen wurden bis zur weiteren Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Im Anschluss fand eine Analyse der einzelnen Proteinfractionen in Hinblick auf deren Proteingröße und -reinheit über SDS-PAGE (siehe 4.2.6.1), sowie über eine massenspektrometrische Methode (siehe 4.2.6.7.1) statt. Zudem wurden die Fraktionen lyophilisiert (Alpha 2-4 LSC, Christ, Osterode am Harz), mit Trypsin (siehe 4.2.5.6) verdaut und die Spaltprodukte in der Nanoelektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (siehe 4.2.6.7.2) analysiert, um über die Spaltprodukte Rückschlüsse auf die ursprünglichen Proteine zu ziehen.

Puffer A: 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in H_2O

Puffer B: 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in 80 % Acetonitril

4.2.5.6 Trypsinverdau

Für den Trypsinverdau wurden Proteinfractionen aus der C_2/C_{18} -Umkehrphasen-HPLC lyophilisiert (Alpha 2-4 LSC, Christ, Osterode am Harz) und in 100 mM NH_4CO_3 resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 μL aktiviertem, modifiziertem Trypsin (100 ng/ μL Trypsin Sequencing Grade, modified, aus Rinderpankreas, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Probe über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Entfernung von den die massenspektrometrische Messung störenden Salze wurden die Spaltprodukte direkt im Nanoelektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (siehe 4.2.6.7.2) untersucht.

Die Aktivierung des Trypsins erfolgte durch die Zugabe von 2 μL 2 %iger Essigsäure zu 2 μL Trypsin (200 ng/ μL), die Lagerung fand bis zum Verbrauch bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt.

4.2.6 Proteinanalytik

4.2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Aufreinigung über HPLC erfolgte zur Kontrolle der Reinheit und Größe eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Für die Kontrolle der einzelnen Aufreinigungsschritte in der Produktion der rekombinanten Proteine wurde das XCell sure lock Mini-Cell-Gelsystem mit dem dazugehörigen MES-Puffer von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Durchführung der nativen SDS-

PAGE erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Proteinbanden wurden durch eine Inkubation des Gels für eine Stunde in Coomassie-Färbelösung und eine anschließende Entfärbung des Hintergrundes mit Entfärbelösung sichtbar gemacht.

Coomassie-Färbelösung: 45 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), 0,25 % Coomassie Brilliant Blau R250 (w/v)

Entfärbelösung: 45 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)

Zur Untersuchung des über die C₂C₁₈-Umkehrphasen-HPLC aufgetrennten Maushautproteinmischs und für Westernblotanalysen (siehe 4.2.6.4) kamen Dreischichten-Tricine-SDS-Polyacrylamidgele nach Schägger und von Jagow (1987) zum Einsatz. Die Proteine wurden in Gelen mit 15,5 % Acrylamid, 6 % Bisacrylamid und 6 M Harnstoff aufgetrennt. Mit Hilfe dieser Methode können auch kleine Proteine unter 10 kDa sehr effizient aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad, München) durchgeführt.

4.2.6.2 Aufschluss eukaryotischer Zellen

Zum Aufschluss eukaryotischer Zellen wurden diese mit einem Zellschaber in PBS von der Zellkulturplatte gelöst und für fünf Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden zur Lyse in Lysepuffer resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und erneut pelletiert. Die Konzentration der Zellüberstände wurde bestimmt (siehe 4.2.6.3) und die Lysate im Westernblot (siehe 4.2.6.4) analysiert.

Lysepuffer: 5 mM Tris, 250 mM Sucrose, 1 mM EGTA, pH 7,5, 1 % Triton X-100

4.2.6.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung wurde unter Verwendung der Bradford-Methode vorgenommen. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Anhand einer Rinder-Serumalbumin (BSA)-Standardkurve wurde aus den gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentration berechnet.

5 x Bradford-Lösung: 25 % Ethanol (95 %, v/v), 50 % Phosphorsäure, 25 % H₂O, 0,05 % Coomassie Brilliant Blau G250 (w/v)

4.2.6.4 Westernblot

Zum Nachweis wurden die Proteine zunächst in einer Tricine-SDS-PAGE (siehe 4.2.6.1) aufgetrennt und anschließend mit einer nassen Blot-Apparatur (Mini-Protean II, BioRad, München) auf eine Nitrozellulosemembran (Protean BA 83, Whatman, Schleicher und Schüll Microscience GmbH, Dassel) übertragen. Die Transferzeit betrug eine Stunde bei einer Stromstärke von 380 mA und 100 V. Die Membran wurde nach der Übertragung eine Stunde in 5 % Magermilchpulver in PBS-T (w/v) und danach mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in PBS-T mit 3 % Magermilchpulver (w/v) (Ziege- α -mBD14: 1,85 mg/mL, 1:10000) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde sechs Mal für fünf Minuten mit PBS-T gewaschen und im Anschluss mit einem Peroxidase-markierten sekundären Antikörper (Maus- α -Ziege, 1:20000; Dianova, Hamburg) in PBS-T mit 3 % Magermilchpulver (w/v) für eine Stunde inkubiert. Nach achtmaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Detektion der Proteine mit Hilfe des CPS (*chemiluminescent peroxidase substrate*)-Detektionsreagenzes der Firma Sigma (Deisenhofen) nach Angaben des Herstellers.

Für die Analyse, ob das generierte Ziegenserum in der Lage war, Proteine zu detektieren, wurden diese Proteine direkt in einem kleinen Punkt auf die Nitrocellulosemembran aufgebracht und anschließend weiter verfahren, wie oben beschrieben (Dotblot).

4.2.6.5 ELISA

Für die Konzentrationsbestimmung von mBD14 in Zellkulturüberständen wurde ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) entwickelt, welcher in 96 Loch-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Omni Tray, Maxisorp, Nunc GmbH, Wiesbaden) durchgeführt wurde. Zur Beschichtung der Platte wurden 46,25 μ g Ziege- α -mBD14-Antikörper in 50 μ L Beschichtungspuffer in jedes Loch gefüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten schüttelnd bei 37 °C. Die Antikörperlösung wurde aus den Löchern entfernt. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen wurde die Platte mit 200 μ L Blockierungslösung pro Loch für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Löcher drei Mal mit je 200 μ L Waschpuffer je Loch gewaschen. Für alle Waschschritte kam eine ELISA-

Platten-Wascheinheit (EL_x 50 Auto Strip Washer, Bio-Tek Instruments Inc., Bad Friedrichshall) zum Einsatz. Je 50 µL einer Konzentrationsreihe (0,39 bis 50 ng/mL) von rekombinanten mBD14 als Standard - von dem später eine Eichkurve erstellt wurde - und ebenfalls 50 µL der zu testenden Überstände wurden in die Löcher pipettiert und 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit 200 µL/Loch wurden die Vertiefungen mit je 23,2 µg biotinyliertem Ziege- α -mBD14-Antikörper in 50 µL Waschpuffer befüllt und für 30 Minuten inkubiert. Die Löcher wurden mit je 200 µL Waschpuffer drei Mal gewaschen und danach mit 50 µL Peroxidase-konjugierten Avidin-Komplex (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerangaben 30 Minuten inkubiert. Die Platte wurde im Anschluss sechs Mal mit 200 µL Waschpuffer pro Loch gewaschen und die gebundene Peroxidase im letzten Schritt mit 2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure (ABTS, Roche Diagnostics, Mannheim) als Substrat quantifiziert. Die Farbreaktion wurde durch die Messung bei 405 nm in einem Multikanal Photometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) gemessen.

Beschichtungspuffer: 0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃, pH 9,6 mit Ameisensäure

Waschpuffer: PBS, 0,05 % Tween 20

Blockierungslösung: 1 % BSA in Waschpuffer

4.2.6.6 Immunhistochemische Färbung

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Hautgewebestücke 24 Stunden in 4,5 % Formaldehyd fixiert, automatisch dehydriert (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, Niederlande) und anschließend eingebettet. Mit einem Mikrotom (Jung AG, Heidelberg) wurden 4-5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträgern (Walter CMP, Kiel) aufgebracht. Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte für eine Stunde bei 60 °C getrocknet und danach mit einer Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Zur Inhibierung intrazellulärer Peroxidasen wurden die Sektionen für fünf Minuten mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung behandelt, danach kurz in H₂O eingetaucht und für 40 Minuten bei 80 °C in 10 mM Citratpuffer, pH 6,0 gekocht. Nach 15-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Objektträger fünf Minuten in TBS (*Tris buffered saline*) gespült. Im Anschluss wurden die Präparate mit normalem Serum (mBD3: Schweineserum, Dako Diagnostics, Hamburg, 1:20 in TBS, mBD14: Kaninchenserum, Dako Diagnostics, Hamburg, 1:5 in TBS) für 20 Minuten inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Kaninchen- α -mBD3, Santa Cruz Biotechnology,

Inc., Santa Cruz, USA: 1:100 in TBS; Ziege- α -mBD14, siehe 4.2.8, 1,85 mg/mL: 1:100 in TBS) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Antikörperlösung wurde durch Spülen mit TBS für 5-10 Minuten entfernt und die Schnitte für 30 Minuten mit einem Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper (mBD3: Schwein- α -Kaninchen, Dako Diagnostics, Hamburg, 1:600 in TBS; mBD14: Kaninchen- α -Ziege, Dako Diagnostics, Hamburg, 1:600 in TBS) inkubiert. Nach fünfminütigem Spülen der Schnitte mit TBS wurde der StreptABCComplex (Streptomycin-Avidin-Biotin-Complex, Dako Diagnostica, Hamburg, 1:100 in TBS) für 30 Minuten aufgetragen. Nach erneutem Waschen für fünf Minuten mit TBS erfolgte die Farbreaktion durch Auftragung der Peroxidase-Substrat-Lösung DAB (3,3'-Diaminobenzidin chromogen Lösung, BioGenex, San Ramon, Kanada) nach Angaben des Herstellers. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxilin (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt) für 30 Sekunden. Abschließend wurden die Schnitte mit Glycergel (Dako Diagnostica, Hamburg) eingedeckelt. Als Kontrolle dienten Schnitte ohne Zugabe von Primärantikörper. Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop (Axioskop) der Firma Zeiss (Oberkochen).

10 mM Citratpuffer: 1,7 mM Citronensäure, 8,3 mM Natriumcitrat, pH 6,0

TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit HCl

4.2.6.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie beruht auf der Eigenschaft elektrischer und magnetischer Felder, Ionen nach ihrer Masse, Ladung und ihrer kinetischen Energie zu trennen. Die zu analysierende Probe wird dabei zunächst ionisiert. Anschließend werden die Ionen im Massenanalysator aufgrund ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt. Die Massenbestimmungen erfolgten an einem Elektrospray-Massenspektrometer (Micromass, Milford, USA).

4.2.6.7.1 Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Proteinmassen von Proteinen wurden direkt im Anschluss an die Trennung mittels HPLC mit Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie in einem Quadropol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF II, Micromass, Milford, USA) im positiven Ionenmodus bestimmt. Vor allen Messungen wurde das Gerät über einen Massenbereich von 50 bis 2000 Da mit einer Natriumiodidlösung (40 g/mL in 50 % Acetonitril) kalibriert. Die

Messungen erfolgten bei einer *Cone Voltage* von 40. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der MassLynx 4-Software von Waters Micromass (Milford, USA). Aus Rohdaten kombinierter Spektren wurden die Durchschnittsmassen mittels Maximum Entropy 1 (MaxEnt1) Dekonvolution ermittelt.

4.2.6.7.2 Nanoelektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (NS-ESI-MS)

Die Nanoelektrospray-Ionisierung (Wilm & Mann, 1996) wurde für MS-MS-Peptidsequenzierungen nach Trypsinverdau (siehe 4.2.5.6) eingesetzt. Hierfür wurde das Massenspektrometer (QTOF II, Micromass, Milford, USA) umgebaut und mit einer speziellen Nano Z Spray-Einheit ausgestattet. 1-3 μL einer salzfreien trypsinverdauten Probe wurden auf eine Nanoflow-Elektrospray-Nadel (Borosilicate metal coated glass capillary, Waters Micromass, Milford, USA) geladen. Die Entsalzung fand durch selbstgebaute μ -Säulen (Shevchenko et al., 1996; Wilm et al., 1996) statt, wofür ausgezogene Gelbeladungsspitzen (Eppendorf, Hamburg) mit einer 2:1-Mischung aus Porosâ 50 R2 und Oligo R3 Umkehrphasenmedium (Applied Biosystems, Foster City, USA) beladen zum Einsatz kamen (Choi et al., 2003). Vor der Entsalzung wurde Ameisensäure in einer Endkonzentration von 5 % zugegeben. Nachdem die Probe auf die Säule geladen wurde, wurde diese zwei Mal mit 10 μL 5 %iger Ameisensäure gewaschen. Die Peptide wurden von der Säule mit 1-3 μL 60 % Methanol/5 % Ameisensäure (v/v) direkt in eine Nano-Elektrospray-Nadel eluiert und mit einer Kapillarspannung zwischen 1 und 1,4 kV gemessen. Für die MS-MS-Analysen der trypsinverdauten Fragmente wurden *Cone Voltage* und Kollisionsenergie für jedes einzelne untersuchte Peptid optimiert. Die Kollisionsenergie variierte zwischen 17 und 40 eV mit Argon als Kollisionsgas. Die MS-MS-Daten wurden für einen Massenbereich von m/z 80 bis 2000 ($m/z = \text{Masse/Ladung}$) erhalten.

Die Analyse der Daten erfolgte mit dem MassLynx 4-Softwarepaket (Micromass, Milford, USA). Von den kombinierten Daten der mit Trypsin verdauten Proteine wurde der Hintergrund subtrahiert, wonach sie über Maximum Entropy 3 (MaxEnt 3) dekonvolviert wurden. So wurden monoisotopische Massen erhalten. Die Identität der Probe wurde über eine Datenbanksuche mit den Größen der Peptidfragmente analysiert („Fingerprint“-Analyse/„Massen-Mapping“). Hierfür wurde die Datenbank der Mausproteine mit dem Mascot Programm (Matrix Science, Boston, USA) durchsucht.

4.2.7 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

4.2.7.1 Mikrodilutionstest

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von rekombinanten mBD14 wurde ein Flüssigkultur-Testsystem (Ganz et al., 1985) in modifizierter Form eingesetzt. Die in Tabelle 4.2 aufgeführten Mikroorganismen wurden in TSB-Medium kultiviert, in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 % TBS verdünnt und 90 μ L aus dieser Verdünnung mit 10 μ L mBD14 in 10 mM Natriumphosphatpuffer in unterschiedlichen Konzentrationen für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 1:10 und 1:100 in 10 mM Natriumphosphatpuffer verdünnt und von diesen Verdünnungen jeweils 100 μ L in drei Parallelansätzen auf TSB-Agarplatten ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt. Als Kontrolle diente je ein Ansatz nur mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, direkt vor und nach der dreistündigen Inkubation ausplattiert.

Es folgte die Berechnung der minimalen bakterizidalen Konzentration (*minimal bactericidal concentration* = MBC, $\geq 99,9$ % Abtötung) und der Konzentration, welche nötig ist, 90 % der Mikroorganismen zu töten (*90 % lethal dose* = LD₉₀).

4.2.8 Generierung eines polyklonalen mBD14-Antikörpers aus Ziege

4.2.8.1 Immunisierung

Da es für das murine β -Defensin 14 keinen kommerziellen Antikörper gibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Antikörper in einer Ziege hergestellt. Hierfür wurde rekombinantes mBD14-pET-32-Fusionsprotein an *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) gekoppelt und der Ziege injiziert.

Es wurde 1 mg KLH in 1 mL PBS mit 1 μ L frischen Glutaraldehyd versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde ungebundenes Glutaraldehyd über eine 30 kDa-Filter-Säule (Vivascience, Hannover) entfernt und das KLH-Glutaraldehydkonjugat gründlich in PBS gewaschen. Zur Kopplung wurden 2 mg Fusionsprotein in 1 mL PBS gelöst, 667 μ L dieses Gemisches, mit 333 μ L KLH-Glutaraldehyd vermischt und eine Stunde schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch die Zugabe von 5 μ L 1 M Tris/HCl, pH 8 gestoppt. Nach Zugabe der restlichen Lösung mit dem

ungekoppelten Protein wurde das Gemisch für die Immunisierung einer Ziege eingesetzt. Bis zur Verwendung wurde es bei -20 °C gelagert. Dem Tier wurden zur Grundimmunisierung $450\text{ }\mu\text{L}$ der Lösung injiziert. Im Abstand von je vier Wochen wurden drei Mal $350\text{ }\mu\text{L}$ der Lösung injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden der Ziege ca. 200 mL Blut entnommen. Zwei weitere Wochen später wurde das Tier getötet und durch eine Punktion des Herzens möglichst viel Blut entnommen. Das Serum wurde bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. Die Immunisierung wurde von dem Zika-Kaninchenbetrieb Goymann in Göttingen vorgenommen.

4.2.8.2 Aufreinigung des mBD14-Antiserums

Die Aufreinigung des Ziege- α -mBD14-Serums erfolgte über zwei Affinitätssäulen mit einer Matrix aus einem Sepharosematerial (HiTrap NHS-activated HP, Pharmacia, Freiburg). Die erste Säule wurde mit rekombinantem mBD14 beladen, an die zweite wurde der pET-32-Fusionsteil gekoppelt. Die Kopplung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. $500\text{ }\mu\text{g}$ rekombinantes mBD14 bzw. rekombinanter pET-32-Fusionsteil wurde in 1 mL Kopplungspuffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach einer Stunde wurde die Säule im Wechsel drei Mal mit Puffer I und Puffer II gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C in Puffer A.

Kopplungspuffer: $0,2\text{ M NaHCO}_3$, $0,5\text{ M NaCl}$, pH 8,3 mit NaOH

Puffer I: $0,5\text{ M Ethanolamin}$, $0,5\text{ M NaCl}$, pH 8,3 mit HCl

Puffer II: $0,1\text{ M Natriumazetat}$, $0,5\text{ M NaCl}$, pH 4 mit HCl

Zur Aufreinigung der Antikörper aus dem Ziegenserum wurde zuerst jeweils 1 mL Serum mit 1 mL Puffer A vermischt und nach Äquilibrierung der mBD14-Affinitätssäule mit Puffer A auf diese aufgetragen. Nachdem die nicht gebundenen Proteine von der Säule gespült waren, wurde die Säule mit Puffer B gespült, um die niederaffinen Immunglobuline ebenfalls zu entfernen. Im Anschluss wurden die hochaffinen Antikörper mit Puffer C von der Säule gelöst. Die Antikörper wurden sofort mit 1 M Tris , pH 7,5 neutralisiert.

Um die den pET-32-Fusionsteil erkennenden Proteine aus der Lösung zu entfernen, wurden die mBD14-Antikörper nach der gleichen Prozedur über die pET-32-Affinitätssäule gegeben. Die Immunglobuline, die von dieser Säule nicht gebunden wurden, wurden aufgefangen und die hochaffinen, welche ebenfalls den pET-32-Fusionsteil erkennen, verworfen.

Puffer A: 2 mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

Puffer B: Puffer A mit 2 M NaCl

Puffer C: 0,2 M Glycin, pH 3,0 mit HCl

Die vereinigten, über beide Affinitätssäulen aufgereinigten mBD14-Antikörperfraktionen wurden über eine Amicon Ultra Säule (Millipore, Billerica, USA) aufkonzentriert, in Puffer A umgepuffert und bei – 80 °C gelagert.

4.2.8.3 Biotinylierung

Für die Biotinylierung des Ziege- α -mBD14-Antikörpers wurden 350 μ g des Antikörpers in 200 μ L 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 200 μ g D-Biotin-N-Hydroxysuccinimid-Ester (Stammlösung: 20 μ g/ μ L in DMSO, Lagerung bei – 80 °C) versetzt und vier Stunden bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler rotiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde überschüssiges Biotin mit einer Amicon Ultra Säule (Millipore, Billerica, USA) durch dreimaliges Zentrifugieren mit je 15 mL PBS bei 3500 g entfernt. Der biotinylierte Antikörper wurde bei – 80 °C gelagert.

4.2.9 Genexpression in Epithelzellen und Organen der Maus

4.2.9.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung inklusive eines DNase-Verdau aus kultivierten murinen Keratinozyten erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei – 80 °C gelagert.

Maushaut bedarf eine Vorbehandlung, bevor die RNA isoliert werden kann. Sie wurde in flüssigem Stickstoff in einem Mörser so lange zerstoßen, bis ein feines Pulver zurück blieb. Für die RNA-Isolierung aus zerstoßener Maushaut und anderen Geweben wurde das TRIzol-Reagenz der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet. Die Organe wurden mit Hilfe von Homogenisatoren und eines Potter S (B. Braun Biotech. Int., Melsungen) direkt in TRIzol homogenisiert. Die isolierte DNA wurde zusätzlich über eine NucleoSpin RNA II-Säule (Macherey-Nagel, Düren) mit DNase-Verdau aufgereinigt, um reinere RNA zu erhalten.

Die Konzentration der RNA-Proben wurde im BioPhotometer der Firma Eppendorf (Hamburg) bestimmt.

4.2.9.2 Reverse Transkription (RT) von RNA

Für Expressionsanalysen und Klonierungen wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Dieser Prozess wird als reverse Transkription bezeichnet. In dieser Methode macht man sich die Eigenschaften des Enzyms Reverse Transkriptase (Gallo, 1971) zu Nutze. Das Enzym synthetisiert aus einer RNA-Matrize die komplementäre DNA (*complementary DNA* = cDNA). Die Umschreibung erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription-Kit der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) nach Angaben des Herstellers. Je Reaktion wurden 0,5 bis 2 µg RNA eingesetzt, sowie 1,5 µL Oligo(dT)-Primer (10 µM) pro µg RNA. Die Reaktion wurde im Thermocycler (PTC-200 Thermal Cycler, MJ Research, San Francisco, USA) nach folgendem Programm vorgenommen:

25 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	5 s
4 °C	≥ 5 min

Die cDNA wurde mit H₂O auf eine Konzentration von 10 ng umgeschriebene RNA/µL eingestellt. Die Kurzzeitlagerung erfolgte bei 4 °C, zur Langzeitlagerung wurde die cDNA bei – 20 °C eingefroren.

4.2.9.3 Real time-RT-Polymerase-Kettenreaktion

Mittels *Real time*-RT-Polymerase-Kettenreaktion kann man quantitative Analysen von mRNA-Expressionsunterschieden in verschiedenen Geweben oder in Zellkulturen vornehmen (Newton und Graham, 1994). Auch mRNA-Moleküle in geringer Anzahl können mit dieser Methode nachgewiesen werden. Es wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, welcher an die neu-synthetisierte, doppelsträngige DNA bindet. Durch permanente Detektion der Fluoreszenz-Emission kann die PCR-Reaktion in Realzeit verfolgt werden. Der Farbstoff SYBR Green I wird bei 494 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 521 nm.

Die aus der reversen Transkription resultierende cDNA wurde in *Real time*-PCR-Analysen mit zwei genspezifischen Oligonukleotidprimern (siehe Tabelle 4.1) amplifiziert. Parallel wurde unter gleichen Bedingungen die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) quantitativ untersucht, um einen internen Standard zu erhalten. GAPDH wird von Epithelzellen konstant exprimiert und ist ein so genanntes *house keeping gene*. Es wurde das Sybr Advantage qPCR Premix 2x-Kit der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) mit je 10 ng cDNA pro Reaktionsansatz verwendet. Alle Untersuchungen fanden im LightCycler 2.0 Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim) statt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes war wie folgt:

5,0	μL 2 x Premix
0,2	μL genspezifischer Vorwärtsprimer
0,2	μL genspezifischer Rückwärtsprimer
3,6	μL H ₂ O
1,0	μL cDNA

Die PCR wurde als *touch down*-PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

<u>β-Defensine:</u>	95 °C	30 s	
	95 °C	15 s	
	66 °C	20 s	45 x, pro Zyklus 1 °C niedriger bis auf 60 °C
	72 °C	15 s	
<u>GAPDH:</u>	95 °C	30 s	
	95 °C	15 s	
	66 °C	20 s	45 x, pro Zyklus 1 °C niedriger bis auf 60 °C
	72 °C	30 s	

Die Spezifität der Produkte wurde durch Größenkontrolle auf einem Agarosegel (siehe 4.2.3.2) und durch eine Schmelzkurvenanalyse verifiziert.

Aus der DNA von Plasmiden, welche die zu untersuchenden Gene insertiert hatten, wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe für jedes Primerpaar eine Standardkurve erstellt. Relative mRNA-Level wurden durch Normierung auf die GAPDH-Transkriptionslevel erhalten.

5. Ergebnisse

5.1 Murines β -Defensin 14

5.1.1 Charakterisierung des mBD14-Gens

5.1.1.1 mBD14 besitzt große Homologie zu hBD3

In einer BLAST-Suche der murinen Protein-Datenbank mit der Sequenz von hBD3 zeigte mBD14 mit 69 % die größte Identität. Die beiden nächst größeren Identitäten wiesen mBD3 mit 44 % und mBD6 mit 39 % auf. Eine BLAST-Suche mit der Sequenz des muren hBD3-Peptids ergab nur noch einen Treffer: mBD14. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass mBD14 das murine Ortholog zu hBD3 ist.

5.1.1.2 mBD14 hat eine Signalsequenz

Die Proteinsequenz des mBD14-Gens wurde der Ensembl-Gen-Datenbank entnommen. Für die Untersuchung der Aminosäuresequenz auf putative Schnittstellen, wurde das Programm SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) verwendet, um somit die Sequenz des muren Proteins zu erhalten. Abbildung 5.1 zeigt ein Alignment von hBD3 und mBD14 inklusive ihrer Signalpeptide.

	Signalpeptid	matures Peptid
hBD3	MR IHYLLFALLFLFLVPVPGHGGI	INTLQKY YCRVRGGRC AVL SCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRKK
mBD14	MRLHYLLFVFLI LFLVPAPGDAFLPKTLRK F	FCR IRGGRC AVLNCLGKEEQIGRCSNSGRKCCRKKK
	* : * * * * * : * : * * * * * * * . . . : : * * : * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * : * * . * * * * * : * *	

Abbildung 5.1: Aminosäuresequenzalignment von hBD3 und mBD14 (Ein-Aminosäure-Code). Die Signalpeptide und muren Peptide sind eingezeichnet (* = identisch, : = große Ähnlichkeit, · = ähnlich).

5.1.2 Funktionelle Charakterisierung von mBD14

Für die Charakterisierung von mBD14 in Hinblick auf mögliche Aufgaben *in vivo* und für die Generierung polyklonaler Antikörper gegen mBD14 wurde das Protein rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt.

5.1.2.1 Rekombinante Expression von mBD14

Zu Beginn wurde das mBD14-Gen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und für die Klonierung verwendet. Hierfür wurden die Primer so generiert, dass der Teil von mBD14 amplifiziert wurde, welcher für das mature Protein ohne Signalsequenz (siehe 5.1.1.2) codiert. Es wurde ein Produkt von 138 Basenpaaren amplifiziert, welches der Länge des maturen Proteins von 45 Aminosäuren entspricht. PCR-Produkt und Vektor wurden für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, unter Verwendung der T4-DNA-Ligase ligiert und in *Escherichia coli* Top10F' transformiert. Nach der Überprüfung des korrekten Einbaus des Gens in den Vektor durch eine Kolonie-PCR wurde die Richtigkeit der Sequenz des insertierten Produktes durch Sequenzierung sichergestellt.

Um eine Expression zu ermöglichen wurde der Vektor in den Expressionstamm *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS transformiert. Die Kontrolle der erfolgreichen Überexpression vom mBD14-pET-32a-Fusionsprotein erfolgte in einem SDS-Gel. Versuche zur Optimierung der Expressionsbedingungen zeigten die höchste Proteinausbeute nach einer dreistündigen Expressionsdauer bei 37 °C, wenn die Zellen bei einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,5 mit IPTG induziert wurden. Das Fusionsprotein wurde zunächst mit seinen „His-Tag“ über eine Nickel-Affinitätssäule und im Anschluss über eine C₈-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. Der N-terminale Fusionsteil konnte durch die Behandlung des Fusionsproteins mit Enterokinase abgespalten werden. Es folgte eine weitere Aufreinigung über eine C₄-Umkehrphasen-HPLC. Das rekombinante mBD14 eluierte bei einem Acetonitrilgehalt von etwa 60 %. In der massenspektrometrischen Untersuchung wurde eine Masse von 5184 Da errechnet. Abzüglich von sechs Dalton, welche drei geknüpften Disulfidbrücken zwischen den sechs vorhandenen Cysteinen entsprechen, entspricht diese Masse der theoretisch berechneten Masse von 5190 Da.

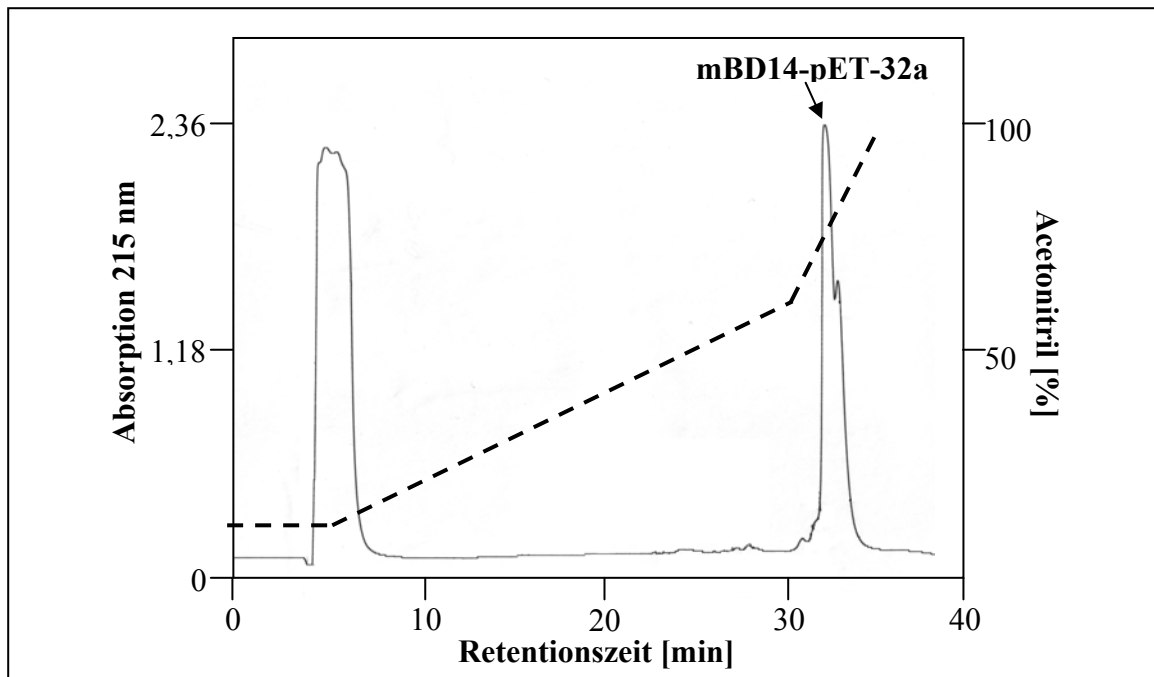


Abbildung 5.2: Chromatogramm einer C₈-Umkehrphasen-HPLC zur Aufreinigung des mBD14-pET-32-Fusionsproteins. Das Fusionsprotein wurde mit einem Acetonitrilgradienten (gestrichelte Linie) von der Säule eluiert und die Absorption kontinuierlich bei 215 nm detektiert. Der Doppelpeak bei einer Retentionszeit von 32 Minuten enthielt das Fusionsprotein.

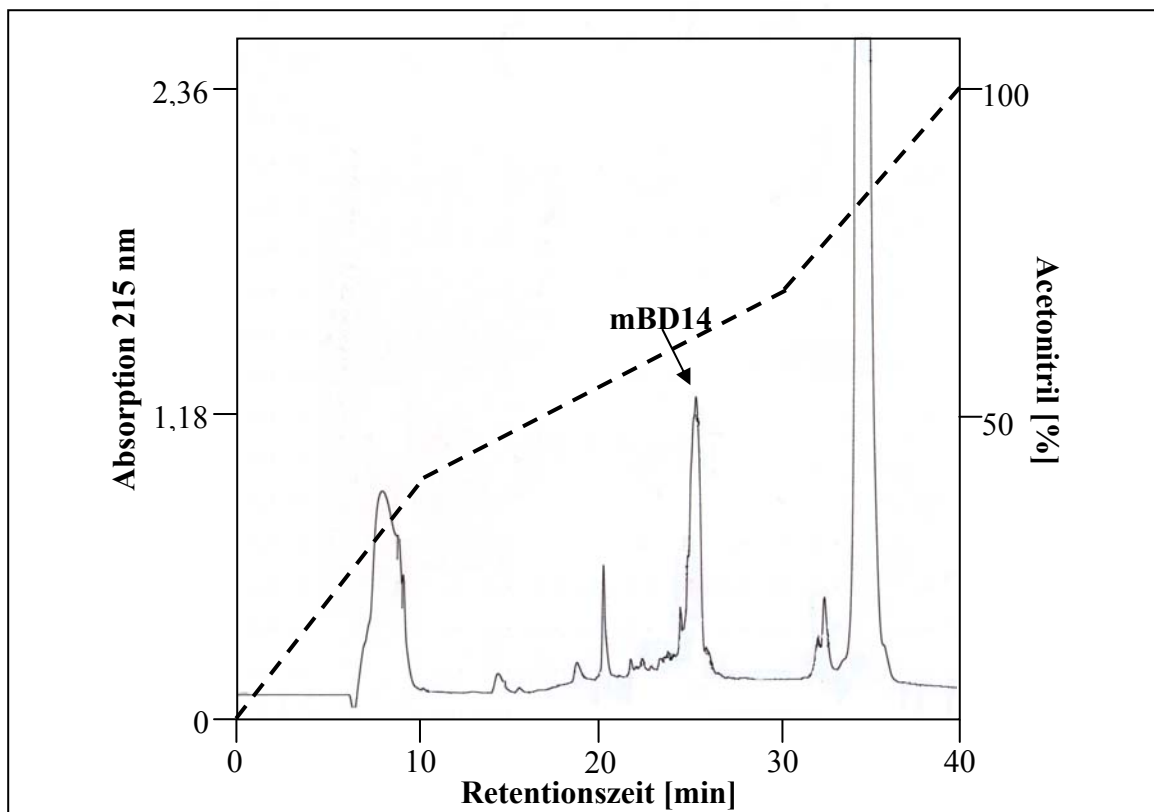


Abbildung 5.3: Chromatogramm einer Aufreinigung von rekombinantem mBD14 über C₄-Umkehrphasen-HPLC nach proteolytischer Abspaltung des „His-Tags“. Die Proteine wurden mit einem Acetonitrilgradienten (gestrichelte Linie) von der Säule eluiert und die Absorption kontinuierlich bei 215 nm detektiert. Der markierte Peak mit einer Retentionszeit von 25 Minuten enthielt ausschließlich rekombinantes mBD14.

Für das aufgereinigte mBD14 wurde in einer massenspektrometrischen Analyse eine Masse von 5184,6 Da errechnet.

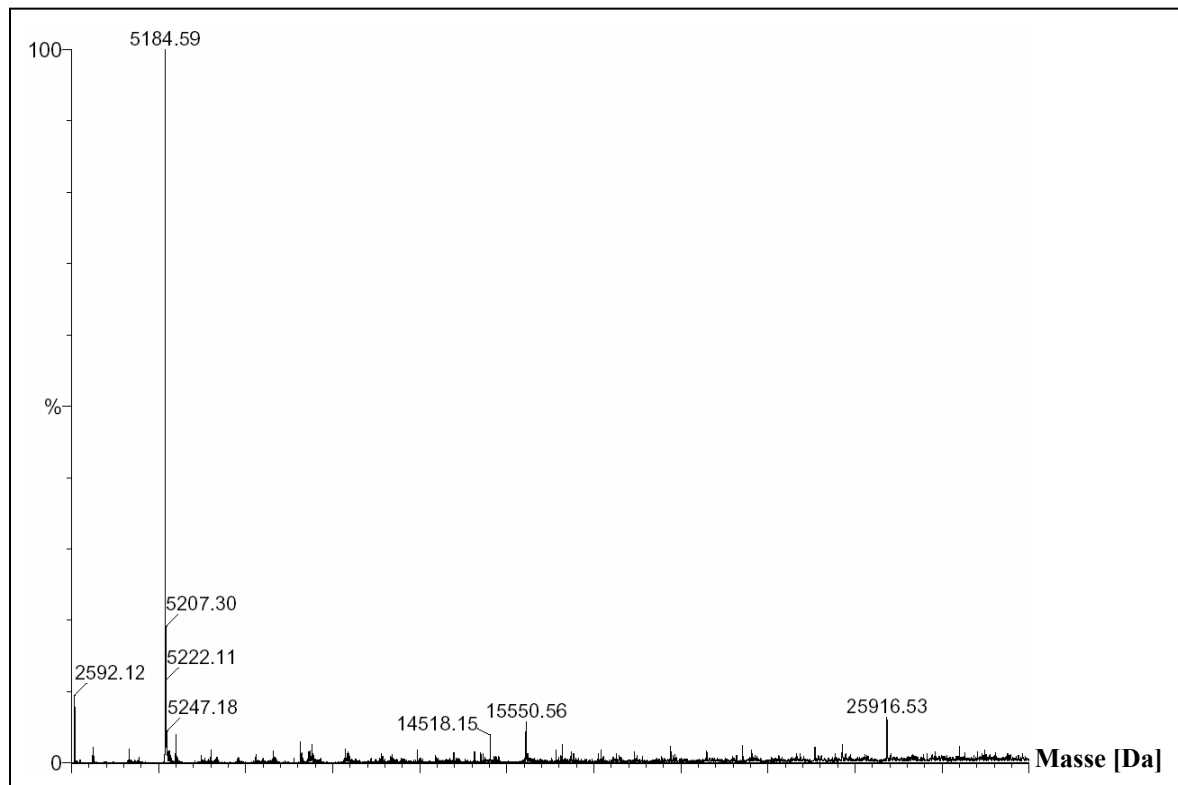


Abbildung 5.4: Massenbestimmung von mBD14 mittels QTOF-Massenspektrometrie. Die Masse von aufgereinigtem rekombinantem mBD14 wurde mittels Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie in einem Quadropol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF II, Micromass, Milford, USA) im positiven Ionen-Modus durchgeführt. Gezeigt ist die MaxEnt1-Auswertung einer Messung von C₄-Umkehrphasen-HPLC-aufgereinigtem mBD14. Es wurde eine Masse von 5184,6 Da errechnet.

Die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 5.5) zeigt, dass das aufgereinigte rekombinante mBD14 auf einer Höhe von etwa 11 kDa läuft.

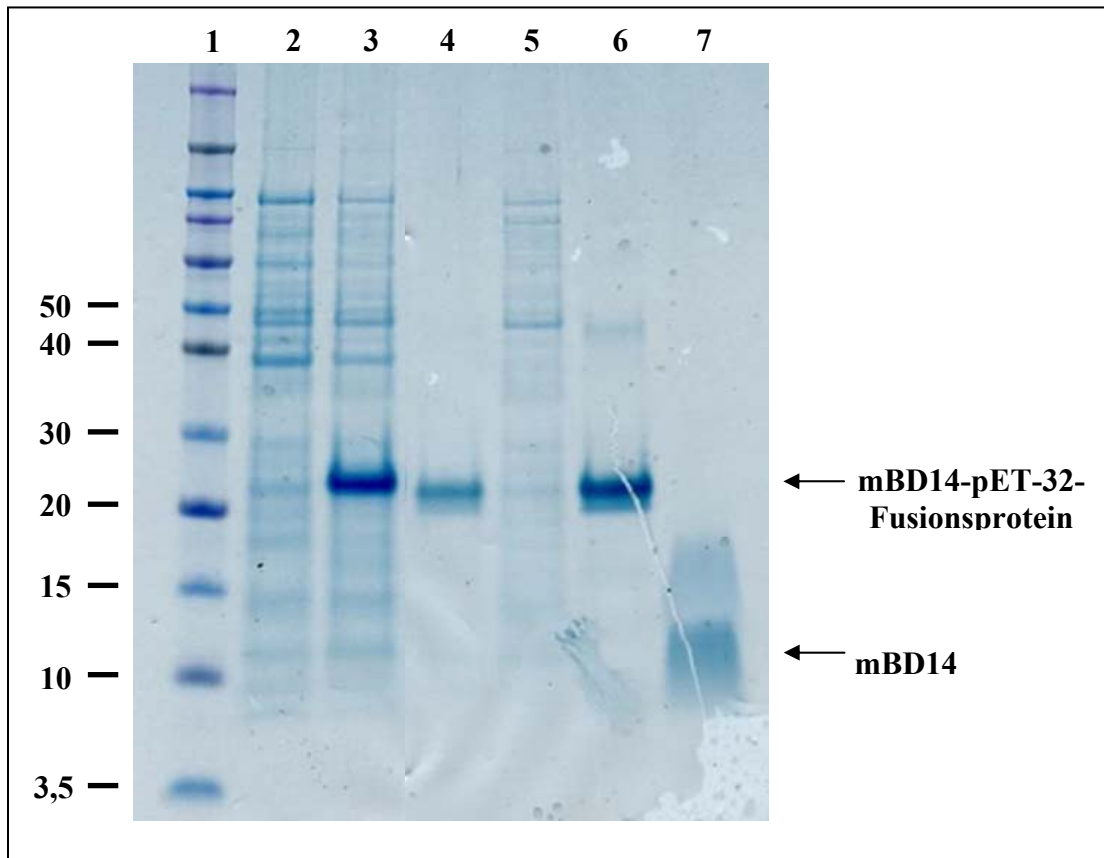


Abbildung 5.5: Coomassie Brilliant Blau-gefärbte SDS-PAGE einer rekombinanten Expression von mBD14 und anschließenden Aufreinigungsschritten. Spur 1: Novex Sharp Protein Standard (Invitrogen, Groningen, Niederlande), Spur 2: gesamte Zellproteine vor Induktion mit IPTG, Spur 3: gesamte Zellproteine drei Stunden nach Induktion mit IPTG, Spur 4: mBD14-pET-32-Fusionsprotein nach Nickel-Affinitätsäule, Spur 5: Durchfluss der Nickel-Affinitätsäule, Spur 6: mBD14-pET-32-Fusionsprotein nach C₈-Umkehrphasen-HPLC, Spur 7: rekombinantes mBD14 nach Enterokinaseverdau und C₄-Umkehrphasen-HPLC.

5.1.2.2 Antimikrobielle Aktivität von mBD14

5.1.2.2.1 mBD14 zeigt ein breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität

Für die Bestimmung der antimikrobiellen Eigenschaften wurde rekombinantes mBD14 in seriellen Verdünnungen in einem Flüssigtestverfahren verwendet (Mikrodilutionstest, siehe 4.2.7.1). Tabelle 5.1 zeigt, dass mBD14 nicht nur eine potente antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien besitzt, sondern auch die Hefe *Candida albicans* effizient abzutöten vermag. Selbst stark pathogene Keime wie der Vancomycin-resistente *Enterococcus faecalis*, der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und der multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* werden mit einer LD₉₀ im nanomolaren Bereich abgetötet (Tabelle 5.1).

Stamm	MBC (µM)	LD ₉₀ (µM)
<u>Gram-positive Bakterien:</u>		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	1,2	0,08-0,15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33593 (MRSA)	2,4	0,30
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	2,4	1,21
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344	1,2	0,08-0,15
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1,2	0,08
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (VRE)	2,4	0,30
<u>Gram-negative Bakterien:</u>		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	0,60-1,2	0,08-0,15
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,2	0,30
<i>Escherichia coli</i> ESBL 4 (Klinisches Isolat)	0,60	0,15
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 13311	1,2	0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	1,2-1,4	0,30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Va 6201/2000 MR (klinisches Isolat)	4,8	0,60
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	> 19	> 19
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	> 19	> 19
<i>Burkholderia stabilis</i> NTCC 13011	> 19	> 19
<u>Hefen:</u>		
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	1,2	0,60

Tabelle 5.1: mBD14 besitzt ein breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität. Für die Testung der antimikrobiellen Aktivität von mBD14 wurde ein Flüssigkulturtestsystem eingesetzt, in dem die aufgeführten Mikroorganismen mit mBD14 in verschiedenen Konzentrationen in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) für drei Stunden inkubiert wurden. Nach Ausplattieren auf Agar-Nährmediumplatten und Inkubation bei 37 °C über

Nacht wurden die Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Gezeigt ist die LD₉₀ (= letale Dosis₉₀, Dosis der antimikrobiellen Substanz, die zu einer 90 %igen Reduktion der KBE führt) und die MBC (= minimale bakterizidale Konzentration) für die jeweiligen Mikroorganismen (MRSA = Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, VRE = Vancomycin-resistente Enterokokken, ESBL = *Extended Spectrum β-Lactamase*, MR = multiresistent).

5.1.2.2.2 Die antimikrobielle Aktivität von mBD14 ist Salz- und pH-abhängig

Der Tabelle 5.1 ist zu entnehmen, dass mBD14 eine potente antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* besitzt. Es ist bekannt, dass die antimikrobielle Aktivität verschiedener antimikrobieller Proteine und auch der β-Defensine durch die Anwesenheit von Kationen wie Na⁺ und Mg²⁺ gehemmt wird (Goldman et al., 1997; Friedrich et al., 1999; Tam et al., 2002). Für die Untersuchung der biologischen Relevanz von mBD14 unter physiologischen Bedingungen wurde im Flüssigkulturtest der Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen auf die antimikrobielle Aktivität von mBD14 analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen *Escherichia coli* bei erhöhten Natriumchloridkonzentrationen komplett verschwindet. Im Gegensatz dazu bleibt die antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* bei erhöhten Natriumchloridkonzentrationen erhalten. Analog dazu beeinflusste eine erhöhte Magnesiumchloridkonzentration die Abtötung von *Staphylococcus aureus* nicht. Die antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* wurde vermindert, blieb jedoch existent. Im Folgenden wurde überprüft, inwieweit die antimikrobielle Aktivität von mBD14 pH-Wert-abhängig ist. Hierfür wurde 10 mM Natriumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 im Flüssigtestverfahren verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen *Escherichia coli* bei niedrigerem pH-Wert erhöht wurde, während das Abtöten von *Staphylococcus aureus* gehemmt wurde.

	LD ₉₀ [µM]	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
	ATCC 12600	ATCC 11775
10 mM NaP pH 7,3	0,08-0,15	0,08-0,15
10 mM NaP pH 7,3 + 50 mM NaCl	0,06	0,9
10 mM NaP pH 7,3 + 100 mM NaCl	0,2	19
10 mM NaP pH 7,3 + 150 mM NaCl	0,9	> 19
10 mM NaP pH 7,3 + 2 mM MgCl ₂	0,06	1,2
10 mM NaP pH 5,5	10,8	< 0,005

Tabelle 5.2: Die antimikrobielle Aktivität von mBD14 ist abhängig von Salzkonzentration und pH-Wert.

Für die Untersuchung, ob die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* abhängig von Salzkonzentration und pH-Wert ist, wurden dem Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) jeweils 50, 100 und 100 mM Natriumchlorid bzw. 2 mM Magnesiumchlorid zugesetzt, sowie der pH-Wert auf 5,5 erniedrigt. Es ist zu sehen, dass die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen *Escherichia coli* durch die Zugabe von Natriumchlorid stark und durch die Zugabe von Magnesiumchlorid weniger stark gehemmt wird. Die antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* wird durch die Zugabe von diesen Salzen kaum beeinflusst. Durch eine Erniedrigung des pH-Wertes auf 5,5 kann die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen *Escherichia coli* stark erhöht werden, bei *Staphylococcus aureus* wird sie hingegen stark reduziert (LD₉₀ = letale Dosis₉₀, NaP = Natriumphosphatpuffer).

5.1.3 Herstellung polyklonaler mBD14-Antikörper

Für die Herstellung von spezifischen mBD14-Antikörpern wurde eine Ziege vier Mal mit mBD14-pET-32-Fusionsprotein im Abstand von jeweils drei Wochen immunisiert. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurde der Ziege Blut entnommen und das Serum über eine mBD14- und über eine pET-32-Affinitätssäule (siehe 4.2.8.2) aufgereinigt. Die Abbildungen 5.6 A und B zeigen die Chromatogramme der Affinitätsreinigungen.

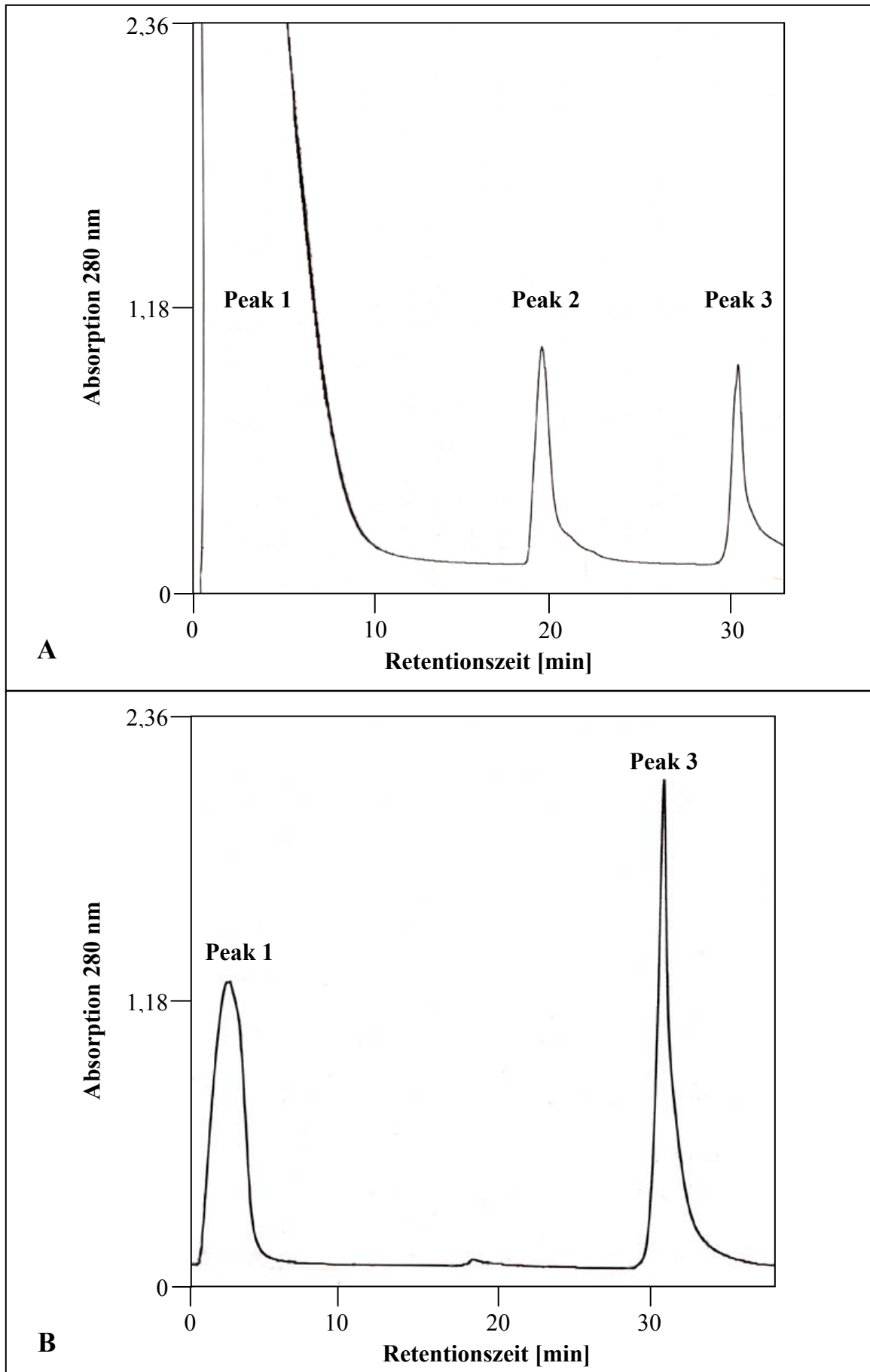


Abbildung 5.6: Spezifische mBD14-Antikörper konnten über Affinitätssäulen aus Ziegenserum aufgereinigt werden. Zuerst erfolgte die Aufreinigung über eine mBD14-Affinitätssäule (A). Der erste Peak stellt den Durchfluss dar und enthielt die ungebundenen Proteine. Das Eluat des zweiten Peaks enthielt schwach gebundene Proteine, welche durch den Zusatz von 2 M Natriumchlorid bei pH 7 von der Säule gelöst wurden. Im dritten Peak befanden sich die für mBD14 spezifischen Antikörper, welche mit 0,2 M Glycinpuffer (pH 3) von der Säule eluiert wurden. Für die Trennung der mBD14- und der pET-32-Antikörper wurde die mBD14-Antikörper-enthaltende Fraktion im Anschluss über eine pET-32-Affinitätssäule aufgereinigt (B). Das Eluat des ersten Peaks enthielt ausschließlich mBD14-Antikörper, während die Antikörper des dritten Peaks gleichzeitig pET-32 detektieren.

Die Spezifität der aufgereinigten mBD14-Antikörper wurde mit Westernblotanalysen überprüft. Die in Lysaten von Maus-Epidermis detektierte Bande befand sich auf gleicher Höhe wie die Bande für das rekombinante mBD14. Sie hatte die nach SDS-PAGE-Gelen erwartete Größe von etwa 11 kDa.

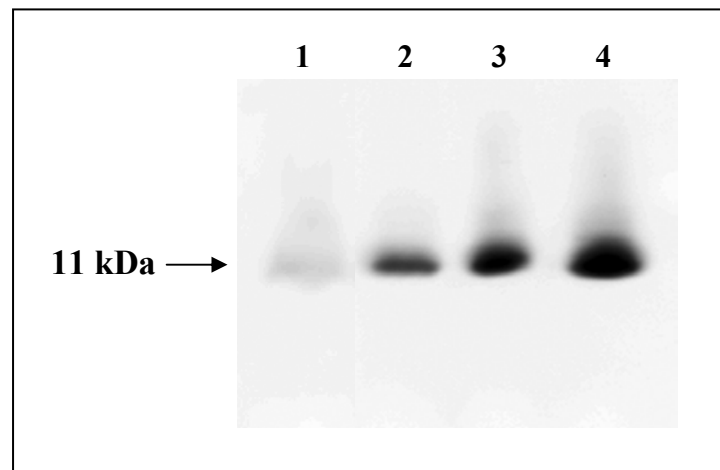


Abbildung 5.7: Die gereinigten mBD14-Antikörper zeigten im Westernblot nur eine spezifische Bande. Gezeigt ist ein Westernblot mit gereinigten mBD14-Antikörpern. Das Protein erscheint als spezifische Bande bei etwa 11 kDa. Spur 1: 20 µg Mausepidermislysate; Spur 2: 5 ng rekombinantes mBD14; Spur 3: 10 ng rekombinantes mBD14; Spur 4: 20 ng rekombinantes mBD14.

Da zwischen humanem β -Defensin 3 (hBD3) und mBD14 ein großer Homologiegrad besteht, wurde untersucht, ob die gereinigten mBD14-Antikörper ebenfalls in der Lage sind, hBD3 zu detektieren. Ein Dotblot mit rekombinanten mBD14 und rekombinanten hBD3 zeigte, dass die mBD14-Antikörper hBD3 vergleichbar gut wie mBD14 erkennen (Abbildung 5.8).

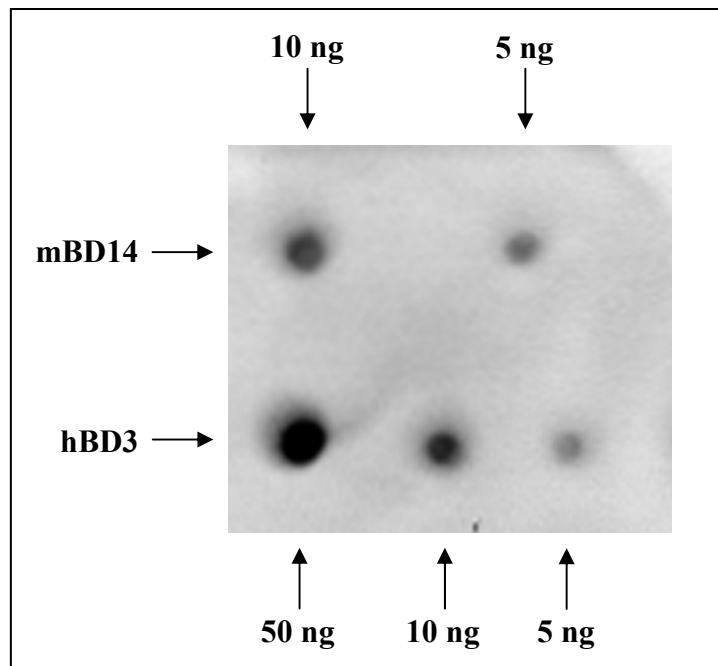


Abbildung 5.8: Die affinitätsgereinigten mBD14-Antikörper detektieren hBD3 in ähnlichen Konzentrationen wie mBD14. Für die Überprüfung, ob die mBD14-Antikörper kreuzreaktiv mit hBD3 reagieren, wurde ein Dotblot angefertigt. In der oberen Reihe der Nitrocellulosemembran wurde rekombinantes mBD14 in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 und 5 ng) aufgetragen, in der unteren Reihe 50, 10 und 5 ng rekombinantes hBD3. Man kann sehen, dass die mBD14-Antikörper in der Lage waren, hBD3 zu detektieren. Die Intensitäten der Punkte sind sehr ähnlich, was darauf hinweist, dass mBD14 und hBD3 etwa gleich gut detektiert werden können.

5.1.3.1 Etablierung eines mBD14-ELISAs

Um eine Bestimmung der mBD14-Konzentration in Überständen von Stimulationsversuchen primärer Keratinozyten zu ermöglichen, wurde durch den Einsatz der generierten Antikörper (siehe 5.1.3) ein mBD14-ELISA etabliert. Die untere Nachweisgrenze des ELISAs liegt unter 1 ng/mL.

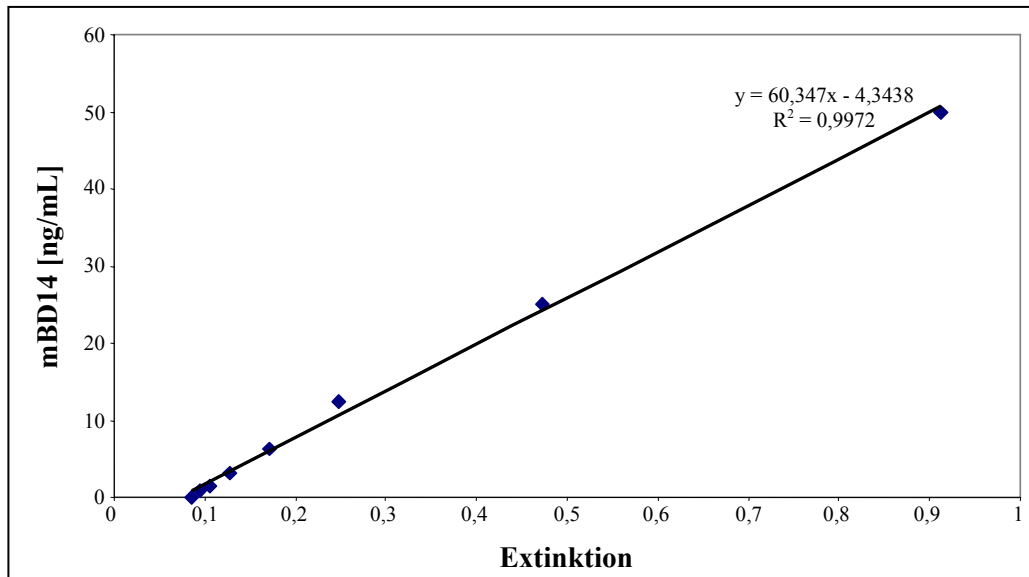


Abbildung 5.9: Standardreihegerade eines mBD14-ELISAs. Die Abbildung zeigt die lineare Abhängigkeit von Extinktion und verschiedenen Konzentrationen an rekombinanten mBD14 im ELISA. Für die unterschiedlichen mBD14-Konzentrationen wurden serielle Verdünnungen (0 bis 50 ng/mL) einer mBD14-Stammlösung angefertigt.

5.1.4 Regulation der mBD14-Genexpression

5.1.4.1 mBD14-mRNA wird in Haut und einigen anderen Geweben exprimiert

Zunächst wurde die mBD14-mRNA-Expression in verschiedenen murinen Geweben bestimmt, um zu untersuchen, in welchen Organen mBD14 exprimiert wird. Abbildung 5.10 zeigt mBD14-mRNA-Expression in vielen der getesteten Gewebe. Eine relativ starke Expression zeigten Thymus, Tonsille, Harnblase, Zunge, Haut und primäre Keratinozyten, wohingegen Niere und Schilddrüse eine schwache Expression zeigten. Sehr geringe Expression konnte in Leber, Dickdarm und Oberschenkelmuskel nachgewiesen werden.

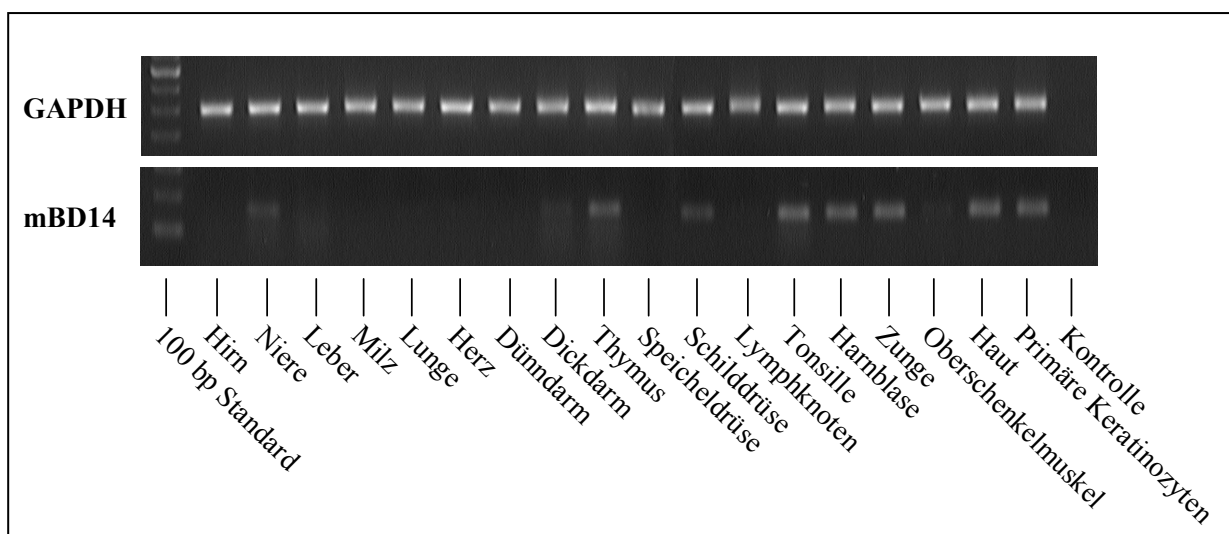


Abbildung 5.10: Analyse der mBD14-Genexpression in verschiedenen murinen Geweben. Die mRNA von verschiedenen Geweben wurde durch den Einsatz einer Reversen Transkriptase in cDNA transkribiert und in einer RT-PCR-Analyse auf mBD14-mRNA-Expression untersucht. Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen PCR-Amplifikate von mBD14- und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in verschiedenen Geweben. Es wurden die intronspannenden Primer aus Tabelle 4.1 verwendet.

5.1.4.2 *In vitro*-Induktion von mBD14

5.1.4.2.1 Induktion von mBD14 durch Bakterienüberstände

Die Intensität der Bande für die mRNA-Expression von mBD14 in primären Keratinozyten (Abbildung 5.10) zeigt, dass mBD14 in primären Keratinozyten bereits eine verhältnismäßig hohe Grundexpression hat. Um zu prüfen, ob die Expression von mBD14 dennoch induzierbar ist, wurden primäre Keratinozyten für 6 und 16 Stunden mit Überständen adhärent gewachsener Kulturen (siehe 4.1.6) von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (1:20 in EpiLife-Medium) und von einem klinischen *Staphylococcus aureus*-Isolat (1:10 in EpiLife-Medium) inkubiert. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mit *real time*-PCR analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten durch Behandlung mit Bakterienüberständen induzieren ließ. Für den Überstand von *Pseudomonas aeruginosa* zeigte sich nach sechs Stunden Stimulationsdauer eine 3,8-fache Induktion der mBD14-mRNA-Expression. Die Induktion wurde in den folgenden zehn Stunden weiter erhöht und betrug nach 16 Stunden das 6,5-fache. Die mBD14-mRNA-Expression war nach sechsständiger Stimulation mit *Staphylococcus aureus*-Überstand 2,9-fach induziert. Nach 16 Stunden war die mRNA-Konzentration auf ihren basalen Level zurückgekehrt.

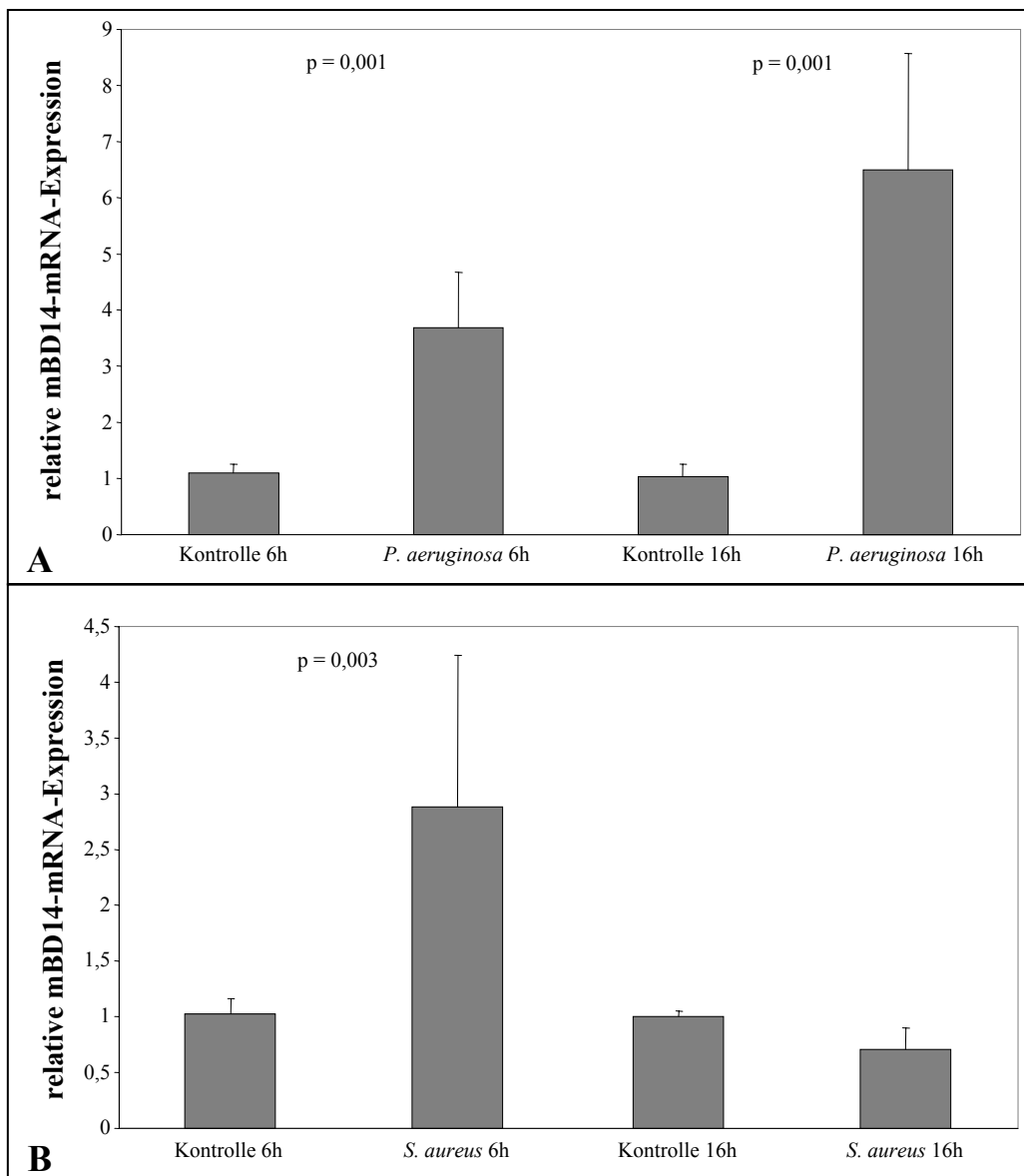


Abbildung 5.11: Überstände von adhären wachsenden Bakterienkulturen induzieren die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten *in vitro*. Primäre Keratinozyten wurden für 6 bzw. 16 Stunden in EpiLife-Medium verdünnten Überständen adhären wachsender *Pseudomonas aeruginosa*- (A) bzw. *Staphylococcus aureus*-Kulturen (B) ausgesetzt. Mittels *real time*-PCR-Analyse wurde die mBD14-mRNA detektiert und quantifiziert. Abgebildet ist jeweils die relative mBD14-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Auf der Proteinebene konnte die Induktion durch *Pseudomonas aeruginosa*-Überstand mit einem ELISA nachgewiesen werden. Hierfür wurde das Kulturmedium der primären Keratinozyten nach Ablauf der Stimulationszeit entfernt und direkt im ELISA eingesetzt. Nach sechsstündiger Stimulation konnte im Kulturüberstand eine mBD14-Proteinkonzentration von 6,2 ng/mL nachgewiesen werden. Nach 16 Stunden war die Konzentration auf 4 ng/mL zurückgegangen. In den Kontrollen konnte nur sehr wenig mBD14-Protein

detektiert werden (< 1 ng/mL). Auch für *Staphylococcus aureus*-Überstand konnte eine erhöhte Proteinkonzentration in den Zellkulturüberständen detektiert werden. Nach sechs Stunden war die mBD14-Proteinkonzentration von 0,6 ng/mL auf 1,8 ng/mL angestiegen. 16 Stunden nach Stimulationsbeginn entsprach die mBD14-Konzentration in den Zellkulturüberständen der Konzentration der Kontrolle.

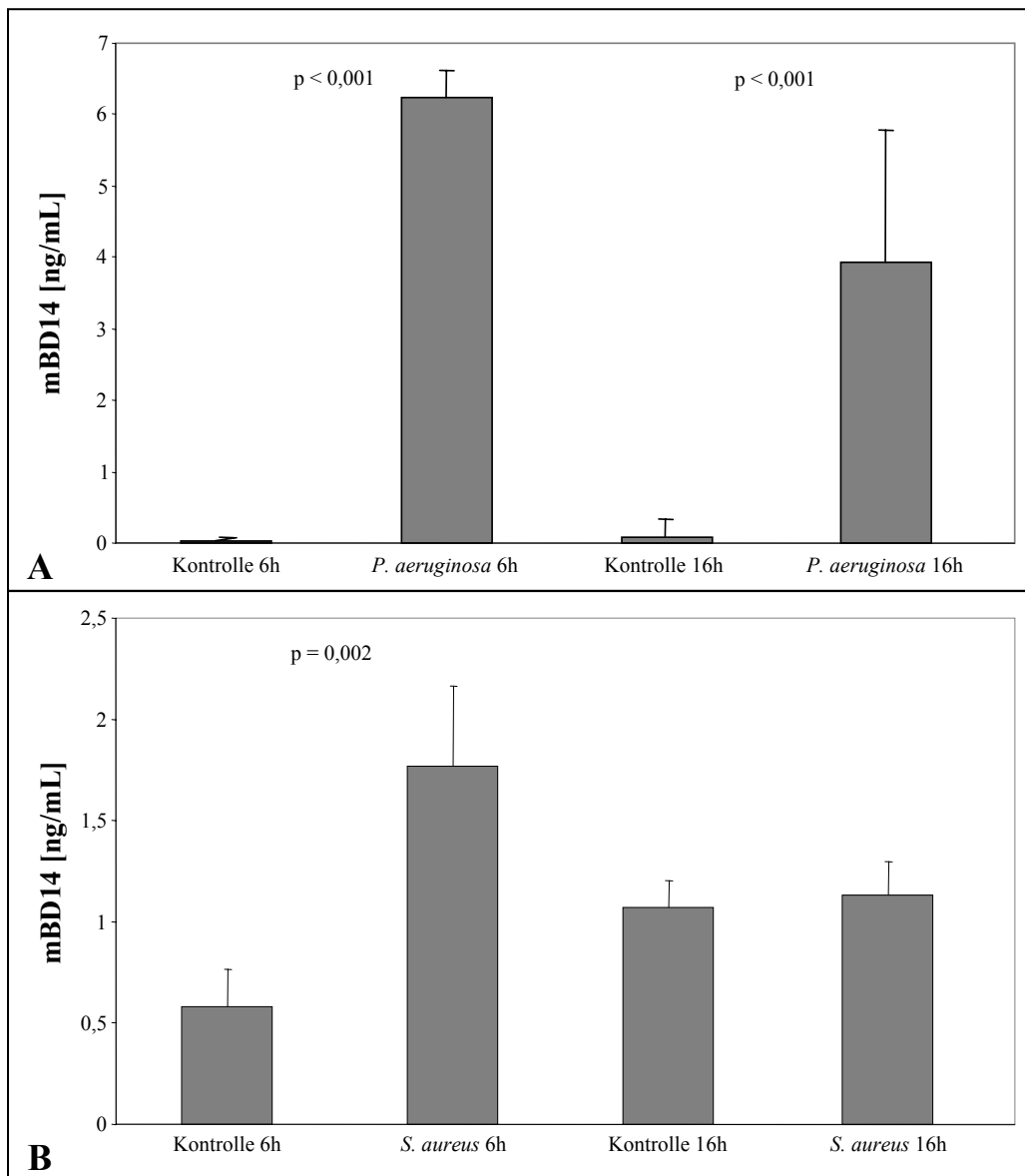


Abbildung 5.12: Überstände von adhärent wachsenden *Pseudomonas aeruginosa*- und *Staphylococcus aureus*-Kulturen induzieren die mBD14-Protein-Expression in primären Keratinozyten *in vitro*. Primäre Keratinozyten wurden für 6 bzw. 16 Stunden mit in EpiLife-Medium verdünnten Überständen adhärent gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*- (A) und *Staphylococcus aureus*-Kulturen (B) behandelt. Mittels ELISA wurde in den Zellkulturüberständen das mBD14-Protein detektiert und quantifiziert. Abgebildet ist die mBD14-Protein-Expression.

5.1.4.2.2 Induktion von mBD14 durch PMA

Durch die Behandlung von primären Keratinozyten mit dem Phorbol ester PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Azetat) kommt es ebenfalls zu einer gesteigerten mBD14-mRNA-Expression. Hierfür wurden primäre Keratinozyten für 3, 6, 10 und 16 Stunden mit 40 ng/mL PMA stimuliert. Die Analyse erfolgte über *real time*-PCR. Bereits nach drei Stunden war die mRNA-Expression 4-fach erhöht. Nach sechs Stunden war sie 8-fach induziert. Auf diesem Level befand sich die Induktion auch nach zehn Stunden. Nach 16 Stunden war die mRNA-Induktion auf eine 4-fache Induktion zurückgegangen. Die Kinetik zeigt, dass die maximale Induktion nach sechs bis zehn Stunden erreicht ist. Es konnte keine erhöhte Proteinkonzentration in den Zellkulturüberständen detektiert werden.

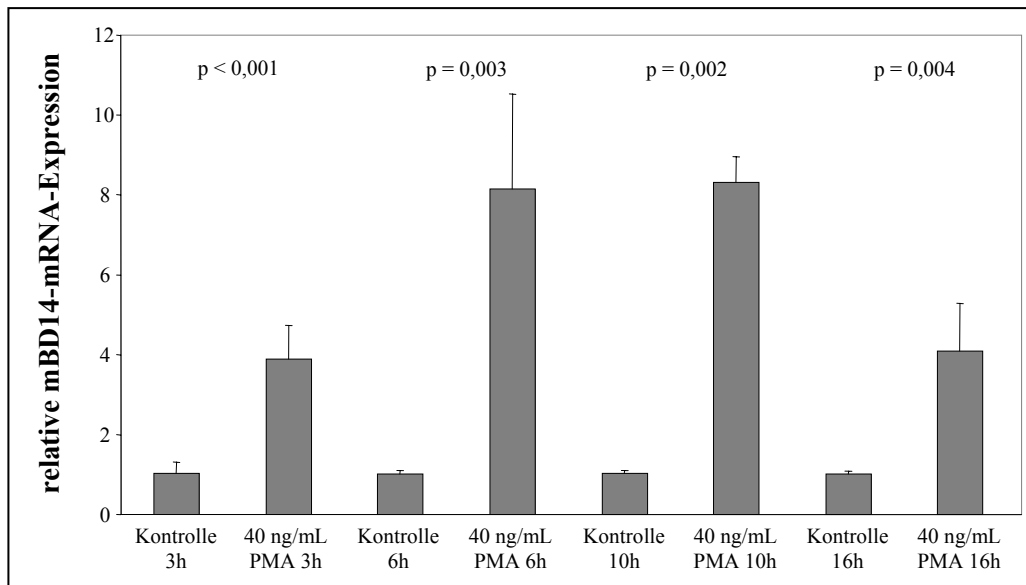


Abbildung 5.13: PMA induziert die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 3, 6, 10 und 16 Stunden mit 40 ng/mL PMA stimuliert. Die mBD14-mRNA-Expression wurde mittels *real time*-PCR analysiert. Abgebildet ist jeweils die relative mBD14-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

5.1.4.2.3 IFN γ aber nicht IL-1 β und TNF α induzieren die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten

Da bekannt ist, dass sich die hBD3-mRNA-Expression in primären humanen Keratinozyten durch die Zytokine Interferon γ (IFN γ), Interleukin-1 β (IL-1 β) und *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) (Garcia et al., 2001; Harder et al., 2004; Nomura et al., 2003) induzieren lässt, wurde untersucht, ob die mBD14-mRNA-Expression in primären murinen Keratinozyten ebenfalls durch diese Zytokine induzierbar ist. Die mBD14-mRNA-Expression befand sich sechs

Stunden nach Stimulation mit 50 ng/mL IFN γ noch auf dem Level der Kontrolle. Nach 16 Stunden war die mRNA 2,5-fach induziert. Die Induktion stieg weiter an und war nach 24 Stunden auf ein 4,5-faches der Kontrolle angestiegen. 48 Stunden nach Beginn der Stimulation war die mRNA noch immer 4,5-fach erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.14). In den Zellkulturüberständen konnte keine erhöhte Proteinkonzentration detektiert werden. IL-1 β und TNF α bewirkten keine Induktion der mBD14-mRNA-Expression (nicht gezeigt).

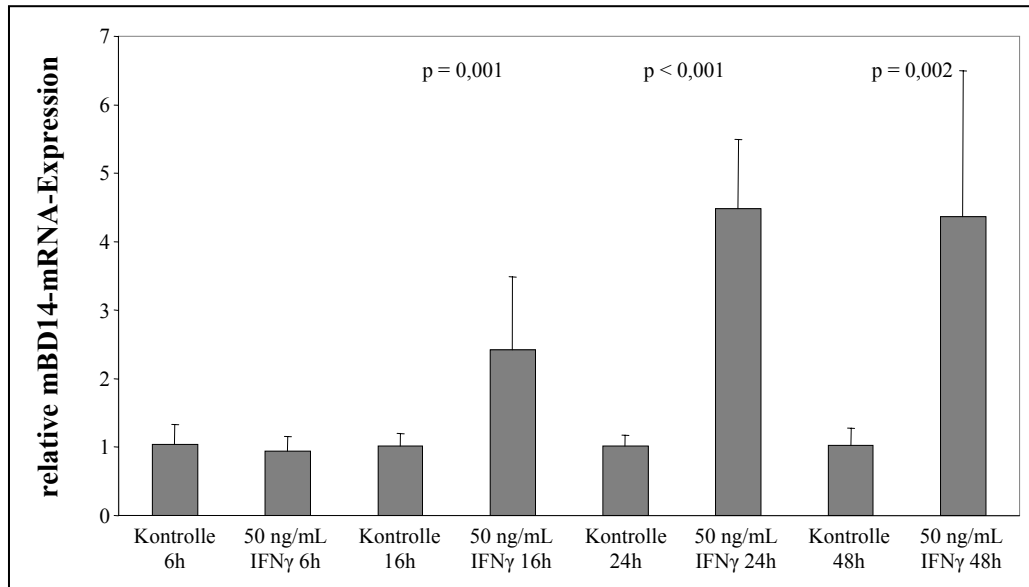


Abbildung 5.14: IFN γ induziert die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit 50 ng/mL IFN γ für 6, 16, 24 und 48 Stunden stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils die relative mBD14-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

5.1.4.2.4 TGF α induziert die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten

Der *Transforming Growth Factor α* (TGF α) spielt in der Wundheilung eine große Rolle (Kumar et al., 1995). Da bekannt ist, dass hBD3 durch TGF α stimuliert wird (Sørensen et al., 2003), wurde untersucht, ob die mBD14-mRNA-Expression in primären murinen Keratinozyten ebenfalls durch TGF α induzierbar ist. Wie der Abbildung 5.15 zu entnehmen ist, induzierte TGF α ebenfalls die mBD14-mRNA-Expression. Sechs Stunden nach Beginn der Stimulation mit 50 ng/mL TGF α war die mBD14-mRNA-Expression 1,8-fach erhöht. Nach 16 Stunden war das Induktionsmaximum von 2,5-fach erreicht. Im Anschluss nimmt die Induktionsstärke wieder ab, nach 24 Stunden betrug sie nur noch das 2,1-fache und nach 48 Stunden das 1,5-fache der Kontrollen.

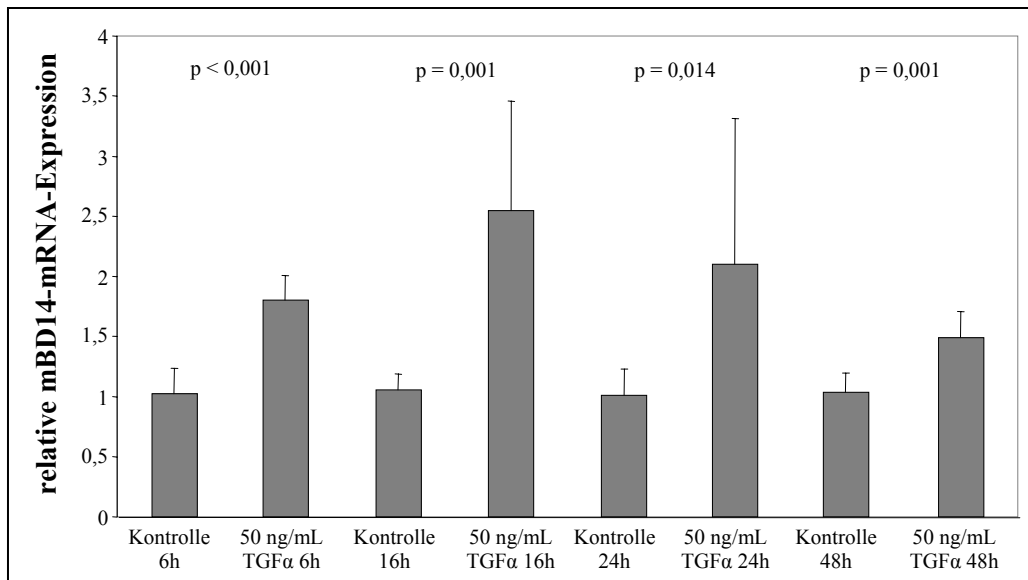


Abbildung 5.15: TGF α induziert die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit 50 ng/mL TGF α für 6, 16, 24 und 48 Stunden stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils die relative mBD14-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Auf der Proteinebene konnte die Induktion durch TGF α mit einem ELISA nachgewiesen werden. Hierfür wurde das Kulturmedium der primären Keratinozyten nach Ablauf der Stimulationszeit entnommen und direkt im ELISA eingesetzt. 16 und 24 Stunden nach Beginn der Stimulation mit 50 ng/mL TGF α war die mBD14-Protein-Expression erhöht, nach 48 Stunden befand sie sich wieder auf dem normalen Level. Diese Tendenz entspricht in etwa der der mBD14-mRNA-Induktion, welche ebenfalls die höchsten Werte 16 und 24 Stunden nach Stimulationsbeginn zeigte.

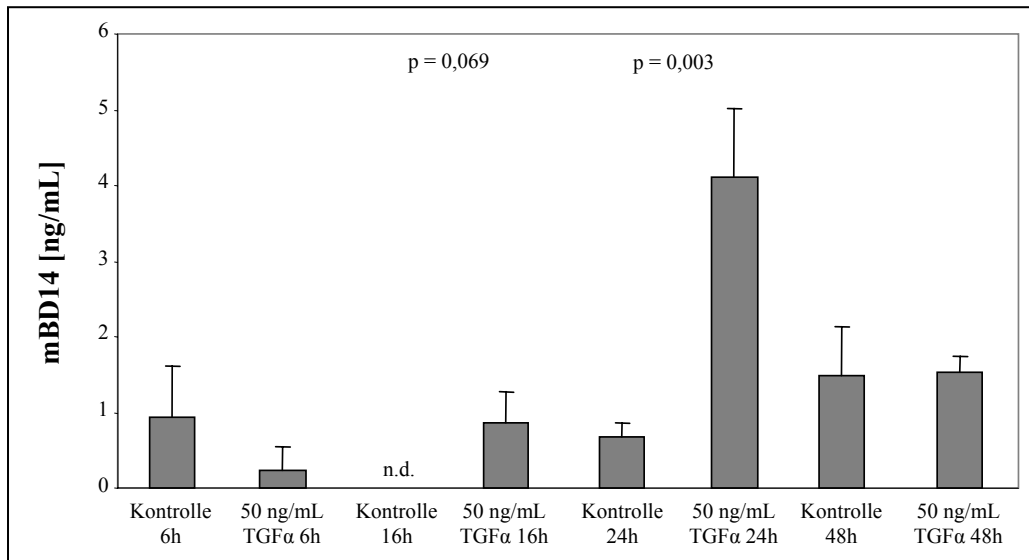


Abbildung 5.16: TGF α induziert die mBD14-Protein-Expression in primären Keratinozyten *in vitro*. Primäre Keratinozyten wurden für 6, 16 24 und 48 Stunden mit 50 ng/mL TGF α behandelt. Im ELISA wurden die Kulturüberstände auf das mBD14-Protein analysiert. Abgebildet ist die mBD14-Protein-Expression in ng/mL (n.d. = nicht detektierbar).

5.1.4.3 mBD14 wird in gesunder Maushaut exprimiert

Für die Untersuchung, ob mBD14 in gesunder Maushaut exprimiert wird, wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffinhautpräparaten von BALB/c-Mäusen mit affinitätsgereinigten mBD14-Antikörpern (siehe 5.1.3) durchgeführt. Es konnte eine deutliche mBD14-Expression in Haut nachgewiesen werden. Eine mBD14-Immunreaktivität zeigte vor allem die Epidermis, insbesondere das *Stratum granulosum*.

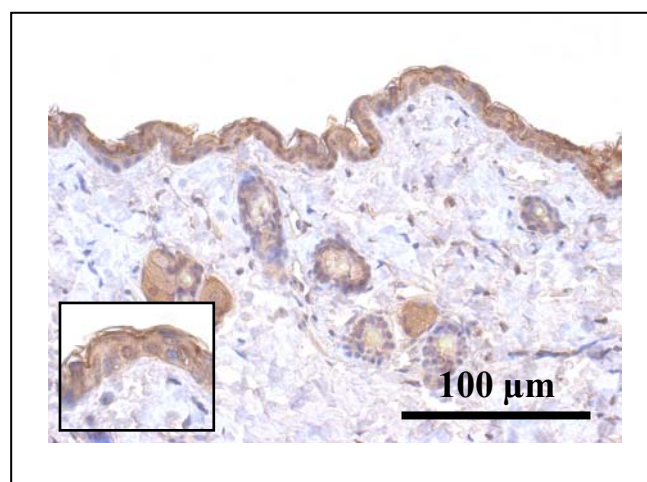


Abbildung 5.17: Immunreaktivität von mBD14 in gesunder Maushaut. Die Abbildung zeigt die immunhistochemische Färbung eines Paraffin-Hautschnittes gesunder BALB/c-Maushaut mit affinitätsgereinigten mBD14-Antikörpern.

Zur Kontrolle der Spezifität der Färbung wurden Präparate mit mBD14-Antikörpern gefärbt, welche zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen rekombinanten mBD14 inkubiert und somit blockiert wurden. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Blockierung der immunhistochemischen Färbung, die Antikörper detektieren demnach spezifisch mBD14.

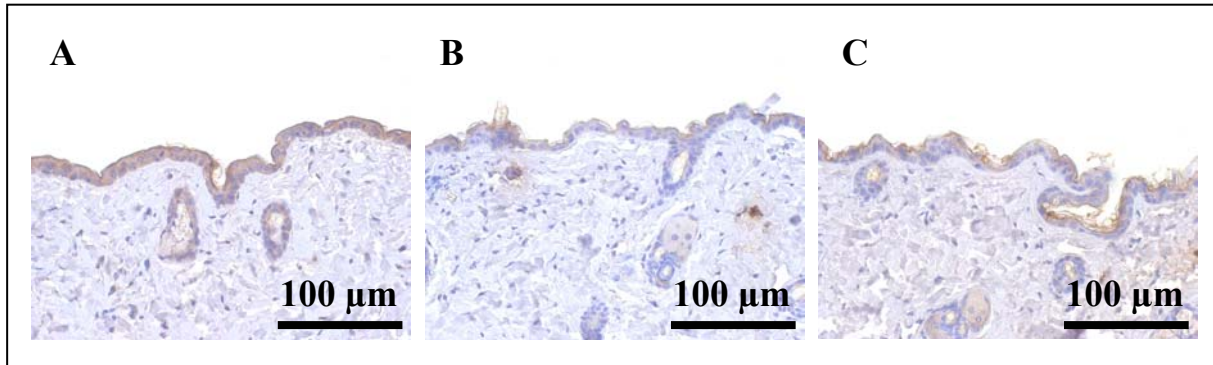


Abbildung 5.18: Die Immunreaktivität des mBD14-Antikörpers ist spezifisch. Die Abbildung zeigt die Blockierbarkeit der immunhistochemischen Färbung von gesunder BALB/c-Maushaut mit affinitätsgereinigten mBD14-Antikörpern. (A) zeigt eine Färbung ohne vorherige Blockierung der Antikörper. Der Antikörper wurde vor Verwendung für eine Stunde bei 37 °C mit (B) 0,05 µg bzw. (C) 0,1 µg rekombinanten mBD14 inkubiert.

5.1.4.4 *In vivo*-Induktion von mBD14

5.1.4.4.1 mBD14 wird durch eine akute Barrierestörung der Maushaut induziert

Durch wiederholtes Aufkleben und Abziehen von Cellophanklebeband wird in Maushaut eine akute Barrierestörung induziert, welche sich durch eine Entfernung von Teilen der Hornschicht und den dadurch erhöhten Wasserverlust kennzeichnen lässt (Jensen et al., 1999). Durch die Induktion der mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten durch den Wachstumsfaktor TGF α scheint eine Rolle für das Protein im Wundheilungsprozess möglich. In *real time*-PCR-Untersuchungen zeigte sich, dass die mBD14-mRNA-Expression in Maushaut sechs Stunden nach einer akuten Störung der Barriere induziert war. Nach 16 Stunden befand sich die mRNA-Konzentration wieder auf dem basalen Level.

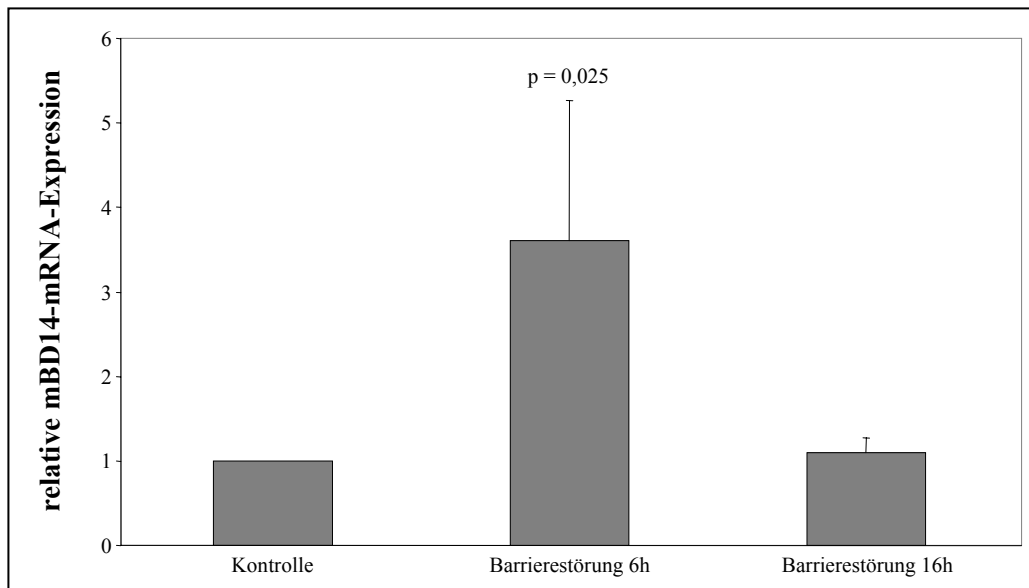


Abbildung 5.19: Die mBD14-mRNA-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere induziert werden. Dargestellt ist die Induktion der mBD14-mRNA 6 und 16 Stunden nach einer Barriestörung der Maushaut durch *tape stripping*. Es wurde jeweils eine Flanke der Mäuse mit Cellophanklebeband behandelt, die andere Flanke diente als unstimulierte Kontrolle und wurde gleich 1 gesetzt. Für den 6 Stunden-Wert wurden fünf Tiere verwendet, für den 16 Stunden-Wert vier. Es ist jeweils die relative mBD14-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase gezeigt.

Für die Untersuchung einer möglichen Stimulation der mBD14-Protein-Expression wurden Hautproben aus den Flanken der Mäuse entnommen, in Paraffin eingebettet und für immunhistochemische Färbungen mit mBD14-Antikörpern verwendet. Da die Paraffinschnitte der BALB/c-Mäuse zum Teil eine sehr ungleichmäßige Färbung zeigten, wurden zusätzlich immunhistologische Färbungen an barrieregestörten SKH-1-Mäusen durchgeführt, welche aufgrund ihrer Haarlosigkeit nicht vor Versuchsbeginn rasiert werden mussten. Die Abbildung 5.20 zeigt einen Anstieg der mBD14-Proteinexpression 4, 12 und 48 Stunden nach einer akuten Störung der Hautbarriere der SKH-1-Mäuse.

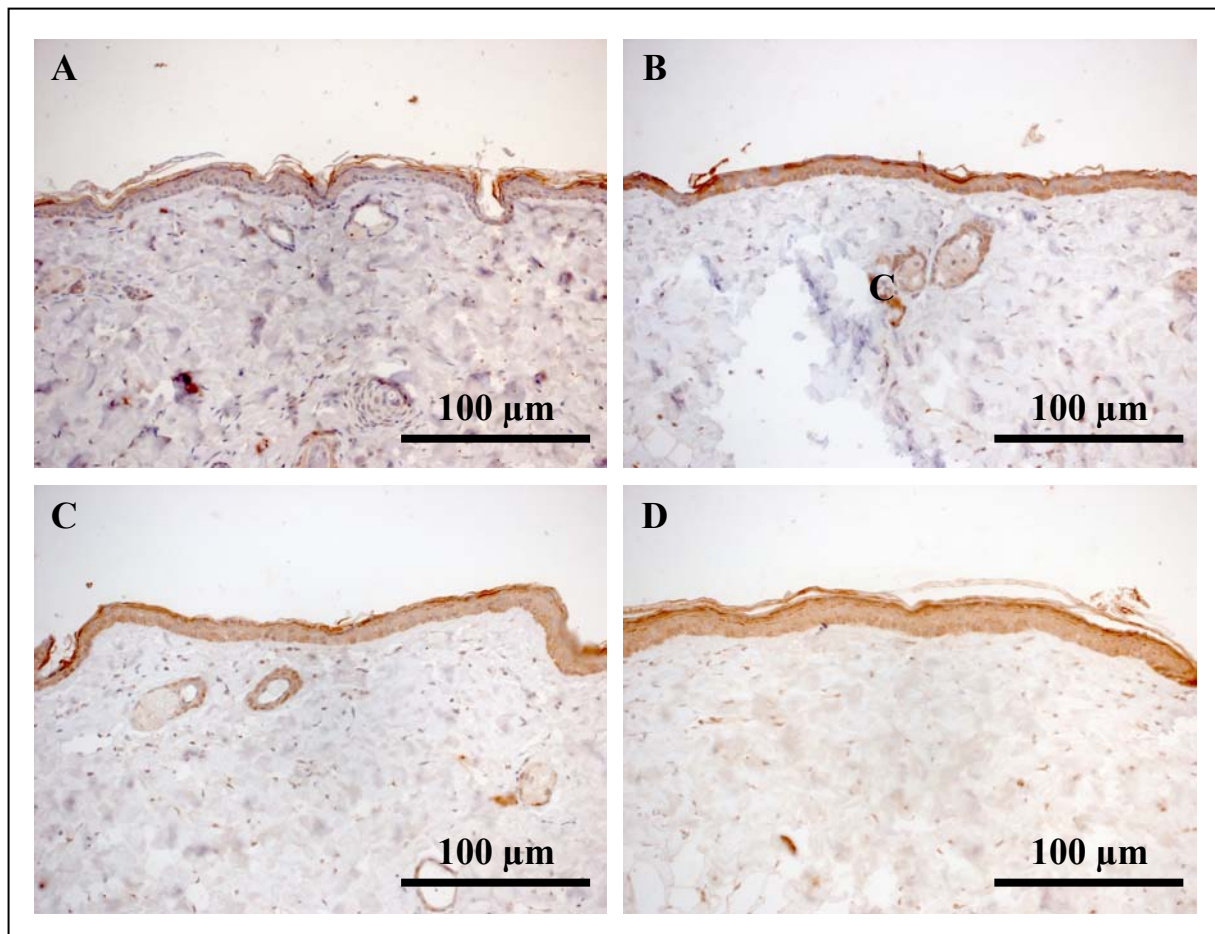


Abbildung 5.20: Die mBD14-Protein-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere induziert werden. Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen von SKH-1-Maushautschnitten mit affinitätsgereinigten mBD14-Antikörpern. In (A) ist die Färbung einer Hautprobe von einer unbehandelten Maus zu sehen. (B) zeigt die Färbung einer Hautprobe vier Stunden nach einer Störung der Hautbarriere durch eine Behandlung mit Klebeband, (C) 12 Stunden und (D) 48 Stunden danach.

5.1.4.4.2 mBD14 wird durch eine chronische Barrierestörung der Maushaut induziert

Füttert man haarlose SKH-1-Mäuse mit einer essentiell Fettsäure-armen Diät (EFAD) entwickeln diese eine gerötete, schuppige Haut mit einer chronischen Störung der Hautbarriere (Feingold et al., 1986). Dies ist vergleichbar mit dem Hautbild einer Neurodermitis beim Menschen. Die Haut ist ebenfalls viel stärker von Mikroorganismen besiedelt als die Haut normal gefütterter SKH-1-Mäuse (Bibel et al., 1989). Für die Untersuchung der Expression von β -Defensinen an Maushaut mit einer chronischen Störung der Hautbarriere wurden freundlicherweise Hautproben von EFAD-Mäusen von Herrn Dr. Meingassner vom Novartis Forschungsinstitut (Wien, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Vor der Entnahme der Hautproben wurde der transepidermale Wasserverlust als Marker der gestörten Barriere gemessen (Tewa-Meter TM210, Courage & Khazaka, Köln), sowie der pH-

Wert der Hautoberfläche und die Hydratation des *Stratum corneums* (Corneometer CM 825, Courage & Khazaka, Köln). Alle diese Messparameter der EFAD-Mäuse waren signifikant unterschiedlich zu denen der normal gefütterten SKH-1-Mäuse. Der transepidermale Wasserverlust war in den EFAD-Mäusen drei Mal so hoch, was zeigt, dass die Hautbarriere deutlich gestört ist. Zudem war der pH-Wert von 6,1 auf 6,6 erhöht. Die Messung der Hydratation des *Stratum corneums* zeigte deutlich, dass die Tiere unter trockener Haut litten.

Real time-PCR-Untersuchungen zeigten, dass die mBD14-mRNA-Expression in Maushaut durch die chronische Störung der Barriere bei einer EFAD-Fütterung der Tiere induziert wurde.

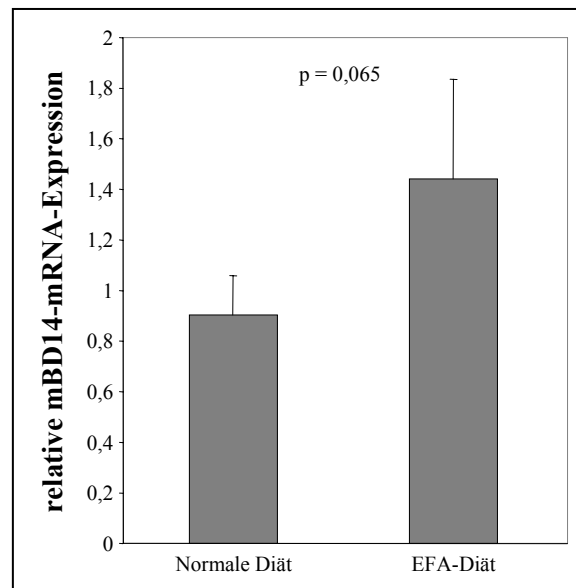


Abbildung 5.21: Die mBD14-mRNA-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine chronische Störung der Barriere induziert werden. Die Abbildung zeigt, dass die mBD14-mRNA-Expression in SKH-1-Mäusen bei einer chronischen Störung der Hautbarriere hervorgerufen durch eine EFA-Diät leicht erhöht war. Die Erhöhung war jedoch nicht signifikant. Als Kontrollgruppe dienten vier Tiere, die eine normale Fütterung erhielten, vier Tiere erhielten die spezielle EFA-Diät. Es ist jeweils die relative mBD14-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase gezeigt.

Mit immunhistologischen Färbungen von Gewebeschnitten der Flanken der beiden Mausgruppen mit mBD14-Antikörpern wurde die mBD14-Protein-Expression analysiert. Es konnte eine deutlich stärkere mBD14-Protein-Expression in der Gruppe mit chronischer Barrierestörung nachgewiesen werden im Vergleich zu der Kontrollgruppe. In den normal gefütterten SKH-1-Mäusen war die Färbung im *Stratum spinosum* und im *Stratum granulosum* lokalisiert. In der Haut der EFAD-gefütterten Tiere konnte mBD14 im gesamten *Stratum basale* detektiert werden.

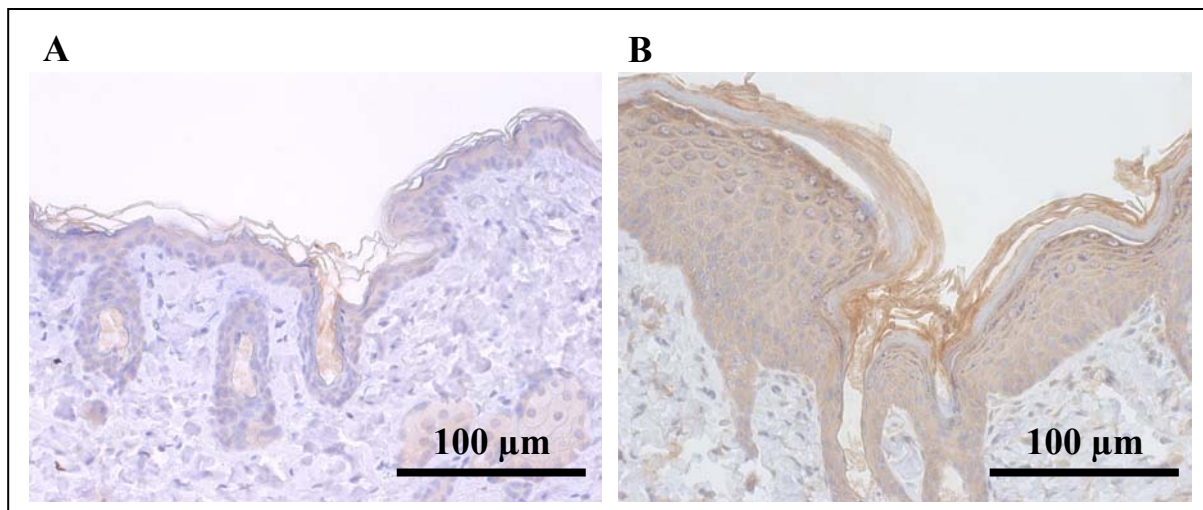


Abbildung 5.22: Die mBD14-Protein-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine chronische Störung der Barriere induziert werden. Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen von SKH-1-Maushautschnitten mit affinitätsgereinigten mBD14-Antikörpern. In (A) ist die Färbung einer Hautprobe aus der Kontrollgruppe, welche mit einer konventionellen Diät gefüttert wurde, zu sehen. (B) zeigt die Färbung einer Hautprobe aus der Gruppe, welche durch die Fütterung einer EFA-Diät eine chronische Hautbarrierestörung entwickelte.

5.1.4.4.3 mBD14 wird durch eine Infektion der Maushaut mit *Pseudomonas aeruginosa* induziert

Da die Induktion von der mBD14-Expression *in vitro* in primären Keratinozyten durch Überstände von *Pseudomonas aeruginosa* möglich ist, sollte untersucht werden, ob diese Beobachtung auch *in vivo* durch eine direkte Infektion der Maushaut möglich ist. Hierfür wurden auf die am Tag zuvor rasierte Flanke einer BALB/c-Maus etwa 2×10^5 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (in 10 μ L LB-Medium) in der logarithmischen Wachstumsphase aufgetragen und nach kurzer Einwirkungszeit mit einem Metallplättchen (Finn Chamber 8 mm, SmartPractice Finland Oy, Tuusula, Finnland), sowie semiokklusiven Folien (Comfeel-Plus, Coloplast, Hamburg) und selbstklebendem medizinischen Pflaster (Durapore, 3M, USA) zur Fixierung abgedeckt. Ein Kontrollareal wurde mit der gleichen Menge sterilem LB-Medium behandelt und ebenfalls auf die selber Weise abgedeckt. Nach sechs Stunden wurden die Maus getötet und die Haut des mit Bakterien behandelten Areal sowie die Haut das Kontrollareals entnommen. Die Hautproben dienten für *real time*-PCR-Untersuchungen der mBD14-mRNA-Expression sowie für immunhistologische Färbungen mit den selbst generierten polyklonalen mBD14-Antikörpern (siehe 5.1.3). Während auf der mRNA-Ebene kein Unterschied in der mBD14-Genexpression beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), war in der Immunhistologie ein deutlicher Anstieg in der mBD14-Protein-Expression zu sehen.

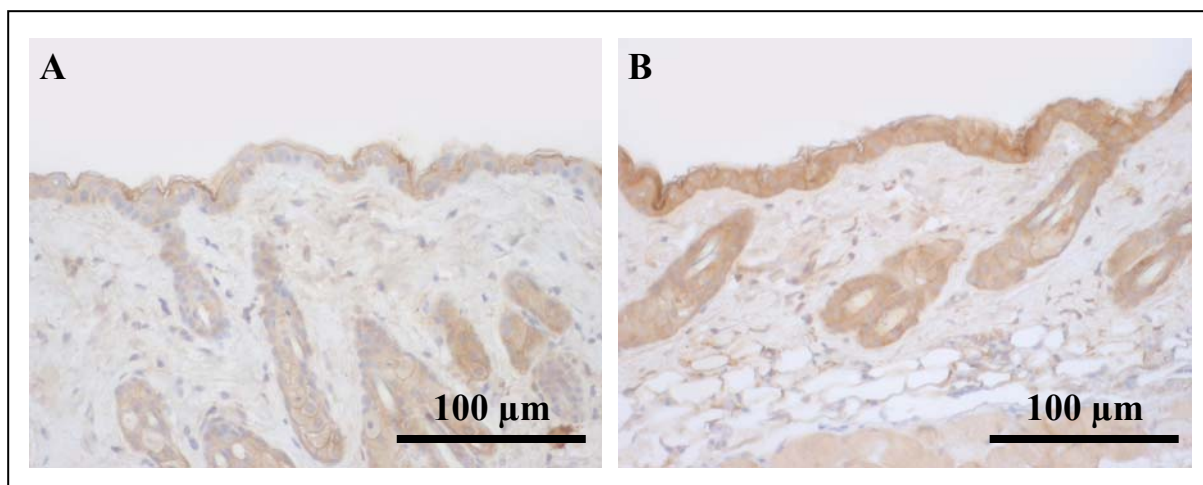


Abbildung 5.23: Die mBD14-Protein-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* induziert werden. Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen von BALB/c-Maushautschnitten mit affinitätsgereinigten mBD14-Antikörpern. In (A) ist die Färbung einer Hautprobe aus dem Kontrollareal, welches mit sterilem LB-Medium behandelt wurde, zu sehen. (B) zeigt die Färbung einer Hautprobe aus dem mit Bakterien behandelten Areal.

5.2 Murines β -Defensin 3

5.2.1 Regulation der mBD3-Genexpression

5.2.1.1 mBD3-mRNA wird in Haut und wenigen anderen Geweben exprimiert

Mit einer Untersuchung verschiedener muriner Gewebe hinsichtlich ihrer mBD3-mRNA-Expression sollte gezeigt werden, in welchen Geweben mBD3-mRNA exprimiert wird. Abbildung 5.24 zeigt mBD3-mRNA-Expression in wenigen der getesteten Gewebe. Eine relativ starke Expression zeigten Thymus und Zunge. Haut zeigte eine moderate Expression. In primären Keratinozyten, Schilddrüse und Oberschenkelmuskel konnte eine schwache Expression detektiert werden. Sehr geringen Expression konnte in Milz nachgewiesen werden.

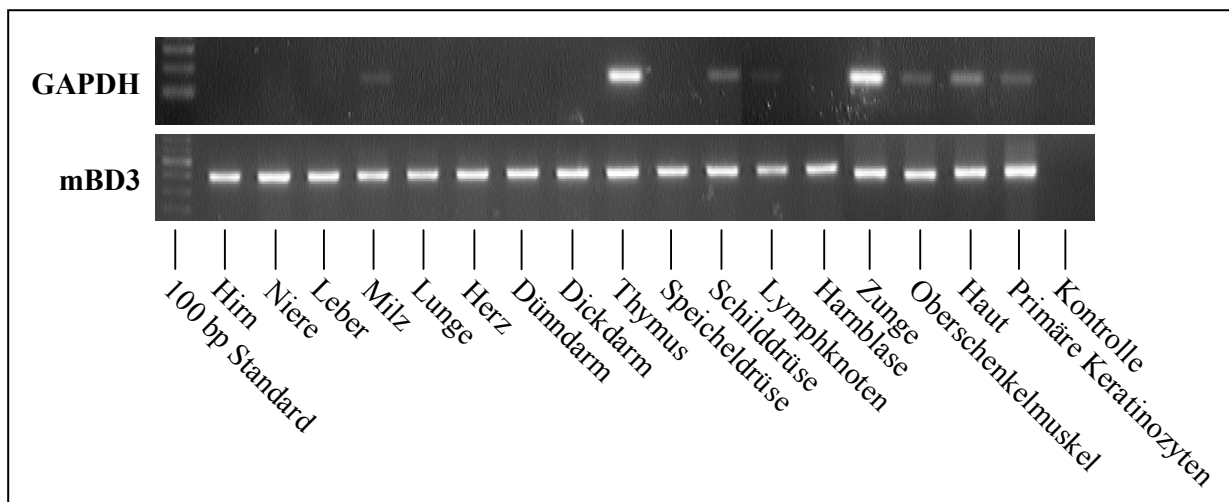


Abbildung 5.24: Analyse der mBD3-Genexpression in verschiedenen murinen Geweben. Die mRNA von verschiedenen Geweben wurde durch den Einsatz einer Reversen Transkriptase in cDNA transkribiert und in einer RT-PCR-Analyse auf mBD3-mRNA-Expression untersucht. Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der spezifischen PCR-Amplifikate von mBD3- und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in verschiedenen Geweben. Es wurden die Primer aus Tabelle 4.1 verwendet.

5.2.1.2 *In vitro*-Induktion von mBD3

5.2.1.2.1 Induktion von mBD3 durch Bakterienüberstände

Die Grundexpression von mBD3 in primären Keratinozyten ist gering (Abbildung 5.24), was vermuten lässt, dass seine Genexpression induzierbar sein könnte. Um zu prüfen, ob die Expression von mBD3 induzierbar ist, wurden primäre Keratinozyten für 6 und 16 Stunden mit Überständen adhärent gewachsener Kulturen (siehe 4.1.6) von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (1:20 in EpiLife-Medium) und von einem klinischen *Staphylococcus aureus*-Isolat (1:10 in EpiLife-Medium) inkubiert. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mit *real time*-PCR-Analysen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten durch Behandlung mit *Pseudomonas aeruginosa*-Überstand induzieren ließ (Abbildung 5.25). Nach sechs Stunden war die mBD3-mRNA 9-fach induziert, nach 16 Stunden 10-fach. Der *Staphylococcus aureus*-Überstand hatte keinen Effekt auf die mBD3-mRNA-Expression (nicht gezeigt).

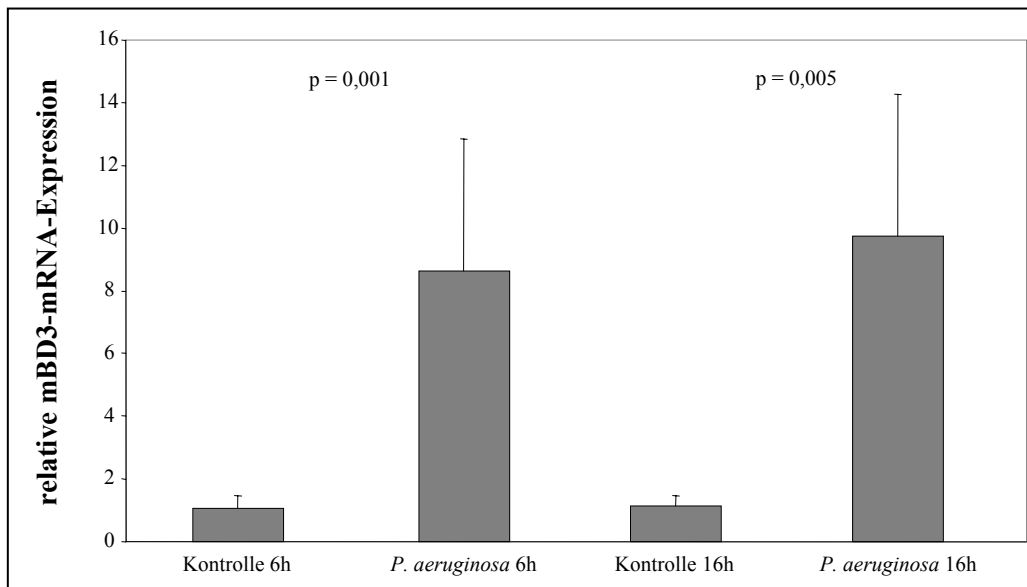


Abbildung 5.25: Überstände von adhärent wachsenden *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterienkulturen induzieren die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten *in vitro*. Primäre Keratinozyten wurden für 6 bzw. 16 Stunden mit Überständen adhärent gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen inkubiert. Mittels *real time*-PCR-Analyse wurde die mBD3-mRNA detektiert und quantifiziert. Abgebildet ist jeweils die relative mBD3-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

5.2.1.2.2 Induktion von mBD3 durch PMA

Im Gegensatz zu mBD14 (Abbildung 5.13) ließ sich die mBD3-mRNA-Expression nicht signifikant durch PMA induzieren. Die Abbildung 5.26 zeigt die Effekte einer Zugabe von 40 ng/mL PMA zum EpiLife-Kulturmedium bei Stimulationen von primären Keratinozyten für 3, 6, 10 und 16 Stunden.

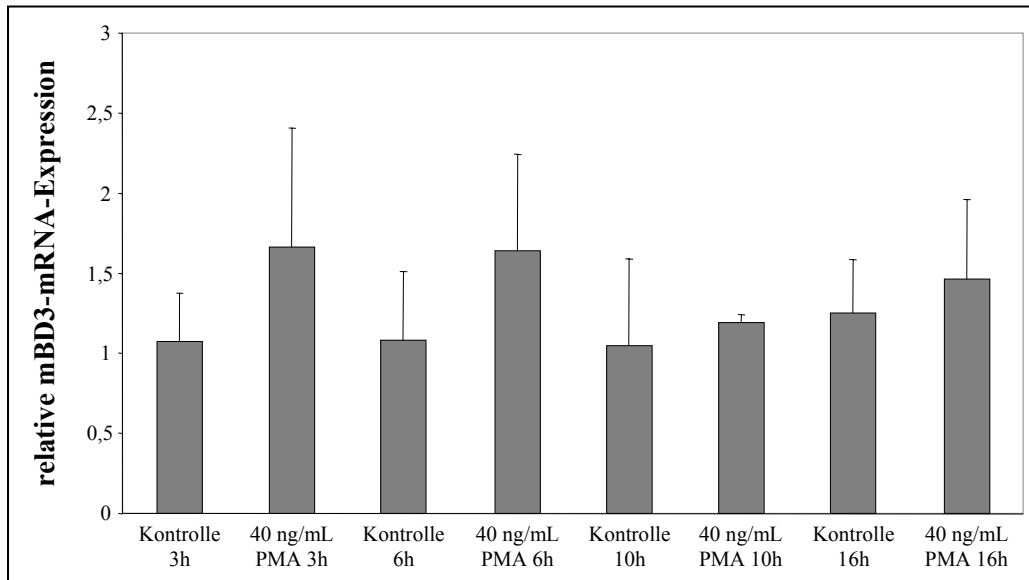


Abbildung 5.26: PMA führt in primären Keratinozyten zu keiner signifikanten Stimulation der mBD3-mRNA-Expression. Primäre Keratinozyten wurden für 3, 6, 10 und 16 Stunden mit 40 ng/mL PMA stimuliert. Die mBD3-mRNA-Expression wurde mittels *real time*-PCR analysiert. Abgebildet ist jeweils die relative mBD3-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

5.2.1.2.3 IFN γ , IL-1 β und TNF α induzieren die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten

Strukturelle und funktionelle Analysen haben gezeigt, dass mBD3 ein Ortholog zu hBD2 ist (Bals et al., 1999). Da bekannt ist, dass sich die hBD2-mRNA-Expression in primären humanen Keratinozyten durch die Zytokine Interferon γ (IFN γ), Interleukin-1 β (IL-1 β) und *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) (Garcia et al., 2001; Harder et al., 2004; Nomura et al., 2003) induzieren lässt, wurde untersucht, ob die mBD3-mRNA-Expression in primären murinen Keratinozyten ebenfalls durch diese Zytokine induzierbar ist.

Wie in Abbildung 5.27 zu sehen ist, führte IFN γ zu einer Induktion der mBD3-mRNA-Produktion, die bis 48 Stunden nach Beginn der Behandlung mit dem Zytokin kontinuierlich anstieg. Nach sechs Stunden konnte noch keine Induktion festgestellt werden. 16 Stunden nach Stimulationsbeginn war die mRNA-Konzentration 2,5-fach höher als in der Kontrolle. Nach 24 Stunden war die Induktion 4,2-fach, nach 48 Stunden 7,3-fach erhöht.

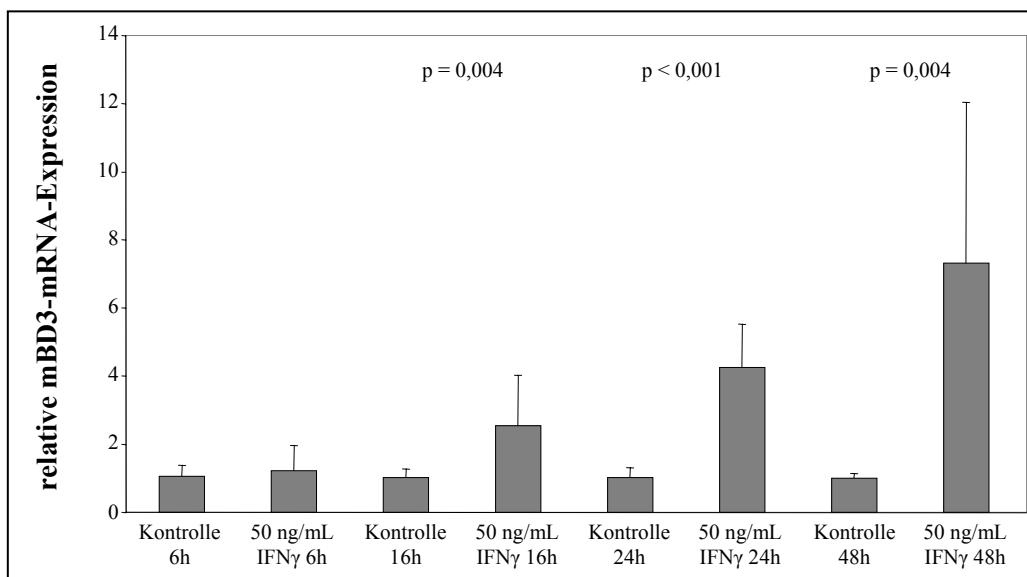


Abbildung 5.27: IFN γ induziert die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit 50 ng/mL IFN γ für 6, 16, 24 und 48 Stunden stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils die relative mBD3-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

IL-1 β bewirkte ebenfalls eine Hochregulation der mBD3-mRNA-Produktion. Sechs Stunden nach Beginn der Stimulation mit 50 ng/mL IL-1 β war die mBD3-mRNA auf das 2,5-fache der Kontrolle angestiegen, nach 16 Stunden war sie 4,5-fach erhöht (Abbildung 5.28).

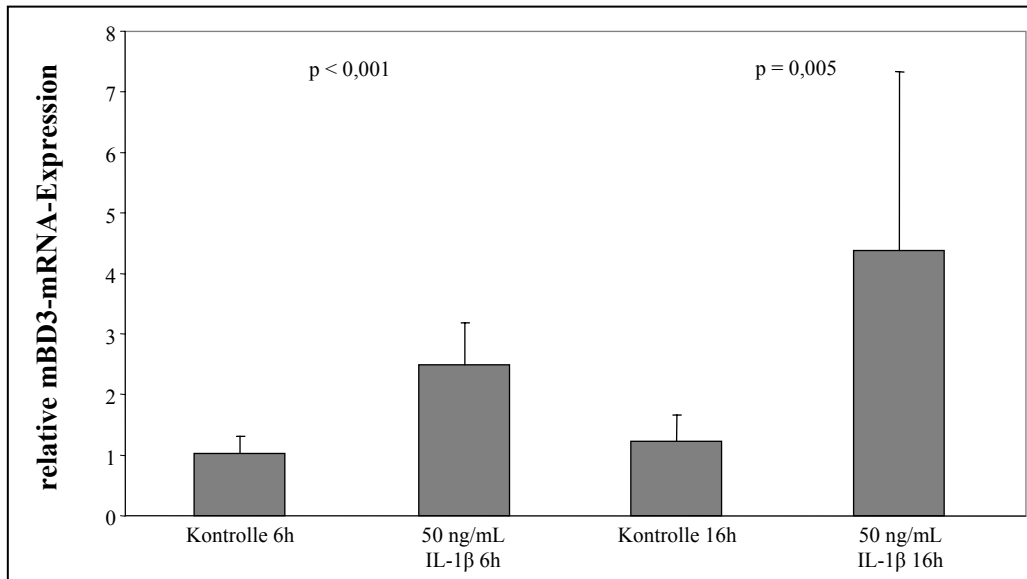


Abbildung 5.28: IL-1 β induziert die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit 50 ng/mL IL-1 β für 6 und 16 Stunden stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils die relative mBD3-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Auch durch die Stimulation mit 10 ng/mL TNF α konnte die mBD3-mRNA-Expression induziert werden. Sechs Stunden nach Beginn der Stimulation war die mBD3-mRNA-Konzentration noch unverändert. Nach 16 Stunden war sie 3,8-fach induziert (Abbildung 5.29).

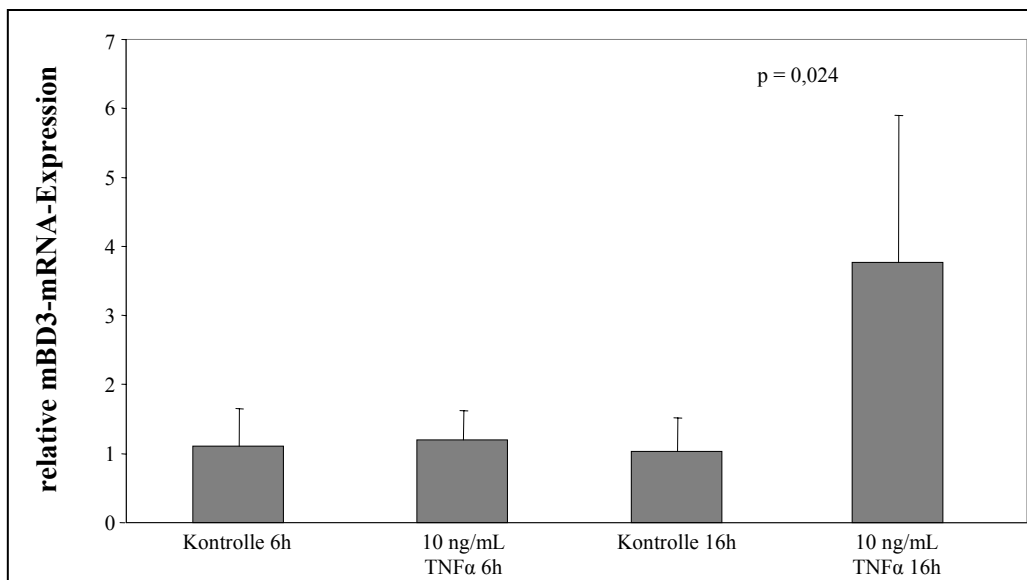


Abbildung 5.29: TNF α induziert die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit 10 ng/mL TNF α für 6 und 16 Stunden stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils die relative mBD3-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

5.2.1.3 mBD3 wird in gesunder Maushaut kaum exprimiert

Um zu untersuchen, ob mBD3 in Maushaut exprimiert wird, wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffinhautpräparaten gesunder BALB/c-Mäuse mit mBD3-Antikörpern durchgeführt (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA). Es war lediglich eine sehr schwache mBD3-Immunreaktivität zu sehen.

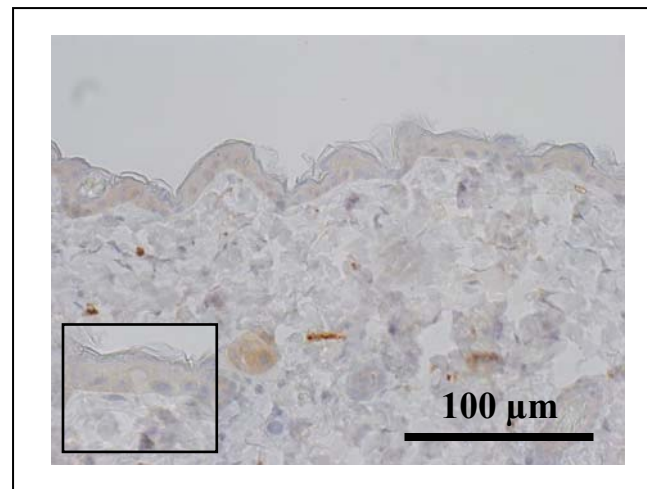


Abbildung 5.30: Immunreaktivität von mBD3 in gesunder Maushaut. Die Abbildung zeigt die immunhistochemische Färbung eines Paraffin-Hautschnittes von gesunder BALB/c-Maushaut mit mBD3-Antikörpern.

5.2.1.4 *In vivo*-Induktion von mBD3

5.2.1.4.1 mBD3 wird durch eine akute Barrierestörung der Maushaut induziert

In *real time*-PCR-Untersuchungen zeigte sich, dass die mBD3-mRNA-Expression in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere nach sechs Stunden 100-fach induziert wurde. 16 Stunden nach Barrierestörung war die mRNA noch 8-fach hochreguliert (Abbildung 5.31).

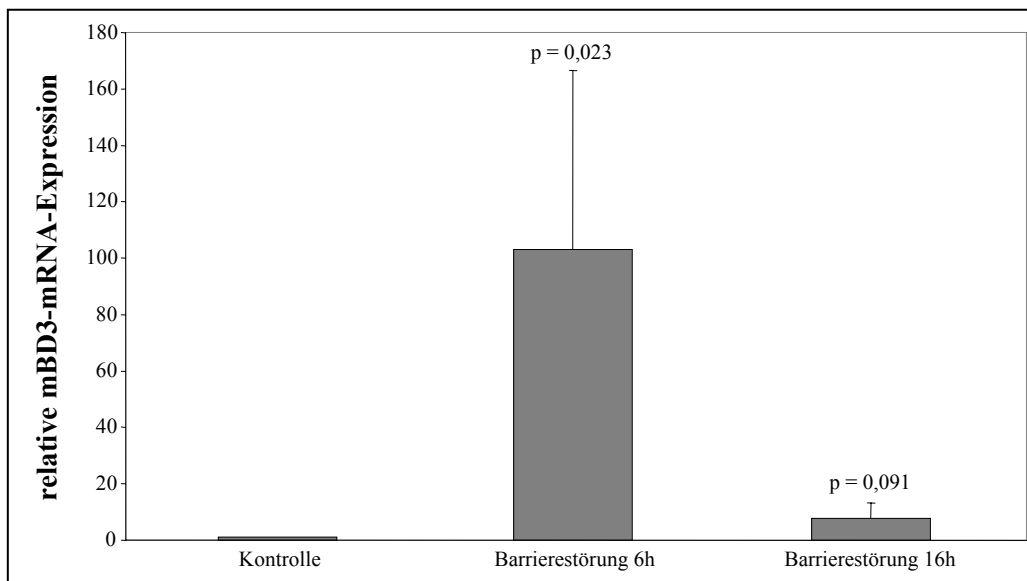


Abbildung 5.31: Die mBD3-mRNA-Expression wird *in vivo* in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere induziert. Dargestellt ist die Induktion der mBD3-mRNA 6 und 16 Stunden nach einer Barrierestörung der Maushaut durch *tape stripping*. Es wurde jeweils eine Flanke der Mäuse mit Cellophanklebeband behandelt, die andere Flanke diente als unstimulierte Kontrolle und wurde gleich 1 gesetzt. Für den 6 Stunden-Wert wurden fünf Tiere verwendet, für den 16 Stunden-Wert vier. Es ist jeweils die relative mBD3-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase gezeigt.

Um die mBD3-Induktion auch auf der Proteinebene zu untersuchen, wurden Hautproben aus den Flanken der Mäuse entnommen, in Paraffin eingebettet und für immunhistochemische Färbungen mit mBD3-Antikörpern verwendet. Da die Paraffinschnitte der BALB/c-Mäuse, ähnlich wie für die mBD14-Proteinexpression beschrieben (siehe 5.1.4.4.1), zum Teil eine sehr ungleichmäßige Färbung zeigten, wurden zusätzlich immunhistologische Färbungen an barrieregestörten SKH-1-Mäusen durchgeführt, welche aufgrund ihrer Haarlosigkeit nicht vor Versuchsbeginn rasiert werden mussten. Die Abbildung 5.32 zeigt einen starken Anstieg der mBD3-Proteinexpression 4, 12 und 48 Stunden nach einer akuten Störung der Hautbarriere der SKH-1-Mäuse. Nach 48 Stunden ist ein Rückgang der Proteinexpression zu beobachten.

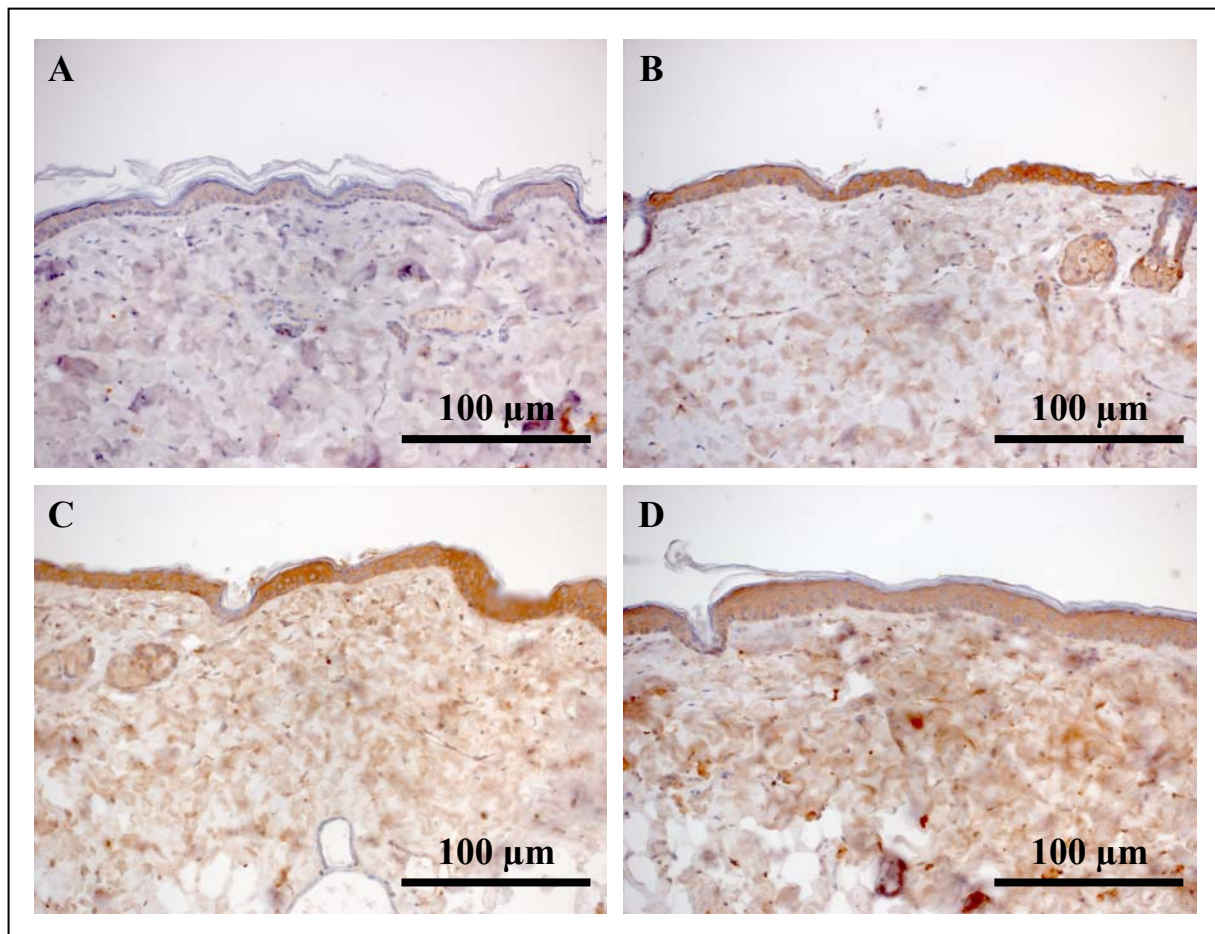


Abbildung 5.32: Die mBD3-Protein-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere induziert werden. Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen von SKH-1-Maushautschnitten mit mBD3-Antikörpern. In (A) ist die Färbung einer Hautprobe von einer unbehandelten Maus zu sehen. (B) zeigt die Färbung einer Hautprobe vier Stunden nach einer Störung der Hautbarriere durch eine Behandlung mit Klebeband, (C) 12 Stunden und (D) 48 Stunden danach.

5.2.1.4.2 mBD3 wird durch eine chronische Barrierestörung der Maushaut induziert

Real time-PCR-Untersuchungen zeigten, dass die mBD3-mRNA-Expression in Maushaut auch durch eine chronische Störung der Barriere durch eine EFAD-Fütterung der Tiere signifikant induziert wurde (siehe 5.1.4.4.2).

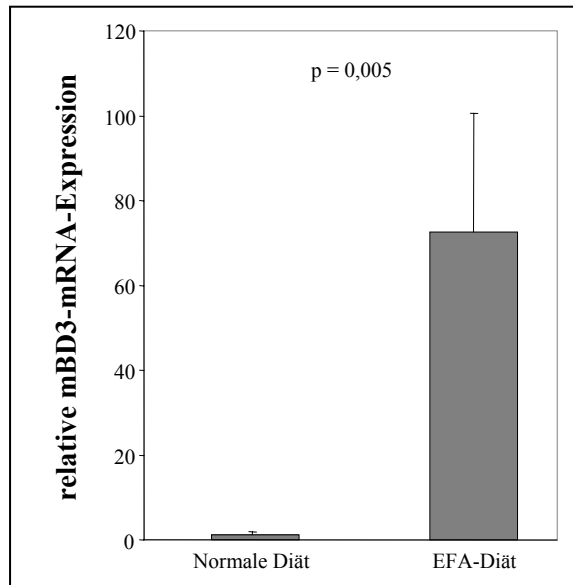


Abbildung 5.33: Die mBD3-mRNA-Expression wird *in vivo* in Maushaut durch eine chronische Störung der Barriere induziert. Die Abbildung zeigt, dass die mBD3-mRNA-Expression in SKH-1-Mäusen bei einer chronischen Störung der Hautbarriere, hervorgerufen durch eine EFA-Diät, signifikant erhöht ist. Als Kontrollgruppe dienten fünf Tiere, die eine normale Fütterung erhielten, ebenfalls fünf Tiere erhielten die spezielle EFA-Diät. Es ist jeweils die relative mBD3-mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase gezeigt.

In immunhistologischen Färbungen von Gewebeschnitten der Flanken der beiden Mausgruppen mit mBD3-Antikörpern konnte im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine erhöhte mBD3-Protein-Expression in der Gruppe mit chronischer Barrierestörung nachgewiesen werden. In den Kontrolltieren zeigte sich eine Immunreaktivität im *Stratum spinosum* und im *Stratum granulosum*. In den EFAD-Mäusen wurde zusätzlich das *Stratum basale* angefärbt. Die stärkste Immunreaktivität war im unteren Bereich des *Stratum spinosum* zu verzeichnen.

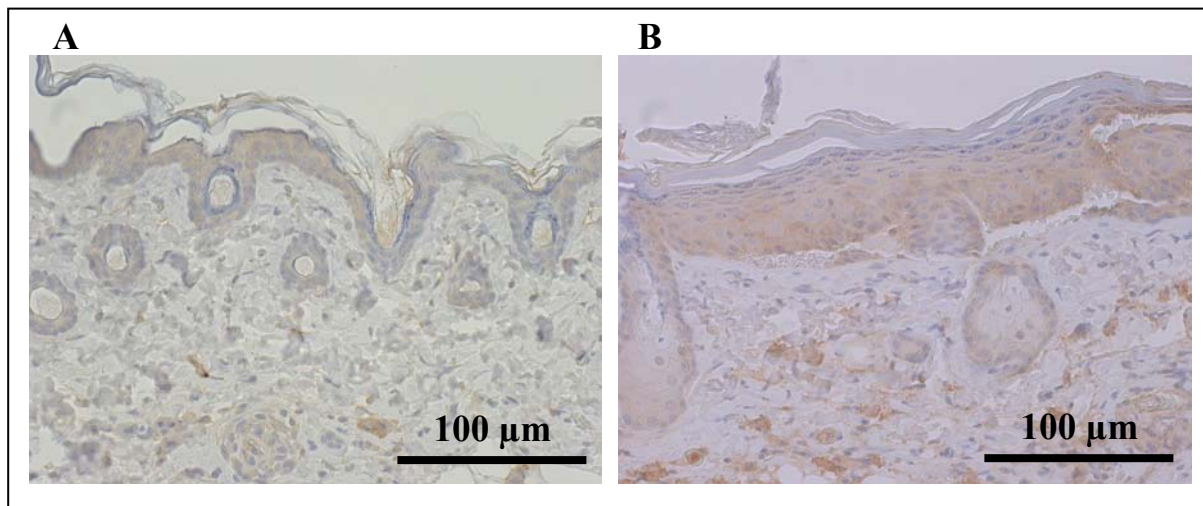


Abbildung 5.34: Die mBD3-Protein-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine chronische Störung der Hautbarriere induziert werden. Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen von SKH-1-Maushautschnitten mit mBD3-Antikörpern. In (A) ist die Färbung einer Hautprobe aus der Kontrollgruppe, welche mit einer konventionellen Diät gefüttert wurde, zu sehen. (B) zeigt die Färbung einer Hautprobe aus der Gruppe, welche durch die Fütterung einer EFA-Diät eine chronische Barrierestörung entwickelte.

5.3 Isolierung neuer antimikrobieller Proteine der Maushaut

Für die Untersuchung, ob antimikrobielle Proteine auf der Maushaut vorhanden sind, wurde die Haut der zuvor rasierten Flanken von BALB/c-Mäusen unterschiedlichen Alters und Geschlechts mit 10 mM Natriumphosphat-Puffer gespült. Nach einer Aufkonzentrierung der Waschflüssigkeit erfolgte die Trennung der Proteine über eine C₂/C₁₈-Umkehrphasen-HPLC (siehe 4.2.5.5).

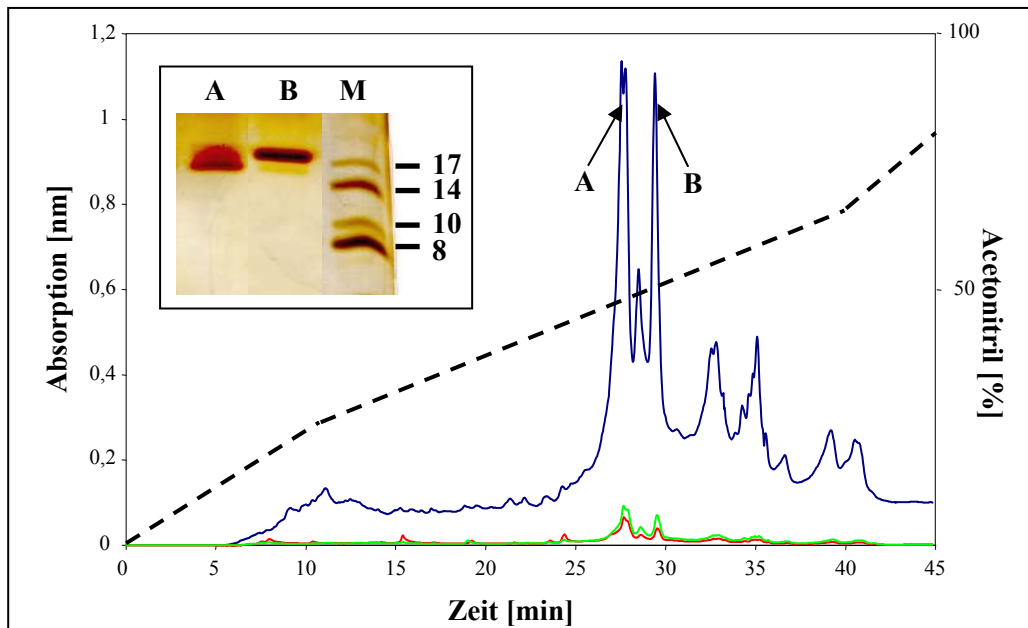


Abbildung 5.35: Chromatogramm einer C₂/C₁₈-Umkehrphasen-HPLC von der Hautwaschungsflüssigkeit von BALB/c-Mäusen. Dargestellt ist die kontinuierlich gemessenen Absorptionen bei 215 nm (blau), 256 nm (rot) und 280 nm (grün), sowie der Acetonitrilgehalt des Eluats (gestrichelte Linie). Die Tricine-SDS-PAGE zeigt die beiden Fraktionen A und B (M = Molekulargewichtsstandard in kDa). Die beiden Peaks A und B werden im Folgenden näher untersucht.

Die massenspektrometrische Analyse der isolierten Maushautproteine errechnete für die zweite Hälfte des Doppelpicks mit der Retentionszeit von ca. 28 Minuten (A) eine Masse von 16766,77 Da. Für das Protein des Peaks mit einer Retentionszeit von ca. 29 Minuten (B) wurde eine Masse von 17270,20 Da errechnet. Die errechneten Massen stimmten mit den in der Tricine-SDS-PAGE beobachteten Massen überein.

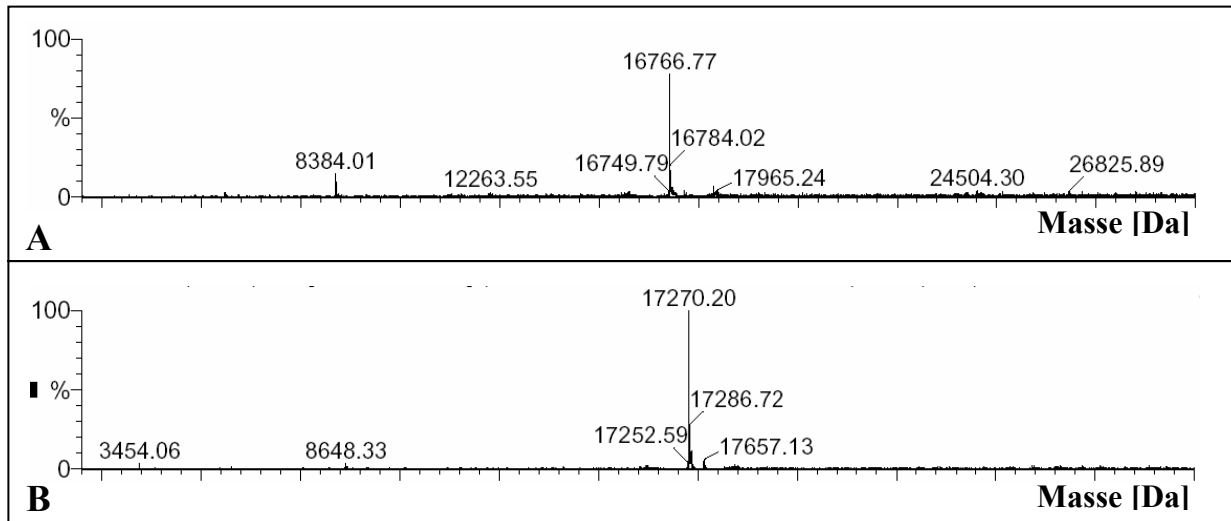


Abbildung 5.36: Massenspektrometrische Untersuchung ausgewählter Peaks aus der C₂C₁₈-Umkehrphasen-HPLC der Maushautwaschflüssigkeit. Gezeigt sind die Massenspektren der MaxEnt1-Auswertung von Peak A und Peak B aus Abbildung 5.35. Peak A zeigte eine Masse von 16766,77 Da, Peak B eine Masse von 17270,20 Da.

Zur Identifizierung der Peaks wurden diese mit Trypsin verdaut und anschließend mittels Nanoelektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie ein „Massen-Mapping“ vorgenommen und MS-MS-Analysen untersucht (siehe 4.2.6.7.2).

Es zeigte sich, dass es sich bei dem Protein des ersten Peaks vermutlich um das *odorant binding protein 1a* (OBP1a; Ensembl-Gen-ID: ENSMUSG 00000067684) handelt. Abbildung 5.37 zeigt die Massen der erhaltenen Trypsinspaltprodukte, die Sequenzen und deren Zuordnung zu der Proteinsequenz.

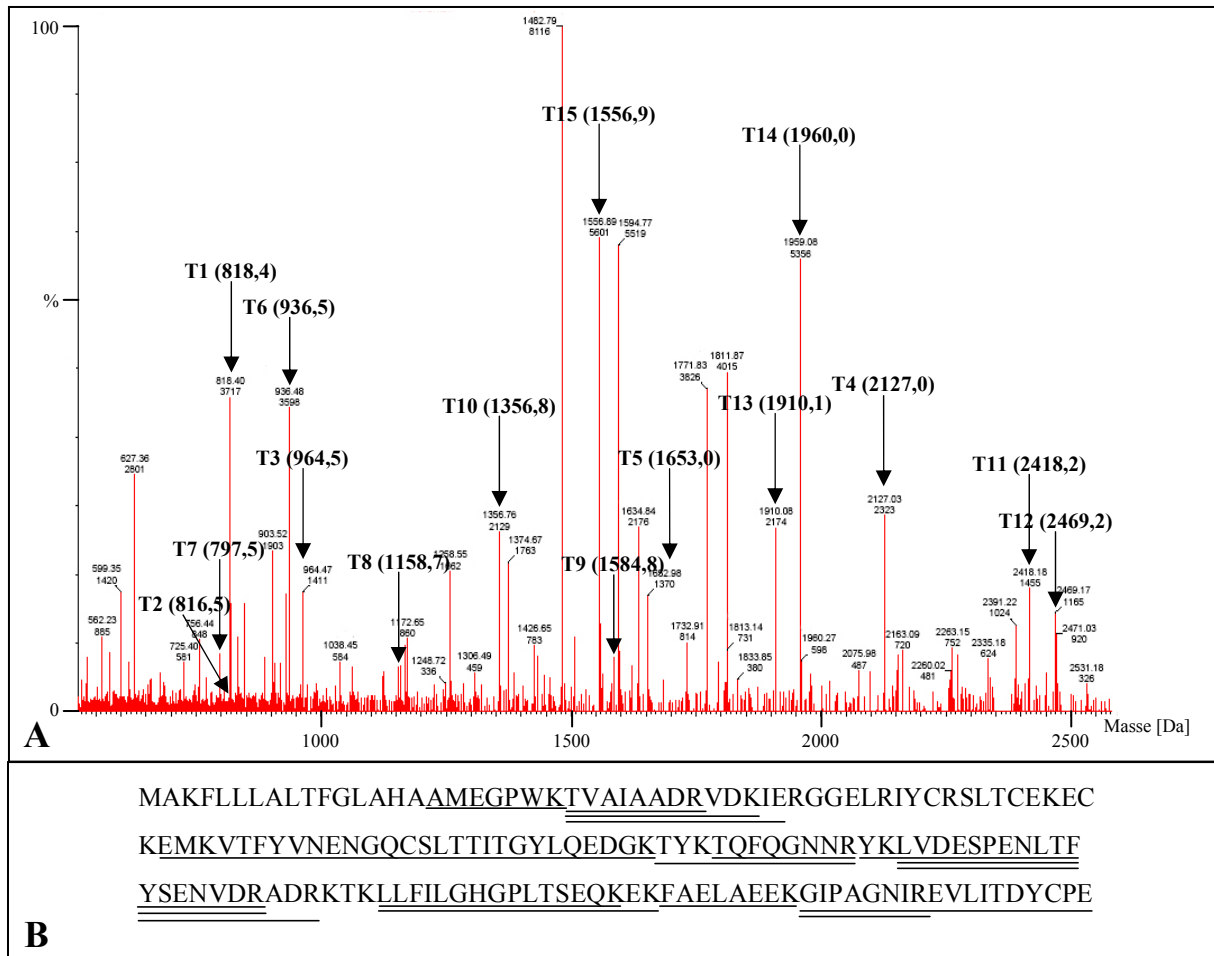


Abbildung 5.37: Spaltprodukte des Trypsinverdaus der Probe aus Abbildung 5.36 (A). Gezeigt sind die Fragmente der ersten mit Trypsin verdauten Fraktion aus C_2C_{18} -Umkehrphasen-HPLC. Dargestellt sind die jeweiligen Massen und die relative Intensität der Signale in der Probe (A). Die Fragmente T1 bis T15 konnten dem *odorant binding protein 1a* (OBP1a) zugeordnet werden. Die jeweiligen Sequenzen der Spaltprodukte wurden in der Sequenz von OBP1a im Einaminosäurecode unterstrichen (B). Die Sequenzen der Spaltprodukte finden sich ein weiteres Mal in Tabelle 5.3.

Fragment	Sequenz	Masse [Da]
T1	AMEGPWK	818,4
T2	TVAIAADR	816,5
T3	TQFQGNNR	964,5
T4	LVDESPENLTFYSENVDR	2127,0
T5	LLFILGHGPLTSEQK	1652,9
T6	FAELAEK	936,5
T7	GIPAGNIR	797,5
T8	TVAIAADRVDK	1158,7
T9	EMKVTFYVNENGLTITGYLQEDGK	1584,8
T10	TYKTQFQGNNR	1356,7
T11	YKLVDESPENLTFYSENVDR	2418,2
T12	LVDESPENLTFYSENVDRADR	2469,2
T13	LLFILGHGPLTSEQKEK	1910,1
T14	GIPAGNIREVLITDYCPE	1960,0
T15	TVAIAADRVDKIER	1556,9

Tabelle 5.3: Sequenzen der Trypsin-verdauten Fragmente von OBP1a und die dazugehörigen, im Spektrum detektierten Massen. Aufgelistet sind die Sequenzen der aufgetretenen Spaltprodukte im Einaminosäurecode und die dazugehörigen Massen der aus dem Trypsinverdau des ersten Peaks resultierenden Fragmente (T1-T15), die im Spektrum gefunden werden konnten.

Das OBP1a hat eine Masse von 18469,03 Da. Für die Analyse möglicher putativer Signalpeptidschnittstellen wurde das Programm SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) verwendet. Es zeigte sich, dass die ersten 16 Aminosäuren des Peptids als Signalpeptid abgespalten werden. Somit ergab sich für das Protein ohne Signalpeptid eine Masse von 16769,96 Da. Die Masse verringert sich um weitere 4 Da, wenn vier der fünf im Peptid enthaltenen Cysteine als Disulfide verbrückt vorliegen, so dass die Masse des maturen Proteins 16765,96 Da beträgt. Sie weicht demnach nur wenig von der gemessenen Masse 16766,7 Da (Abbildung 5.36) ab.

Nach dem Verdau des zweiten Peaks (Abbildung 5.36 (B)) mit Trypsin zeigte sich, dass das Protein nicht effizient verdaut werden konnte, es blieb noch viel unverdautes Protein zurück, wie massenspektrometrische Analysen zeigten (nicht gezeigt). Mit den Trypsin-verdauten Fragmenten konnte mittels Nanoelektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie dennoch ein „Massen-Mapping“ und MS-MS-Analysen durchgeführt werden (siehe 4.2.6.7.2). Es zeigte sich, dass es sich bei dem Protein vermutlich um das *novel protein similar to odorant binding*

protein 1b (NPSOBP1b; Ensembl-Gen-ID: ENSMUSG00000079519) handelt. Abbildung 5.38 zeigt die Massen der erhaltenen Trypsinspaltprodukte und deren Zuordnung zu der Proteinsequenz von NPSOBP1b.

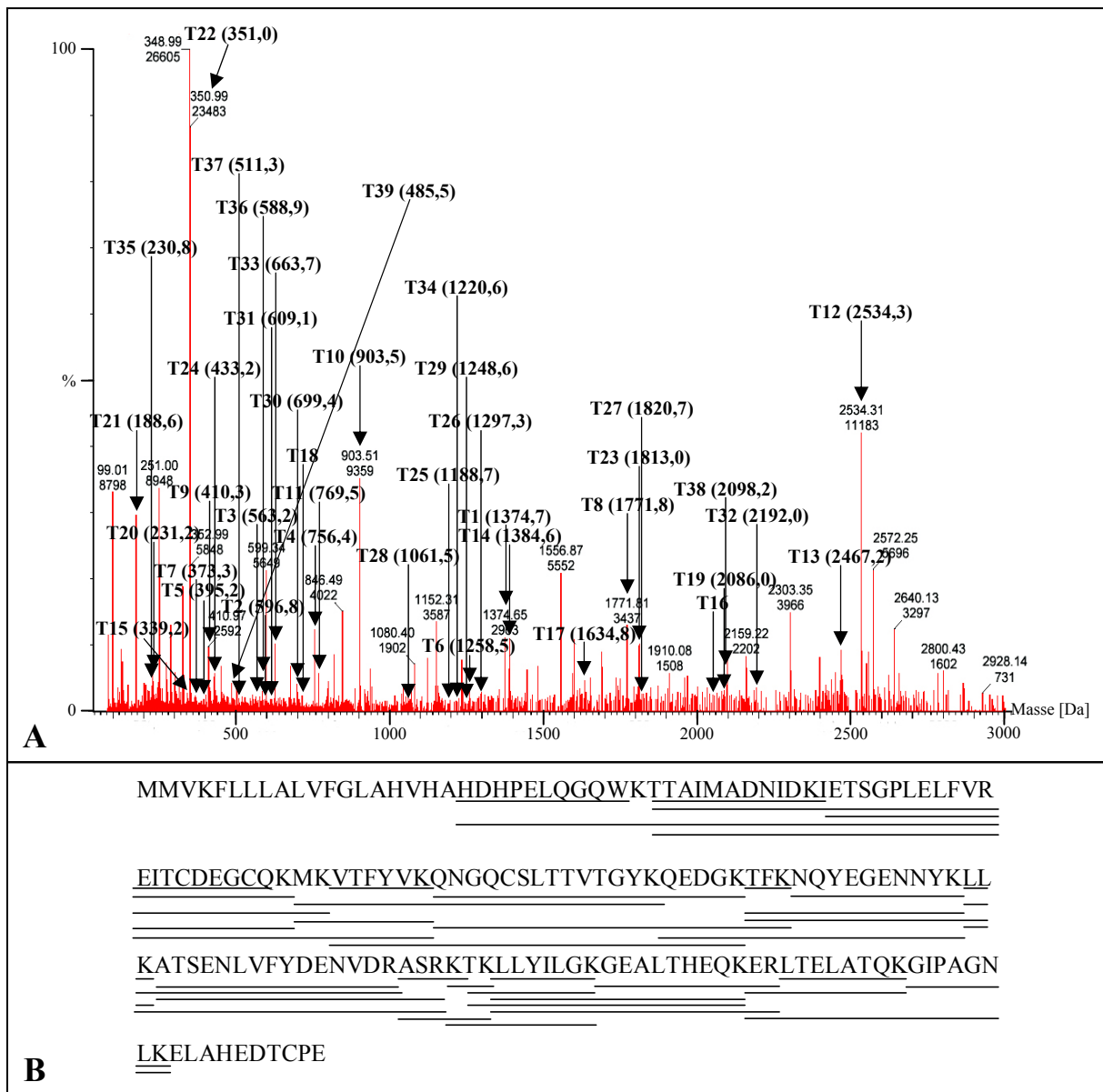


Abbildung 5.38: Spaltprodukte des Trypsinverdaus der Probe aus Abbildung 5.36 (B). Gezeigt sind die Fragmente der zweiten mit Trypsin verdauten Fraktion aus C_2C_{18} -Umkehrphasen-HPLC. Dargestellt sind die jeweiligen Massen und die relative Intensität der Signale in der Probe (A). Die Fragmente T1-T39 konnten dem *novel protein similar to odorant binding protein 1b* (NPSOBP1b) zugeordnet werden. Die Sequenz des NPSOBP1bs inklusive der gefundenen Fragmente (unterstrichen) im Einaminoäurecode ist ebenfalls dargestellt (A). Die Sequenzen der Spaltprodukte finden sich ein weiteres Mal in Tabelle 5.4 aufgelistet.

Fragment	Sequenz	Masse [Da]
T1	HDHPELQGQWK	1374,7
T2	TTAIMADNIDK	596,8
T3	EITCDEGCQK	563,2
T4	VTFQVK	756,4
T5	TFK	395,2
T6	NQYEGENNYK	1258,5
T7	LLK	373,3
T8	ATSENLVFYDENVDR	1771,8
T9	LLYILGK	410,3
T10	LTELATQK	903,5
T11	GIPAGNLK	769,5
T12	TTAIMADNIDKIETSGPLELFVR	2534,3
T13	IETSGPLELFVREITCDEGCQK	2467,2
T14	EITCDEGCQKMK	1384,6
T15	MKVTFYVK	339,2
T16	QNGQCSLTTVTGYKQEDGK	2057,0
T17	TFKNQYEGENNYK	1634,8
T18	LLKATSENLVFYDENVDR	709,4
T19	ATSENLVFYDENVDRASR	2086,0
T20	ASRK	231,2
T21	KTK	188,6
T22	TKLLYILGK	350,2
T23	LLYILGKGEALTHEQK	1813,0
T24	GEALTHEQKER	433,2
T25	ERLTELATQK	1188,7
T26	HDHPELQGQWKTTAIMADNIDKIETSGPLELFVR	1297,3
T27	TTAIMADNIDKIETSGPLELFVRREITCDEGCQK	1820,9
T28	EITCDEGCQKMKVTFYVK	1061,5
T29	MKVTFYVKQNGQCSLTTVTGYK	1248,6
T30	VTFYVKQNGQCSLTTVTGYKQEDGK	699,4
T31	QNGQCSLTTVTGYKQEDGKTFK	609,1
T32	QEDGKTFKNQYEGENNYK	2192,0
T33	TFKNQYEGENNYKLLK	663,7
T34	LLKATSENLVFYDENVDRASR	1220,6
T35	ASRKTK	230,8
T36	KTKLLYILGK	588,9

T37	TKLLYILGKGEALTHEQK	511,3
T38	LLYILGKGEALTHEQKER	2098,2
T39	ERLTELATQKGIPAGNLK	483,5

Tabelle 5.4: Sequenzen der Trypsin-verdauten Fragmente von NPSOBP1b und die dazugehörigen, im Spektrum gefundenen Massen. Aufgelistet sind die Sequenzen der aufgetretenen Spaltprodukte im Einaminoäurecode und die dazugehörigen Massen der aus dem Trypsinverdau des zweiten Peaks resultierenden Fragmente (T1-T39), die im Spektrum gefunden werden konnten.

In massenspektrometrische Untersuchungen wurde für das Protein eine Masse von 19366,09 Da errechnet. Für die Analyse möglicher putativer Signalpeptidschnittstellen wurde das Programm SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) eingesetzt. Es zeigte sich, dass die ersten 19 Aminosäuren des Peptids als Signalpeptid abgespalten werden. Somit ergab sich für das mature Protein eine Masse von 17273,41 Da. Die Masse verringert sich um weitere 4 Da, wenn alle vier Cysteine als Disulfide verbrückt vorliegen, so dass die Masse des maturen Proteins 17269,4 Da beträgt. Sie weicht demnach nur minimal von der gemessenen Masse 17270,2 Da (Abbildung 5.36) ab.

Zudem konnte in ersten antimikrobiellen Tests gezeigt werden, dass diese Fraktion eine antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* aufweist.

5.3.1 Funktionelle Charakterisierung von OBP1a und NPSOBP1b

Für die Charakterisierung der beiden auf der Maushaut entdeckten Proteine in Hinblick auf mögliche Aufgaben *in vivo* und für die Generierung polyklonaler Antikörper wurden die Proteine rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt.

5.3.1.1 Rekombinate Expression von OBP1a

Zu Beginn wurde das OBP1a-Gen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und für die Klonierung verwendet. Hierfür wurden die Oligonukleotid-Primer so generiert, dass lediglich der Teil von OBP1a amplifiziert wurde, welcher für das mature Protein ohne Signalsequenz codiert, welches in der Maushautwaschflüssigkeit entdeckt wurde (Abbildung 5.36 (A)). Es wurde ein Produkt von 444 Basenpaaren amplifiziert, welches der Länge des maturen Proteins von 147 Aminosäuren entspricht. PCR-Produkt und Vektor wurden für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, unter Verwendung der T4-DNA-Ligase ligiert und in *Escherichia coli* Top10F' transformiert.

Nach der Überprüfung des korrekten Einbaus des Gens in den Vektor durch eine Kolonie-PCR wurde die Richtigkeit der Sequenz des insertierten Produktes durch Sequenzierung überprüft.

Um eine Expression zu ermöglichen wurde der Vektor in den Expressionstamm *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS transformiert. Die Kontrolle der erfolgreichen Überexpression vom OBP1a-pSUMO3-Fusionsprotein erfolgte in einer SDS-PAGE (nicht gezeigt). Die höchste Proteinausbeute ergab sich nach dreistündiger Expressionsdauer bei 37 °C nach einer Induktion durch IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,5. Das Fusionsprotein wurde zunächst mit Hilfe seines „His-Tag“ über eine Nickel-Affinitätsäule und im Anschluss über eine C₈-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. Der N-terminale Fusionsteil konnte durch die Behandlung des Fusionsproteins mit der SUMO-Protease 2 abgespalten werden. Es folgte eine weitere Aufreinigung über eine C₄-Umkehrphasen-HPLC. Das rekombinante mBD14 eluierte bei einem Acetonitrilgehalt von etwa 60 %. Es wurde in einer massenspektrometrischen Analyse eine Masse von 16766 Da errechnet.

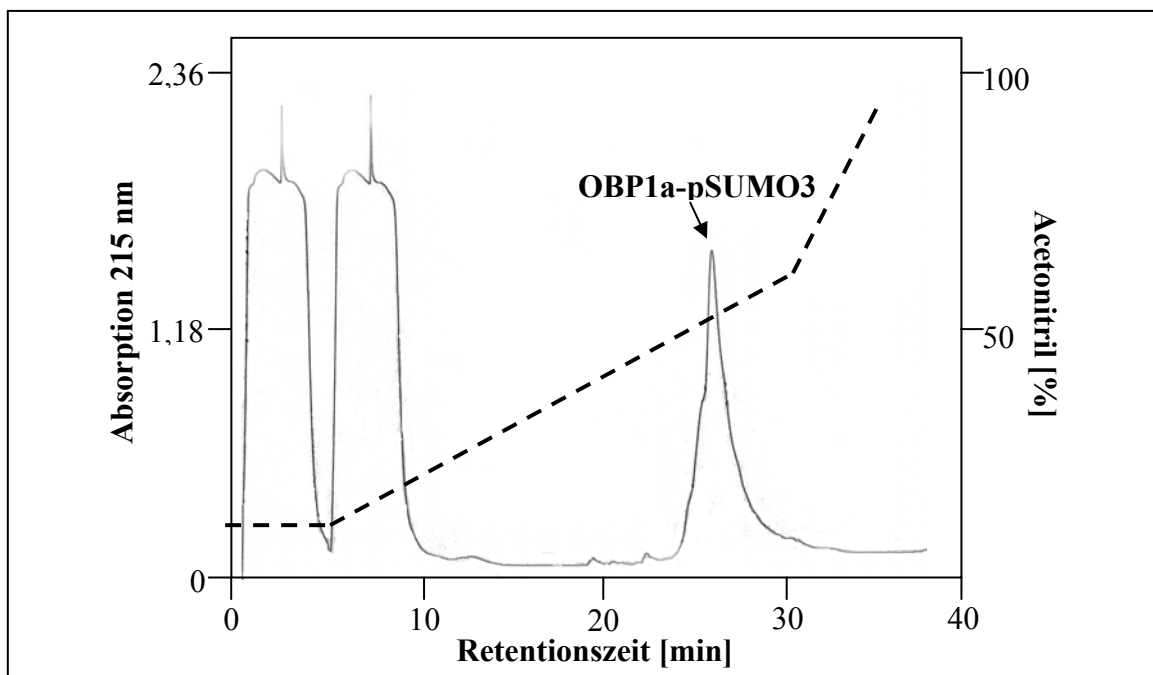


Abbildung 5.39: Chromatogramm der Aufreinigung des OBP1a-pSUMO3-Fusionsproteins über C₈-Umkehrphasen-HPLC. Dargestellt ist die kontinuierlich gemessene Absorption bei 215 nm und der Acetonitrilgehalt des Eluats (gestrichelte Linie). Der breite Peak bei einer Retentionszeit von 25 Minuten enthält ausschließlich das Fusionsprotein.

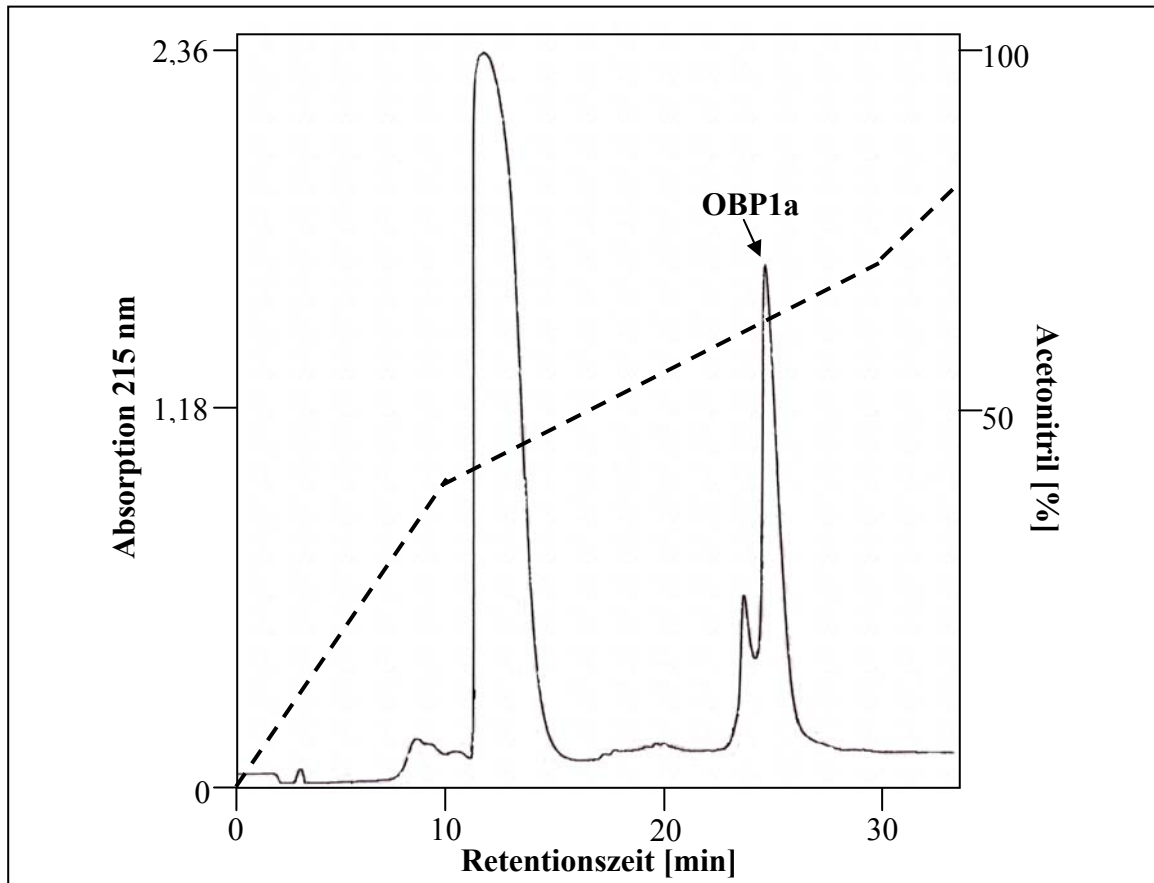


Abbildung 5.40: Chromatogramm der Aufreinigung von rekombinantem OBP1a über C₄-Umkehrphasen-HPLC nach proteolytischer Abspaltung des „His-Tags“. Dargestellt ist die kontinuierlich gemessene Absorption bei 215 nm und der Acetonitrilgehalt des Eluats (gestrichelte Linie). Der Peak bei einer Retentionszeit von 27 Minuten enthält ausschließlich rekombinantes OBP1a mit zwei Disulfidbrücken (16766 Da).

Für das aufgereinigte OBP1a wurde mittels einer massenspektrometrischen Analyse eine Masse von 16765,7 Da berechnet.

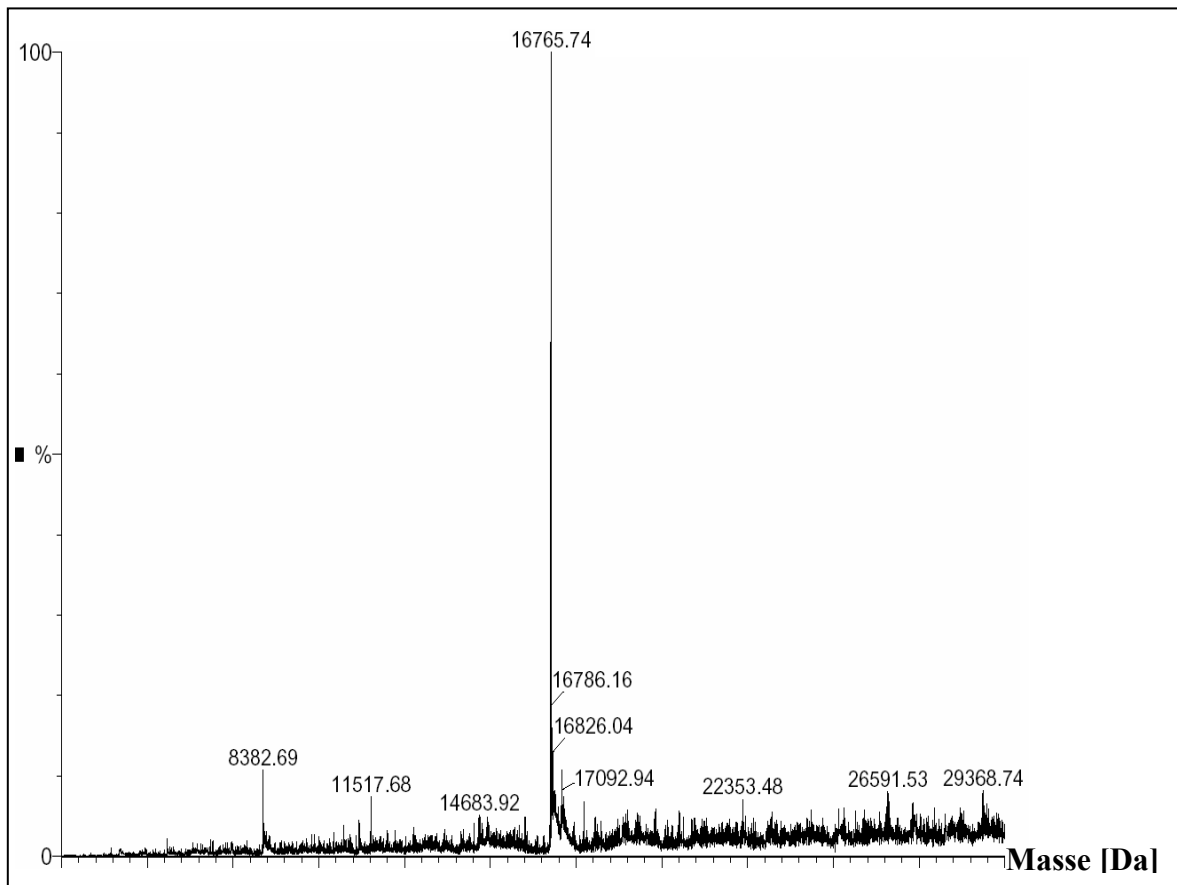


Abbildung 5.41: Massenbestimmung von OBP1a mittels QTOF-Massenspektrometrie. Die Masse von aufgereinigtem rekombinantem OBP1a wurde mittels Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie in einem Quadropol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF II, Micromass, Milford, USA) im positiven Ionen-Modus durchgeführt. Gezeigt ist eine Messung von C₄-Umkehrphasen-HPLC-aufgereinigtem OBP1a. Es wurde eine Masse von 16765,7 Da errechnet.

5.3.1.2 Rekombinate Expression von NPSOBP1b

Das NPSOBP1b-Gen wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und für die Klonierung verwendet. Die Primer wurden so generiert, dass lediglich der Teil von NPSOBP1b amplifiziert wurde, welcher für das mature Protein ohne Signalsequenz codiert, welches in der Maushautwaschflüssigkeit entdeckt wurde (Abbildung 5.36 (B)). Es wurde ein Produkt von 456 Basenpaaren amplifiziert, welches der Länge des maturen Proteins von 152 Aminosäuren entspricht. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu der rekombinanten Expression von OBP1a (siehe 5.3.1.1).

Der N-terminale Fusionsteil konnte bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nicht durch eine Behandlung des Fusionsproteins mit der SUMO-Protease 2 abgespalten werden. Hier bedarf es noch weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen.

5.3.1.3 Herstellung polyklonaler OBP1a-Antikörper

Für die Herstellung von spezifischen OBP1a-Antikörpern wurde eine Ziege vier Mal mit OBP1a-pSUMO3-Fusionsprotein im Abstand von jeweils drei Wochen immunisiert. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurde der Ziege Blut entnommen und das Serum in einem Dotblot auf seine Immunreaktivität für rekombinantes OBP1a untersucht. Der Abbildung 5.42 ist zu entnehmen, dass das Immunserum der Ziege OBP1a noch in Konzentrationen von 5 ng erkannte.

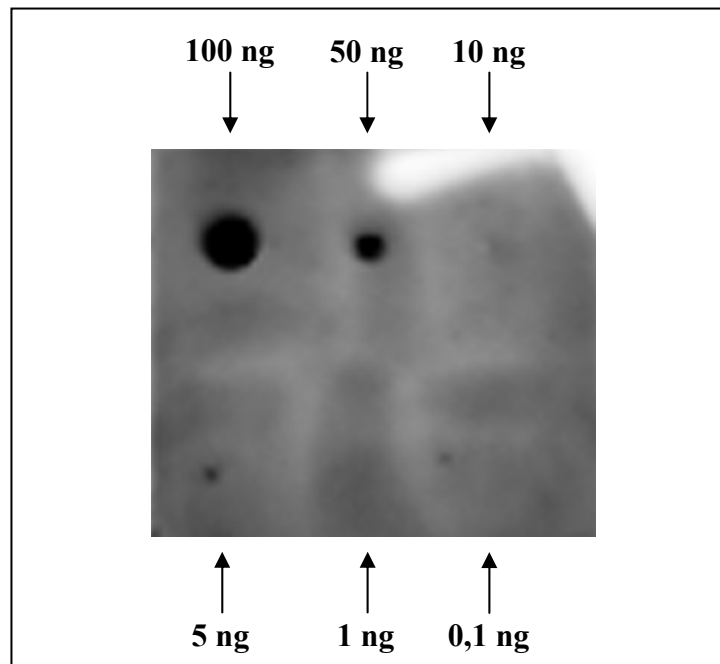


Abbildung 5.42: Das Serum der mit rekombinanten OBP1a-SUMO3-Fusionsprotein immunisierten Ziege detektiert rekombinantes OBP1a. Für die Überprüfung des Ziegenserums auf eine erfolgreiche Immunisierung mit OBP1a wurde die Immunreaktivität des Serums gegen verschiedene Konzentrationen (0,1, 1, 5, 10, 50 und 100 ng) von rekombinanten OBP1a in einem Dotblot untersucht. Man kann erkennen, dass das Ziegenserum in der Lage war, OBP1a in Konzentrationen von bis zu 5 ng zu detektieren.

Im Anschluss soll analog zu der Aufreinigung von mBD14-spezifischen Antikörpern (siehe 5.1.3) eine Reinigung der OBP1a-spezifischen Antikörper über Affinitätsäulen erfolgen.

6. Diskussion

6.1 Antimikrobielle Proteine der Haut

Eine Vielzahl von Studien der letzten Jahre zeigte, dass die menschliche Haut über verschiedene Abwehrmechanismen gegen das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen verfügt (Harder et al., 1997; Sahly et al., 2003; Gläser et al., 2005). Von besonderer Bedeutung sind Moleküle, die das Wachstum von Mikroorganismen auf der Hautoberfläche kontrollieren. Zu diesen Molekülen gehören die antimikrobiellen Proteine. Die größte Gruppe der antimikrobiellen Proteine sind die Defensine und die Cathelicidine (Pivarcsi et al., 2004). Defensine sind kleine, kationische und Cystein-reiche Mitglieder einer hochkonservierten Genfamilie. Innerhalb dieser Genfamilie gibt es drei Untergruppen, die α - und β -Defensine, die sich in der Lage ihrer drei Disulfidbrücken unterscheiden (Ganz, 2003), sowie die zyklischen θ -Defensine (Selstedt, 2004). Von den sechs bekannten β -Defensinen des Menschen werden hBD1, hBD2, hBD3 und hBD4 von Keratinozyten exprimiert und besitzen potente antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, Hefen und Viren (Elias, 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass mit mBD1, mBD2, mBD3 und mBD4 ebenfalls β -Defensine in der Maushaut exprimiert werden (Dorschner et al., 2003; Aberg et al., 2007; Gariboldi et al., 2008).

Auch Cathelicidine sind kleine, kationische Peptide. Sie besitzen ein hoch konserviertes, N-terminales Cathelinsegment, das Cysteinproteaseaktivität aufweist und ein antimikrobiell aktives C-terminales Segment (Zaiou und Gallo, 2002). In der menschlichen Haut wird das Cathelicidin hCAP-18 (*human cationic antimicrobial protein*) exprimiert (Zaiou und Gallo, 2002; Gallo und Nizet, 2003). Das C-terminale Fragment von hCAP-18, welches unter dem Namen LL-37 bekannt ist, weist sowohl ein breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität, als auch antivirale Aktivität auf (Howell et al., 2004). Auch die Maushaut exprimiert mit dem Ortholog von hCAP-18, dem CRAMP (*cathelin-related antimicrobial peptide*), ein antimikrobiell aktives Cathelicidin (Gallo et al., 1997).

Humane Keratinozyten sind zudem in der Lage, Proteaseinhibitoren zu produzieren, die zum Beispiel Elastase inhibieren und somit Gewebsschädigungen vorbeugen können. In dieser Gruppe konnte für die Serinproteaseinhibitoren Antileukoprotease (ALP)/SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*) (Wiedow et al., 1998) und Elafin/SKALP (*skin-derived anti-leukoproteinase*) (Wiedow et al., 1990) eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden.

Die ALP/SLPI zeigte antimikrobielle Aktivität sowohl gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, als auch gegen Hefen (Wiedow et al., 1998).

Ein weiteres sehr wichtiges antimikrobielles Protein der menschlichen Haut ist das S100A7-Protein, welches aus Hautschuppen von Psoriasispatienten gewonnen wurde und auch Psoriasin genannt wird. Es hemmt spezifisch das Wachstum von *Escherichia coli* (Gläser et al., 2005). Als Maus-Ortholog zu Psoriasin wurde das murine S100A15-Protein vorgestellt, welches strukturelle und funktionelle Homologie zu seinem humanen Ortholog aufweist (Wolf et al., 2006). Es konnte bis heute jedoch nicht isoliert werden.

Auch RNase 7 stellt ein sehr bedeutendes antimikrobielles Protein der gesunden menschlichen Haut dar. Im Jahre 2002 wurde RNase 7 aus *Stratum corneum*-Extrakten isoliert. RNase 7 besitzt eine ausgesprochen potente, breite antimikrobielle Aktivität (Harder et al., 2002). Im Mausgenom konnte bis heute kein Ortholog für RNase 7 gefunden werden.

Beinahe sämtliche antimikrobielle Proteine der Haut werden von Keratinozyten der Epidermis produziert. Zu Beginn des neuen Jahrtausends konnte jedoch gezeigt werden, dass auch Schweißdrüsen die Möglichkeit haben, antimikrobielle Proteine zu produzieren. In menschlichen Schweißdrüsen wurde das anionische antimikrobielle Protein Dermcidin entdeckt. Die prozessierte Form dieses Peptids besitzt eine potente antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* und wird mit dem Schweiß abgegeben (Schitteck et al., 2001).

Sowohl in der menschlichen Haut als auch in der Maushaut existieren mehrere konstitutiv exprimierte antimikrobielle Proteine, wie zum Beispiel hBD1 und sein murines Ortholog mBD1. Andere antimikrobielle Proteine werden wiederum in gesunder Haut nicht oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert und erst im Rahmen von Entzündungsreaktionen oder Infektionen vermehrt gebildet. Zu dieser Gruppe gehören hBD2 und hBD3 im Menschen und ihre korrespondierenden Proteine mBD3 und mBD14 in der Maus. Es wird vermutet, dass die induzierbaren antimikrobiellen Moleküle eine wichtige Funktion in der epithelialen Erregerabwehr besitzen.

6.2 Charakterisierung der murinen β -Defensine 3 und 14

6.2.1 mBD14 ist das Mausortholog zu hBD3

Mausmodelle sind für Analysen der *in vivo* Relevanz antimikrobieller Peptide ausgesprochen nützlich, da verschiedene Untersuchungen, zum Beispiel Infektionsversuche oder genetisch Veränderungen, aus ethischen und technischen Gründen nur im Tier durchgeführt werden können. Es ist somit wichtig, die jeweiligen Mausorthologe der bedeutenden humanen antimikrobiellen Proteine zu finden. Verdeutlicht wird dies zum Beispiel an der Maus, in der das Gen für CRAMP, dem Ortholog des humanen Cathelicidin LL-37, ausgeschaltet wurde. Dieses Mausmodell wurde intensiv genutzt, um die Rolle der Cathelicidine in der angeborenen Immunität zu studieren (Chromek et al., 2006; Nizet et al., 2001). Ein weiteres Beispiel ist die Matrilysin-defiziente Maus, welcher die Cryptine fehlen. Auch sie wurde für intensive Studien zur *in vivo* Relevanz der α -Defensine genutzt (Wilson et al., 1999).

Die humanen β -Defensine sind kleine, kationische Proteine, welche mit ihrer potenten antimikrobielle Aktivität den Menschen vor Infektionen schützen können (Pazgier et al., 2006). Hierbei könnte insbesondere hBD3 mit seiner breiten antimikrobiellen Aktivität in nanomolaren Konzentrationen eine große Rolle spielen (Harder et al., 2001; Maisetta et al., 2006; Sahly et al., 2003). Um Untersuchungen an zu hBD3 korrespondierenden Mausmodellen überhaupt zu ermöglichen, sollte im Rahmen dieser Arbeit nach dem murinen Ortholog zu hBD3 gesucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch mehrere Untersuchungen gezeigt, dass mBD14 ein murines Ortholog zu hBD3 ist. Eine BLAST-Suche der Mausdatenbank mit der Aminosäuresequenz von hBD3 zeigte mit 69 % die größte Identität für mBD14. Eine Suche mit der Sequenz des maturen Proteins ergab letztlich nur einen Treffer: mBD14. Auch die Ergebnisse zur antimikrobiellen Aktivität von mBD14 waren vergleichbar mit denen von hBD3. Sie war der von hBD3 sowohl im Hinblick auf das Spektrum, als auch auf die Werte für die LD₉₀ sehr ähnlich. Beide β -Defensine zeigen ein sehr breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität mit Wirksamkeit gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistente *Enterococcus faecalis* (Tabelle 5.1; Hinrichsen et al., 2008). Auch mechanistisch zeigten sich Parallelen bei den beiden β -Defensinen, so waren die Abhängigkeiten von pH-Wert und Natriumchloridkonzentration nahezu identisch (Tabelle 5.2; Hinrichsen et al., 2008). Mit der Analyse der mBD14-Genexpression in verschiedenen

Mausgewebe wurde ein weiteres Indiz für die aufgestellte Theorie gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass mBD14 in Zunge, Thymus, Tonsillen, Niere und Haut exprimiert wird (Abbildung 5.10), alles Gewebe in denen ebenfalls eine Expression von hBD3 nachgewiesen werden konnte (Harder et al., 2001). Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von mBD14 *in vitro* in primären murinen Keratinozyten durch zum Teil gleiche Stimuli, wie hitzeinaktivierte Bakterien, IFN γ , PMA und TGF α (Abbildungen 5.11-5.16), in ähnlicher Weise wie die hBD3-Expression in primären humanen Keratinozyten induziert werden konnte (Harder et al., 2001; Harder et al., 2004).

Die mBD14-Genexpression in primären Keratinozyten konnte jedoch nicht durch IL-1 β und TNF α induziert werden. Für diese proinflammatorischen Zytokine wurde gezeigt, dass sie dazu befähigt sind, die hBD3-Genexpression in primären Keratinozyten zu induzieren (Harder et al., 2001; Harder et al., 2004). Allerdings ist die Induktion der hBD3-Genexpression durch IL-1 β und TNF α im Vergleich zu anderen Stimuli wie IFN γ und PMA gering ausgeprägt (Harder et al., 2004). Für Stimulationen mit IL-1 β und TNF α existieren kontroverse Ergebnisse. Die Gruppe von Sørensen konnte keine Induktion der hBD3-Genexpression durch diese beiden Zytokine nachweisen, was mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zu mBD14 übereinstimmt (Sørensen et al., 2003a). Geht man aber von der geringgradigen Stimulation der hBD3-Expression durch IL-1 β und TNF α aus (5-15-fach; Harder et al., 2004), so ist die Diskrepanz in der hBD3/mBD14-Geninduktion möglicherweise auf deren unterschiedliche basale Grundexpression zurückzuführen. Die Grundexpression von mBD14 ist wesentlich höher als die von hBD3. Für hBD3 ist in unstimulierten Keratinozyten lediglich eine geringe Grundexpression beschrieben worden (Harder et al., 2001). Im Gegensatz dazu war die mBD14-Grundexpression in unstimulierten Keratinozyten wesentlich höher und vergleichbar mit der Grundexpression von mBD1 (eigene Beobachtungen), einem konstitutiv exprimierten β -Defensin, welches das murine Ortholog zu hBD1 darstellt (Bals et al., 1998). Mäuse sind von Natur aus potentiell pathogenen Mikroorganismen aufgrund ihrer Lebensbedingungen viel stärker ausgesetzt als der Mensch, was eine mögliche Erklärung für die erhöhte Alarmbereitschaft ihres Körpers durch eine höhere mBD14-Grundexpression in der Haut bieten könnte. Es ist möglich, dass bereits ausreichend mBD14 vorhanden ist und lediglich dann mehr gebildet wird, wenn eine konkretere Bedrohung durch eindringende Mikroorganismen vorhanden ist. Es werden also möglicherweise stärkere Signale benötigt als die untersuchten Konzentrationslevel von IL-1 β und TNF α . Wie bereits erwähnt, ist die Induktion der hBD3-Genexpression durch IFN γ und PMA wesentlich stärker als die durch IL-1 β und TNF α (Harder et al., 2004). Vielleicht ist dies der Grund, warum in primären

Keratinocyten durch diese Stimuli eine Induktion der mBD14-Genexpression beobachtet werden konnte.

Diese Ergebnisse bieten die Basis für Analysen zur *in vivo* Funktion von hBD3 in Mausmodellen. Untersuchungen an mBD14-defizienten oder transgenen Mäusen könnten weitere Erkenntnisse über die Rolle von hBD3 und anderen β -Defensinen *in vivo* liefern.

6.2.2 Regulation von mBD3 und mBD14

Im Menschen gibt es konstitutiv exprimierte antimikrobielle Proteine, wie hBD1, und induzierbare antimikrobielle Proteine, wie hBD2 und hBD3. Dies trifft auch auf die Maus zu. Es konnte gezeigt werden, dass mBD1 wie hBD1 konstitutiv in Maushaut und primären Keratinocyten exprimiert wird und durch unterschiedliche Stimuli nicht induzierbar ist (Daten nicht gezeigt; Morrison et al., 1998). Im Gegensatz zu mBD1 steht mBD3, welches in unstimulierter Maushaut und unstimulierten primären Keratinocyten kaum gebildet wird, und dessen Expression sich ohne Stimulation durch Zytokine oder ähnliches an der Nachweisgrenze befindet (eigene Beobachtungen). Interessanterweise zeigte sich, dass mBD14 hier eine Zwischenposition einnimmt. Es wird von gesunder Haut und primären Keratinocyten in sehr gut nachweisbaren Mengen exprimiert und kann dennoch durch die verschiedensten Stimuli induziert werden.

Die relativ hohe basale Grundexpression von mBD14-mRNA kann durch Stimulation primärer Keratinocyten mit Kulturüberständen *in vitro* von *Pseudomonas aeruginosa*, einem klinisch bedeutsamem Erreger der Haut, und *Staphylococcus aureus*, dem wichtigsten Erreger nosokomaler Infektionen, noch weiter erhöht werden. Für beide Erreger konnte dies in Zellkulturüberständen mit einem ELISA ebenfalls auf der Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildungen 5.11 und 5.12). Die Stärke der Induktion war hierbei abhängig von der Stimulationsdauer. Die Reaktion der Keratinocyten auf die Bedrohung durch Mikroorganismen zeigt, dass sie in der Lage sind, eindringende Mikroorganismen zu erkennen und sich durch eine erhöhte Produktion von antimikrobiellen Proteinen wie mBD14 zu schützen. Auch sechs Stunden nach einer Infektion der Maushaut mit einer *Pseudomonas aeruginosa* Kultur wurde die mBD14-Proteinexpression wie in immunhistologischen Färbungen gezeigt induziert (Abbildung 5.23). Interessanterweise zeigte sich jedoch keine erhöhte mBD14-mRNA-Expression im Gegensatz zu den durchgeführten *in vitro* Stimulationsversuchen.

Über den molekularen Mechanismus der Erkennung von Bakterien durch Keratinozyten ist bisher wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass bestimmte bakterielle *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) durch auf oder in den Keratinozyten exprimierte Rezeptoren (*Pathogen Recognition Receptors* = PPRs) erkannt werden können, und somit eine Schutzreaktion der Zellen ausgelöst wird. Zu den PAMPs gehören zum Beispiel Zellwandbestandteile, nichtmethylierte DNA, RNA und die verschiedensten Proteine (Janeway und Medzhitov, 2002). PPRs gibt es extrazellulär, membranständig oder auch intrazellulär in verschiedenen Zellkompartimenten (Gordon, 2002).

Die vermutlich wichtigste Gruppe der PPRs sind die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), die in Leukozyten und Epithelzellen in unterschiedlichen Mustern exprimiert werden (Medzhitov et al., 1997). Beim Menschen wurden bislang zwölf TLRs entdeckt, wovon TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 10 in Keratinozyten beschrieben wurden (Mempel et al., 2003; Lebre et al., 2006). Über das TLR-Expressions-Muster in murinen Keratinozyten ist bislang nicht so viel bekannt wie bei Menschen, sie exprimieren aber zumindest TLR 2 und 4 konstitutiv (Sumikawa et al., 2006).

Auch intrazelluläre PPRs können für eine Signalweiterleitung verantwortlich sein. Eine wichtige Klasse intrazellulärer PPRs, die in den letzten Jahren insbesondere mit der Pathogenese von Morbus Crohn in Verbindung gebracht wurde, sind die *Nucleotide-binding Oligomerization Domain Protein* (NOD)-Proteine (Murray, 2005). Die NODs binden wie die TLRs über eine C-terminale Leucin-reiche Region (LRR) PAMPs und können über eine N-terminale *Caspase-recruitment-Domäne* (CARD) NF- κ B und MAP-Kinasen aktivieren (Girardin et al., 2001; Inohara et al., 1999; Ogura et al., 2001). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch primäre humane Keratinozyten in der Lage sind NOD2 zu exprimieren, und dass NOD2 die hBD2-Regulation vermittelt (Voss et al., 2005). Eine andere Gruppe konnte zusätzlich zeigen, dass NOD2 auch von murinen Keratinozyten exprimiert wird (Kim et al., 2008). Es ist bekannt, dass die Induktion der hBD3-Genexpression über TLR 2 vermittelt wird (Menzies et al., 2006), und dass die indirekte Antwort auf eine bakterielle Bedrohung durch die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ über die Aktivierung des JAK-STAT- und des NF- κ B-Weges vermittelt wird (Jia et al., 2001; Albanesi et al., 2007). Es ist zumindest ein Rezeptor bekannt, der die Induktion von mBD3 in Keratinozyten durch bakterielle Lipopeptide vermittelt. Diese ist abhängig vom TLR 2-Myd88-Weg (Sumikawa et al., 2006). Bislang ist nicht bekannt, welche Rezeptoren für die Vermittlung der mBD14-Induktion verantwortlich sind. Zudem ist noch nicht endgültig geklärt, ob mBD14 direkt von mikrobiellen Faktoren aktiviert wird oder indirekt durch die

Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Stimulationsexperimenten mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF α keine Induktion der mBD14-Genexpression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass möglicherweise die mikrobiellen Faktoren der Mikroorganismen direkt für die gesteigerte mBD14-Genexpression verantwortlich sind und nicht der Umweg über die proinflammatorischen Zytokine gegangen werden muss.

Durch Stimulation von primären Keratinozyten mit dem Phorbolster Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA) kann die mBD14-mRNA-Expression induziert werden. Es ist bekannt, dass PMA in Keratinozyten den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren kann (Diaz et al., 2000). Eine Analyse der Promotorregion von mBD14 mit dem Genomatrix-Software-Programm zeigte putative Bindestellen für AP-1, so dass man vermuten kann, dass die Induktion der mBD14-Expression durch PMA über AP-1 vermittelt werden könnte.

Für mBD3 konnte *in vitro* in primären Keratinozyten eine Induktion der mRNA-Produktion durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α beobachtet werden (Abbildungen 5.28 und 5.29). Diese Ergebnisse waren zu erwarten, da auch hBD2, das humane Ortholog zu mBD3, durch diese Stimuli *in vitro* in primären Keratinozyten induziert werden kann (Harder et al., 2004). Die Intensität der Induktion war für hBD2 jedoch viel stärker als für mBD3. Während die hBD2-mRNA-Expression durch IL-1 β und TNF α nach 16 Stunden etwa 20-fach induziert werden konnte (Harder et al., 2004), war für mBD3 lediglich ein etwa 4-facher Anstieg zu beobachten. Der Promotorbereich von hBD2 beinhaltet zwei proximale putative Bindestellen für NF- κ B (Harder et al., 2000; Liu et al., 1998), ein Transkriptionsfaktor, der von proinflammatorischen Zytokinen aktiviert wird, und in primären Keratinozyten vermutlich verantwortlich für die IL-1 β - und TNF α -vermittelte hBD2-Induktion ist (Harder et al., 2004). Auch mBD3 besitzt in seiner Promotorsequenz eine NF- κ B-Bindestelle (Burd et al., 2002), so dass die IL-1 β - und TNF α -induzierte Stimulation wahrscheinlich wie im Falle von hBD2 über die Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird. Zudem konnte die mBD3-Genexpression durch IFN γ stimuliert werden (Abbildung 5.27). Da hBD2 nicht durch dieses Zytokin stimuliert werden kann (Harder et al., 2004), kann man hier über unterschiedliche Funktionen der beiden Sequenzhomologen spekulieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die mBD3-mRNA-Expression in einem *Escherichia coli*-Peridontitis-Modell ebenfalls induziert wird (Burd et al., 2002). Es wird vermutet, dass die durch Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli*-vermittelte Sepsis ebenfalls über die Aktivierung der NF- κ B-Bindestelle in der 5'-untranslatierten Region von mBD3 läuft (Burd

et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte in primären Keratinozyten eine Induktion der mBD3-mRNA-Expression durch Überstände von *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet werden (Abbildung 5.25). Es ist möglich, dass die Signalvermittlung dieses Gram-negativen Bakteriums ebenfalls über die Aktivierung von NF- κ B läuft. Auch die hBD2-Expression wurde durch *Pseudomonas aeruginosa* induziert, allerdings wie für IL-1 β und TNF α wesentlich stärker als die von mBD3 (hBD2, 40-fache Induktion; mBD3, 10-fache Induktion; Harder et al., 2004). Interessanterweise konnte für mBD3 keine Induktion durch PMA beobachtet werden. PMA ist ein relativ starker Induktor der hBD2-Expression in primären Keratinozyten (Harder et al., 2004). Im Gegensatz dazu wurde aber eine Induktion der mBD3-mRNA-Produktion unter Einfluss von IFN γ beobachtet, was konträr zu hBD2 ist, da hBD2 in primären Keratinozyten nicht durch IFN γ induziert werden kann (Harder et al., 2004). Diese Unterschiede können unter Umständen mit der im Vergleich zu hBD3 und mBD14 eher geringen Sequenzhomologie zwischen hBD2 und mBD3 begründet werden. Es bedarf aber noch weiterer klärender Experimente in Hinblick auf die unterschiedlichen Regulationsmechanismen von hBD2 und mBD3.

6.2.3 Rekombinantes mBD14 kann in *Escherichia coli* produziert werden

Für die Generierung von Antikörpern gegen mBD14 und für Testungen einer eventuell vorhandenen antimikrobiellen Aktivität von mBD14 wurden relativ große Mengen Protein benötigt. Da die Aufreinigung von natürlichem mBD14 bisher noch nicht etabliert wurde und mit einem sehr großen Aufwand verbunden wäre, wurde versucht, das Protein rekombinant herzustellen. Die Technik der rekombinanten Expression von Proteinen in prokaryotischen Zellen erlaubt eine schnelle, günstige und effiziente Produktion von Proteinen in großen Mengen. Insbesondere *Escherichia coli* eignet sich aufgrund seiner einfachen Kultivierbarkeit und seiner sehr hohen Wachstumsrate (Verdoppelungszeit ca. 20 Minuten) für die rekombinante Expression von Proteinen (Sambrook et al., 1989).

Ein wichtiger Punkt musste bei der rekombinanten Expression von mBD14 in *Escherichia coli* besondere Beachtung finden: Da mBD14 vermutlich das murine Ortholog zu hBD3 darstellt, musste von einer starken antimikrobiellen Aktivität ausgegangen werden, welche toxisch für das Bakterium sein könnte. In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass die hohe Aktivität vieler antimikrobieller Peptide gegen *Escherichia coli* ein Grund dafür sein könnte, dass der Versuch der rekombinanten Expression vieler antimikrobieller Proteine in *Escherichia coli* bisher scheiterte (Valore und Ganz, 1997).

Damit dieses Problem vermieden werden konnte, wurde der pET-32a-Expressionsvektor von der Firma Novagen (Madison, USA) für die rekombinante Herstellung von mBD14 ausgewählt. Dieses Expressionssystem gestattet die Expression des gewünschten Proteins als Fusionsprotein, welches keine antimikrobielle Aktivität besitzt. Nach Aufreinigung und anschließender Abspaltung des Fusionsteils durch eine Enterokinase wird das Zielprotein erhalten. Weitere Vorteile des Systems sind die im N-terminalen Fusionsteil befindliche „His-Tag“-Sequenz (sechs aufeinander folgende Histidine), die eine einfache und effiziente Aufreinigung über eine Nickel-Affinitätssäule ermöglicht.

Es zeigte sich, dass die Verwendung dieses Systems die rekombinante Expression von mBD14 in *Escherichia coli* ermöglichte (siehe 5.1.2.1). Bei der Expression traten jedoch Verluste auf, da das mBD14-pET-32-Fusionsprotein nicht gut im zugehörigen EK_{Max}-Puffer (siehe 4.2.5.2) löslich war, es blieb eine leichte Trübung, welche sich auch durch Inkubation bei 37 °C nicht vollständig auflöste. Möglicherweise war ein Teil des Fusionsproteins durch fehlerhaft geknüpfte Disulfidbrücken anders gefaltet (z.B. durch Verbindungen der mBD14-Cysteine mit den Cysteinen aus dem Fusionsteil), so dass sich unterschiedlich gute Löslichkeiten im EK_{Max}-Puffer ergaben.

6.2.4 mBD14 besitzt potente antimikrobielle Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mBD14 wie hBD3 (Harder et al., 2001; Sahly et al., 2003) eine potente antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien besitzt. Es ist ebenfalls in der Lage, die Hefe *Candida albicans* abzutöten. Es vermag selbst pathogene Bakterien wie Vancomycin-resistente *Enterococcus faecalis*, Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* effizient abzutöten (Tabelle 5.1).

Die mBD14-Expression ließ sich deutlich durch Überstände des Gram-negative Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* und des Gram-positive Bakteriums *Staphylococcus aureus* induzieren (Abbildung 5.11 und 5.12). Diese Beobachtung korreliert mit der antimikrobiellen Aktivität von mBD14 gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*.

mBD14 zeigt wie hBD3 keine antimikrobielle Aktivität gegen *Burholderia ssp.* (Sahly et al., 2003). Diese Bakterien sind dafür bekannt, resistent gegenüber kationischen Peptiden wie Polymyxin B (Moore et al., 1986), Cathelicidinen (Saiman et al., 2001) und den humanen β -Defensinen 1, 2 und 3 zu sein (Baird et al., 1999; Sahly et al., 2003) zu sein. Es wird vermutet, dass die Resistenz dieser Gram-negativen Bakterien auf die strukturellen

Besonderheiten ihres in der äußeren Membran verankerten Lipopolysaccharids (LPS) zurückzuführen ist (Hancock und Rozek, 2002; Müller-Loennies et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* durch erhöhte Salzkonzentrationen herabgesetzt wird und ab einer Konzentration von 100 mM Natriumchlorid ganz verschwindet. Beim Gram-positiven *Staphylococcus aureus* wurde die antimikrobielle Aktivität von steigenden Salzkonzentrationen kaum beeinflusst (Tabelle 5.2). Die antimikrobielle Aktivität von hBD3 wurde gleichermaßen beeinflusst (Hinrichsen et al., 2008). Man vermutet, dass der initiale Schritt der antimikrobiellen Wirksamkeit von kationischen Peptiden gegen Mikroorganismen ihre Interaktion mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Oberfläche der Mikroorganismen ist – es handelt sich demnach um einen elektrostatischen Effekt (Tam et al., 2002). Eine höhere Ionenstärke verursacht durch eine erhöhte Salzkonzentration würde die elektrostatischen Kräfte vermindert und somit die Aktivität der antimikrobiellen Proteine verhindern (Tam et al., 2002). Interessant bleibt, dass es Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Bakterien *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* gibt. Ob diese Unterschiede auf die verschiedenen Strukturen Gram-negativer und Gram-positiver Membranen oder auf unterschiedliche Mechanismen der Bakterienabtötung zurückzuführen sind, bedarf weitere Untersuchungen. Sollte dies der Fall sein, kann man spekulieren, ob die Effekte auf alle Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien übertragen werden können, so dass die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* möglicherweise auf die selbe Weise durch hohe Natriumchloridkonzentrationen minimiert werden könnte. Untersuchungen hierzu stehen noch aus.

In einer weiteren Variante des Testverfahrens für die antimikrobielle Aktivität von mBD14 konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Wirkung von mBD14 gegen *Escherichia coli* deutlich schlechter wird, wenn man dem Testsystem Magnesiumchlorid zusetzt. Für die Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* wurde durch die Magnesiumchloridzugabe keine Veränderung beobachtet (Tabelle 5.2). Divalente Kationen können die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien stabilisieren (Vaara, 1992) und inhibieren die antimikrobielle Aktivität der β -Defensine (Lehrer et al., 1993; Tomita et al., 2000). Es handelt sich hierbei vermutlich um eine Maskierung der negativen Ladung der Mikroorganismen.

Ein weiterer Unterschied in der antimikrobiellen Aktivität von mBD14 gegen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*, der auch bei hBD3 beobachtet werden konnte, ist die pH-Abhängigkeit (Tabelle 5.2; Hinrichsen et al., 2008). Die antimikrobielle Aktivität von

mBD14 gegen *Escherichia coli* wurde durch eine pH-Wert-Erniedrigung auf 5,5 erhöht, während die antimikrobielle Aktivität von mBD14 gegen *Staphylococcus aureus* deutlich vermindert wurde. Diese Tatsache könnte allerdings auch auf synergistische Abtötungseffekte zurückzuführen sein, da *Escherichia coli* alleine durch einen pH-Wert von 5,5 leicht abgetötet wurde und somit möglicherweise empfindlicher auf die Wirkung von mBD14 reagieren könnte.

6.2.5 mBD14 besitzt eine Rolle in der Wundheilung

Man nimmt an, dass β -Defensine aufgrund ihrer antimikrobiellen Aktivität eine große Rolle in der angeborenen Immunität spielen (Ganz 2003). Es wird vermutet, dass sie zudem auch regulierende Eigenschaften auf das adaptive Immunsystem haben, da sie chemotaktisch auf Effektor-T-Zellen wirken, und somit diese zu entzündlichen Stellen im Körper dirigieren (Yang et al., 1999).

Das ist aber noch lange nicht alles, was die β -Defensine vermögen. Neuere Studien zeigen, dass antimikrobielle Proteine eine potenzielle Relevanz in der Wundheilung besitzen (Niyonsaba et al., 2007; Otte et al., 2008). Bereits im Jahr 2001 konnte die Gruppe um Dorschner zeigen, dass die antimikrobiellen Peptide LL-37 im Menschen und das murine Ortholog CRAMP in der Maus durch eine Verwundung der Haut induziert werden können (Dorschner et al., 2001). Kurz darauf wurde bekannt, dass der *Transforming Growth Factor- α* (TGF α), ein Wachstumsfaktor mit sehr großer Bedeutung für die Wundheilung (Kumar et al., 1995), die Expression von LL-37 und hBD3 - nicht aber hBD2 - *in vitro* in Keratinozyten induzieren kann (Sørensen et al., 2003a). Die gleiche Gruppe konnte drei Jahre später zeigen, dass die hBD3-Expression auch *ex vivo* durch eine sterile Verwundung der Haut induziert werden kann, und dass diese Induktion über die Aktivierung des *Epidermal Growth Factor Receptors* (EGFR) vermittelt wird (Sørensen et al., 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass hBD2, 3 und 4 primäre Keratinozyten stimulieren können, vermehrt Interleukin 6 und 10, sowie das *Monocyte Chemoattractant Protein 1* und *Macrophage Inflammatory Protein 3- α* zu produzieren (Niyonsaba et al., 2007). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sie zu einer vermehrten Ca²⁺-Mobilisierung führen, und die Phosphorylierung des EGFR induzieren. Diese Phosphorylierung führt zu einer vermehrten Transkription von STAT1 und 3, welche in der Migration und Proliferation von Keratinozyten beteiligt sind (Niyonsaba et al., 2007). Eine aktuelle Arbeit zeigte zudem, dass hBD2 in epithelialen Darmzellen *in vitro* die Wundheilung den Dünndarms stimulieren kann (Otte et al., 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die mBD14-Expression wie die von hBD3 *in vitro* in Keratinozyten durch eine Stimulation mit TGF α induziert werden kann (Abbildung 5.15 und 5.16). Für mBD3 konnte keine Induktion durch eine Stimulation mit TGF α beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Sørensen (Sørensen et al., 2003a).

In dieser Arbeit konnten gezeigt werden, dass die mBD14-mRNA- und Proteinexpression durch akute und chronische Störung der Hautbarriere induziert werden kann (Abbildung 5.19 bis 5.22). Ob diese Induktion auf eine Expression von TGF α im normalen Prozess der Wundheilung oder auf möglicherweise eindringende Mikroorganismen zurückzuführen ist, bedarf einer weiteren Untersuchung.

Es ist bekannt, dass SKH-1-Mäuse, die mit einer EFA-Diät gefüttert wurden, eine 100-fach höhere Besiedelung mit Mikroorganismen aufweisen als Kontrolltiere, die eine konventionelle Nagerdiät erhielten (Bibel et al., 1989). Insbesondere wurde auf der Haut der EFAD-Tiere *Staphylococcus aureus* gefunden, welcher in der Kontrollgruppe nicht vorkam (Bibel et al., 1989). Auch in den Tieren, von denen die Hautproben für die Untersuchungen dieser Arbeit stammten, wurde vor der Entnahme der Biopsien die antimikrobielle Besiedelung der Haut bestimmt (nicht gezeigt). Hierbei wurden keine *Staphylococcus aureus* gefunden. Die Haut der Kontrolltiere war generell sehr gering besiedelt. Es konnte lediglich ein Pilz der Gattung *Mucor*, der vermutlich aus dem Einstreu stammte, in geringen Mengen auf der Hälfte der Tiere nachgewiesen werden. Auf der Haut der EFAD-Tiere war die Besiedelung stärker. Etwa ein Drittel der Tiere war mit *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus cohnii ssp. urealyticum* und *Corynebacterium ssp.* besiedelt, welche zur Normalflora der Tiere gehören und unter normalen Umständen und in nicht hohen Konzentrationen nicht pathogen sind (Bibel et al., 1989). In zwei Dritteln der Tiere war jedoch lediglich eine Besiedelung mit *Proteus mirabilis* nachweisbar. *Proteus mirabilis* ist ein fakultativ pathogener Keim, der im Menschen in chronischen Wunden, in Infektionen des Urogenitaltraktes und in Osteomyelitis gefunden wird (Jacobsen et al., 2008; Hartemann-Heurtier & Senneville, 2008). Auch in Mäusen wurde dieser Keim gefunden (Dubos et al., 1965; O'Rourke et al., 1988). Es wurde gezeigt, dass hBD3 keine antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis* aufweist (Böhling et al., 2006), so ist es sehr wahrscheinlich, dass auch mBD14 nicht antimikrobiell aktiv gegen den Keim ist. Unter Umständen vermag nur dieser Keim sich bei der erhöhten Produktion von mBD14 zu vermehren, da er nicht abgetötet werden kann. Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse in der antimikrobiellen Besiedelung der im dieser Arbeit untersuchten Tiere im Vergleich mit der von der Gruppe um Bibel im Jahre

1989 gab es jedoch eine Gemeinsamkeit: Auf der Haut der in dieser Arbeit untersuchten Mäuse fanden sich lediglich in den EFAD-gefütterten Tieren Gram-negative Bakterien (*Proteus mirabilis*), was mit dem Ergebnis der anderen Gruppe übereinstimmt (Bibel et al., 1989).

Für mBD3 konnten im Wesentlichen ähnliche Effekte für die akute und die chronische Barrierestörung wie bei mBD14 beobachtet werden (Abbildung 5.31-5.34). Die mBD3-mRNA- und Proteinproduktion wurde durch akute und chronische Barrierestörung induziert. Diese Induktion war auf der mRNA-Ebene jedoch um ein Vielfaches stärker als die Induktion von mBD14, was vermutlich auf die sehr geringe basale Grundexpression von mBD3 im Vergleich zu mBD14 zurückzuführen ist. Da die mBD3-mRNA-Expression *in vitro* nicht durch TGF α induziert werden konnte, kann man hier spekulieren, dass die erhöhte mBD3-Expression direkt auf die erhöhte antimikrobielle Besiedelung der Tiere zurückzuführen ist. Da auch hBD2 wie hBD3 keine antimikrobielle Wirksamkeit gegen *Proteus mirabilis* aufweist (persönliche Mitteilung von Frau Dr. Schubert, Instituts für Infektionsmedizin, UK-SH, Campus Kiel), ist es wahrscheinlich, dass mBD3 ebenfalls keine Wirksamkeit zeigt. So vermag auch dieses β -Defensin nicht, diesen Keim abzutöten, womit er sich vermehren kann. Es besteht die Möglichkeit, dass die mBD3- und die mBD14-mRNA-Produktion durch Störungen der Hautbarrierefunktion jeglicher Art induziert wird, damit im Falle des Eindringens von pathogenen Mikroorganismen, erleichtert durch die gestörte Barriere, möglichst schnell Proteine translatiert werden können, um die Gefahr durch eingedrungene Erreger bekämpfen zu können. Dies kann mit der Beobachtung begründet werden, dass erst in den stärker besiedelten EFAD-Mäusen die Proteinproduktion von mBD3 und mBD14 hochreguliert wurde. Es wurde postuliert, dass antimikrobielle Proteine über eine Trans-Aktivierung des EGFR in Situationen vermehrt gebildet werden, die für den Körper ein hohes Risiko darstellen, da im Falle einer Verletzung pathogene Keime in den Körper eindringen können (Sørensen et al., 2006). Dieses Prinzip ist nicht unbekannt, so wird das Vorläufermolekül des humanen Cathelicidins LL-37, hCAP-18, im Sperma nur bei erhöhter Temperatur und niedrigem pH-Wert, wie sie in der Vagina vorliegen, durch die aus der Prostata stammende Protease Gastricsin gespalten und somit in eine antimikrobiell aktive Form ALL-38 umgewandelt. ALL-38 zeigt gleiche antimikrobielle Eigenschaften wie LL-37 und schützt die Vagina nach dem Geschlechtsverkehr vor drohenden Infektionen durch möglicherweise eingebrachte pathogene Mikroorganismen (Sørensen et al., 2003b). Zudem besitzen antimikrobielle Proteine anscheinend die Fähigkeit durch die Induktion der

Phosphorylierung des EGFR zu einem schnelleren Wundverschluss durch die Aktivierung der Keratinozytenmigration und -proliferation zu führen (Niyonsaba et al., 2007).

6.3 Wird die Maushaut durch Lipocaline gegen Bakterien geschützt?

Die vorgenommenen Waschungen der Maushaut mit Puffer sollten Aufschluss darüber geben, welche Proteine sich direkt auf der Haut befinden, die diese potentiell gegen bakterielle Besiedelung schützen können. Insbesondere sollte nach einem Mausortholog zum humanen Psoriasin gesucht werden, welches in der humanen Haut konstitutiv gebildet wird und für die Resistenz der Haut gegen *Escherichia coli* verantwortlich ist (Gläser et al., 2005). Im Jahre 2006 wurde das S100A15-Protein als mögliches murines Ortholog zu Psoriasin vorgestellt (Wolf et al., 2006), es besitzt jedoch nur wenig strukturelle Homologie zu Psoriasin. Psoriasin ist eines der wichtigsten antimikrobiellen Peptide des Menschen. Es wird von Keratinozyten exprimiert und sezerniert und kann somit konstitutiv auf gesunder Haut gefunden werden. Hier schützt es gegen Infektionen mit dem Darmbakterium *Escherichia coli* (Gläser et al., 2005). In der Maus muss es demnach zumindest ein Funktionshomolog geben, das die Aufgaben des Psoriasins übernimmt und die Haut der Tiere vor *Escherichia coli* schützt. In der Hautwaschflüssigkeit der Mäuse konnte keines der S100-Proteine der Maus gefunden werden. Die beiden größten Peaks konnten einer anderen Proteinfamilie zugeordnet werden: Den *odorant binding* Proteinen (OBPs). Was könnte Proteine des Olfaktorischen Systems mit der antimikrobiellen Aktivität der Maushaut verbinden? Literaturrecherchen ergaben, dass OBPs Strukturverwandte der Proteinfamilie der Lipocaline sind und somit durchaus eine antimikrobielle Wirksamkeit durch den möglichen Entzug der Siderophore der Mikroorganismen haben könnten. Siderophore sind Teil eines Mechanismus, der von Bakterien entwickelt wurde, um Fe^{3+} aufzunehmen. Siderophore sind kleine, stark negativ geladene Eisen-Transportproteine, die Eisen chelatieren und eine große Affinität zu Fe^{3+} haben (Neilands, 1981).

Da Siderophore bei Mikroorganismen weit verbreitet sind, haben Säugetiere Gegenmaßnahmen entwickelt, um den durch Siderophore vermittelte Eisengewinn der Mikroorganismen zu begegnen. Moleküle wie das sekretierte Lipocalin 2 (Lcn2, Siderocalin) binden bakterielles Enterobactin und verhindern die Rückkehr des Eisensiderophors in die Bakterienzelle. Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) wird von Neutrophilen während Entzündungsreaktionen freigesetzt. Seine Affinität ist groß genug, um die bakteriellen Siderophore zu binden und die Eisenaufnahme zu stoppen (Goetz et al., 2002). So

entspricht der K_d -Wert von Siderocalin in etwa dem des Rezeptors des Enterobactins (Abergel et al., 2006).

Eisen ist eines der am häufigsten in der Umwelt vorkommenden und wandlungsfähigsten Übergangsmetallelemente. Mit nur wenigen Ausnahmen wird es für das Wachstum von beinahe allen Zellen, prokaryotische wie eukaryotische, benötigt (Posey & Gheradini, 2000; Weinberg, 1997). Bakterien brauchen Eisen für viele metabolische Funktionen und Signalwege wie zum Beispiel Elektronentransport, Peroxidreduktion, Aminosäure- und Nukleosidsynthese, DNA-Synthese, Photosynthese und letztlich für ihre Virulenzeigenschaften (Griffiths, 1991). Das Vorhandensein von Eisen scheint für pathogene Situationen sehr bedeutsam zu sein, so wird die Virulenz von *Escherichia coli* (Bullen et al., 1968), *Klebsiella* (Ward et al., 1986), *Listeria* (Martinez et al., 1990), *Neisseria* (Bullen et al., 1971), *Shigella* (Payne, 1989), *Salmonella* (Griffiths, 1991), *Vibrio* (Chart & Griffiths, 1985) and *Yersinia* (Robins-Browne & Prpic, 1985) bei einem Überschuss an Eisen deutlich erhöht. Eisen kommt in zwei Ionenformen (Fe^{2+} und Fe^{3+}) vor. Obwohl es in großen Mengen in der Umwelt vorkommt, ist es nicht leicht verfügbar. Bei neutralem pH-Wert unter aeroben Bedingungen liegen beide Eisenformen als unlösliche Hydroxide vor (Neilands, 1982), welche die in der Umgebung frei verfügbaren Konzentrationen auf etwa 10^{-18} M limitieren (Raymond & Carrano, 1979). Eisen ist für Lebewesen nicht ungefährlich, es ist sogar in niedrigen Konzentrationen giftig für Zellen, da es in so genannten „Fenton-Reduktions-Reaktionen“ toxische Hydroxylradikale produziert. Daher haben Säugerzellen ein spezielles System entwickelt, um Eisen effizient und für sie ungefährlich aus der Umgebung aufzunehmen. Eisen wird dabei in Proteinen wie Transferrin und Lactoferrin sequestriert (Martin et al., 1987; Weinberg, 1978). Bakterien benötigen eine cytoplasmatische Eisenkonzentration von 10^{-6} M für ihr Wachstum (Braun & Killmann, 1999). Diese Konzentration liegt weitaus über der Konzentration des frei verfügbaren Eisens. Die bakteriellen Siderophore haben eine sehr große Affinität für Eisen, so dass dieses trotz der geringen Konzentration effektiv aus der Umgebung aufgenommen werden kann.

Das vermutlich am besten untersuchte Siderophor ist das Enterobactin-System von *Escherichia coli*. Enterobactin ist ein Siderophor aus der Catechol-Familie. Außerhalb der Zelle kann Enterobactin mit allen bekannten Fe^{3+} -bindenden Proteinen, die eine sehr hohe Affinität für Eisen ($K_d = 10^{-35}$ - 10^{-49}) haben, konkurrieren (Crosa et al., 2004).

Erste Analysen der verschiedenen, aus der C_2C_{18} -Umkehrphasen-HPLC hervorgegangenen Fraktionen zeigten eine antimikrobielle Aktivität des zweiten großen Peaks gegen *Escherichia coli*. Möglicherweise ist das Protein aus dieser Fraktion (*novel protein similar to odorant*

binding protein 1b) wie das Lipocalin 2 dazu befähigt das Enterobactin von *Escherichia coli* zu binden und beim Bakterium so einen Eisenmangel hervorzurufen (Goetz et al., 2002). Bisher ist noch nichts bekannt zu einer möglichen Bindung von Siderophoren an OBPs. Es sollten weitere Versuche folgen, um Licht in dieses spannende Thema zu bringen.

7. Literatur

Aberg K. M., Radek K. A., Choi E. H., Kim D. K., Demerjian M., Hupe M., Kerbleski J., Gallo R. L., Ganz T., Mauro T., Feingold K. R., Elias P. M. (2007) Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J Clin Invest* **117**, 3339-49.

Abergel R. J., Moore E. G., Strong R. K., Raymond K. N. (2006) Microbial evasion of the immune system: structural modifications of enterobactin impair siderocalin recognition. *J Am Chem Soc* **128**, 10998-9.

Albanesi C., Fairchild H. R., Madonna S., Scarponi C., De Pita O., Leung D. Y., Howell M. D. (2007) IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* **179**, 984-92.

Baird R. M., Brown H., Smith A. W., Watson M. L. (1999) Burkholderia cepacia is resistant to the antimicrobial activity of airway epithelial cells. *Immunopharmacology* **44**, 267-72.

Bals R., Goldman M. J., Wilson J. M. (1998) Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun* **66**, 1225-32.

Bals R., Wang X., Meegalla R. L., Wattler S., Weiner D. J., Nehls M. C., Wilson J. M. (1999) Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs. *Infect Immun* **67**, 3542-7.

Barra D. & Simmaco M. (1995) Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol* **13**, 205-9.

Bendtsen J. D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-95.

Bensch K. W., Raida M., Magert H. J., Schulz-Knappe P., Forssmann W. G. (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**, 331-5.

Bibel D. J., Miller S. J., Brown B. E., Pandey B. B., Elias P. M., Shinefield H. R., Aly R. (1989) Antimicrobial activity of stratum corneum lipids from normal and essential fatty acid-deficient mice. *J Invest Dermatol* **92**, 632-8.

Biragyn A., Surenhu M., Yang D., Ruffini P. A., Haines B. A., Klyushnenkova E., Oppenheim J. J., Kwak L. W. (2001) Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* **167**, 6644-53.

Böhling A., Hagge S. O., Roes S., Podschun R., Sahly H., Harder J., Schröder J. M., Grotzinger J., Seydel U., Gutschmann T. (2006) Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3. *Biochemistry* **45**, 5663-70.

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

Braff M. H., Bardan A., Nizet V., Gallo R. L. (2005) Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* **125**, 9-13.

Braun V. & Killmann H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**, 104-9.

Bullen J. J., Leigh L. C., Rogers H. J. (1968) The effect of iron compounds on the virulence of *Escherichia coli* for guinea-pigs. *Immunology* **15**, 581-8.

Bullen J. J., Rogers H. J., Lewin J. E. (1971) The bacteriostatic effect of serum on *Pasteurella septica* and its abolition by iron compounds. *Immunology* **20**, 391-406.

Burd R. S., Furrer J. L., Sullivan J., Smith A. L. (2002) Murine beta-defensin-3 is an inducible peptide with limited tissue expression and broad-spectrum antimicrobial activity. *Shock* **18**, 461-4.

Chart H. & Griffiths E. (1985) The availability of iron and the growth of *Vibrio vulnificus* in sera from patients with haemochromatosis. *FEMS Microbiology Letters* **26**, 227-231.

Chertov O., Michiel D. F., Xu L., Wang J. M., Tani K., Murphy W. J., Longo D. L., Taub D. D., Oppenheim J. J. (1996) Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* **271**, 2935-40.

Choi B. K., Cho Y. M., Bae S. H., Zoubaulis C. C., Paik Y. K. (2003) Single-step perfusion chromatography with a throughput potential for enhanced peptide detection by matrix-assisted laser desorption/ ionization-mass spectrometry. *Proteomics* **3**, 1955-61.

Chromek M., Slamova Z., Bergman P., Kovacs L., Podracka L., Ehren I., Hokfelt T., Gudmundsson G. H., Gallo R. L., Agerberth B., Brauner A. (2006) The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* **12**, 636-41.

Crosa J. H., Mey A. R., Payne S. M. (2004) Iron transport in bacteria. *ASM Press, Washington, D.C.*

Diamond G., Zasloff M., Eck H., Brasseur M., Maloy W. L., Bevins C. L. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3952-6.

Diaz B. V., Lenoir M. C., Ladoux A., Frelin C., Demarchez M., Michel S. (2000) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem* **275**, 642-50.

Dorschner R. A., Pestonjamas V. K., Tamakuwala S., Ohtake T., Rudisill J., Nizet V., Agerberth B., Gudmundsson G. H., Gallo R. L. (2001) Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol* **117**, 91-7.

Dubos R., Schaedler R. W., Costello R., Hoet P. (1965) Indigenous, Normal, and Autochthonous Flora of the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med* **122**, 67-76.

Eisenhauer P. B. & Lehrer R. I. (1992) Mouse neutrophils lack defensins. *Infect Immun* **60**, 3446-7.

Elias P. M. (2005) Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* **125**, 183-200.

Elias P. M., Goerke J., Friend D. S. (1977) Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J Invest Dermatol* **69**, 535-46.

Feingold K. R., Brown B. E., Lear S. R., Moser A. H., Elias P. M. (1986) Effect of essential fatty acid deficiency on cutaneous sterol synthesis. *J Invest Dermatol* **87**, 588-91.

Fischer E. (1959) Der Einfluss von Schweiss und pH auf das Wachstum hautpathogener Pilze. *Dermatologica* **118**, 197.

Fitzpatrick T.B. E. A. Z., Wolff K., Freedberg I.M., Austen K.F. (1993) *Dermatology in general medicine*. McGraw-Hill, New York.

Fleming A. (1922) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc Roy Soc Ser B* **93**, 306-317.

Friedrich C., Scott M. G., Karunaratne N., Yan H., Hancock R. E. (1999) Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1542-8.

Gallo R. C. (1971) Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* **234**, 194-8.

Gallo R. L., Kim K. J., Bernfield M., Kozak C. A., Zanetti M., Merluzzi L., Gennaro R. (1997) Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem* **272**, 13088-93.

Gallo R. L. & Nizet V. (2003) Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr Allergy Asthma Rep* **3**, 402-9.

Ganz T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 710-20.

Ganz T. & Lehrer R. I. (1995) Defensins. *Pharmacol Ther* **66**, 191-205.

Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. (1990) Defensins. *Eur J Haematol* **44**, 1-8.

Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D., Harwig S. S., Daher K., Bainton D. F., Lehrer R. I. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* **76**, 1427-35.

Garcia J. R., Jaumann F., Schulz S., Krause A., Rodriguez-Jimenez J., Forssmann U., Adermann K., Kluver E., Vogelmeier C., Becker D., Hedrich R., Forssmann W. G., Bals R. (2001) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* **306**, 257-64.

Gariboldi S., Palazzo M., Zanobbio L., Selleri S., Sommariva M., Sfondrini L., Cavicchini S., Balsari A., Rumio C. (2008) Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J Immunol* **181**, 2103-10.

Girardin S. E., Tournebise R., Mavris M., Page A. L., Li X., Stark G. R., Bertin J., DiStefano P. S., Yaniv M., Sansonetti P. J., Philpott D. J. (2001) CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* **2**, 736-42.

Gläser R., Harder J., Lange H., Bartels J., Christophers E., Schröder J. M. (2005) Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* **6**, 57-64.

Goetz D. H., Holmes M. A., Borregaard N., Bluhm M. E., Raymond K. N., Strong R. K. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**, 1033-43.

- Goldman M. J., Anderson G. M., Stolzenberg E. D., Kari U. P., Zasloff M., Wilson J. M. (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**, 553-60.
- Gordon S. (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927-30.
- Griffiths E. (1991) Iron and bacterial virulence--a brief overview. *Biol Met* **4**, 7-13.
- Hahn H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U. (1999) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Berlin.
- Hancock R. E. & Rozek A. (2002) Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* **206**, 143-9.
- Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder J. M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861.
- 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**, 5707-13.
- Harder J., Meyer-Hoffert U., Wehkamp K., Schwichtenberg L., Schröder J. M. (2004) Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* **123**, 522-9.
- Harder J. & Schröder J. M. (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* **277**, 46779-84.
- Harder J. & Schröder J. M. (2005) Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol* **77**, 476-86.
- Hartemann-Heurtier A. & Senneville E. (2008) Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Metab* **34**, 87-95.

Hetru C., Troxler L., Hoffmann J. A. (2003) *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infect Dis* **187 Suppl 2**, S327-34.

Hinrichsen K., Podschun R., Schubert S., Schröder J. M., Harder J., Proksch E. (2008) Mouse beta-defensin-14, an antimicrobial ortholog of human beta-defensin-3. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1876-9.

Hiratsuka T., Nakazato M., Date Y., Ashitani J., Minematsu T., Chino N., Matsukura S. (1998) Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 943-7.

Hornef M. W., Putsep K., Karlsson J., Refai E., Andersson M. (2004) Increased diversity of intestinal antimicrobial peptides by covalent dimer formation. *Nat Immunol* **5**, 836-43.

Howell M. D., Jones J. F., Kisich K. O., Streib J. E., Gallo R. L., Leung D. Y. (2004) Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J Immunol* **172**, 1763-7.

Hughes A. L. (1999) Evolutionary diversification of the mammalian defensins. *Cell Mol Life Sci* **56**, 94-103.

Inohara N., Koseki T., del Peso L., Hu Y., Yee C., Chen S., Carrio R., Merino J., Liu D., Ni J., Nunez G. (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **274**, 14560-7.

Jacobsen S. M., Stickler D. J., Mobley H. L., Shirtliff M. E. (2008) Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* **21**, 26-59.

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

- Jensen J. M., Schutze S., Forl M., Kronke M., Proksch E. (1999) Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest* **104**, 1761-70.
- Jia H. P., Schutte B. C., Schudy A., Linzmeier R., Guthmiller J. M., Johnson G. K., Tack B. F., Mitros J. P., Rosenthal A., Ganz T., McCray P. B., Jr. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* **263**, 211-8.
- Jones D. E. & Bevins C. L. (1992) Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* **267**, 23216-25.
- Kim J. Y., Omori E., Matsumoto K., Nunez G., Ninomiya-Tsuji J. (2008) TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J Biol Chem* **283**, 137-44.
- Kumar V., Bustin S. A., McKay I. A. (1995) Transforming growth factor alpha. *Cell Biol Int* **19**, 373-88.
- Kunkel T. A. (1992) DNA replication fidelity. *J Biol Chem* **267**, 18251-4.
- Lebre M. C., van der Aar A. M., van Baarsen L., van Capel T. M., Schuitemaker J. H., Kapsenberg M. L., de Jong E. C. (2007) Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* **127**, 331-41.
- Lehrer R. I. (2004) Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* **2**, 727-38.
- Lehrer R. I. & Ganz T. (2002) Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* **14**, 96-102.
- Lehrer R. I., Lichtenstein A. K., Ganz T. (1993) Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* **11**, 105-28.
- Liu L., Wang L., Jia H. P., Zhao C., Heng H. H., Schutte B. C., McCray P. B., Jr., Ganz T. (1998) Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* **222**, 237-44.

- Maisetta G., Batoni G., Esin S., Florio W., Bottai D., Favilli F., Campa M. (2006) In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 806-9.
- Martin R. B., Savory J., Brown S., Bertholf R. L., Wills M. R. (1987) Transferrin binding of Al³⁺ and Fe³⁺. *Clin Chem* **33**, 405-7.
- Martinez J. L., Delgado-Iribarren A., Baquero F. (1990) Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* **6**, 45-56.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7.
- Mempel M., Voelcker V., Kollisch G., Plank C., Rad R., Gerhard M., Schnopp C., Fraunberger P., Walli A. K., Ring J., Abeck D., Ollert M. (2003) Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol* **121**, 1389-96.
- Menzies B. E. & Kenoyer A. (2006) Signal transduction and nuclear responses in Staphylococcus aureus-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect Immun* **74**, 6847-54.
- Miescher G. (1960) Antibacterial effects of sebum and the inhibition of these effects by free amino acids. *Proc. 11th Internatl. Congress Dermatology Stockholm* **2**, 9.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Roch P. (2000) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett* **486**, 185-90.
- Moore R. A. & Hancock R. E. (1986) Involvement of outer membrane of Pseudomonas cepacia in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 923-6.

Morrison G., Kilanowski F., Davidson D., Dorin J. (2002) Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model. *Infect Immun* **70**, 3053-60.

Morrison G. M., Davidson D. J., Kilanowski F. M., Borthwick D. W., Crook K., Maxwell A. I., Govan J. R., Dorin J. R. (1998) Mouse beta defensin-1 is a functional homolog of human beta defensin-1. *Mamm Genome* **9**, 453-7.

Muller-Loennies S., Zahringer U., Seydel U., Kusumoto S., Ulmer A. J., Rietschel E. T. (1998) What we know and don't know about the chemical and physical structure of lipopolysaccharide in relation to biological activity. *Prog Clin Biol Res* **397**, 51-72.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.

Murray P. J. (2005) NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr Opin Immunol* **17**, 352-8.

Neilands J. B. (1981) Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* **50**, 715-31.

Neilands J. B. (1982) Microbial envelope proteins related to iron. *Annu Rev Microbiol* **36**, 285-309.

Newton C. R. & Graham A. (1994) *PCR*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg.

Niyonsaba F., Ushio H., Nakano N., Ng W., Sayama K., Hashimoto K., Nagaoka I., Okumura K., Ogawa H. (2007) Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* **127**, 594-604.

Nizet V., Ohtake T., Lauth X., Trowbridge J., Rudisill J., Dorschner R. A., Pestonjamas V., Piraino J., Huttner K., Gallo R. L. (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**, 454-7.

- Nomura I., Goleva E., Howell M. D., Hamid Q. A., Ong P. Y., Hall C. F., Darst M. A., Gao B., Boguniewicz M., Travers J. B., Leung D. Y. (2003) Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* **171**, 3262-9.
- Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F. F., Yamaoka S., Nunez G. (2001) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**, 4812-8.
- O'Rourke J., Lee A., McNeill J. (1988) Differences in the gastrointestinal microbiota of specific pathogen free mice: an often unknown variable in biomedical research. *Lab Anim* **22**, 297-303.
- Otte J. M., Werner I., Brand S., Chromik A. M., Schmitz F., Kleine M., Schmidt W. E. (2008) Human beta defensin 2 promotes intestinal wound healing in vitro. *J Cell Biochem* **104**, 2286-97.
- Ouellette A. J., Greco R. M., James M., Frederick D., Naftilan J., Fallon J. T. (1989) Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. *J Cell Biol* **108**, 1687-95.
- Payne S. M. (1989) Iron and virulence in Shigella. *Mol Microbiol* **3**, 1301-6.
- Pazgier M., Hoover D. M., Yang D., Lu W., Lubkowski J. (2006) Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1294-313.
- Pivarcsi A., Kemeny L., Dobozy A. (2004) Innate immune functions of the keratinocytes. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* **51**, 303-10.
- Posey J. E. & Gherardini F. C. (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**, 1651-3.
- Prpic J. K., Robins-Browne R. M., Davey R. B. (1985) In vitro assessment of virulence in *Yersinia enterocolitica* and related species. *J Clin Microbiol* **22**, 105-10.

Raymond K. N. & Carrano C. J. (1979) Coordination chemistry and microbial iron transport. *Accounts of Chemical Research* **12**, 183-190.

Rivas-Santiago B., Sada E., Tsutsumi V., Aguilar-Leon D., Contreras J. L., Hernandez-Pando R. (2006) beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis* **194**, 697-701.

Robins-Browne R. M. & Prpic J. K. (1985) Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **47**, 774-9.

Röhrl J., Yang D., Oppenheim J. J., Hehlhans T. (2008) Identification and Biological Characterization of Mouse beta-defensin 14, the orthologue of human beta-defensin 3. *J Biol Chem* **283**, 5414-9.

Sahly H., Schubert S., Harder J., Rautenberg P., Ullmann U., Schröder J., Podschun R. (2003) Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1739-41.

Saiman L., Tabibi S., Starner T. D., San Gabriel P., Winokur P. L., Jia H. P., McCray P. B., Jr., Tack B. F. (2001) Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-resistant pathogens from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2838-44.

Salzman N. H., Ghosh D., Huttner K. M., Paterson Y., Bevins C. L. (2003) Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* **422**, 522-6.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual, Bd. 1-3, 2. ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Schägger H. & von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.

Schibli D. J., Hunter H. N., Aseyev V., Starner T. D., Wienczek J. M., McCray P. B., Jr., Tack B. F., Vogel H. J. (2002) The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **277**, 8279-89.

Schittek B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kalbacher H., Stevanovic S., Schirle M., Schroeder K., Blin N., Meier F., Rassner G., Garbe C. (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* **2**, 1133-7.

Schofield D. A., Westwater C., Balish E. (2004) beta-defensin expression in immunocompetent and immunodeficient germ-free and *Candida albicans*-monoassociated mice. *J Infect Dis* **190**, 1327-34.

Schonwetter B. S., Stolzenberg E. D., Zasloff M. A. (1995) Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* **267**, 1645-8.

Schröder J. M. (1999) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* **57**, 121-34.

Selsted M. E. (2004) Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins. *Curr Protein Pept Sci* **5**, 365-71.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-8.

Singh P. K., Jia H. P., Wiles K., Hesselberth J., Liu L., Conway B. A., Greenberg E. P., Valore E. V., Welsh M. J., Ganz T., Tack B. F., McCray P. B., Jr. (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14961-6.

Sørensen O. E., Cowland J. B., Theilgaard-Monch K., Liu L., Ganz T., Borregaard N. (2003a) Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* **170**, 5583-9.

Sørensen O. E., Gram L., Johnsen A. H., Andersson E., Bangsboll S., Tjabringa G. S., Hiemstra P. S., Malm J., Egesten A., Borregaard N. (2003b) Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *J Biol Chem* **278**, 28540-6.

Sørensen O. E., Thapa D. R., Roupe K. M., Valore E. V., Sjobring U., Roberts A. A., Schmidtchen A., Ganz T. (2006) Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* **116**, 1878-85.

Studier F. W. & Moffatt B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.

Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.

Sumikawa Y., Asada H., Hoshino K., Azukizawa H., Katayama I., Akira S., Itami S. (2006) Induction of beta-defensin 3 in keratinocytes stimulated by bacterial lipopeptides through toll-like receptor 2. *Microbes Infect* **8**, 1513-21.

Tam J. P., Lu Y. A., Yang J. L. (2002) Correlations of cationic charges with salt sensitivity and microbial specificity of cystine-stabilized beta -strand antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **277**, 50450-6.

Tang X., Nakata Y., Li H. O., Zhang M., Gao H., Fujita A., Sakatsume O., Ohta T., Yokoyama K. (1994) The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res* **22**, 2857-8.

Tang Y. Q. & Selsted M. E. (1993) Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *J Biol Chem* **268**, 6649-53.

- Tarver A. P., Clark D. P., Diamond G., Russell J. P., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Cohen K. S., Jones D. E., Sweeney R. W., Wines M., Hwang S., Bevins C. L. (1998) Enteric beta-defensin: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* **66**, 1045-56.
- Taylor K., Clarke D. J., McCullough B., Chin W., Seo E., Yang D., Oppenheim J., Uhrin D., Govan J. R., Campopiano D. J., MacMillan D., Barran P., Dorin J. R. (2008) Analysis and separation of residues important for the chemoattractant and antimicrobial activities of beta-defensin 3. *J Biol Chem* **283**, 6631-9.
- Territo M. C., Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. (1989) Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* **84**, 2017-20.
- Tomita T., Hitomi S., Nagase T., Matsui H., Matsuse T., Kimura S., Ouchi Y. (2000) Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol Immunol* **44**, 749-54.
- Vaara M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **56**, 395-411.
- Valore E. V. & Ganz T. (1997) *Laboratory Production of Antimicrobial Peptides in Native Conformations*. In: Shafer, W. M. *Antibacterial Peptide Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Voss E., Wehkamp J., Wehkamp K., Stange E. F., Schröder J. M., Harder J. (2006) NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* **281**, 2005-11.
- Ward C. G., Hammond J. S., Bullen J. J. (1986) Effect of iron compounds on antibacterial function of human polymorphs and plasma. *Infect Immun* **51**, 723-30.
- Weinberg E. D. (1997) The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Perspect Biol Med* **40**, 578-83.

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**, 904-9.

Wiedow O., Schröder J. M., Gregory H., Young J. A., Christophers E. (1990) Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* **265**, 14791-5.

Wilm M. & Mann M. (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **68**, 1-8.

Wilm M., Shevchenko A., Houthaave T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T., Mann M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **379**, 466-9.

Wilson C. L., Ouellette A. J., Satchell D. P., Ayabe T., Lopez-Boado Y. S., Stratman J. L., Hultgren S. J., Matrisian L. M., Parks W. C. (1999) Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* **286**, 113-7.

Wolf R., Voscopoulos C. J., FitzGerald P. C., Goldsmith P., Cataisson C., Gunsior M., Walz M., Ruzicka T., Yuspa S. H. (2006) The mouse S100A15 ortholog parallels genomic organization, structure, gene expression, and protein-processing pattern of the human S100A7/A15 subfamily during epidermal maturation. *J Invest Dermatol* **126**, 1600-8.

Wu Z., Hoover D. M., Yang D., Boulegue C., Santamaria F., Oppenheim J. J., Lubkowski J., Lu W. (2003) Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8880-5.

Yang D., Chertov O., Bykovskaia S. N., Chen Q., Buffo M. J., Shogan J., Anderson M., Schröder J. M., Wang J. M., Howard O. M., Oppenheim J. J. (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-8.

Zaiou M. & Gallo R. L. (2002) Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med* **80**, 549-61.

Zasloff M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5449-53.

Zucht H. D., Grabowsky J., Schrader M., Liepke C., Jurgens M., Schulz-Knappe P., Forssmann W. G. (1998) Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur J Med Res* **3**, 315-23.

8. Anhang

8.1 Abbildungen und Tabellen

8.1.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 5.1: Aminosäuresequenzalignment von hBD3 und mBD14 (Ein-Aminosäure-Code).
- Abbildung 5.2: Chromatogramm einer C₈-Umkehrphasen-HPLC zur Aufreinigung des mBD14-pET-32-Fusionsproteins.
- Abbildung 5.3: Chromatogramm einer Aufreinigung von rekombinantem mBD14 über C₄-Umkehrphasen-HPLC nach proteolytischer Abspaltung des „His-Tags“.
- Abbildung 5.4: Massenbestimmung von mBD14 mittels QTOF-Massenspektrometrie.
- Abbildung 5.5: Coomassie Brilliant Blau-gefärbte SDS-PAGE einer rekombinanten Expression von mBD14 mit anschließender Aufreinigung.
- Abbildung 5.6: Spezifische mBD14-Antikörper konnten über Affinitätsäulen aus Ziegen Serum aufgereinigt werden.
- Abbildung 5.7: Die gereinigten mBD14-Antikörper zeigten im Westernblot nur eine spezifische Bande.
- Abbildung 5.8: Die affinitätsgereinigten mBD14-Antikörper detektieren hBD3 in ähnlichen Konzentrationen wie mBD14.
- Abbildung 5.9: Standardeichgerade des mBD14-ELISAs.
- Abbildung 5.10: Analyse der mBD14-Genexpression in verschiedenen murinen Geweben.
- Abbildung 5.11: Überstände von adhärent wachsenden Bakterienkulturen induzieren die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten *in vitro*.
- Abbildung 5.12: Überstände von adhärent wachsenden *Pseudomonas aeruginosa*- und *Staphylococcus aureus*-Kulturen induzieren die mBD14-Protein-Expression in primären Keratinozyten *in vitro*.
- Abbildung 5.13: PMA induziert die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten.
- Abbildung 5.14: INF- γ induziert die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten.
- Abbildung 5.15: TGF- α induziert die mBD14-mRNA-Expression in primären Keratinozyten.
- Abbildung 5.16: TGF- α induziert die mBD14-Protein-Expression in primären Keratinozyten *in vitro*.

- Abbildung 5.17: Immunreaktivität von mBD14 in gesunder Maushaut.
- Abbildung 5.18: Die Immunreaktivität des mBD14-Antikörpers ist spezifisch.
- Abbildung 5.19: Die mBD14-mRNA-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere induziert werden.
- Abbildung 5.20: Die mBD14-Protein-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere induziert werden.
- Abbildung 5.21: Die mBD14-mRNA-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine chronische Störung der Barriere induziert werden.
- Abbildung 5.22: Die mBD14-Proteinexpression kann *in vivo* in Maushaut durch eine chronische Störung der Barriere induziert werden.
- Abbildung 5.23: Die mBD14-Proteinexpression kann *in vivo* in Maushaut durch eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* induziert werden.
- Abbildung 5.24: Analyse der mBD3-Genexpression.
- Abbildung 5.25: Überstände von adhärent wachsenden *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterienkulturen induzieren die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten *in vitro*.
- Abbildung 5.26: PMA führt in primären Keratinozyten zu keiner signifikanten Stimulation der mBD3-mRNA-Expression.
- Abbildung 5.27: INF γ induziert die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten.
- Abbildung 5.28: IL-1 β induziert die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten.
- Abbildung 5.29: TNF α induziert die mBD3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten.
- Abbildung 5.30: Immunreaktivität von mBD3 in gesunder Maushaut.
- Abbildung 5.31: Die mBD3-mRNA-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere induziert werden.
- Abbildung 5.32: Die mBD3-Protein-Expression kann *in vivo* in Maushaut durch eine akute Störung der Barriere induziert werden.
- Abbildung 5.33: Die mBD3-mRNA-Expression wird *in vivo* in Maushaut durch eine chronische Störung der Barriere induziert.
- Abbildung 5.34: Die mBD3-Proteinexpression kann *in vivo* in Maushaut durch eine chronische Störung der Hautbarriere induziert werden.
- Abbildung 5.35: Chromatogramm einer C₂/C₁₈-Umkehrphasen-HPLC von der Hautwaschungsflüssigkeit von BALB/c-Mäusen.
- Abbildung 5.36: Massenspektrometrische Untersuchung ausgewählter Peaks aus der C₂C₁₈-Umkehrphasen-HPLC der Maushautwaschflüssigkeit.

- Abbildung 5.37: Spaltprodukte des Trypsinverdaus der Probe aus Abbildung 5.36 (A).
- Abbildung 5.38: Spaltprodukte des Trypsinverdaus der Probe aus Abbildung 5.36 (B).
- Abbildung 5.39: Chromatogramm der Aufreinigung des OBP1a-pSUMO3-Fusionsproteins über C₈-Umkehrphasen-HPLC.
- Abbildung 5.40: Chromatogramm der Aufreinigung von rekombinantem OBP1a über C₄-Umkehrphasen-HPLC nach proteolytischer Abspaltung des „His-Tags“.
- Abbildung 5.41: Massenbestimmung von OBP1a mittels QTOF-Massenspektrometrie.
- Abbildung 5.42: Das Serum der mit rekombinanten OBP1a-SUMO3-Fusionsprotein immunisierten Ziege detektiert rekombinantes OBP1a.

8.1.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 4.1: Verwendete Oligonukleotide.
- Tabelle 4.2: Verwendete Bakterien- und Hefestämme.
- Tabelle 4.3: Verwendete PCR-Produkte und deren Zielplasmide.
- Tabelle 5.1: mBD14 besitzt ein breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität.
- Tabelle 5.2: Die antimikrobielle Aktivität von mBD14 ist abhängig von Salzkonzentration und pH-Wert.
- Tabelle 5.3: Sequenzen der Trypsin-verdauten Fragmente von OBP1a und die dazugehörigen, im Spektrum gefundenen Massen.
- Tabelle 5.4: Sequenzen der Trypsin-verdauten Fragmente von NPSOBP1b und die dazugehörigen, im Spektrum gefundenen Massen.

9. Veröffentlichungen

9.1 Publikationen

K. Hinrichsen, R. Podschun, S. Schubert, J.M Schröder, J. Harder, E. Proksch (2008): **Mouse β -Defensin-14, an antimicrobial ortholog of human β -Defensin-3.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52 (5): 1876-1879.

9.2 Poster

K. Hinrichsen, J. Harder, E. Proksch (2007): **Recombinant expression of murine β -Defensin 14.** J. Invest. Dermatol. 127: 371 (Abstract).

R. Panzer, K. Hinrichsen, J.M. Jensen, E. Proksch (2007): **TLR 9 is not constitutively expressed in mouse skin in vivo, but is inducible by barrier injury.** J. Invest. Dermatol. 127: 369 (Abstract).

K. Hinrichsen, J. Harder and E. Proksch (2008): **Murine β -Defensin 14 is an antimicrobial active and inducible protein.** Exp. Dermatol. 17 (3): P171 (Abstract).

R. Panzer, K. Hinrichsen, M. Schmuth, K.R. Feingold, E. Proksch (2008): **Murine TLR 2, TLR 4 and TLR 9 are inducible by severe barrier injury.** J. Invest. Dermatol. 128 (S1): 627 (Abstract).

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure
ALP	Antileukoprotease
AP-1	Transkriptions-Aktivierungsprotein 1
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
cDNA	komplementäre DNA
CRAMP	Cathelin-related Antimicrobial Peptide
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFAD	Essentielle Fettsäuren-freie Diät
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamase
et al.	und andere
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hBD	Humanes β -Defensin
HNP	Human Neutrophil Peptide
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
JAK	Janus Kinase
kDa	Kilo-Dalton
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JAK	Janus-Kinase
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
Lcn	Lipocalin
LD ₉₀	Lethale Dosis 90 %
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Region
M	Molar (mol/L)
MAP	Mitogen-activated Protein
mBD	Murines β -Defensin
MR	multiresistent
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
min	Minute

mRNA	Boten-RNA
Myd88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
NCTC	National Collection of Type Cultures
NFκB	Nuclear Factor for κ Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells
NGAL	Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin
nm	Nanometer
NPSOBP	Novel Protein similar to OBP
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain Protein
OBP	Odorant-binding Protein
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-Myristat 13-Azetat
PPR	Pathogen Recognition Receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SKALP	Skin-derived anti-Leukoproteinase
SLPI	Secretory Leucocyte Protease Inhibitor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TSB	Tryptic Soy Broth
u	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VRE	Vancomycin-resistent
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ehrhardt Proksch möchte ich sehr für die Bereitstellung des Themas, für die Betreuung, sein Vertrauen und die ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig danke ich ganz herzlich für sein Interesse, seine Hilfsbereitschaft und die offizielle Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jens-Michael Schröder und Herrn Dr. Jürgen Harder danke ich für die vielen Hilfestellungen, Diskussionen und so manch guten Tipp.

Herrn Prof. Dr. Rainer Podschun möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der antimikrobiellen Tests danken.

Bei Herrn Dr. Josef Meingassner bedanke ich mich für das Übersenden der EFAD-Maushaut-Proben.

Ich möchte mich bei Graziella-Francesca Podda bedanken, die mit ihrer hervorragenden praktischen Arbeit einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, und darüber hinaus zu einer Freundin geworden ist.

Ich danke allen Kollegen und auch ehemaligen Kollegen des sechsten Stocks der Hautklinik für die Unterstützung und den netten Laboralltag. Bente Köten und Britta „Mac Gyver“ Hansmann danke ich für die vielen Tipps und Tricks. Insbesondere gilt mein Dank unser kleinen „AG-Proksch“ Claudia Neumann, Felix Scholz, Graziella-Francesca Podda und Rüdiger Panzer für die Unterstützung, den Zusammenhalt und all die lustigen Erlebnisse.

Für das aufmerksame Durchlesen verschiedener Teile meiner Doktorarbeit danke ich Felix Scholz, Uli Gerstel, Rüdiger Panzer und Graziella-Francesca Podda.

All meinen Freunden danke ich für ihr Interesse und die vielen aufmunternden Worte.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich durch nette Gespräche und so manch flotten Spruch immer wieder aufgebaut haben, wenn ich mal niedergeschlagen war, und Christoph, der mit seiner ruhigen Art immer für mich da war, auch wenn ich bestimmt das eine oder andere Mal anstrengend gewesen bin.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname, Name Kerstin Hinrichsen
Geburtstag 20. Februar 1979
Geburtstort Flensburg
Familienstand ledig
Derzeitige Anschrift Eckernförder Straße 19, 24116 Kiel

Schulische Daten

1985-1989 Besuch der Grundschule in Harrislee
1989-1998 Besuch des Alten Gymnasiums in Flensburg
19. Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

1998-2000 Ausbildung zur Milchwirtschaftlichen Laborantin bei der Firma Danisco in Niebüll
18. Juli 2000 Abschluss Milchwirtschaftliche Laborantin
2000-2005 Studium der Biochemie an der Universität Bielefeld
12/04-06/05 Diplomarbeit an der Universität Bielefeld in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie, Prof. Dr. Wienands und an der Georg-August-Universität Göttingen, Bereich Humanmedizin im Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie, Prof. Dr. Wienands; Thema der Diplomarbeit: „Funktionsanalyse des Adapterproteins mAbp1 in genetischen Mausmodellen“
5. Juli 2005 Abschluss Diplom Biochemikerin

Berufspraxis

Seit 10/05 Wissenschaftliche Angestellte am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, SFB 617, Teilprojekt A7, Projektleiter Prof. Dr. Dr. Proksch

Erklärung

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

Kiel, den

Kerstin Hinrichsen