

# **Proteinexpressionsanalysen und Funktionsuntersuchungen von Ifapsoriasin in der menschlichen Haut**

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



vorgelegt von  
Britta Hansmann

Kiel 2008

Referent/in: .....

Korreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

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

Der Dekan

»In der Wissenschaft beginnt alles Neue damit, dass jemand brummt

"Hmmm...ist ja komisch."«

*Isaac Asimov*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Haut.....	1
1.1.1 Aufbau der menschlichen Haut.....	1
1.1.1.1 Der "Cornified Cell Envelope" und der "Epidermale Differenzierungskomplex" .....	4
1.1.1.2 Die "S100 Fused Type Protein"-Familie .....	7
1.2 Die Immunabwehr der Haut .....	11
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	13
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Chemikalien .....	15
2.2 Geräte .....	15
2.3 Mikroorganismen und Zellkulturen .....	16
2.4 Antikörper.....	17
2.5 Vektoren .....	17
2.6 Oligonukleotide .....	18
2.7 Eukaryotische Zellen.....	19
2.7.1 Zellkultur-Medien .....	19
2.7.2 Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Kollagen .....	19
2.7.3 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten .....	20
2.8 Molekularbiologische Methoden.....	20
2.8.1 RNA-Isolierung.....	20
2.8.2 cDNA-Synthese .....	21
2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion .....	21
2.8.3.1 Standard-PCR mit <i>Pfu</i> DNA-Polymerase.....	21
2.8.3.2 "Nested PCR" .....	22
2.8.3.3 Kolonie-PCR .....	24
2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.8.5 Aufreinigung amplifizierter PCR-Fragmente.....	25
2.8.6 Klonierung.....	25
2.8.6.1 Ligation .....	26
2.8.6.2 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien .....	26

---

2.8.6.3	Transformation.....	27
2.8.7	Plasmidisolierung.....	28
2.8.8	Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	28
2.8.9	Restriktionshydrolyse.....	28
2.9	Rekombinante Expression in <i>E. coli</i> -Bakterien.....	29
2.9.1	Verwendete Expressionsvektoren.....	29
2.9.1.1	pET-32a.....	29
2.9.1.2	pET SUMO und pSUMO3.....	30
2.9.2	Expression des Fusionsproteins in <i>E. coli</i> -Bakterien.....	30
2.9.3	Lyse der <i>E. coli</i> -Bakterien.....	31
2.9.4	Hydrolyse der Fusionsproteine.....	31
2.9.4.1	Hydrolyse der im pET-32a-System exprimierten Fusionsproteine.....	31
2.9.4.2	Hydrolyse der im SUMO-System exprimierten Fusionsproteine.....	32
2.10	Chromatographische Aufreinigung exprimierter Proteine.....	32
2.10.1	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie.....	32
2.10.2	C8-Umkehrphasen-HPLC.....	33
2.10.3	C4-Umkehrphasen-HPLC.....	33
2.10.4	C2/C18-Umkehrphasen-HPLC.....	34
2.11	Proteinanalytik.....	34
2.11.1	Proteinextraktionen aus Haut und <i>Stratum corneum</i> .....	34
2.11.2	Gewinnung und Behandlung von Schweißproben.....	37
2.11.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	37
2.11.3.1	Berechnung über den molaren Extinktionskoeffizienten.....	37
2.11.3.2	Berechnung mit der Bicinchoninsäure-Bestimmung.....	38
2.11.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	39
2.11.5	Proteinfärbung.....	39
2.11.5.1	Coomassie Brilliant Blue-Färbung.....	39
2.11.5.2	Silberfärbung.....	39
2.11.6	Massenspektrometrie.....	40
2.11.7	Datenbankenanalysen und Sequenzvergleiche.....	41
2.12	Herstellung polyklonaler Antikörper aus der Ziege.....	41
2.12.1	Antigen-Kopplung und Immunisierung.....	41
2.12.2	Aufreinigung polyklonaler Antisera über Affinitätschromatographie.....	42
2.13	Immunologische Methoden.....	44
2.13.1	Dot Blot.....	44

---

2.13.2	Western Blot .....	44
2.13.3	Immunhistochemie.....	45
2.13.4	Immunfluoreszenz.....	46
2.13.4.1	Immunfluoreszenz histologischer Schnitte.....	46
2.13.4.2	Immunfluoreszenz kultivierter Keratinozyten .....	46
2.14	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität.....	47
2.14.1	Radialdiffusionstest.....	47
2.14.2	Mikrodilutionstest .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1	Rekombinante Expression verschiedener IFPS-Fragmente.....	50
3.1.1	Expression im pET-32a-System .....	52
3.1.2	Expression im SUMO-System .....	54
3.2	Generierung polyklonaler Antikörper gegen IFPS-Fragmente.....	57
3.2.1	Aufreinigung des Ziegenserums.....	58
3.2.2	Titrierung der Antikörper-Konzentration .....	59
3.3	Proteinexpression von Ifapsoriasin .....	59
3.3.1	Ifapsoriasin ist in gesunder Haut exprimiert .....	59
3.3.2	Ifapsoriasin ist zum Teil in Hauterkrankungen reguliert .....	61
3.3.3	Ifapsoriasin ist räumlich ähnlich exprimiert wie Filaggrin .....	63
3.3.4	Ifapsoriasin-Antikörper zeigen auf zellulärer Ebene unterschiedliche Verteilungsmuster .....	65
3.3.5	Ifapsoriasin ist in Proteinextrakten der Haut nachweisbar .....	66
3.3.6	Ifapsoriasin ist im Schweiß nachweisbar.....	76
3.4	Identifizierung natürlich vorkommender Ifapsoriasin-Fragmente .....	79
3.5	Antimikrobielle Aktivität von Ifapsoriasin .....	80
3.5.1	Ifapsoriasin-Fragmente besitzen antimikrobielle Aktivität .....	81
3.5.2	Ein C-terminaler Sequenzabschnitt ist verantwortlich für die antimikrobielle Aktivität gegen Pseudomonaden .....	83
3.6	Sequenzanalysen .....	84
3.6.1	Ein Teil des C-Terminus ist hochkonserviert in 25 Säugetier- Spezies .....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>88</b>
4.1	Ausblick .....	106
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>110</b>

---

<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>112</b>
7.1	Vektorkarten.....	112
7.1.1	pET-32a-Vektor.....	112
7.1.2	pET SUMO-Vektor.....	113
7.1.3	pSUMO3-Vektor.....	113
7.2	Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleinsäuren .....	114
7.3	Sequenzen.....	114
7.3.1	cDNA- und Protein-Sequenz des humanen Ifapsoriasins.....	114
7.3.2	Übersicht der rekombinanten Proteinfragmente von Ifapsoriasin .....	114
7.3.2.1	IFPS-1.....	114
7.3.2.2	IFPS-2.....	115
7.3.2.3	IFPS-3.....	115
7.3.2.4	IFPS-4.....	115
7.3.2.5	IFPS-B13 .....	116
7.3.2.6	IFPS-B14 .....	116
7.3.2.7	IFPS-C-Term.....	116
7.3.2.8	IFPS-C-Term short.....	116
7.4	Biochemische Eigenschaften der rekombinanten IFPS-Fragmente.....	117
7.4.1	Übersicht über die Massen rekombinanter Ifapsoriasin-Fragmente .....	117
7.4.2	Übersicht über die pI-Werte rekombinanter Ifapsoriasin-Fragmente .....	117
7.4.3	Übersicht über die molaren Extinktionskoeffizienten rekombinanter Ifapsoriasin-Fragmente .....	118
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>119</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>128</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>131</b>

# Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

## Abbildungen

1.1	Aufbau der menschlichen Epidermis .....	2
1.2	Ausbildung des "Cornified Cell Envelope" .....	5
1.3	Der "Epidermale Differenzierungskomplex" des humanen Chromosoms 1q21.3 .....	6
1.4	Struktur der "S100 Fused Type Protein"-Familie .....	7
2.1	Das Prinzip der "Nested PCR" .....	23
2.2	Proteinextraktion aus <i>Stratum corneum</i> -Proben .....	36
3.1	Schematische Struktur des humanen Ifapsoriasin-Proteins .....	50
3.2	Schematische Übersicht über die Versuchsabläufe zur Herstellung eines rekombinanten Proteins .....	51
3.3	Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten SUMO-IFPS-4- Fusionsproteins mittels C8-Umkehrphasen-HPLC .....	53
3.4	Chromatogramm der Aufreinigung einer Enterokinase-behandelten Probe des pET-IFPS-3-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC .....	54
3.5	Chromatogramm der Aufreinigung einer SUMO-Protease 2- behandelten Probe des SUMO-IFPS-B13-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC .....	56
3.6	Massenspektrometrische Daten des IFPS-4-Proteins .....	57
3.7	Übersicht der Ifapsoriasin-Sequenzabschnitte, gegen die Antikörper generiert wurden .....	57
3.8	Chromatogramm der Aufreinigung der polyklonalen IFPS-3-Antikörper mittels Affinitätschromatographie .....	58
3.9	Immunhistochemische Färbungen von Hautgewebeschnitten .....	60
3.10	Immunhistochemische Färbungen von verschiedenen Hautanhangsgebilden .....	61
3.11	Immunhistochemische Färbungen von läSIONALEM und nicht-läSIONALEM Hautgewebe bei Psoriasis und Atopischer Dermatitis .....	62
3.12	Immunfluoreszenzfärbungen mit $\alpha$ -Filaggrin und $\alpha$ -IFPS-2 in Haut .....	63
3.13	Immunfluoreszenzfärbungen mit $\alpha$ -Filaggrin und $\alpha$ -IFPS-4 in Haut .....	64
3.14	Immunfluoreszenzfärbungen mit $\alpha$ -IFPS-2 bzw. $\alpha$ -IFPS-4 und $\alpha$ -Filaggrin bzw. $\alpha$ -E-Cadherin .....	65
3.15	Dot Blot der Proteinextrakte aus Vollhaut mit unterschiedlichen Puffern .....	67
3.16	Silber-gefärbte SDS-PAGE der Proteinextrakte aus Vollhaut-Proben .....	68
3.17	Silber-gefärbte SDS-PAGE der Proteinextrakte aus <i>Stratum corneum</i> - und Epidermis- Proben .....	69
3.18	Western Blot-Analysen verschiedener <i>Stratum corneum</i> - und Epidermis-Proteinextrakte .....	70
3.19	Silber-gefärbte SDS-PAGE der Proteinextrakte aus Vollhaut- und <i>Stratum corneum</i> - Proben .....	72
3.20	Western Blot-Analysen verschiedener Vollhaut- und <i>Stratum corneum</i> -Proteinextrakte .....	73



3.21	Vergleichende Dot Blot-Analysen von <i>Stratum corneum</i> -Extrakten.....	75
3.22	Dot Blot-Analysen von Detergenzien-behandeltem <i>Stratum corneum</i> .....	76
3.23	Silber-gefärbte SDS-PAGE unterschiedlich behandelte Schweißproben .....	78
3.24	Western Blot-Analysen unterschiedlich behandelte Schweißproben.....	79
3.25	Vergleich von C-terminalen Sequenzabschnitten in putativen Ifapsoriasin-Orthologen.....	85
3.26	Phylogramm der putativen Orthologe des Ifapsoriasin-C-Terminus .....	86
3.27	Immunhistochemische Färbungen verschiedener Epithelien von Mäusen .....	87
4.1	Potenzielle Funktionen von Ifapsoriasin in der Haut.....	105
7.1	Schematische Darstellung des pET-32a-Expressionsvektors .....	112
7.2	Schematische Darstellung des pET SUMO-Expressionsvektors.....	113
7.3	Schematische Darstellung des pSUMO3-Expressionsvektors .....	113

## Tabellen

2.1	Antibiotika-Resistenzen der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme .....	27
2.2	Antibiotika-Resistenzen der verwendeten Vektoren .....	27
2.3	Verwendete Restriktionsendonukleasen .....	28
2.4	Übersicht über die Hydrolyse-Bedingungen der verschiedenen Fusionsproteine im SUMO-System .....	32
2.5	Kultivierung der unterschiedlichen Mikroorganismen-Gattungen im Radialdiffusionstest .....	48
3.1	Antimikrobielle Aktivität verschiedener Ifapsoriasin-Fragmente.....	82
7.1	Abkürzungen der Aminosäuren.....	114
7.2	Abkürzungen der Nukleinsäuren .....	114
7.3	Massen der rekombinant exprimierten IFPS-Proteinfragmente in Dalton .....	117
7.4	pI-Werte der rekombinant exprimierten IFPS-Proteinfragmente.....	117
7.5	Molare Extinktionskoeffizienten der rekombinant exprimierten IFPS-Proteinfragmente.....	118

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
APS	Aminoperoxysulfat
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	"complementary DNA"
CMC	kritische Mizellenkonzentration
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie
EST	"expressed sequence tag"
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm
IFPS	Ifapsoriasin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	"Lysogenic Broth"
M	molar
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
mM	millimolar
mRNA	"messenger RNA"
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	mikromolar

---

NCBI	"National Center for Biotechnology Information"
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD <sub>600nm</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	"Phosphate-Buffered Saline solution"
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
RACE	"Rapid Amplification of cDNA Ends"
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	"Tris-Buffered Saline"
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit(s)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

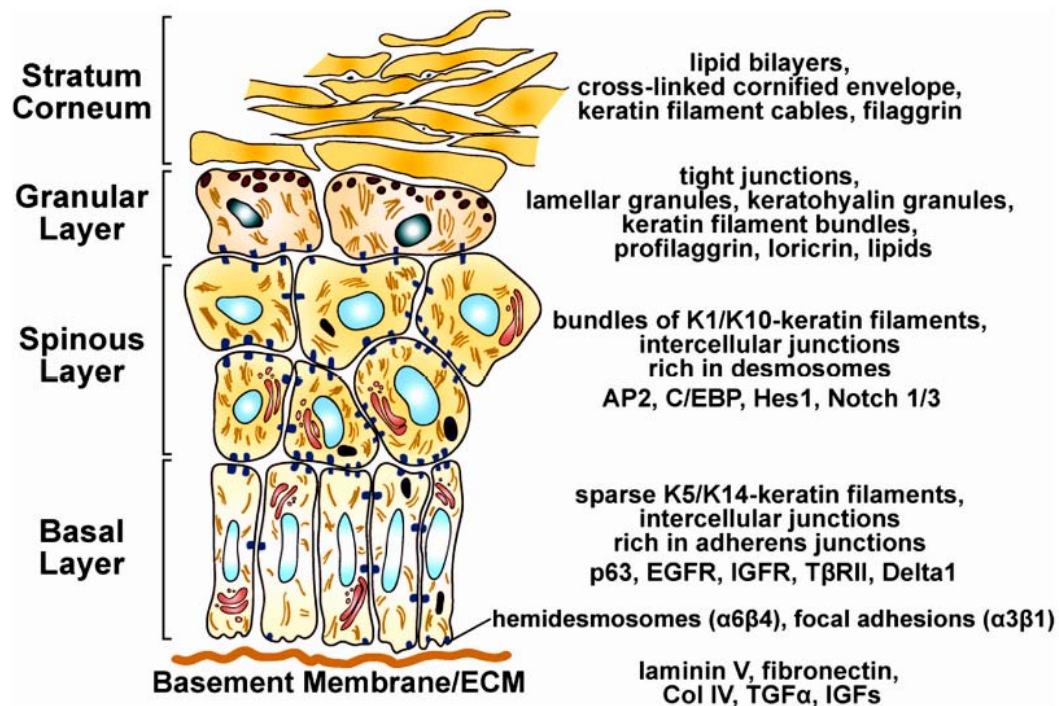
## 1.1 Die Haut

Die Haut des Menschen ist mit einer Fläche von 1–2 m<sup>2</sup> eines der größten Organe des menschlichen Körpers (Alonso und Fuchs, 2003). Sie stellt den Kontakt zwischen der Umwelt und dem Körperinneren her und erfüllt wichtige Funktionen zur Homeostase verschiedener Körperfunktionen. So bietet sie durch die Verhornung des äußeren Plattenepithels (*Stratum corneum*) einen mechanischen Schutz und ist zusätzlich beteiligt an der Temperaturregulierung (z. B. durch Regulierung der Hautblutgefäße oder Flüssigkeitsabgabe durch Drüsen), der Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes (Schutz vor Flüssigkeitsverlust, kontrollierte Flüssigkeitsabgabe), trägt bei zu verschiedenen Sinnesfunktionen (Tastsinn, Druck-, Schmerz- und Thermorezeptoren) und sogar zur Kommunikation (Erröten, Erblassen) (Leonhardt, 1990). Die Haut spielt zudem eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der angeborenen Immunität und verbindet das angeborene und adaptive Immunsystem. Die Haut als mechanischer Schutzmantel, sensorisches und exkretorisches Organ, Regulator der Körpertemperatur und Permeabilitätsbarriere stellt damit eine essentielle Anpassung an das terrestrische Leben dar (Harding, 2004; Elias, 2005; Elias, 2008).

### 1.1.1 Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Hautdecke wird aufgeteilt in die Haut (Cutis) und Unterhaut (Subcutis). Hierbei wird die Cutis nochmals unterteilt in die Lederhaut (Dermis) und Oberhaut (Epidermis). Den Hauptzelltyp der Epidermis machen Keratinozyten aus (Eckert et al., 1997). Die Epidermis wird typischerweise in vier Schichten gegliedert: das *Stratum basale*, das *Stratum spinosum*, das *Stratum granulosum* und das *Stratum corneum* (Abb. 1.1). Im *Stratum basale*, das auch Regenerationsschicht genannt wird, laufen die Hauptanzahl der Mitosen ab. Hier sind auch die interfollikulären Stammzellen lokalisiert (Alonso und Fuchs, 2003). Das *Stratum basale* ist die erste Zellschicht der Epidermis über der Dermis und steht in Kontakt mit der Basallamina, während die Zellen im *Stratum spinosum* diesen Kontakt verloren haben. Die Zellen im *Stratum spinosum* besitzen eine eher polygonale Form und hängen durch stachelförmige Fortsätze an vermehrt gebildeten Desmosomen

zusammen ("Stachelzellschicht"). Das *Stratum granulosum* ist durch vermehrte Granula-Bildung innerhalb der Zellen charakterisiert, dazu gehören vor allem Keratohyalin-Granula und lamellierte Granula, die so genannten "Lamellar Bodies". Im *Stratum corneum* sind die Keratinozyten abgestorben. Sie sind durch eine verhornte Zellhülle, den so genannten "Cornified Cell Envelope", und die lipidreiche extrazelluläre Matrix sowie Korneodesmosomen miteinander verbunden (so genanntes "brick and mortar"-Modell, Nemes und Steinert, 1999). Zellkerne oder Organellen sind nicht mehr vorhanden. Die toten Zellen werden auch Korneozyten genannten und stellen den hauptsächlichsten Schutz der Haut gegen äußere Einflüsse, vor allem Wasserverlust, dar. Sie werden durch immer neue, vom *Stratum basale* nachkommende, ausdifferenzierende Zellen ersetzt. Ein Keratinozyt durchläuft den Zyklus von einer Teilung im *Stratum basale* bis hin zur Ausdifferenzierung und Abschuppung in etwa einem Monat (Houben et al., 2007).



**Abb. 1.1: Aufbau der menschlichen Epidermis.** Die Keratinozyten proliferieren im *Stratum basale* ("Basal Layer") und durchwandern während der terminalen Differenzierung zu Korneozyten die Zellschichten der Epidermis (*Stratum spinosum*, "Spinous Layer"; *Stratum granulosum*, "Granular Layer"; *Stratum corneum*) und ändern hierbei nicht nur ihre Morphologie, sondern auch die Genexpression. Die verschiedenen Zellschichten exprimieren für sie jeweils typische Gene ("molekulare Marker"), von denen einige rechts aufgeführt sind (aus Fuchs, 2008).

Die stattfindende Ausdifferenzierung und Verhornung stellt eine spezielle Art des programmierten Zelltods dar, der sich allerdings von der Apoptose unterscheidet (Polakowska et al., 1994; Takahashi et al., 2000; Lippens et al., 2005). Die Apoptose ist ein relativ schneller Prozess, der in einigen Stunden vollendet wird. Dabei löst sich die Zelle vom Substrat, die Caspase-Kaskade wird in Gang gesetzt und die Zelle beginnt, Blasen zu bilden ("Blebbing"). Chromatin und Zytoplasma kondensieren, die DNA wird in charakteristische Fragmente gespalten, das Zytoskelett abgebaut und Organellen werden geschädigt (Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien). Durch Abschnürung werden die so genannten "Apoptotic Bodies" gebildet, die jeweils Teile des Zytoplasmas und auch der Organellen enthalten. Die Zytoplasmamembran bleibt während des gesamten Vorgangs intakt. Beim Vorgang der Differenzierung und Verhornung der Epidermiszellen hingegen befinden sich undifferenzierte Zellen ausschließlich im *Stratum basale*. Diese lösen sich nach mitotischer Teilung von der Basallamina ab und beginnen, sich im *Stratum spinosum* abzuflachen. Die Zellen exprimieren statt der für das *Stratum basale* typischen Keratine 5 und 14 die für das *Stratum spinosum* und nachfolgende Zellschichten charakteristischen Keratine 1 und 10 (Eckert et al., 1997; Fuchs, 2008). Im *Stratum granulosum* werden vermehrt Proteine exprimiert, die als Marker der Differenzierung dienen, unter anderem Involucrin, Loricrin und Filaggrin (Eckert et al., 1997). Diese Proteine sind auch maßgeblich an der Ausbildung der verhornten Zellen und deren Hülle, dem "Cornified Cell Envelope", beteiligt (Candi et al., 2005). Involucrin und Loricrin, das in so genannten L-Keratohyalin-Granula in der Zelle vorkommt, sind durch kovalente Verknüpfungen von Transglutaminasen am Aufbau des "Cornified Cell Envelope" beteiligt (siehe 1.1.1.1). Profilaggrin, das als Proprotein exprimiert wird, ist in den so genannten F-Keratohyalin-Granula gelagert und wird während der Differenzierung der Keratinozyten zu funktionellen Filaggrin-Einheiten prozessiert (Übersicht in O'Regan et al., 2008). Diese Untereinheiten interagieren mit den Keratinfilamenten der Zellen, was zu einem Kollaps des Keratin-Netzwerks führt und eine Änderung der Zellform bedingt (Dale et al., 1997).

Sowohl während der Apoptose als auch während der Differenzierung spielen Proteasen eine entscheidende Rolle. Aktivierte Caspasen, vor allem Caspase-3, -6 und -7, sind Effektor-Moleküle der Apoptose und das Resultat der Caspase-Kaskade (Lamkanfi et al., 2002; Houben et al., 2007). Diese Proteasen zerstören durch Hydrolyse zelluläre Proteine und tragen so zum Absterben der Zelle bei. Während

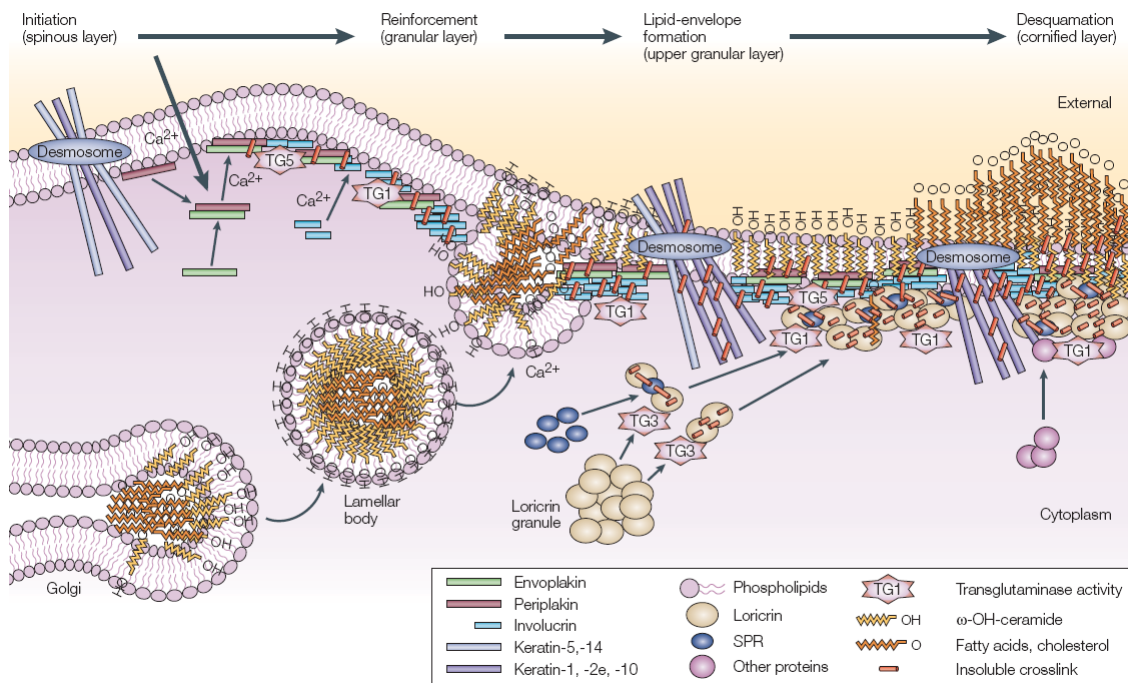
der terminalen Differenzierung von Keratinozyten sind ebenfalls eine Reihe verschiedener Proteasen beteiligt, allerdings wurde bisher als einzige Caspase nur Caspase-14 vollständig prozessiert und aktiv identifiziert (Lippens et al., 2000; Eckhart et al., 2000).

Der epidermale  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient scheint als einer der Auslöser der terminalen Differenzierung eine Schlüsselrolle einzunehmen. In der Epidermis ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im *Stratum basale* niedrig und steigt bis zum *Stratum granulosum* hin an. Im *Stratum corneum* kann kaum noch  $\text{Ca}^{2+}$  detektiert werden (Menon et al., 1985). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass in Medium mit geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultivierte Keratinozyten Differenzierungsmarker wie Profilaggrin und Loricrin kaum exprimieren. Kultivierung dieser Zellen in Medium mit erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führte dagegen zu einem Anstieg der Expression solcher Differenzierungsmarker (Übersicht in Bikle et al., 2005).

#### **1.1.1.1 Der "Cornified Cell Envelope" und der "Epidermale Differenzierungskomplex"**

Im *Stratum spinosum* beginnt die Ausbildung des "Cornified Cell Envelope", einer Struktur, deren Präsenz für die Differenzierung und spätere Desquamation (Abschuppung) der Keratinozyten von entscheidender Bedeutung ist (Abb. 1.2). Strukturelle Proteine und Lipide werden synthetisiert, die Struktur und Zusammensetzung der Desmosomen verändert sich während der Differenzierung. Im *Stratum basale* und im *Stratum spinosum* bilden Plakoglobin, Desmoplakin und Plakophilin hauptsächlich die intrazellulären Plaques, die über die zu den Cadherinen gehörenden Adhäsionsproteine Desmocollin 2 und 3 sowie Desmoglein 2 und 3 mit den Nachbarzellen verbunden sind. Während der weiteren Differenzierung werden die intrazellulären Plaques durch kovalent verknüpftes Envoplakin und Periplakin ersetzt, die Zellen sind extrazellulär ausschließlich durch Desmocollin 1 und Desmoglein 1 miteinander verbunden. Zusätzlich wird diese Zell-Zell-Verbindung durch das Glykoprotein Corneodesmosin extrazellulär verstärkt (Egelrud, 2000; Candi et al., 2005). Die Degradation dieser Corneodesmosomen trägt im Wesentlichen zur Desquamation bei (Chapman und Walsh, 1990). Im *Stratum granulosum* werden Lipide kovalent extrazellulär an bereits verknüpfte "Cornified Cell Envelope"-Proteine, vor allem Involucrin, gebunden. Auch Loricrin, neben Profilaggrin ein Hauptbestandteil der Keratohyalin-Granula, wird durch

Transglutaminasen verstärkt mit den "Small Proline-Rich"-Proteinen vernetzt und an den Desmosomen verankert. Lipide, die in die Lamellarkörper synthetisiert wurden, werden durch Fusion dieser Lamellarkörper mit der Zytoplasmamembran in den extrazellulären Raum abgegeben und tragen so ebenfalls zu der Ausbildung einer äußeren Lipidhülle bei. Hauptsächliche Bestandteile dieser Lipidmatrix sind vor allem  $\omega$ -Ceramide, Cholesterin und freie Fettsäuren (Weerheim und Ponec, 2001). Im *Stratum corneum* schließlich ist die Plasmamembran der Zelle vollständig ersetzt durch vernetzte Proteine auf der zytosolischen Seite und durch die Lipidmatrix auf der extrazellulären Seite.

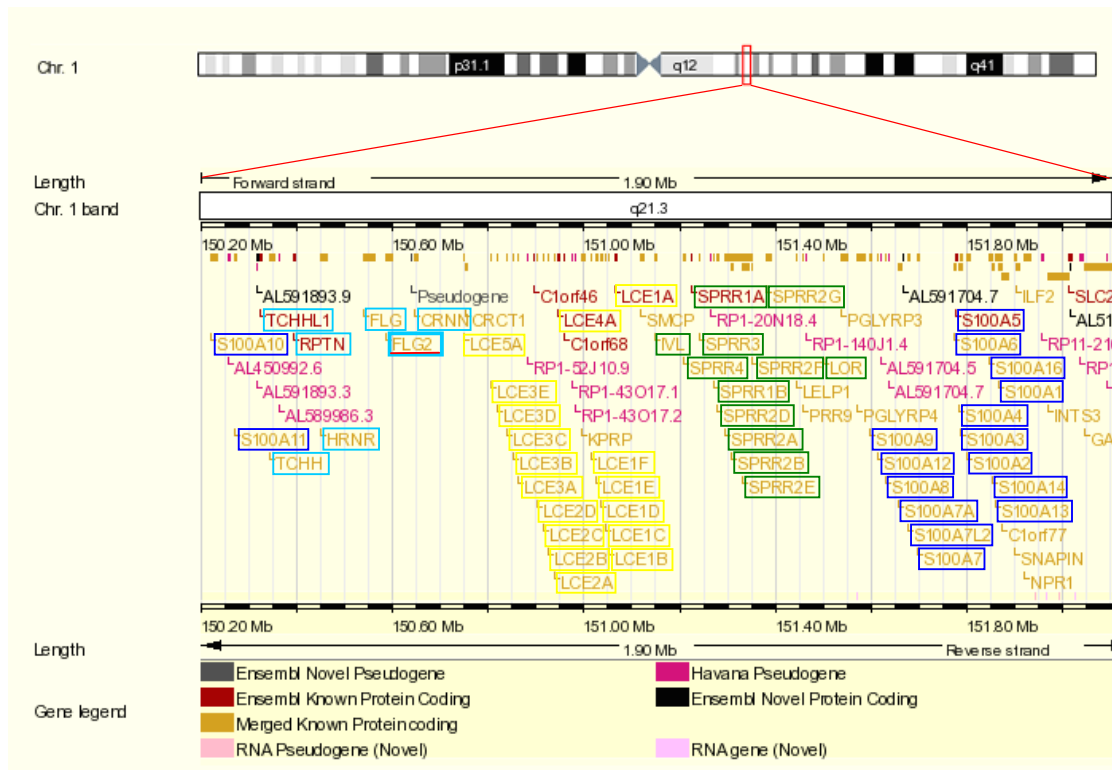


**Abb. 1.2: Ausbildung des "Cornified Cell Envelope".** Als "Cornified Cell Envelope", eine verhornte Zelhülle, wird die unlösliche Proteinschicht bezeichnet, die in Korneozyten (Keratinocyten im *Stratum corneum*) die Plasmamembran ersetzt und als Grundgerüst für die extrazelluläre Lipidschicht dient. Die Ausbildung beginnt im *Stratum spinosum* und wird im *Stratum granulosum* vollendet, bis sich schließlich die toten Korneozyten von den anderen Zellen ablösen (Desquamation) (aus Candi et al., 2005).

Viele der Proteine, die verstärkt während des Prozesses der Differenzierung exprimiert werden, sind in der Region 1q21.3 des humanen Chromosoms 1 lokalisiert. Dieser Abschnitt wird daher "Epidermaler Differenzierungskomplex" genannt und umfasst eine Region von etwa 1,7 Mb (Moseley und Seldin, 1989; Volz et al., 1993; Mischke et al., 1996). Diese chromosomale Region konnte auch bei verschiedenen anderen Spezies identifiziert werden, wie z. B. bei der Maus auf



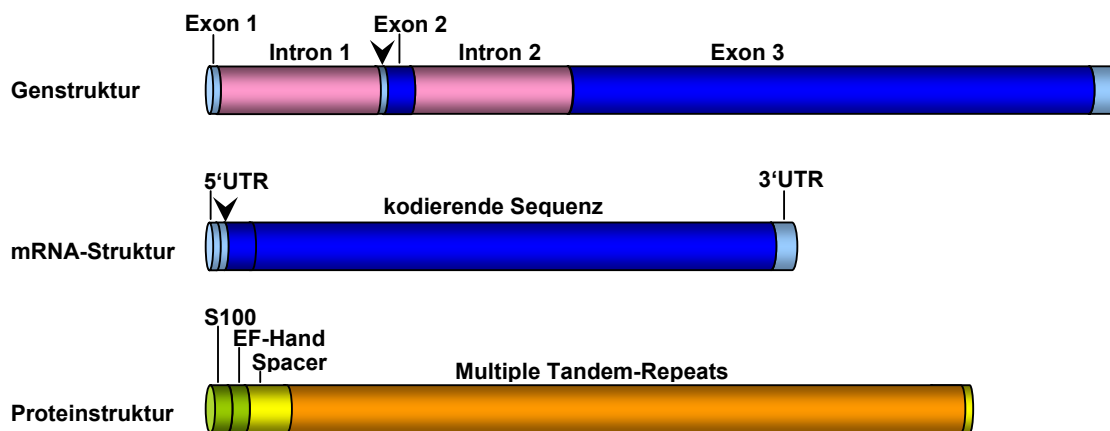
Chromosom 3F2.1 (Mathur et al., 2004) und bei der Spitzmausbeutelratte aus der Ordnung der Beuteltiere auf Chromosom 2 (Vanhoutteghem et al., 2008). Vermutlich existieren syntenische Bereiche auch in weiteren Spezies der Säugetiere und auch der Vögel (Vanhoutteghem et al., 2008). Die Proteine, deren kodierende Sequenzen in diesem Abschnitt liegen, können im Wesentlichen vier verschiedenen Familien zugeordnet werden (Mischke et al., 1996; Jackson et al., 2005): die Familie der S100-Proteine, die Familie der "Late Cornified Envelope"-Proteine, der "Cornified Envelope Precursor"-Proteine und der "S100 Fused Type"-Proteine (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Der "Epidermale Differenzierungs-komplex" des humanen Chromosoms 1q21.3.** In Chromosom 1 (Chr. 1) wurde die Region von 150,2 Mb bis 152,0 Mb vergrößert dargestellt. Der "Epidermale Differenzierungs-komplex" umfasst eine Region von etwa 1,7 Mb im Abschnitt 1q21.3 (roter Kasten). Die Expression eines großen Anteils der Gene dieses Chromosomenabschnitts ist während der terminalen Differenzierung von Keratinozyten reguliert. Darunter fallen u. a. die Familien der "S100"-Proteine (blauer Kasten), die "S100 Fused Type"-Proteine (hellblauer Kasten), zu der auch Ifapsoriasisin (FLG2) gehört, der "Late Cornified Envelope"-Proteine (grüner Kasten), und der "Cornified Cell Envelope Precursor"-Proteine, zu denen die Gruppe der "Small Proline-Rich"-Proteine, Loricrin (LOR) und Involucrin (IVL) gehören. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Ensembl-Servers erstellt.

### 1.1.1.2 Die "S100 Fused Type Protein"-Familie

Die Proteinstruktur der "S100 Fused Type"-Proteine weist sowohl charakteristische Sequenzmerkmale der S100-Proteine als auch Sequenzmerkmale der "Cornified Cell Envelope Precursor"-Proteine auf. Die S100-Proteine, zu der unter anderem auch Proteine wie Psoriasin (S100A7), Calgranulin A (S100A8) und B (S100A9) gehören, sind charakterisiert durch ihre N-terminalen potenziellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomänen, die S100- und EF-Hand-Domäne. Die "Cornified Cell Envelope Precursor"-Proteine, zu denen die Gruppe der "Small Proline-Rich"-Proteine sowie Involucrin und Loricrin gehören, zeichnen sich durch eine unterschiedliche Anzahl an Tandem-Wiederholungen aus. Diese Merkmale sind in der Sequenz der "S100 Fused Type"-Proteine "fusioniert". Auf genomischer, mRNA- und Proteinebene weisen alle Mitglieder der Familie eine sehr konservierte Struktur auf (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Struktur der "S100 Fused Type Protein"-Familie.** Die Struktur auf genomischer, mRNA- und Proteinebene der "S100 Fused Type Protein"-Mitglieder ist hochkonserviert. Hellblau: nicht-kodierende Sequenzen; dunkelblau: kodierende Sequenzen; grün: S100- und EF-Hand-Domäne; gelb: Spacer-Sequenzen; orange: Multiple Tandemwiederholungen; UTR: untranslatierte Region. Der Pfeil markiert das Translationsstartkodon ATG.

Die genomische Sequenz weist drei Exons auf, die durch zwei Introns geteilt werden. Das erste, mit etwa 50 bp sehr kleine Exon beinhaltet einen nicht-kodierenden Bereich der 5'-UTR. Das mit etwa 150 bp größere zweite Exon trägt das Translationsstartkodon und kodiert für die S100-Domäne, während die gesamte restliche kodierende Sequenz und die 3'-UTR im dritten Exon liegen. Die Proteinstruktur weist N-terminal eine S100- und eine EF-Hand-Domäne auf, es folgen verschiedene Tandemsequenzwiederholungen, die sich je nach Protein in

Länge und Zusammensetzung unterscheiden und sowohl N- als auch C-terminal von Spacer-Sequenzen flankiert werden.

Zur Familie der humanen "S100 Fused Type"-Proteine gehören Trichohyalin-like 1, Trichohyalin, Repetin, Hornerin, Profilaggrin, Ifapsoriasin und Cornulin.

Trichohyalin-like 1 konnte bisher nur auf genomischer Ebene identifiziert werden, zur Expression und Funktion sind keine Daten bekannt.

Das humane Trichohyalin wird hauptsächlich in Haarfollikelzellen der inneren Wurzelscheide, aber auch in Zellen des Nagelbetts, in den filiformen Papillen der Zunge und eingeschränkt in der Epidermis in so genannten Trichohyalin-Granula exprimiert (Rothnagel und Rogers, 1986; Hamilton et al., 1991; O'Keefe et al., 1993). In den Zungen verschiedener anderer Säugetiere wie Maus, Rind, Schaf, Hund und Schwein konnte es ebenfalls nachgewiesen werden (O'Keefe et al., 1993). Als Substrat von Transglutaminasen wird Trichohyalin vermutlich zur mechanischen Verstärkung der jeweiligen Strukturen kovalent über Isopeptid-Bindungen an Keratine im Haar oder an verschiedene Proteine des "Cornified Cell Envelope" in der Epidermis und anderer Epithelien gebunden (Tarcza et al., 1997; Steinert et al., 1998).

Das Repetin der Maus wird auf mRNA-Ebene vor allem in der Zunge und im Vormagen, aber nur gering in der Haut exprimiert (Krieg et al., 1997). Es wird auf Proteinebene im "Cornified Cell Envelope" mit Trichohyalin in der inneren Haarwurzelscheide verknüpft (Steinert et al., 2003). Das humane Repetin konnte hauptsächlich in der Zunge, inneren Haarwurzelscheide und fokal auch in der Epidermis nachgewiesen werden (Huber et al., 2005). Repetin ist vermutlich mit Keratohyalin-Granula assoziiert (Huber et al., 2005).

Hornerin wurde ebenfalls zuerst in der Maus beschrieben. Die Expression beschränkt sich hier auf das *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* der Epidermis, die Zunge, den Ösophagus und hauptsächlich den Vormagen, wo sowohl mRNA als auch Protein detektiert wurden (Makino et al., 2001; Makino et al., 2003). Murines Hornerin kommt wie murines Profilaggrin in den Keratohyalin-Granula vor (Makino et al., 2003). Das humane Hornerin konnte zunächst lediglich in psoriatischen Läsionen und regenerierender Haut detektiert werden (Takaishi et al., 2005). Kürzlich konnte jedoch auch eine Proteinexpression im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* gesunder Haut nachgewiesen werden; während die Expression in läsionaler Haut in Psoriasis und Atopischer Dermatitis verringert war

(Wu et al., 2008). Zusätzlich wurde Hornerin in der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel detektiert (Wu et al., 2008).

Neben Trichohyalin ist Filaggrin bzw. Profilaggrin das am längsten bekannte Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie. Es wird als unlösliches und phosphoryliertes Proprotein exprimiert (Resing et al., 1995a) und in den so genannten F-Keratohyalin-Granula gelagert (Steven et al., 1990). Für Profilaggrin ist bekannt, dass nach der Proteinsynthese als Proprotein durch Prozessierung die funktionellen Filaggrin-Untereinheiten entstehen. Diese werden anschließend im *Stratum corneum* zu kleineren Einheiten weiter prozessiert und dienen der Haut als so genannte "Natural Moisturizing Factors", natürliche Feuchtigkeitsspeicher (Übersicht in Rawlings et al., 1994; Harding et al., 2000). An dieser Prozessierung sind vermutlich verschiedene Proteasen wie Matriptase (List et al., 2003), Profilaggrin Endoproteinase 1 (PEP1, Resing et al., 1995b), Furin (Pearton et al., 2001) und Caspase 14 (Denecker et al., 2008) beteiligt. Filaggrin ist in der Epidermis im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*, ebenso wie im Ösophagus und in der Zunge exprimiert (Makino et al., 2003). Die Filaggrin-Untereinheiten sind in der Lage, Keratinfilamente zu bündeln. Dies führt zum Kollaps des Zytoskeletts und begünstigt die Ausbildung der abgeflachten Zellform, die im *Stratum corneum* charakteristisch für die Zellen ist (Dale et al., 1997; Candi et al., 2005). Mutationen des *Filaggrin*-Gens oder Mutationen in Genen, deren Proteine an der korrekten Prozessierung beteiligt sind, werden mit verschiedenen chronisch entzündlichen Hautkrankheiten assoziiert, wie z. B. mit Atopischer Dermatitis und Ichthyosis vulgaris (Übersicht in Hoffjan und Stemmler, 2007).

Während das humane Cornulin (auch unter den Namen "Chromosome 1 Open Reading Frame 10", C1orf10 und "Squamous Epithelial induced stress Protein of 53 kDa", SEP53, bekannt) zunächst als Ösophagus-spezifisch und mit ösophagialem Plattenepithelzellkarzinom assoziiert beschrieben worden war (Xu et al., 2000; Luo et al., 2004), wurde es auch in fetaler Leber und im *Stratum granulosum* der Epidermis, im Ösophagus und in der inneren Wurzelscheide des Haarfollikels nachgewiesen (Contzler et al., 2005). Kürzlich wurde eine Verringerung der Expression von Cornulin in oralem Zungen-Plattenepithelzellkarzinom gezeigt, in dem die mRNA-Expression wie im ösophagialen Plattenepithelzellkarzinom reduziert ist (Ye et al., 2008). Zudem wird die Expression von Cornulin mit Hitzeschock- und Stress-Antwort (Yagui-Beltran et al., 2001), Zellzyklus-Regulation (Imai et al., 2005) und als

Überlebensfaktor der Zellen (Darragh et al., 2006) in Verbindung gebracht. Evolutionäre Analysen der Cornulin-Nukleotidsequenz innerhalb der Säugetier-Spezies zeigten eine Mutationsrate, die ähnlich der Evolution von Genen ist, welche an der Fortpflanzung oder am Immunsystem beteiligt sind. Diese Gene des Immunsystems sind vorrangig Gene, die am "Wettrüsten" von Adaption und Gegenadaption mit Pathogenen und Parasiten mitwirken (Little et al., 2007). Da Cornulin hauptsächlich in Epithelien exprimiert ist, welche die Verbindung zur Umgebung und somit auch zu potenziell Pathogenen darstellen, wird eine Beteiligung an der epithelialen angeborenen Immunabwehr diskutiert (Little et al., 2007).

Ifapsoriasisin (auch Filaggrin-2 genannt) wurde während der Doktorarbeit von Zhihong Wu in unserer Abteilung als Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie identifiziert. Strukturelle Analysen zeigten den für diese Familie typischen Exon-Intron-Aufbau: ein sehr kleines erstes Exon (51 bp), welches die 5'-UTR enthält, ein zweites, mit 160 bp etwas größeres Exon, welches das Translationsstartkodon beinhaltet und für die S100-Domäne kodiert, und das dritte, 8907 bp große Exon, welches die restliche kodierende Sequenz und die 3'-UTR beinhaltet. Auf mRNA-Ebene konnte eine Regulation des *Ifapsoriasisin*-Gens durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in primären Keratinozyten nachgewiesen werden. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Expression wurde auch für die "S100 Fused Type Protein"-Familienmitglieder Trichohyalin, Repetin, Hornerin, Filaggrin und Cornulin nachgewiesen (Dale et al., 1983; Ishida-Yamamoto et al., 1997; Makino et al., 2001; Huber et al., 2005; Contzler et al., 2005). Die mRNA-Expression beschränkte sich auf Haut, Thymus, Magen, Tonsillen, Hoden und Plazenta. Die abgeleitete Proteinsequenz zeigte einen für die Proteinfamilie konservierten Aufbau mit einer N-terminalen S100- und EF-Hand-Domäne (potenzielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomänen), zwei Arten von multiplen Tandemsequenzwiederholungen, die jeweils 75-77 Aminosäuren lang sind, sich aber in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden, und zwei die Tandemsequenzwiederholungen flankierenden Spacer-Sequenzen. Da sich die vorhandenen Sequenzwiederholungen in zwei Gruppen einteilen ließen, wurden sie als "A-Repeats" und "B-Repeats" benannt. Innerhalb dieser multiplen Tandemsequenzwiederholungen konnten zehn A-Repeats und 14 B-Repeats identifiziert werden, die nochmals durch eine kurze Spacer-Sequenz geteilt sind (siehe Abb. 3.1). Insgesamt umfasst das Protein 2391 Aminosäuren, besitzt eine theoretische Masse von etwa

248 kDa und einen pI-Wert von 8,45. Im Rahmen einer Expressionsstudie, in der Gene untersucht wurden, die an der epidermalen Differenzierung beteiligt sind, wurde *Ifaporsiasin* als ausschließlich in granulären Keratinozyten exprimiert nachgewiesen (Toulza et al., 2007). Verschiedene Peptid-Fragmente des Ifaporsiasins wurden in Zervikal-Vaginal-Fluid gefunden, darunter ein Peptidfragment aus der S100-Domäne, vier verschiedene Fragmente aus dem Bereich der B-Repeats und ein C-terminales Fragment (Shaw et al., 2007). Für das murine Ifaporsiasin konnte anhand einer rekombinant hergestellten Untereinheit gezeigt werden, dass es *in vitro* in der Lage ist, isolierte Keratinfilamente zu bündeln (Listwan und Rothnagel, 2004) wie es auch für Filaggrin-Untereinheiten nachgewiesen wurde (Dale et al., 1978).

## 1.2 Die Immunabwehr der Haut

Die Haut verfügt über eine Vielzahl von Abwehrstrategien. Aufgrund ihrer Struktur und des Aufbaus bildet vor allem das *Stratum corneum* eine physikalische Barriere, die das Eindringen von potenziellen Pathogenen erschwert. Die abgestorbenen Keratinozyten des *Stratum corneums* sind nicht nur über Korneodesmosomen miteinander verbunden, sondern auch von einer Lipidmatrix umgeben, die den Zusammenhalt dieser Zellschicht zusätzlich verstärkt (siehe auch 1.1.1.1). Zudem trägt auch die regelmäßige Abschuppung und Erneuerung der Keratinozyten des *Stratum corneums* dazu bei, dass Mikroorganismen die Haut nicht übermäßig kolonisieren. Neben dieser "physikalischen Barriere" besitzt die Haut eine weitere, die so genannte "chemische Barriere" (Übersicht in Boman, 2000; Schröder und Harder, 2006). Dazu gehört der so genannte Säureschutzmantel. Die Hautoberfläche besitzt einen sauren pH (4,5-5,0). Dieser soll das übermäßige Wachstum von Bakterien behindern, besitzt aber noch zusätzliche, für die Barrierefunktion der Haut wichtige Funktionen (Übersicht in Fluhr und Elias, 2002). Des Weiteren besteht diese "chemische Barriere" aus antimikrobiell wirksamen Lipiden (Übersicht in Drake et al., 2008) sowie hauptsächlich aus antimikrobiellen und antiviralen Peptiden und Proteinen (Harder et al., 1997; Harder und Schröder, 2002; Gläser et al., 2005). Diese Moleküle stellen einen Teil der angeborenen Immunabwehr dar und sind gegen ein breites Spektrum an Organismen wirksam. Zudem verbinden sie mit zusätzlichen Funktionen das angeborene und adaptive Immunsystem; so besitzen einige antimikrobielle Proteine chemotaktische Wirkung auf Zellen des adaptiven

Immunsystems und weitere immunmodulatorische Wirkung (Übersicht in Harder et al., 2007). Antimikrobielle Proteine werden in vier Hauptgruppen eingeteilt: Defensine, Cathelicidine, Ribonukleasen und S100-Proteine. Daneben gibt es weitere, bisher nicht klassifizierte antimikrobielle Proteine wie z. B. Lactoferrine, Dermcidin, Lysozym, Lipocaline und auch verschiedene Chemokine. Einige antimikrobielle Proteine der Haut sind unter anderem die humanen  $\beta$ -Defensine hBD-1, hBD-2, hBD-3 und hBD-4, das Cathelicidin LL-37, die Ribonuklease RNase 7, verschiedene S100-Proteine wie Psoriasin (S100A7), Calprotectin (S100A8/A9), Lysozym und Antileukoprotease (Harder et al., 2007). Diese antimikrobiellen Proteine sind zum Teil in gesunder Haut konstitutiv exprimiert wie z. B. RNase 7 oder auch nur induzierbar wie z. B. hBD-2. Neben den antimikrobiellen Proteinen kommen auch Zellen des Immunsystems in der Haut vor, so finden sich in der Dermis dendritische Zellen, in der Epidermis die Langerhans-Zellen sowie einige naive und aktivierte T-Zellen (Wagner und Sohnle, 1995; Mutyambizi et al., 2008).

Das angeborene Immunsystem, das auch Pflanzen und niedere mehrzellige Organismen besitzen, wird als ursprünglicher und phylogenetisch älter angesehen als das adaptive Immunsystem, welches ausschließlich Wirbeltiere besitzen (Schröder, 1999; Murphy et al., 2008).

Das angeborene Immunsystem erkennt hauptsächlich konservierte Strukturen von Pathogenen, die der eigene Organismus nicht besitzt, wie z. B. Lipopolysaccharide, Flagellin, bestimmte Oberflächenmoleküle von Mikroorganismen, DNA- oder RNA-Fragmente. Durch diese Einschränkung, nur konservierte Bereiche von Pathogenen erkennen zu können, wird das angeborene Immunsystem als wenig variabel angesehen. Es erkennt also eher unspezifisch potenzielle Pathogene, ist aber in der Lage, diese schnell (innerhalb von Stunden) zu bekämpfen, und ist sofort verfügbar. Zum angeborenen Immunsystem werden z. B. das Komplementsystem, "Toll like"-Rezeptoren, Granulozyten, Makrophagen, "Natural Killer"-Zellen, verschiedene Lipide und antimikrobielle Proteine gezählt (Harder et al., 2007; Albiger et al., 2007; Murphy et al., 2008; Duncan et al., 2008).

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität ist die Immunantwort des adaptiven Immunsystems hochvariabel, anpassungsfähig und besitzt ein so genanntes "immunologisches Gedächtnis", d. h. es ist in der Lage, bekannte Pathogene bzw. assoziierte Moleküle wiederzuerkennen und zu bekämpfen. Die Immunantwort benötigt hier allerdings wesentlich länger als die des angeborenen Immunsystems.

Die Haupteffektorzellen des adaptiven Immunsystems sind hierbei B- und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten sekretieren nach Aktivierung und Differenzierung in eine Plasma-Zelle spezifische Antikörper, die über die Blutbahn im Körper verteilt werden und Pathogene erkennen. Diese mit Antikörpern markierten Strukturen werden wiederum von Phagozyten anhand spezifischer Rezeptoren erkannt und Pathogene können phagozytiert werden. T-Lymphozyten werden unterteilt in zytotoxische T-Zellen, die Zellen eliminieren, welche von intrazellulären Erregern befallen sind, T-Helfer-Zellen, die Makrophagen und vor allem B-Zellen aktivieren können, und regulatorische T-Zellen, die an der Regulation und Modulation des Immunsystems beteiligt sind (Murphy et al., 2008).

Angeborenes und adaptives Immunsystem sind miteinander verflochten und können nicht isoliert betrachtet werden, da viele Reaktionen des angeborenen Immunsystems das adaptive Immunsystem aktivieren wie auch umgekehrt. Makrophagen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems erkennen z. B. Mikroorganismen an konservierten Strukturen, sind dann aber als Bestandteil des adaptiven Immunsystems in der Lage, T- und B-Zellen zu aktivieren (Murphy et al., 2008). Ein weiteres Beispiel ist das Komplementsystem. Das Komplementsystem ist in der Lage, unspezifisch an die Oberflächen von Mikroorganismen zu binden und durch Oligomerisierung eines Proteins der Komplementsystem-Kaskade Poren zu bilden und diese so zu lysieren. Zusätzlich erkennen bestimmte Komplementsystem-Faktoren auch an Mikroorganismen gebundene Antikörper, welche dann die Komplement-Kaskade initiieren können, so dass sich auch hier angeborenes und adaptives Immunsystem ergänzen und unterstützen (Murphy et al., 2008; Duncan et al., 2008).

Die Fähigkeit der Haut, sich "ihrer Haut zu wehren", beruht also auf einer Vielzahl von Faktoren, wobei angeborenes und adaptives Immunsystem eng "zusammenarbeiten", um dem Eindringen von Pathogenen, Infektionen und Entzündungen vorzubeugen.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Da in der Doktorarbeit von Zhihong Wu Ifapsoriasin als neues Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie gefunden wurde und bereits Analysen zu mRNA-Expression und potenzieller Regulierung vorlagen, war es zunächst Ziel dieser Arbeit, Expressions- und Funktionsanalysen auf Proteinebene durchzuführen. Da



diese Expressionsanalysen nur mit Hilfe von spezifischen Antikörpern durchgeführt werden konnten, sollten zunächst einige typische Bereiche des Proteins rekombinant in *E. coli* exprimiert werden, um mit diesen rekombinanten Fragmenten polyklonale Antiseren zu gewinnen. Neben immunhistochemischen Untersuchungen sollten Western Blots und ELISAs etabliert werden, um festzustellen, ob Ifapsoriasin als Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie ebenfalls eine Funktion bei der Differenzierung von Keratinozyten übernimmt und, wie für Profilaggrin bekannt (Resing et al., 1995b; Yamazaki et al., 1997; O'Regan et al., 2008), prozessiert wird. Da alle bisher bekannten Mitglieder dieser Proteinfamilie hauptsächlich in Epithelien exprimiert werden, ist fraglich, ob diese Proteine neben ihrem Beitrag zu strukturellen Funktionen im Rahmen der Zelldifferenzierung eventuell auch zur antimikrobiellen Abwehr der Haut beitragen könnten. Zudem wurde in unserer Arbeitsgruppe eine antimikrobielle Aktivität von Hornerin-Fragmenten nachgewiesen (Doktorarbeit Z. Wu). Die rekombinant exprimierten Ifapsoriasin-Fragmente sollten daher hinsichtlich potenzieller antimikrobieller Aktivität untersucht werden, um so eine mögliche neue Funktion von Ifapsoriasin in der Barrierefunktion der menschlichen Haut aufzudecken.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

Hefe-Extrakt	Oxoid
Acetonitril	Promochem GmbH
Agarose	Biozym
dNTPs	Pharmacia
EDTA	Gibco
H <sub>2</sub> O (für HPLC)	Promochem GmbH
Trifluoressigsäure	Promochem GmbH

### 2.2 Geräte

#### Photometer

150-20 Spectrophotometer	Hitachi
Biophotometer	Eppendorf

#### Thermoblock

Thermomixer comfort	Eppendorf
---------------------	-----------

#### Thermocycler

PTC-200 DNA-Engine	MJ Research
T3 Thermocycler	Biometra

#### Ultraschall

Sonopuls GM70	Bandelin Elektronik
---------------	---------------------

#### Konzentratoren

Lyophilisator Alpha 2-4 LSC	Christ
Vakuumpumpe KAS 16	Pfeiffer Vacuum
Concentrator 5301	Eppendorf
Gel Pump GP 100	Savant

#### Zentrifugen

Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Centrifuge 5804 R	Eppendorf

**Gelkammern**

Horizon 11·14	Life Technologies
Mini Protean III-System	BioRad

**HPLC**

## Gradientenpumpen

Liquid Chromatograph LC-10AT VP	Shimadzu
FCV-10 AL VP	Shimadzu
SpectraSystem P4000	Spectra Physics

## Detektor

UV-VIS Detector SPD-10A VP	Shimadzu
----------------------------	----------

## Entgaser

Degasser DG-4	Henggeler
---------------	-----------

## Integratoren

SP 4270 integrator	Spectra Physics
SP 4290 integrator	Spectra Physics

**2.3 Mikroorganismen und Zellkulturen**

<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
<i>Escherichia coli</i>	TOP10 F' (Invitrogen)
	BL21(DE3) (Novagen)
	BL21(DE3)pLysS (Novagen)
	BL21 <i>trxB</i> (DE3)pLysS (Novagen)
	ATCC 11775
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
	ATCC 33348
	ATCC 33354
	ATCC 33358
	ATCC 39342
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 10038
	ATCC 49323
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	RV A2/1994
<i>Pseudomonas putida</i>	RV A1/2000
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	RV A2/1990

<i>Pseudomonas syringae</i>	ATCC 10205
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	ATCC 13637
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	ATCC 17666

Alle ATCC- und RV-Stämme wurden freundlicherweise vom Institut für Infektionsmedizin sowie vom Institut für Meereskunde zur Verfügung gestellt. Die "RV"-Stämme von *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas stutzeri* stammen aus verschiedenen Ringversuchen des Instituts für Infektionsmedizin aus den Jahren 1990, 1994 und 2000.

Primäre humane Keratinozyten wurden aus neonatalen Vorhäuten präpariert (siehe 2.7.3).

## 2.4 Antikörper

Ziege- $\alpha$ -IFPS-2, -3, -4 (0,8-1 mg/ml)	selbst aufgereinigt (siehe 2.12.2)
Maus- $\alpha$ -Filaggrin (50 $\mu$ g/ml)	Biologo
Maus- $\alpha$ -E-Cadherin (250 $\mu$ g/ml)	BD Biosciences
Maus- $\alpha$ -Ziege IgG Meerrettichperoxidase-gekoppelt	Dianova
Kaninchen- $\alpha$ -Ziege IgG Biotin-gekoppelt	Vector Laboratories
Pferd- $\alpha$ -Maus IgG (1,5 mg/ml) FITC-gekoppelt	Biologo
Huhn- $\alpha$ -Ziege IgG (2 mg/ml) Alexa Fluor 594-gekoppelt	Molecular Probes

## 2.5 Vektoren

pGEM-T	Promega
pET-32a	Novagen
pET SUMO	Invitrogen
pSUMO3	LifeSensors

## 2.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden von Sigma-Genosys synthetisiert.

Bezeichnung                      5'-3'-Sequenz

### Fragmente für "Nested PCR"

IFPS-3-F	TATGGCCAACATGGTTCTGGCTCA
IFPS-3-R	TGGCCTGTGTTGTCCAAATCCAGA
IFPS-4-F	ACACTCACAGCCAAGCCGGATCTC
IFPS-4-R	TGGCCAAATCCAAGGTGGTCATTT
IFPS-C-Term long-F	GCCATTCACGGGAGACAGG

### pET-32a-System

pET-IFPS-1-F	ACTGAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGACCGACCTCTTGAGAAGTGT
pET-IFPS-1-R	ATTTGCGGCCGCTCACTTGAATATCATCAAAAGAACTC
pET-IFPS-2-F	ACTGAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCTTCAGGGTCAAAGAAGCA
pET-IFPS-2-R	ATTTGCGGCCGCTCATTTCCTTTCCCAACTGTTTGAT
pET-IFPS-3-F	ACTGAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGTCAGGCTCAGGTCAATCCTC
pET-IFPS-3-R	ATTTGCGGCCGCTCACCTGTGTTGTCCAAAGCCAG
pET-IFPS-4-F	ACTGGGTACCGACGACGACGACAAGGGTCCAGGACAACCTGGAA
pET-IFPS-4-R	ATTTGCGGCCGCTCAATGTCTAGACAGTTGCTTGTTT

### pET SUMO-System

SUMO-IFPS-1-F	ACCGACCTCTTGAGAAGTGT
SUMO-IFPS-1-F2	AGAAGTGTTGTCACCGTAATTG
SUMO-IFPS-1-R2	TCAGCTTGAATATCATCAAAAGAAAC
SUMO-IFPS-2-F	GCTTCAGGGTCAAAGAAGCA
SUMO-IFPS-2-R	TCATTTCCTTTCCCAACTGTTTG
SUMO-IFPS-3-F	TCAGGCTCAGGTCAATCCT
SUMO-IFPS-3-R	TCACCTGTGTTGTCCAAAGC
SUMO-IFPS-4-F	GGGTCCAGGACAACCTGGAA
SUMO-IFPS-4-R	TCAATGTCTAGACAGTTGCTTGTTT

### pSUMO3-System

SUMO3-IFPS-B13-F	GCAGGTCTCAAGGTACAACCTGGAAGACAAAGATCTA
SUMO3-IFPS-B13-R	GCAGCGGCCGCTTACCTGGACCCTCTCTGTGTG
SUMO3-IFPS-B14-F	GCAGGTCTCAAGGTACAACCTGGAAGAAGGGGATC
SUMO3-IFPS-B14-R	GCAGCGGCCGCTTATCTGGAACCTGTCTGTGTGG

SUMO3-IFPS-C-Term-F GCAGGTCTCAAGGTTCTAGTAGAGCAAGTCATTTTC  
SUMO3-IFPS-C-Term-R GCAGGATCCTTAATGTCTAGACAGTTGCTTGTTT

### Vektorprimer für Kolonie-PCR und Sequenzierungen

M13-F GTTTTCCCAGTCACGAC  
M13-R CAGGAAACAGCTATGAC  
S-Tag CGAACGCCAGCACATGGACA  
T7 Terminator GCTAGTTATTGCTCAGCGG  
Sumo Forward TCAATGAGGCAGATCAGATT  
T7 Term short CTAGTTATTGCTCAGCGG  
T7-Reverse TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

## 2.7 Eukaryotische Zellen

### 2.7.1 Zellkultur-Medien

Für die Kultivierung der primären humanen Keratinozyten wurde Epilife-Medium der Firma Cascade Biologics, ergänzt mit epidermalen Wachstumsfaktoren und  $\text{Ca}^{2+}$ , verwendet. Das in der Zellkultur eingesetzte fetale Kälberserum ("FCS") und PBS wurde von PAA, Trypsin/EDTA-Lösung von Invitrogen und Penicillin/Streptomycin-Lösung von Biochrom bezogen.

### 2.7.2 Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Kollagen

Keratinozyten lassen sich in unbeschichteten Kulturgefäßen schlecht kultivieren, da sie nur eingeschränkt adhärent wachsen können. *In vivo* bieten den Zellen Proteine der extrazellulären Matrix bzw. andere Zellen Halt, welcher bei der Kultivierung *in vitro* fehlt. Daher wird den Zellen durch Beschichtung der Kultivierungsflaschen und -platten mit Kollagen eine künstliche Matrix zur Verfügung gestellt, an der sie adhären können. Zur Beschichtung wurde bovines Kollagen I (BD Biosciences) verwendet. Zellkulturflaschen und 12-Loch-Platten wurden mit 5 ml bzw. 0,3 ml 1 %iger Kollagenlösung in 0,01 M HCl 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

### **2.7.3 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten**

Als Primärzellen werden Zellen bezeichnet, die erst vor kurzem aus intaktem Gewebe isoliert wurden und unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen.

Die Isolierung von humanen Keratinozyten erfolgte aus neonatalen Vorhäuten, die direkt nach der Operation bearbeitet wurden. Die Vorhaut wurde von Fett- und Bindegewebe befreit. Der epidermale Teil der Vorhaut wurde durch eine 16-stündigen Trypsin-Hydrolyse (0,1 % in PBS) vom dermalen Teil getrennt. Mit Hilfe eines Skalpell wurden die Keratinozyten vom verhornten Bestandteil der Epidermis abgeschabt. Die so abgelösten Zellen wurden resuspendiert, bei 800 x g für 5 min zentrifugiert und anschließend in kollagenisierten Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>, Sarstedt) in Epilife-Medium unter Zusatz von Penicillin und Streptomycin kultiviert.

Die Inkubation der isolierten Keratinozyten erfolgte in wasserdampfgesättigter, 5 % CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre bei 37 °C. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz (80-90 %) kultiviert und anschließend passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 min in einer 0,1 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Kulturflaschen zu lösen. Die Trypsin-Behandlung wurde durch Zugabe von Epilife-Medium versetzt mit 10 % FCS abgestoppt. Die Zellen wurden einmalig mit Epilife-Medium gewaschen und in angemessener Konzentration (etwa 30-40 % Konfluenz) in kollagenisierte Kulturflaschen oder in 12-Loch-Platten (Becton Dickinson) überführt und weiter kultiviert. Keratinozyten wurden in der zweiten Passage benutzt.

## **2.8 Molekularbiologische Methoden**

### **2.8.1 RNA-Isolierung**

Gesamt-RNA aus primären humanen Keratinozyten wurde mit TRIzol® nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach Lyse der Zellen wurde Chloroform hinzugegeben und zentrifugiert. Die Lösung trennte sich in eine wässrige, eine organische und eine Interphase. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde abgenommen und die RNA durch Fällung mit Isopropanol gewonnen. Anschließend wurde die RNA mit 75 % EtOH gewaschen und in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Um Kontaminationen durch genomische DNA zu vermeiden, wurde im Anschluss eine DNase I-Hydrolyse durchgeführt. Die erhaltene Gesamt-RNA wurde mit H<sub>2</sub>O auf

50 µl aufgefüllt, mit 10 U DNase I versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das RNA CleanUp-Protokoll mittels RNeasy-Säulen (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, um überflüssige Komponenten der DNase I-Hydrolyse zu entfernen. Die RNA wurde mit 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert, RNA-Konzentration und Reinheit der Proben wurden photometrisch bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **2.8.2 cDNA-Synthese**

Die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde nach Protokoll des "SuperScript II Reverse Transcriptase"-Kits (Invitrogen) durchgeführt. Hierzu wurde zwischen 0,5 µg und 2,0 µg Gesamt-RNA für die Synthese eingesetzt und mit einem Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer in cDNA umgeschrieben. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

### **2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion**

In einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert werden. Durch die Wiederholung von Denaturierung, Oligonukleotid-Bindung und Elongation wird hierbei in jedem Zyklus die Menge der vorhandenen DNA-Fragmente theoretisch verdoppelt. Die Dauer und Temperatur jedes Schrittes können in Abhängigkeit von Matrizen-DNA, Reaktionsvolumen, verwendeten Oligonukleotiden und Länge des zu amplifizierenden Fragments variiert werden. Die verwendeten Primersequenzen sind unter 2.6 angegeben.

#### **2.8.3.1 Standard-PCR mit *Pfu* DNA-Polymerase**

Zur Herstellung verschiedener Fragmente des humanen Ifapsoriasin-Proteins wurden zunächst mit spezifischen Primern größere Fragmente von Keratinozyten-cDNA amplifiziert, um dann später als Matrize für kürzere Fragmente zu dienen. Zum Teil konnte auch auf bereits klonierte Fragmente als Matrize zurückgegriffen werden, die freundlicherweise von Dr. Zhihong Wu zur Verfügung gestellt wurden. Alle Fragmente, die zur Proteinexpression verwendet werden sollten, wurden mit einer *Pfu* DNA-Polymerase generiert. Diese ursprünglich aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* isolierte DNA-Polymerase besitzt "Proof-Reading"-Funktion, d.h. sie ist in der Lage, während der Neustrangsynthese fehlerhaft eingebaute Nukleotide aufgrund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zu entfernen. Die Fehlerrate solcher



*Pfu* DNA-Polymerasen ist somit etwa sechsfach geringer als bei *Taq* DNA-Polymerasen aus *Thermophilus aquaticus*.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

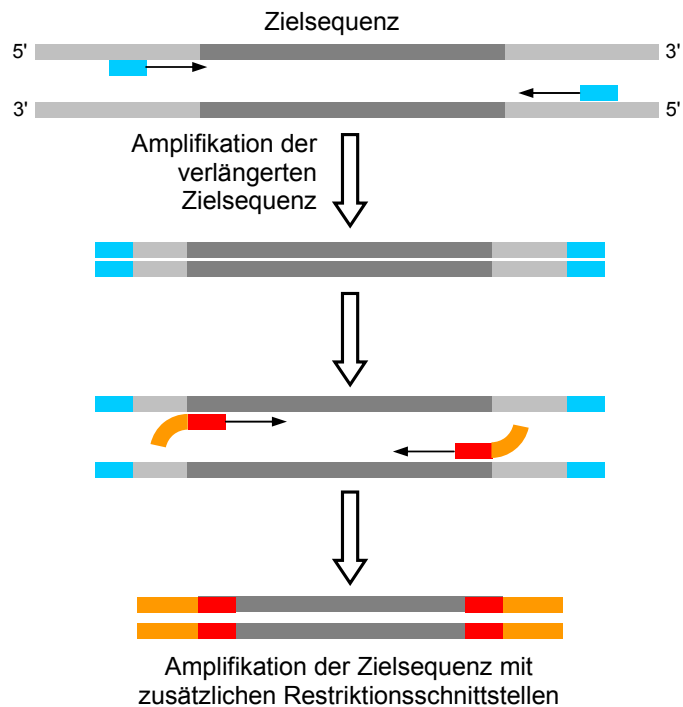
- 1 x Cloned PCR-Puffer (Stratagene)
- 200 nM dNTPs
- 200 mM 5'- und 3'-Primer
- cDNA (entsprechend 1-5 ng Gesamt-RNA)
- 2,5 U *Pfu* Hotstart Turbo DNA-Polymerase (Stratagene)
- H<sub>2</sub>O ad 50 µl.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 95 °C 10 min
  - 95 °C 45 s
  - 55-60 °C 45 s
  - 72 °C 60-90 s
  - 72 °C 7 min
  - 10 °C ∞.
- } 35 Zyklen

### 2.8.3.2 "Nested PCR"

Bei der "Nested PCR" wird ein PCR-Produkt als Matrize verwendet, von welchem mit einem weiter innen liegenden Primerpaar ein weiteres Fragment amplifiziert wird (Abb. 2.1). Die Bindungsstellen dieses Primerpaares liegen weiter zum 5'-Ende als die der zuvor verwendeten Primer. Diese Strategie wird gewählt, wenn Primer zusätzliche, nicht-genspezifische Ankersequenzen z. B. für Restriktionsschnittstellen tragen. Bei einer PCR mit solchen Primern kommt es oft zur Amplifikation unspezifischer Produkte. Aus diesem Grund wird zunächst wie in 2.8.3.1 eine Standard-PCR durchgeführt, um ein verlängertes Fragment zu amplifizieren, welches dann als Matrize für die "Nested PCR" dienen kann. Da in dieser Reaktion nur noch ein Fragment als Matrize vorliegt, wird die Amplifizierung unspezifischer Banden vermieden.



**Abb. 2.1: Das Prinzip der "Nested PCR".** In einer ersten PCR wird mit einem Primerpaar (hellblau) ohne zusätzliche Ankersequenzen ein verlängertes Fragment der Zielsequenz amplifiziert. In einer zweiten PCR, der "Nested PCR", wird mit einem weiter innen liegenden Primerpaar (rot), die z. B. Restriktionsschnittstellen enthalten können (orange, nicht komplementär zur Matrize) die Zielsequenz vervielfältigt. Die Zielsequenz trägt nach dieser "Nested PCR" die angefügten Restriktionsschnittstellen. Die Pfeile an den Primern stellen die Synthese-Richtung der DNA-Polymerase dar.

Die "Nested PCR" wurde wie die Standard-PCR mit einer *Pfu* DNA-Polymerase angesetzt; das Programm unterschied sich wie folgt:

- 95 °C 10 min
  - 95 °C 45 s
  - 60 °C 45 s
  - 72 °C 60-90 s
  - 95 °C 45 s
  - 72 °C 60-90 s
  - 72 °C 7 min
  - 10 °C ∞.
- } 7 Zyklen
- } 28 Zyklen

Die ersten sieben Zyklen wurden ähnlich der Standard-PCR gewählt, da anfangs die Primer nur mit der genspezifischen Teilsequenz komplementär zur Matrize sind. In

den darauf folgenden Strangverlängerungen werden an den jeweiligen 3'-Enden jedoch die künstlich angefügten Restriktionsschnittstellen zusätzlich verlängert, so dass sich der Primer über seine komplette Sequenz an die Matrize anlagern kann. Durch diese verlängerte komplementäre Sequenz erhöht sich die spezifische Schmelztemperatur, so dass Hybridisierungs- und Elongationstemperatur zusammengelegt werden können.

Die Elongationszeiten wurden je nach Fragmentlänge angepasst; pro 500 bp wurden etwa 60 s Elongationszeit kalkuliert, wobei die Inkubationszeit für einen 50 µl-Ansatz nicht kürzer als 30 s gewählt wurde.

### 2.8.3.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Überprüfung einer Transformation durchgeführt. Einzelkolonien wurden von der Agarplatte aufgenommen und in einem PCR-Ansatz resuspendiert. Durch Erhitzen des Reaktionsansatzes wurden die Bakterien lysiert und die freigesetzte DNA diente als Matrize in der PCR-Reaktion. Mit je einem Vektor- und einem Insert-spezifischen Primer wurde das aufgenommene Vektorkonstrukt überprüft.

Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

- 1 x PCR-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- 200 nM dNTPs
- 1 µM 5'- und 3'-Primer
- 1,0 U *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen)
- H<sub>2</sub>O ad 20 µl.

Es wurden nachstehende Bedingungen gewählt:

- 95 °C 10 min
  - 95 °C 30 s
  - 55-60 °C 30 s
  - 72 °C 45-60 s
  - 72 °C 7 min
  - 10 °C ∞.
- } 30 Zyklen

#### **2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde in einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Überprüfung von Plasmiden wurden 0,8 %ige, bei DNA-Fragmenten (je nach erwarteter Größe) zwischen 1,0 %ige und 1,8 %ige Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) durch Aufkochen vollständig gelöst und auf etwa 50 °C abgekühlt. Ethidiumbromid wurde zur späteren Detektion der DNA in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Lösung wurde in einen horizontalen Gelträger gegossen. Nach Aushärten des Agarose-Gels wurden die Proben mit Ladepuffer LVI (6x, 0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin, 10mM Tris/HCl, pH 8,0) versetzt. Die verwendeten Größen- und Massenstandards richteten sich nach Größe der Fragmente bzw. Plasmide (TriDye 100 bp-Ladder, New England Biolabs bzw. Smartladder, Eurogentech); die Dauer und Stärke der Stromspannung wurde in Abhängigkeit von Agarose-Konzentration und Größe der zu trennenden Fragmente variiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in TAE-Puffer. Im Anschluss wurden im Gel getrennte Nucleinsäuren durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Tisch (Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator TM-20, UVP) detektiert und mittels CCD ("Charged Coupled Device")-Kamera der "BioDoc II"-Fotodokumentationsanlage (Biometra) dokumentiert.

#### **2.8.5 Aufreinigung amplifizierter PCR-Fragmente**

PCR-Fragmente für eine Ligation oder zur weiteren Verwendung als Matrize für eine "Nested PCR" wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem "QIAEX II Gel Extraction Kit" nach Angaben des Herstellers (QIAGEN) aufgereinigt. Die DNA wurde mit 20 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 eluiert. Im Anschluss an die Aufreinigung erfolgte eine Überprüfung der Extraktion durch eine Agarose-Gelelektrophorese, um die Konzentration des Gelextraktes bestimmen zu können.

#### **2.8.6 Klonierung**

Eine Klonierung umfasst im Allgemeinen die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor, die darauf folgende Transformation in kompetente Zellen und die anschließende Anzucht eines Klons. Als kompetent werden Zellen bezeichnet, die für die Aufnahme von sich in Lösung befindender DNA durch spezielle Behandlung

geeignet sind. Durch diese Vorgehensweise kann ein DNA-Fragment in großen Mengen vervielfältigt werden.

### 2.8.6.1 Ligation

Für die direkte Ligation nach dem so genannten "TA-System" in pGEM-T- bzw. pET SUMO-Vektoren wurden im Anschluss an die jeweilige PCR 2,5 U *Taq* DNA-Polymerase zum Ansatz gegeben. So wurden durch die sequenzunabhängige Transferase-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase die PCR-Produkte mit einem 3'-Desoxyadenosinphosphat-Überhang versehen. Diese generierten "sticky ends" der PCR-Produkte sind komplementär zu den 3'-Desoxythymidinphosphat-Überhängen der verwendeten Vektoren.

Für die Ligation wurde das zu ligierende DNA-Fragment im achtfachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Dazu wurden 25 ng des jeweiligen Vektors, entsprechendes Volumen des DNA-Fragments und 2 U einer T4-Ligase (Promega) in Ligationspuffer (Promega) auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht und für 8 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zehnfach mit H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

Als Ligationskontrolle wurde der Vektor linear eingesetzt, um zu ermitteln, ob dieser mit sich selbst religiert.

### 2.8.6.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien

Chemisch-kompetente *E. coli*-Bakterien wurden von den Stämmen TOP10, BL21(DE3) pLysS und BL21(DE3) pLysS hergestellt. Aus einer Übernachtskultur wurden 40 ml LB-Flüssigmedium (1 % (w/v) Sojamehlpepton, 0,5 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, pH 7,4) mit entsprechenden Antibiotika (siehe Tab. 2.1) angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 inkubiert. Die Bakterien wurden 20 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C und 5000 x g für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 20 ml kaltem TBS (100 mM NaCl, 5 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0) resuspendiert und wie zuvor für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 20 ml kalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0) resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien wie zuvor abzentrifugiert und in 2 ml kalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach wiederholter Inkubation auf Eis für 1 h wurden 500 µl Glycerin (87 %) zugegeben, die

Bakteriensuspension in 50 µl-Aliquots zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei -80 °C gelagert.

**Tab. 2.1: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten *E. coli*-Stämme.**

<i>E. coli</i> -Stamm	Antibiotika-Resistenz (µg/ml)
TOP10	-
BL21(DE3)pLysS	Chloramphenicol (34)
BL21 <i>trxB</i> (DE3)pLysS	Chloramphenicol (34), Tetracyclin (12,5)

### 2.8.6.3 Transformation

Die Transformation erfolgte in Anlehnung an das "pGEM-T-Vector manual" (Promega). Je 10 µl des verdünnten Ligationsansatzes bzw. eines zehnfach verdünnten isolierten Plasmids (siehe 2.8.7) zu 50 µl der auf Eis gehaltenen kompetenten *E. coli*-Bakterien gegeben, vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 45 s, anschließend wurden die Zellen erneut 2 min auf Eis gehalten. Darauf wurden 300 µl SOC-Medium (2 % Pepton (w/v), 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glukose, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) zugegeben und der Ansatz für 1 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Je 100 und 200 µl wurden auf vorgewärmten LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Antibiotika-Resistenzen der Vektoren sind zur Übersicht in Tab. 2.2 dargestellt.

**Tab. 2.2: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten Vektoren.**

Vektor	Antibiotika-Resistenz	Endkonzentration
pGEM-T	Ampicillin (Carbenicillin)	100 µg/ml
pET-32a	Ampicillin (Carbenicillin)	50 µg/ml
pET SUMO	Kanamycin	50 µg/ml
pSUMO3	Kanamycin	50 µg/ml

Statt des für einige Vektoren angegebenen Ampicillins wurde Carbenicillin in der gleichen Konzentration verwendet.

Gewachsene Kolonien wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR (siehe 2.8.3.3) überprüft.

### 2.8.7 Plasmidisolierung

Plasmidisolierungen wurden mit dem "NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit" (Macherey-Nagel) durchgeführt. Bakterien aus 3 ml einer Übernachtskultur, die in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37 °C und 200 Upm inkubiert worden war, wurden lysiert und das Plasmid nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5. Im Anschluss wurde eine Qualitätskontrolle und Konzentrationsabschätzung in einem 0,8 %igen Agarose-Gel durchgeführt.

### 2.8.8 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Expressionsplasmide wurden nach positiver Kolonie-PCR aufgereinigt (2.8.7) und von der Firma SeqLab in Göttingen nach der Strangabbruchmethode nach Sanger in einem Fluoreszenz-Kapillar-Sequenzierer sequenziert.

### 2.8.9 Restriktionshydrolyse

Die in den pGEM-T-Vektor ligierten verschiedenen Ifapsoriasin-Fragmente wurden im Anschluss an die Plasmidisolierung durch eine Restriktionshydrolyse aus dem Vektor herausgeschnitten, um entsprechende Überhänge für die Ligation in den jeweiligen Expressionsvektor zu generieren (Tab. 2.3).

**Tab. 2.3: Verwendete Restriktionsendonukleasen.**

Fragment	Expressionsvektor	Restriktionsendonukleasen
<b>IFPS-1</b>	pET-32a	<i>Bgl</i> I und <i>Not</i> I
<b>IFPS-2</b>	pET SUMO	-
<b>IFPS-3</b>		
<b>IFPS-4</b>	pET-32a	<i>Kpn</i> I und <i>Not</i> I
	pET SUMO	-
<b>IFPS-B13</b>	pSUMO3	<i>Bsa</i> I und <i>Not</i> I
<b>IFPS-B14</b>		
<b>IFPS-C-Term</b>	pSUMO3	<i>Bsa</i> I und <i>Bam</i> HI

Die Hydrolyse der Expressionsvektoren pET-32a bzw. pSUMO3 erfolgte mit den entsprechenden Enzymen, mit denen die zu ligierenden Fragmente behandelt worden waren. Damit wurde eine gerichtete Ligation der Fragmente sichergestellt. Die Restriktionshydrolyse erfolgte mit Endonukleasen der Firma New England Biolabs nach Anleitung für 3 h bei angegebener optimaler Temperatur mit nachfolgender 20-minütiger Hitze-Inaktivierung bei 65 °C.

Da die Fragmente in den pET SUMO-Vektor über das TA-System ligiert wurden, war weder für die Fragmente noch den Vektor eine Restriktionshydrolyse notwendig.

## **2.9 Rekombinante Expression in *E. coli*-Bakterien**

### **2.9.1 Verwendete Expressionsvektoren**

Für die rekombinante Expression verschiedener Ifapsoriasin-Fragmente wurden unterschiedliche Vektoren verwendet, deren Struktur und Prinzip im Folgenden kurz erklärt wird. Alle beruhen auf dem Prinzip der durch IPTG induzierbaren Proteinexpression, wobei das zu exprimierende Protein mit einem so genannten Fusionstag, einer künstlich angefügten Sequenz, versehen wird. Diese Sequenz soll die darauf folgende Aufreinigung erleichtern und besteht aus mehreren Histidin-Resten und einer Protease-Schnittstelle, um die Tag-Sequenz wieder abzuspalten.

#### **2.9.1.1 pET-32a**

Der pET-32a-Vektor besitzt in der "Multiple Cloning Site" mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die verschieden kombiniert werden können, um ein Fragment in den Vektor zu ligieren. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass der Leserahmen des Fusionsproteins erhalten blieb; die entsprechende Schnittstelle und Sequenz wurde durch einen Primerüberhang an die zu exprimierende Nukleotidsequenz des Fragments angehängt (siehe Abb. 2.1). Die Ligation des Inserts erfolgt somit gerichtet, da an den jeweiligen Enden des Fragments sich die Überhänge unterscheiden und so nur in einer Orientierung in den Vektor ligiert werden können. Das Fusionsprotein bestand hier aus einer Thioredoxin-Histidin-Sequenz, die mit einer Enterokinase-Schnittstelle der Aminosäure-Sequenz "DDDDK" endet. Der Fusionstag kann also nach Aufreinigung des Fusionsproteins über Hydrolyse durch die spezifische Enterokinase-Schnittstelle vom Zielprotein getrennt werden. Zusätzlich besitzt der Vektor eine Ampicillin- bzw. Carbenicillin-



Resistenz-Sequenz und eine *lacI*-Sequenz, die für den *lacI*-Repressor kodiert. Dieser inhibiert vor Induktion durch IPTG eine Expression des Zielproteins und der T7-Polymerase, die für die Expression des Zielproteins notwendig ist. Der Aufbau des Vektors ist schematisch im Anhang dargestellt (siehe 7.1.1).

### 2.9.1.2 pET SUMO und pSUMO3

Auch der pSUMO3-Vektor besitzt ähnlich dem pET-32a-Vektor in seiner "Multiple Cloning Site" verschiedene Restriktionsenzym-Schnittstellen, um das Einfügen eines Inserts in den Leserahmen zu ermöglichen. Hierbei findet die Ligation des Inserts ebenfalls gerichtet statt. Der pET SUMO-Vektor wird in einem "TA-Klonierungssystem" eingesetzt, d. h. weder Vektor noch Insert müssen mit Restriktionsenzymen hydrolysiert werden, um passende Überhänge zu erhalten; das Insert muss lediglich am 3'-Ende der Sequenz ein Desoxyadenosinphosphat-Überhang besitzen (siehe auch 2.8.6.1). In diesem Vektor muss das Insert auf richtige Orientierung geprüft werden, da eine Ligation des Fragments in verschiedenen Orientierungen aufgrund der identischen Überhänge an beiden Sequenz-Enden möglich ist. Als Fusionstag wird in diesen beiden Vektoren zusätzlich zu den Histidin-Resten ein SUMO-Fusionstag angehängt, der nach einem anderen Prinzip abgespalten wird als der Fusionstag im Enterokinase-System. SUMO steht für "Small Ubiquitin-like Modifier" und wird von SUMO-Proteasen aufgrund der Tertiärstruktur und nicht von Konsensussequenzen erkannt und abgespalten (Malakhov et al., 2004). Ebenso wird laut Angaben des Herstellers die Löslichkeit des Fusionsproteins erhöht, die Expression verstärkt und die Abspaltung des Fusionstags spezifischer, da nie innerhalb des Zielproteins geschnitten wird. Beide Vektoren tragen ein Kanamycin-Resistenz-Gen; ihr Aufbau ist schematisch im Anhang dargestellt (siehe 7.1.2 und 7.1.3).

### 2.9.2 Expression des Fusionsproteins in *E. coli*-Bakterien

Von positiven Klonen in BL21*trxB*(DE3)pLysS- bzw. BL21(DE3)pLysS-Bakterien wurden 3 ml einer LB-Übernachtskultur bei 37 °C und 200 Upm mit entsprechenden Antibiotika angesetzt. Von dieser wurde die OD<sub>600nm</sub> photometrisch bestimmt. Die Expressionskultur wurde auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,02 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Kulturen wurden weitere 3 h inkubiert. Zur

Überprüfung der Proteinexpression wurden sowohl direkt vor als auch 3 h nach Induktion Proben der Kultur in einer SDS-PAGE analysiert (siehe 2.11.4). Hierzu wurden nach der Formel  $(90:OD_{600nm})$  entsprechende Mikroliter aus der Kultur entnommen; 5 min bei 10000 x g abzentrifugiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Expressionskulturen zur weiteren Verwendung bei 4 °C und 5000 x g abzentrifugiert.

Das Bakterienpellet wurde in 1 ml Lysis-Äquilibrierungs-Wasch(LEW)-Puffer (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, pH 8,0) je 100 ml Kultur resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

### **2.9.3 Lyse der *E. coli*-Bakterien**

Die in LEW-Puffer gelagerten *E. coli*-Bakterien wurden in drei Auftau-Einfrier-Zyklen ("freeze and thaw"-Methode) für jeweils 10 min bei 30 °C im Wasserbad bzw. -80 °C inkubiert und durch anschließende Ultraschallbehandlung für 5 min (je 30 s Puls bei 60 % Leistung, 15 s Pause) auf Eis lysiert. Die Bakterienreste wurden für 45 min bei 4 °C und 13500 x g abzentrifugiert und der Überstand steril filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm, Filtropur S 0.45, Sarstedt). Das Fusionsprotein wurde im Anschluss chromatographisch aufgereinigt (siehe 2.10.1 und 2.10.2)

### **2.9.4 Hydrolyse der Fusionsproteine**

Da sowohl im pET-32a- als auch im SUMO-System das exprimierte Protein als Fusionsprotein mit angehängtem Histidin-Thioredoxin- bzw. Histidin-SUMO-Teil vorlag, musste der Fusionsteil durch Enterokinase bzw. SUMO-Protease abgespalten werden. Für die Hydrolyse mit entsprechender Protease wurde C8-Umkehrphasen-HPLC-aufgereinigtes und anschließend lyophilisiertes Protein verwendet. Für jedes Fusionsprotein wurden die Konditionen der Hydrolyse in Bezug auf Protease-Konzentration und Dauer angepasst.

#### **2.9.4.1 Hydrolyse der im pET-32a-System exprimierten Fusionsproteine**

Die Hydrolyse der Fusionsproteine erfolgte im pET-32a-System mit Hilfe der Enterokinase, die nach der Aminosäuresequenz "DDDDK" spaltet. Je 100 mg Fusionsprotein wurden in 200 µl des "EKMax"-Puffers (Invitrogen) gelöst, mit 0,1 U Enterokinase ("EKMax", Invitrogen) versetzt und zunächst für 5 h bei 37 °C inkubiert. Konzentration der Enterokinase und Dauer der Hydrolyse wurden weiter angepasst,

fürten aber zu keiner spezifischen Trennung von Fusionstag und Zielprotein-Fragment (siehe 3.1.1).

#### 2.9.4.2 Hydrolyse der im SUMO-System exprimierten Fusionsproteine

Die Hydrolyse erfolgte im pET SUMO-System mit der SUMO-Protease 1 und im pSUMO3-System, soweit nicht anders angegeben, mit der SUMO-Protease 2 (beide LifeSensors). Diese Proteasen hydrolysierten die SUMO-Fusionsproteine, indem sie den Fusionsteil an der Tertiärstruktur erkennen und abspalten. Je 100 mg Fusionsprotein wurden im pET SUMO-System in 500 µl PBS (0,8 % (w/v) NaCl, 0,02 % (w/v) KCl, 0,115 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,02 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8) gelöst und mit verschiedenen Konzentrationen an SUMO-Protease 1 hydrolysiert. Im pSUMO3-System wurden je 100 mg Fusionsprotein ebenfalls in 500 µl PBS gelöst, hier wurden zusätzlich 5 mM DTT zugesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen an SUMO-Protease 2 hydrolysiert. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 30 °C. Die optimalen Bedingungen der Hydrolyse für die verschiedenen Fragmente im jeweiligen System sind in Tab. 2.4 dargestellt.

**Tab. 2.4: Übersicht über die Hydrolyse-Bedingungen der verschiedenen Fusionsproteine im SUMO-System.**

Fragment	System	PBS	5 mM DTT	SUMO-Protease	Mindestdauer
IFPS-2	pET SUMO	500 µl je 100 mg Fusions- protein	-	2,0 U SUMO-Protease 1	24 h
IFPS-3				2,0 U SUMO-Protease 1	
IFPS-4				3,0 U SUMO-Protease 1	
IFPS-B13	pSUMO3		+	5,0 U SUMO-Protease 2	72 h
IFPS-B14				5,0 U SUMO-Protease 2	
IFPS-C-Term short	pSUMO3		+	5,0 U SUMO-Protease 1	96 h
IFPS-C-Term				2,5 U SUMO-Protease 2	

## 2.10 Chromatographische Aufreinigung exprimierter Proteine

### 2.10.1 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Der Überstand der lysierten *E. coli*-Bakterien wurde über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Die Proben wurden auf Protino® Ni-IDA ("iminodiacetic acid")-Säulen (Macherey-Nagel) mit einem Säulenvolumen von 500 µl aufgetragen. Pro 125 ml Expressionskultur wurde eine Säule

verwendet. Über die im Fusionsprotein vorhandene Polyhistidin-Sequenz erfolgte eine Interaktion mit den an die Säulenmatrix gebundenen Nickelionen. Während das Fusionsprotein also an die Säulenmatrix gebunden wurde, befanden sich die übrigen *E. coli*-Proteine im Durchfluss. Die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll des Herstellers, eluiert wurde mit 4 ml Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0).

### **2.10.2 C8-Umkehrphasen-HPLC**

Das über die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie aufgereinigte Fusionsprotein wurde im Anschluss zusätzlich über eine C8-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. Die Auftrennung erfolgte über eine SP 250/10 Nucleosil 300-7 C8-Säule (Macherey-Nagel) mittels eines Gradienten aus Puffer A (0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in H<sub>2</sub>O) und Puffer B (0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in Acetonitril). Die Flussrate betrug 3 ml/min, die Detektion erfolgte bei 215 nm. Das Eluat der Nickelaffinitätssäule wurde mit Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in 10 % Puffer B äquilibriert. Der Gradient startete die ersten 5 min bei dieser Konzentration, stieg in den darauf folgenden 25 min linear auf 60 % Puffer B an, in den nächsten 5 min linear auf 100 % Puffer B und abschließend lief er für 10 min in 100 % Puffer B. Die Fraktionierung erfolgte manuell. Im Anschluss wurden die Fraktionen, die eine Absorption bei 215 nm zeigten, im Massenspektrometer auf die genaue Masse hin untersucht (siehe 2.11.6). Von den Fraktionen, die Proteine mit der berechneten Masse besaßen, wurde die Konzentration bestimmt (siehe 2.11.3.1). Zur weiteren Verwendung wurden diese zu 100-500 µg lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

### **2.10.3 C4-Umkehrphasen-HPLC**

Nach Hydrolyse des Fusionsproteins in Fusionsteil und Zielprotein wurde eine C4-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt, um den Fusionsteil und die Protease vom Zielprotein zu trennen. Die Auftrennung erfolgte über eine Bakerbond C4 5u 300A-Säule (Phenomenex) mit Hilfe eines Gradienten aus Puffer A und B (siehe auch 2.10.2). Der Versuchsansatz mit Fusionsprotein und entsprechender Protease (siehe 2.9.4) wurde mit Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde mit 10 % Puffer B äquilibriert, es

folgte ein linearer Gradient in 10 min auf 40 % Puffer B, anschließend in weiteren 15 min auf 70 % Puffer B, wiederum in 10 min auf 100 % Puffer B; zum Abschluss wurde 5 min lang mit Puffer B gespült. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min, die Detektion erfolgte bei 215 nm, die Trennung der Fraktionen manuell. Die Fraktionen mit einer Absorption bei 215 nm wurden massenspektrometrisch analysiert (2.11.6) und bei korrekter Masse wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.11.3.1). Die jeweiligen Proteine wurden zu 10-100 µg lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **2.10.4 C2/C18-Umkehrphasen-HPLC**

Die C2/C18-Umkehrphasen-HPLC wurde mit einer µRPC C2/C18 SC 2.1/10-Säule (GE Healthcare) an einer „SMART™ System“-Anlage (Pharmacia) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls über einen H<sub>2</sub>O/Acetonitril-Gradienten, hier wurde als Puffer B 80 % Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure verwendet. Die Säule wurde in 100 % Puffer A äquilibriert. Der Gradient wurde linear in den ersten 10 min auf 25 % Puffer B, anschließend in 30 min auf 70 % Puffer B und in den abschließenden 10 min auf 100 % Puffer B gesteigert. Die Flussrate betrug 100 µl/min. Detektiert wurde zeitgleich bei 215, 254 und 280 nm; zusätzlich wurde die Leitfähigkeit gemessen. Fraktioniert wurde manuell.

## **2.11 Proteinanalytik**

### **2.11.1 Proteinextraktionen aus Haut und *Stratum corneum***

Zum Nachweis von natürlich vorkommenden Ifapsoriasin wurden Proteine sowohl aus *Stratum corneum* von gesunden Personen als auch aus abdominaler Vollhaut und kultivierten Keratinozyten isoliert. Die abgehobelte Hornhaut (*Stratum corneum*) stammte aus der Fußpflege, die abdominale Vollhaut aus kosmetischen Reduktionsoperationen.

Die Vollhaut wurde vom Fettgewebe befreit und für 1 h bei 37 °C mit der Dermis-Seite nach oben in PBS mit 10 mM EDTA und Protease-Inhibitoren (Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets Mini, Roche) inkubiert. Um Dermis und Epidermis voneinander zu trennen, wurde die Epidermis mit einem Skalpell vorsichtig von der

Dermis abgeschabt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

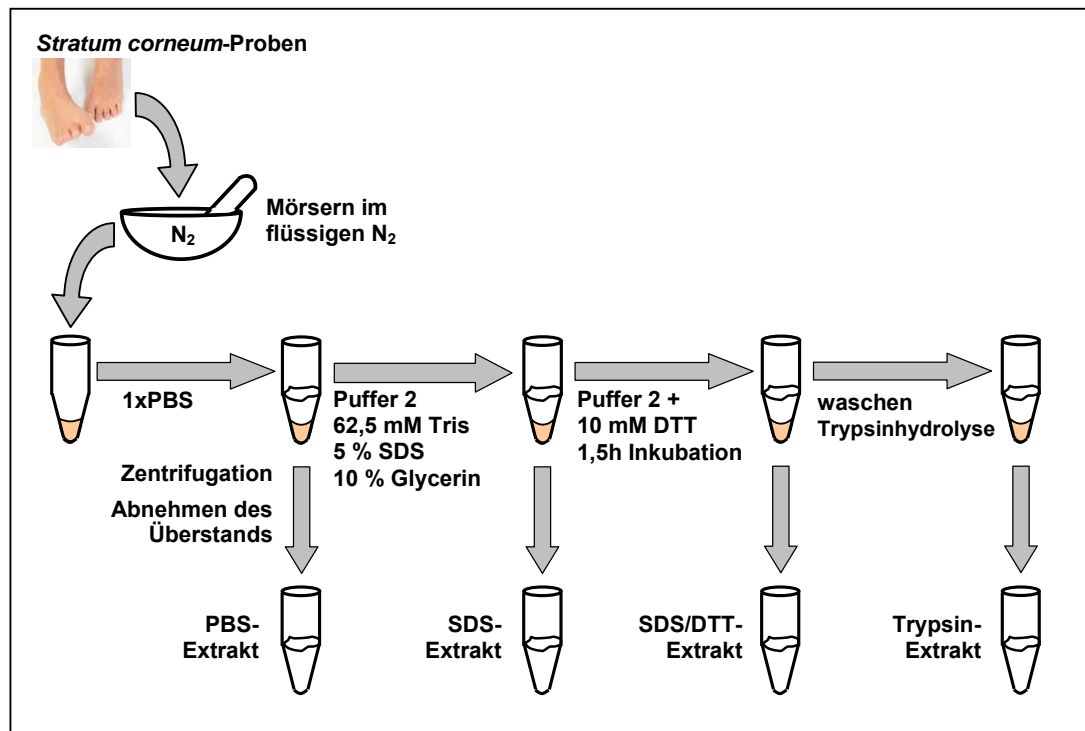
Feine, pulverige Anteile des *Stratum corneums*, die durch Schleifen von Hornhaut entstanden waren, wurden durch ein Sieb abgetrennt und ebenfalls bei -20 °C gelagert. Epidermis- und gesiebte *Stratum corneum*-Proben wurden in 500 µl Puffer pro 100 mg Gewebe mittels eines "Potter S Homogenizer" (B. Braun Biotech International) bei 600 Upm mechanisch zerkleinert.

Abgehobelte, gröbere *Stratum corneum*-Proben und Vollhaut-Proben, bei denen Dermis und Epidermis nicht getrennt worden waren, wurden in flüssigem Stickstoff mit HCl-gereinigtem Seesand gemörsert und ebenso in 500 µl Puffer pro 100 mg Material aufgenommen und gevortext. Zum Teil wurde auch bereits mit Citrat-EtOH-Puffer (Schröder et al., 1992) behandeltes *Stratum corneum*-Material verwendet. Proteinextraktionen wurden zum einen mit verschiedenen Puffern hergestellt, zum anderen wurde das Probenmaterial sequenziell extrahiert (siehe Abb. 2.2).

Zunächst wurden einige Puffer auf die Effizienz der Extraktion von Ifapsoriasin aus Haut überprüft. Neben H<sub>2</sub>O wurde 10 mM Tris/5 mM EDTA pH 7,4 (nach Contzler et al., 2005), 62,5 mM Tris/5 % SDS/10 % Glycerin pH 6,8 (nach Koch et al., 2000) und 8 M Urea/50 mM Tris pH 7,6 (nach Resing et al., 1984) getestet. Bei der separaten Extraktion wurden die Proben pro 100 mg mit 500 µl des entsprechenden Puffers versehen. Nach gründlichem Vortexen wurde der Überstand durch eine Zentrifugation bei 11900 x g für 10 min abgetrennt.

Bei der sequenziellen Extraktion wurden die Proben zunächst mit 500 µl PBS pro 100 mg Material versetzt und gründlich gevortext. Nach einer Zentrifugation bei 11900 x g für 10 min wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in der gleichen Menge SDS-Glycerin-Puffer (62,5 mM Tris, 10 % Glycerin, 5 % SDS, nach Koch et al., 2000) durch Vortexen resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde wie zuvor abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und das Pellet im gleichen Volumen DTT-Puffer (62,5 mM Tris, 10 % Glycerin, 5 % SDS, 10 mM DTT) resuspendiert. Die Probe wurde 1,5 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und abzentrifugiert. Auch dieser Überstand wurde abgenommen. Zum Schutz vor endogenen Proteasen enthielten alle Puffer Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche). Das Pellet wurde mehrmals in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gewaschen, um Reste von Protease-Inhibitoren, SDS und DTT zu entfernen. Zur Extraktion von kovalent verknüpften Proteinen wurde eine Hydrolyse

mit Trypsin angeschlossen. Dazu wurde das Pellet in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  aufgenommen, mit 400 ng Trypsin pro 100 mg Probe versetzt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Die festen Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand wurde abgenommen. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert. Eine Übersicht zur sequenziellen Proteinextraktion aus *Stratum corneum*-Proben ist in Abb. 2.2 dargestellt.



**Abb. 2.2: Proteinextraktion aus *Stratum corneum*-Proben.** Die in flüssigem Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) mit HCl-gereinigtem Seesand gemörserten *Stratum corneum*-Proben wurden in PBS aufgenommen, gevortext und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in Puffer 2 (62,5 mM Tris, 5 % SDS, 10 % Glycerin) aufgenommen. Danach wurden die festen Bestandteile wiederum abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in Puffer 2 mit 10 mM DTT aufgenommen. Nach einer Inkubation für 1,5 h bei Raumtemperatur wurden Pellet und Überstand durch eine Zentrifugation getrennt. Das Pellet wurde mehrmals mit 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gewaschen und anschließend mit Trypsin inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation und der Überstand wurde abgenommen.

Zusätzlich wurden weitere Extraktionen aus Haut- und *Stratum corneum*-Proben in Harnstoff-Puffer (8 M Urea, 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, Protease-Inhibitor-Cocktail modifiziert nach Resing et al., 1984, z. T. mit 10 mM DTT versetzt, nach Sybert et al., 1985) durchgeführt. Die Probe wurde nach der mechanischen Zerkleinerung mit 500  $\mu\text{l}$  Puffer pro 100 mg Haut oder *Stratum corneum* versehen,

bei 20000 x g und 0 °C für 30 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.11.2 Gewinnung und Behandlung von Schweißproben

Schweißproben wurden unter anderem in der Sauna gewonnen; der Schweiß wurde in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen und eingefroren. Weitere Schweißproben wurden in einer Sportgruppe beim "Spinning" gewonnen; auch hier wurde der Schweiß in Röhrchen aufgefangen und eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Schweißproben wurden ähnlich wie *Stratum corneum*-, Epidermis- und Vollhaut-Proben mit DTT behandelt. Die Proben wurden dazu mit DTT in einer Endkonzentration von 10 mM versetzt und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Schweißproben sehr trüb und partikulär waren, wurden die Partikel in einigen Proben durch eine Zentrifugation (10000 x g, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, mit 10 mM DTT versetzt und inkubiert. Das Pellet wurde in einem identischen Volumen PBS mit 10 mM DTT resuspendiert und ebenfalls inkubiert.

### 2.11.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unterschiedlich, in Abhängigkeit davon, ob es sich um ein Proteingemisch oder um aufgereinigte Proteine handelte.

#### 2.11.3.1 Berechnung über den molaren Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde für Lösungen, die nur ein definiertes Protein enthielten (wie z. B. Fusionprotein nach RP8-Aufreinigung), die Konzentration mittels des Extinktionskoeffizienten bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz verhält sich die Lichtextinktion bei einer bestimmten Wellenlänge proportional zur Konzentration der Lösung, wenn die Schichtdicke der Lösung gleich bleibt:

$$E_{280 \text{ nm}} = \epsilon_{280 \text{ nm}} \cdot c \cdot d$$

mit  $E_{280 \text{ nm}}$ : Extinktion bei 280 nm;  $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ : molarer Extinktionskoeffizient in  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ;  
c: Konzentration der Lösung in M; d: Schichtdicke der Küvette in cm.



Der molare Extinktionskoeffizient ist konstant für eine definierte Wellenlänge und Temperatur und spezifisch für eine Substanz. Bei Proteinen ist der molare Extinktionskoeffizient für 280 nm unter anderem abhängig von der Anzahl der vorhandenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin einer Sequenz sowie der Ausbildung von Disulfid-Brücken. Da die Sequenzen der rekombinant exprimierten Ifapsoriasin-Proteinregionen sowohl für die Fusionsproteine als auch für die Fragmente bekannt waren, wurden mit Hilfe des Analyseprogramms "ProtParam" auf der Internetseite des "ExpASY Proteomics Servers" (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) die jeweiligen Extinktionskoeffizienten berechnet. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz konnte die Konzentration der Lösung durch Messung der Absorption bei 280 nm errechnet werden. Da das Gesetz nur in einem definierten Bereich gültig ist, wurden Konzentrationen nur bei gemessenen Absorptionen zwischen 0,04 und 0,8 berechnet. Lagen die Werte darüber oder darunter, wurde entsprechend aufkonzentriert oder verdünnt. Die Messungen erfolgten photometrisch in UVetten® (Eppendorf).

### **2.11.3.2 Berechnung mit der Bicinchoninsäure-Bestimmung**

Die Bicinchoninsäure(BCA)-Methode (Smith et al., 1985) wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration gewählt, wenn es sich bei den Proben um Proteingemische handelte. Die Konzentration konnte in solchen Gemischen nicht mit dem Extinktionskoeffizienten ermittelt werden, da sich z. B. in den Epidermis- oder *Stratum corneum*-Extrakten viele verschiedene Proteine in nicht bekannter Zusammensetzung befanden. Ein weiteres Problem trat bei der Verwendung der Extraktionspuffer auf. Die Puffer enthielten unter anderem EDTA (aus den Protease-Inhibitor-Tabletten), SDS, DTT und Harnstoff. Diese Pufferbestandteile interferieren bei der kolorimetrischen Bestimmung der Proteinkonzentration durch die Lowry-, Bradford- und BCA-Methode. Die BCA-Methode wurde gewählt, da insgesamt die gewonnenen Extrakte am wenigsten verdünnt werden mussten, um Interferenzen der Pufferbestandteile bei der Messung auszuschließen bzw. zu minimieren (Olson und Markwell, 2007).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das "Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit" (Sigma) nach Protokoll verwendet. Die Kalibrierung wurde mit Hilfe einer BSA-Standardreihe hergestellt. Die photometrischen Messungen wurden in Halbmikroküvetten (Sarstedt) bei einer Wellenlänge von 562 nm durchgeführt.

#### **2.11.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde eingesetzt, um Proteine elektrophoretisch ihrer Größe nach aufzutrennen. Trenngele zwischen 7 % und 10 % wurden verwendet. Die Trenngele setzten sich aus dem entsprechenden Volumen von 40 % (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) (BioRad), 0,39 M Tris, 0,039 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) TEMED und 0,1 % (w/v) APS zusammen. Das Sammelgel bestand aus 3,8 %igem Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1), 0,69 M Tris, 0,2 % TEMED und 0,2 % APS.

Die Trennung erfolgte in einem Elektrodenpuffer mit 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,2. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladepuffer (4x, 4 % (w/v) SDS, 60 % (v/v) Glycerin, 0,3M Tris, 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Als Größenstandard wurde die "Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder" (Fermentas) verwendet.

#### **2.11.5 Proteinfärbung**

Es wurden verschiedene Färbemethoden benutzt, um nach einer SDS-PAGE die Proteine im Gel sichtbar zu machen.

##### **2.11.5.1 Coomassie Brilliant Blue-Färbung**

Die Proteinfärbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue beruht vermutlich auf der direkten Bindung des Farbstoffs an die Aminosäuren Arginin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin und Phenylalanin (Olson und Markwell, 2007).

Zur Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue wurde das Gel 1 h in Färbelösung (0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 7 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) EtOH) bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Entfärbung erfolgte unter Schütteln in Entfärberlösung (7 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol) ebenfalls bei 37 °C, wobei die Lösung regelmäßig erneuert wurde, um die Entfärbung zu beschleunigen.

##### **2.11.5.2 Silberfärbung**

Das Prinzip der Anfärbung von Proteinen durch reduzierte Silberionen beruht vermutlich auf der Komplexbildung der Silberionen an Proteine durch Formaldehyd-Behandlung (Heukeshoven und Dernick, 1985). Wichtig scheinen hierbei funktionelle

Gruppen der sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat sowie die der basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin zu sein.

Die Silberfärbung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Heukeshoven und Dernick, 1988. Die Gele wurden im Anschluss an die SDS-PAGE in eine Fixierungslösung (30 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Eisessig) gegeben und 30 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min schüttelnd in "Farmers Reducer" (0,4 M Natriumacetat, 30 % (v/v) EtOH, 0,1 % (w/v) Natriumthiosulfat, 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd, pH 6,0). Darauf schlossen sich drei Waschschrte für je 10 min in H<sub>2</sub>O an. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit einer 0,1 %igen (w/v) AgNO<sub>3</sub>-Lösung mit 0,025 % (v/v) Formaldehyd schüttelnd für 30 min. Zur Entwicklung wurden 2,5 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit 0,04 % (v/v) Formaldehyd verwendet. Hierzu wurde das Gel so lange vorsichtig geschüttelt, bis Banden sichtbar wurden. Die Entwicklung wurde mit 5 % (v/v) Essigsäure gestoppt.

#### **2.11.6 Massenspektrometrie**

Zur Überprüfung der Proteinaufreinigung nach C4-, C8- bzw. C2/C18-Umkehrphasen-HPLC und zur Ermittlung der Masse unbekannter Proteine wurde die Masse mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) in einem Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid-Massenspektrometer ("QTOF II", Waters Micromass) bestimmt. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mit einer Natriumiodid-Lösung (40 µg/ml in Isopropanol) in einem Bereich von 80-2000 m/z (Masse/Ladungsverhältnis). Die Proben wurden mit einer Lösung aus 50 % (v/v) Acetonitril mit 0,2 % (v/v) Ameisensäure versetzt und bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 µl/min im positiven Ionen-Modus gemessen. Die Kapillarspannung betrug 4 kV, die Konus-Spannung 35-55 kV; gemessen wurde bei einer Konus-Temperatur von 80 °C und einer Desolvationstemperatur von 150 °C. Die Messungen erfolgten mit Stickstoff als Träger-Gas. Spektren wurden in einem m/z-Bereich von 80-2000 aufgenommen und unter Verwendung der MassLynx 4-Software (Micromass) ausgewertet. Hierzu wurden die Spektren der einzelnen Scans gemittelt, Hintergrund-korrigiert und die monoisotopischen Massen in Dalton über die "Maximum Entropy 1" (MaxEnt1)-Dekonvolution berechnet.

### 2.11.7 Datenbankenanalysen und Sequenzvergleiche

Anhand der C-terminalen Sequenz des humanen Ifapsoriasins (RQRHGSSQVWKHGSYGPAEYDYGHTGYGPSGGSR) wurden mit Hilfe des BLAST-Programms des Ensembl-Servers (<http://www.ensembl.org/index.html>) Orthologe gesucht. Die genomischen Sequenzen aller verfügbaren Spezies wurden mit der "tblastn"-Funktion analysiert. Putativ orthologe Sequenzen wurden näher analysiert, wenn der "Expectation value" unter  $10^{-6}$  lag und die Identität auf Aminosäure-Ebene mehr als 50 % betrug. Dieser "Expectation value" ist ein Wert, der, je kleiner er ist, eine höhere Signifikanz der verglichenen Sequenzen anzeigt. Für diese so erhaltenen Sequenzfragmente wurde die komplette Proteinsequenz anhand der verfügbaren Daten ermittelt.

Zusätzlich wurde die C-terminale Sequenz mit Hilfe des BLAST-Programms des NCBI-Servers (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) ebenfalls über die "tblastn"-Funktion analysiert, um weitere Spezies untersuchen zu können.

Die gefundenen Sequenzabschnitte wurden mit Hilfe des "ClustalW-Programms" (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) verglichen und ein Stammbaum wurde erstellt.

## 2.12 Herstellung polyklonaler Antikörper aus der Ziege

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper gegen verschiedene Teilfragmente des Ifapsoriasins wurde ein Gemisch aus geschnittenen Ifapsoriasin-Fragmenten und pET-Fusionsproteinen verwendet. Ein Teil dieses Gemisches wurde an das Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke ("Keyhole Limpet Hemocyanin", KLH) gekoppelt, um die Immunantwort und somit die Antikörperproduktion in der Ziege zu erhöhen. Antiseren wurden jeweils gegen die Proteinfragmente IFPS-2 (N-terminale Spacer-Region), IFPS-3 (Repeat A-Region) und IFPS-4 (letzte B-Repeat-Region inklusive C-Terminus) generiert.

### 2.12.1 Antigen-Kopplung und Immunisierung

Insgesamt wurden 1 mg des hydrolysierten Ifapsoriasin-Fragments und 0,8 mg des intakten pET-Fusionsproteins verwendet. Es wurde eine 2 µg/µl-Lösung in PBS hergestellt. Um das KLH für die Kopplung an das Protein vorzubereiten, wurde 1 mg KLH mit 1 µl 25 % Glutaraldehyd und 900 µl PBS vermischt und 1 h bei

Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Das ungebundene Glutaraldehyd wurde über eine 30 kDa-Größenfiltrationssäule (0.5 ml Concentrator columns, 30 kDa filter, Vivascience) nach Anleitungen des Herstellers abgetrennt. Das KLH-Glutaraldehyd-Konjugat wurde mehrmals mit PBS gewaschen und auf ein Endvolumen von 400 µl eingestellt. Von den insgesamt 1,8 mg des Ifapsoriasin-Proteingemisches wurden jeweils 1,2 mg zur Kopplung mit dem KLH-Glutaraldehyd versetzt und in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei Raumtemperatur 1 h schüttelnd inkubiert. Zur Beendigung des Kopplungsvorgangs wurde Tris-HCl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Das an KLH gekoppelte wurde mit dem ungekoppelten Proteingemisch anschließend vereinigt. Das Gemisch der gekoppelten und ungekoppelten Proteine soll die Zahl der potenziellen Antigene aufgrund eventueller Konformationsunterschiede zwischen gekoppeltem, ungekoppeltem, Fusionsprotein und geschnittenem Protein steigern und so eine größere Zahl an Epitopen bereitstellen.

Für die Grundimmunisierung wurden 540 µg und für die drei Folgeimmunisierungen je 420 µg des Ifapsoriasin-Proteingemisches aliquotiert. Die Immunisierung wurde vom ZIKA-Kaninchenbetrieb Goymann in Gottin durchgeführt. Nach der Grundimmunisierung erfolgten die Folgeimmunisierungen im dreiwöchigen Abstand; Serum wurde vier Wochen nach der letzten Immunisierung entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **2.12.2 Aufreinigung polyklonaler Antiseren über Affinitätschromatographie**

Zur Aufreinigung von Ifapsoriasin-spezifischen Antikörpern aus den jeweiligen polyklonalen Ziegenseren wurde für jedes Fragment eine Affinitätssäule hergestellt. Hierbei wurde zunächst das jeweilige Antigen in Form von geschnittenem Ifapsoriasin-Proteinfragment kovalent an eine Säulenmatrix gebunden, welches bei der Aufreinigung der polyklonalen Antiseren der selektiven Bindung und somit Aufreinigung spezifischer Antikörper diene.

Eine "HiTrap NHS-activated HP"-Säule (GE Healthcare) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Es handelte sich um eine Säule mit N-Hydroxysuccinimid(NHS)-aktivierter Sepharose, an die Liganden mit primären Aminogruppen kovalent gebunden werden. Von den verschiedenen Ifapsoriasin-Fragmenten wurden 0,56 mg IFPS-2, 1,8 mg IFPS-3 und 1 mg IFPS-4 in je 1 ml Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gelöst, nach HCl-Aktivierung

der Säule eingespritzt, zunächst 3 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Säule wurde nach Protokoll insgesamt sechsmal abwechselnd mit je 6 ml Puffer A (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3) und Puffer B (0,1 M Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4) gewaschen und in 10 mM Natriumphosphatpuffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> eingestellt auf pH 7,3 mit 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) bei 4 °C gelagert.

Die Kopplungseffizienz wurde nach Angaben des Herstellers über Ansäuerung des ersten Säulendurchlaufs nach der Antigen-Kopplung gemessen. Dazu wurde 1 ml des Durchlaufs mit 1 ml einer Glycin-HCl-Lösung (2 M, pH 2,0) gemischt und die Extinktion bei 280 nm gemessen. Über den molaren Extinktionskoeffizienten konnte berechnet werden, wie viel des zuvor aufgetragenen Antigens tatsächlich gekoppelt worden war.

Die Säule wurde vor der ersten Benutzung zunächst sowohl mit 10 mM Natriumphosphatpuffer als auch mit 10 mM Natriumphosphatpuffer/2 M NaCl (pH 6,5) und 0,2 M Glycinpuffer (pH 3,0) gewaschen. Zur Aufreinigung des Antiserums wurde die Säule mit 10 mM Natriumphosphatpuffer äquilibriert und anschließend mit 0,5 und 1,5 ml Serum beladen. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm. Ungebundene Serumproteine wurden mit Natriumphosphatpuffer von der Säule gewaschen. Im Anschluss wurden weniger affine Antikörper mit 10 mM Natriumphosphatpuffer/2 M NaCl eluiert. Hochaffine Ifapsoriasin-Antikörper wurden mit 0,2 M Glycin eluiert und aufgefangene Fraktionen wurden zum Schutz der Antikörper durch sofortige Zugabe von 1 M Tris pH 8,5 neutralisiert. Die hochaffinen Antikörper wurden über einen "Amicon Ultra-15"-Filter (Millipore) mit einem 50 kDa-Größenfilter nach Angaben des Herstellers insgesamt dreimal mit PBS gewaschen und aufkonzentriert. Die Bestimmung der Antikörperkonzentration erfolgte photometrisch, aliquotierte Antikörper wurden bei -20 °C und nach Anbruch bei 4 °C gelagert.

Zur Überprüfung, dass die Affinitätsäulen mit dem jeweiligen Volumen an Serum nicht überladen worden waren, wurde ein Aliquot des ersten Durchlaufs in Äquilibrierungspuffer rechromatographiert.

## 2.13 Immunologische Methoden

### 2.13.1 Dot Blot

Für die aufgereinigten Antikörper wurde zunächst mit Hilfe eines Dot Blots eine geeignete Verdünnungsstufe für die weitere Verwendung bestimmt.

Von den jeweiligen Ifapsoriasin-Fragmenten, gegen die Antikörper generiert wurden, wurde eine Verdünnungsreihe von 100 µg bis 0,1 µg hergestellt, um die Empfindlichkeit des Testsystems zu ermitteln. Zusätzlich wurden weitere rekombinante Proteine (z. B. andere Ifapsoriasin-Fragmente oder Fragmente des Hornerins, freundlicherweise von Dr. Zhihong Wu zur Verfügung gestellt) verwendet, um die Spezifität des Antikörpers zu testen. Pro Verdünnung wurde 1 µl bis maximal 2 µl auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm, GE Healthcare) getropft und getrocknet. Die Membran wurde zum Blocken 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver/PBS-T (PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die geblockte Membran mit entsprechenden primären Antikörpern gegen das jeweilige Ifapsoriasin-Fragment in verschiedenen Verdünnungen in 3 % Milchpulver/PBS-T für 16 h bei 4 °C inkubiert. Auf sechs Waschstufen für je 5 min in PBS-T folgte eine einstündige Inkubation in 3 % Milchpulver/PBS-T mit dem sekundären Maus- $\alpha$ -Ziege-IgG-Antikörper (Peroxidasegekoppelt, 1:20000 verdünnt) schüttelnd bei Raumtemperatur. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Detektion von immunreaktivem Ifapsoriasin durch das "Immobilon Western HRP (horseradish peroxidase)"-Substrats (Millipore) oder das "Western C Immunostar" (BioRad) nach Angaben des Herstellers. Die Dokumentation wurde mit dem "Diana III Digital CCD Imaging System" (Raytest) durchgeführt. Anhand der Signalstärke und des Detektionslimits wurde die beste Verdünnungsstufe für die jeweiligen Antikörper ermittelt. Die Dot Blot-Methode wurde ebenso zur Testung des Präimmunserums der Ziegen auf vorhandene Immunreaktivität und für Untersuchungen von HPLC-Fractionen und Proteinextrakten verwendet.

### 2.13.2 Western Blot

Im Western Blot erfolgte die Detektion von immunreaktiven Proteinen ähnlich wie im Dot Blot, jedoch können im Western Blot Aussagen über die ungefähre molekulare Größe des detektierten Proteins gemacht werden, da eine SDS-PAGE (siehe 2.11.4)

vorangeschaltet ist. Die in der SDS-PAGE getrennten Proteine wurden mit einer Mini Protean III-Western Blot-Apparatur (BioRad) für 1 h bei einer Stromstärke von  $2,5\text{mA}/\text{cm}^2$  Gelfläche auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße  $0,2\ \mu\text{m}$ , GE Healthcare) transferiert. Der Transferpuffer bestand aus 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS und 20 % EtOH (pH 9,2). Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran wie unter 2.13.1 für den Dot Blot beschrieben mit Milchpulver geblockt. Der primäre Ziege- $\alpha$ -Ifapsoriasisin-Antikörper wurde in einer Konzentration von  $0,25\ \mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt. Der sekundäre Peroxidase-gekoppelte Maus- $\alpha$ -Ziege-Antikörper wurde in gleicher Verdünnung wie unter 2.13.1 eingesetzt. Die Detektion der Immunreaktivität erfolgte ebenfalls über Chemilumineszenz.

### 2.13.3 Immunhistochemie

Zur Untersuchung von Hautgewebe wurden in Paraffin eingebettete Stücke aus dem Archiv der Kieler Hautklinik zur Verfügung gestellt. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von  $5\ \mu\text{m}$  verwendet. Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und anschließend durch eine zwanzigminütige Inkubation in 10 mM Citratpuffer bei  $80\ ^\circ\text{C}$  demaskiert. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte durch Inkubation mit 12 % BSA und Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock (1:10) in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl) für 10 min. Die Schnitte wurden in TBS gewaschen und für 16 h bei  $4\ ^\circ\text{C}$  mit affinitätsaufgereinigtem polyklonalem Ziege- $\alpha$ -Ifapsoriasisin-Antikörper ( $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  in TBS/1 % (w/v) BSA) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Schnitte wurden mit TBS gespült und für 30 min mit biotinyliertem Kaninchen- $\alpha$ -Ziege-Antikörper (1:500 verdünnt in TBS/1 % BSA) inkubiert. Nach wiederholtem Spülen mit TBS wurde die Detektion des sekundären Antikörpers mittels des Vectastain ABC-AP<sup>®</sup>-Systems (Vector) nach Angaben des Herstellers für 30 min durchgeführt. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurde das Vector Red Alkaline Phosphatase-Substrate-Kit (Vector) eingesetzt. Für die Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet. Die Spezifität der Ifapsoriasisin-Antikörper wurde durch Blockierung mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens getestet. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die statt mit spezifischem Primärantikörper mit Präimmunserum inkubiert wurden und Schnitte ohne die Zugabe von Primärantikörper. Die Analyse der Schnitte wurde an einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss) durchgeführt.



### **2.13.4 Immunfluoreszenz**

Bei der Immunfluoreszenz erfolgt die Detektion von immunreaktiven Proteinen ähnlich wie für die Immunhistochemie beschrieben, jedoch mit Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelten Antikörpern.

#### **2.13.4.1 Immunfluoreszenz histologischer Schnitte**

In Paraffin eingebettete Schnitte wurden wie in 2.13.3 beschrieben geschnitten, entparaffiniert, rehydriert und mit Ziegen- und Maus-Normalserum (10 % in TBS mit 0,1 % BSA und 0,2 % Glycin) geblockt. Die Schnitte wurden für die Doppelfärbungen in einer Primärantikörper-Mischung aus 20 µg/ml polyklonalem Ziege- $\alpha$ -Ifapsoriasin-Antikörper und 1:50-verdünntem Maus- $\alpha$ -Filaggrin für 16 h bei 4 °C in TBS inkubiert. Nach drei Waschschritten für je 10 min in PBS folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einer Sekundärantikörper-Mischung aus Alexa Fluor 594-gekoppeltem Huhn- $\alpha$ -Ziege-IgG- und FITC-gekoppeltem Pferd- $\alpha$ -Maus-IgG-Antikörper (beide 1:200 verdünnt). Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hilfe des DNA-selektiven Farbstoffs Bisbenzimid (Hoechst 33258). Kontrollschnitte wurden ohne Zugabe von Primärantikörper angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop (LSM 510 UV, Zeiss).

#### **2.13.4.2 Immunfluoreszenz kultivierter Keratinozyten**

Primäre humane Keratinozyten wurden wie in 2.7.3 beschrieben kultiviert und statt auf Loch-Platten auf kollagenisierten Achtkammer-Objektträgern (BD Biosciences) inkubiert. Die Keratinozyten wurden in Epilife-Medium ohne zusätzliches  $\text{Ca}^{2+}$  über vier bis sieben Tage kultiviert. Darauf folgend wurden die Zellen über 24-48 h mit 1,6 mM  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliert. Die Fixierung erfolgte für 25 min in 3 % Paraformaldehyd/PBS. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100 für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert, mit 5 % Serum geblockt und in PBS gewaschen. Als primäre Antikörper wurden polyklonale Ziege- $\alpha$ -Ifapsoriasin-Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Die fixierten Zellen wurden für 16 h bei 4 °C inkubiert, gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit Alexa Fluor 594-konjugiertem Huhn- $\alpha$ -Ziege-Sekundärantikörper (1:1000 verdünnt) inkubiert. Zum Vergleich der Expression mit anderen Proteinen wurden auch Antikörper gegen Filaggrin (Maus- $\alpha$ -Filaggrin) bzw. E-Cadherin (Maus- $\alpha$ -E-Cadherin) verwendet und mit FITC-gekoppeltem Pferd- $\alpha$ -Maus als Sekundärantikörper

detektiert (alle 1:200 verdünnt). Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop (Axio Imager Z1, Zeiss).

## **2.14 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität**

Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von verschiedenen Ifapsoriasin-Proteinfragmenten erfolgte in zwei unterschiedlichen Testsystemen: dem Radialdiffusionstest und dem Mikrodilutionstest in Anlehnung an Steinberg und Lehrer, 1997. Beide Tests wurden im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchgeführt.

### **2.14.1 Radialdiffusionstest**

Beim Radialdiffusionstest wurden die jeweiligen Mikroorganismen aus einer Übernachtskultur in 8 ml TSB-Medium ("Tryptic Soy Broth") weitere 2-3,5 h bei 37 °C und 120 Upm kultiviert. Je nach verwendetem Bakterienstamm wurden unterschiedliche Volumina überimpft und die Kulturen verschieden kultiviert; eine Übersicht ist in Tab. 2.5 gezeigt.

Die "Underlay"-Agarose (1 % (w/v) Agarose (Elektrophorese-Grad, Invitrogen), 0,02 % (v/v) Tween20, 1 % (v/v) TSB-Medium, 10 mM Natriumphosphatpuffer) wurde verflüssigt und auf 46 °C gehalten. Jeweils 10 ml Underlay-Agarose wurden anschließend mit verschiedenen Volumina der Bakterien (siehe Tab. 2.5) versetzt und gründlich gemischt. Die Suspension wurde in Petrischalen (Sarstedt) gegossen und ausgehärtet. Mit Hilfe einer Hautstanze mit 3 mm Durchmesser wurden Löcher in die Underlay-Agarose gestanzt. Die Proben wurden in entsprechender Konzentration in 0,01 % (v/v) Essigsäure gelöst. Von den zu testenden Substanzen wurden je 5 µl in die gestanzten Löcher gegeben. Als Positivkontrolle wurde humanes Lysozym (100 ng/ml in 0,01 % Essigsäure), als Negativkontrolle 0,01 % Essigsäure verwendet. Es folgte eine Inkubation für 3 h bei 37 °C.

"Overlay"-Agarose (1 % (w/v) Agarose, 3,4 % (w/v) Caseinpepton, 0,6 % (w/v) Sojamehlpepton, 0,5 % (w/v) D+-Glucose-Monohydrat, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,2-7,4) wurde in der Zwischenzeit verflüssigt und auf 46 °C gehalten. Die Underlay-Agarose wurde nach Inkubation mit der Overlay-Agarose überschichtet. Nach Aushärtung der Platten wurden diese für 16 h bei 37 °C inkubiert, im Anschluss wurden die Hemmhöfe vermessen.

**Tab. 2.5: Kultivierung der unterschiedlichen Mikroorganismen-Gattungen im Radialdiffusionstest.**

Gattung	überimpftes Volumen aus Übernachtskultur	Inkubation der Kultur bei 37 °C	Volumen in 10 ml Underlay
<i>Escherichia</i>	50 µl	Standkultur	50 µl
<i>Pseudomonas</i>	50 µl	Standkultur	50 µl
<i>Staphylococcus</i>	100 µl	Standkultur	100 µl
<i>Candida</i>	200 µl	Schüttelkultur	200 µl

Die Auswertung und Berechnung der "Minimalen Effektiven Konzentration" (MEK) erfolgte nach Steinberg und Lehrer, 1997. Hierzu wurden die 3 mm des gestanzten Probenloches von den Hemmhof-Werten abgezogen. Die Größe des tatsächlichen Hemmhofes wurde in Einheiten umgerechnet, wobei zehn Einheiten einem Millimeter entsprachen. Die Einheiten wurden halblogarithmisch gegen die Konzentration der jeweiligen Probe graphisch aufgetragen, der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszissen-Achse bezeichnete die MEK. Konzentrationen, die keinen Hemmhof zeigten, wurden in der graphischen Auswertung nicht berücksichtigt.

#### 2.14.2 Mikrodilutionstest

Im Gegensatz zum Radialdiffusionstest erfolgte die Testung der antimikrobiellen Aktivität im Mikrodilutionstest in einem flüssigen Testsystem. Aus einer Übernachtskultur der jeweiligen Mikroorganismen in TSB-Medium wurden mit 50-100 µl 10 ml frisches TSB-Medium angeimpft und 2,5 h schüttelnd inkubiert. Zur Wachstumskontrolle wurde von den Kulturen die Transmission bei 540 nm bestimmt. Die Transmission gibt den prozentualen Anteil des die Mikroorganismen-Suspension durchdringenden Lichts an. Nach zwei Waschschritten in 10 mM Natriumphosphatpuffer/1 % (w/v) TSB wurde die Kultur in 10 ml Natriumphosphatpuffer/1 % TSB resuspendiert und die Transmission bei 540 nm erneut kontrolliert. Anschließend wurden die Bakterien auf eine Konzentration von  $10^4$ - $10^5$  Keimen pro Milliliter eingestellt. Zur Keimzahlkontrolle wurden jeweils 100 µl in 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnungen in Doppelwerten auf TSB-Agarplatten ausplattiert. Von der Bakterien suspension wurden 100 µl mit 10 µl der zu testenden Substanz in entsprechenden Konzentrationen (standardmäßig von 100 µg/ml bis zu 0,0125 µg/ml gelöst in 0,01 % Essigsäure) gemischt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrollen wurden 10 µl des Natriumphosphatpuffers mit 1 % TSB bzw.

---

0,01 % Essigsäure verwendet. Nach Ende der Inkubation wurden von jedem Ansatz eine 1:10- und 1:100-Verdünnung hergestellt und davon 100 µl in Doppelwerten auf TSB-Agarplatten ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C wurden die kolonienbildenden Einheiten ausgezählt. In Bezug auf die Negativkontrolle wurde die LD<sub>90</sub> berechnet. Als LD<sub>90</sub> wird die Konzentration der zu testenden Substanz bezeichnet, bei der 90 % oder mehr Bakterien abgetötet werden.

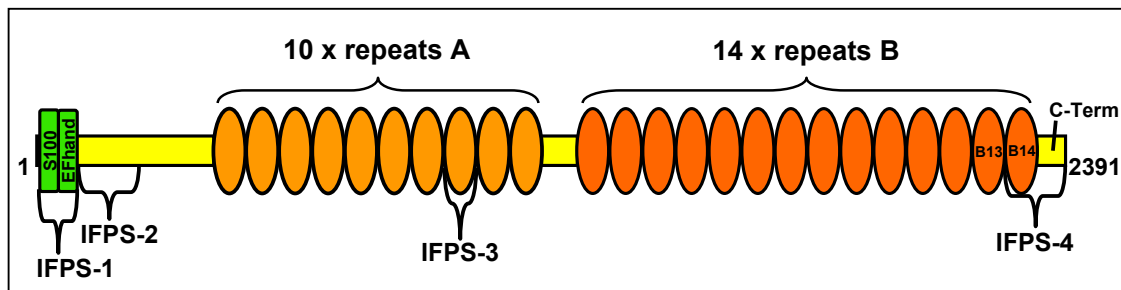
### 3 Ergebnisse

In unserer Arbeitsgruppe wurde Ifapsoriasin als neues Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie auf genomischer Ebene in der Region des "Epidermalen Differenzierungskomplexes" im Abschnitt 1q21.3 des humanen Chromosoms 1 identifiziert. In der Doktorarbeit von Zhihong Wu wurden zunächst die genomische Organisation, die cDNA-Sequenz, die mRNA-Expression und deren Regulation untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die Expression und mögliche Funktion des Proteins näher zu untersuchen.

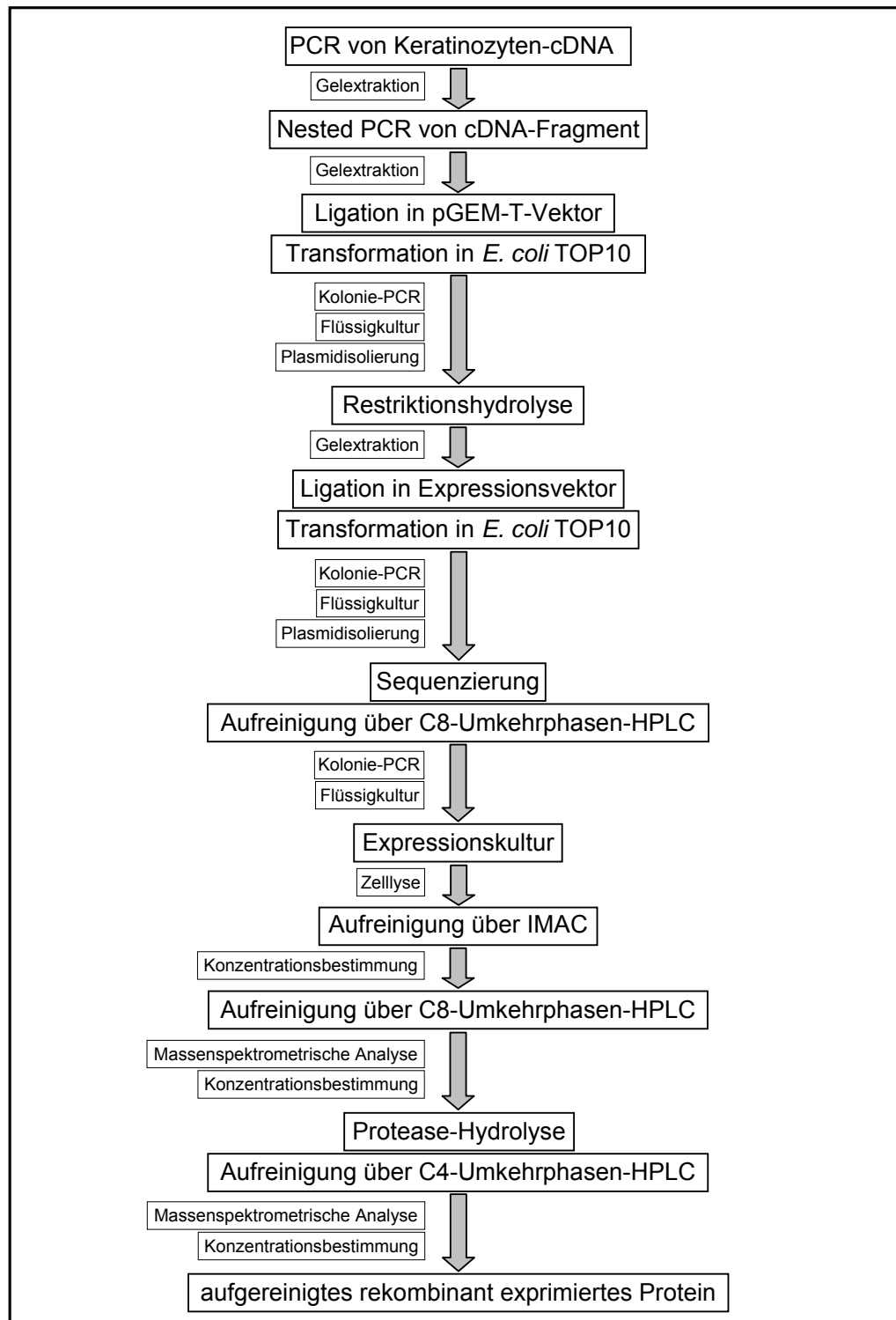
#### 3.1 Rekombinante Expression verschiedener IFPS-Fragmente

Einige sequenztypische Fragmente von Ifapsoriasin wurden für Funktionsanalysen und die Generierung von Antikörpern für die rekombinante Expression ausgewählt (Abb. 3.1): der vollständige N-Terminus mit den potenziellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomänen (IFPS-1, Aminosäuren 2-80), ein Teil der N-terminalen Spacer-Region (IFPS-2, Aminosäuren 96-235), eine Tandemsequenz der A-Repeats (IFPS-3, Aminosäuren 953-1029) und die letzte Tandemsequenz der B-Repeats inklusive des C-Terminus (IFPS-4, Aminosäuren 2244-2391). Für detailliertere Ergebnisse im Bereich der antimikrobiellen Aktivität wurden zusätzlich das vorletzte B-Repeat (IFPS-B13, Aminosäuren 2172 bis 2246), das letzte B-Repeat (IFPS-B14, Aminosäuren 2247 bis 2321) und der C-Terminus (IFPS-C-Term, Aminosäuren 2322 bis 2391) getrennt rekombinant hergestellt.



**Abb. 3.1: Schematische Struktur des humanen Ifapsoriasin-Proteins.** Ifapsoriasin besitzt zwei potenzielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomänen (S100- und EF-Hand-Domäne) und zwei Arten von Tandem-Sequenzwiederholungen (A- und B-Repeats), die durch eine kurze Spacer-Sequenz geteilt sind. Gelb: Spacer-Sequenzen; hell- und dunkelorange: multiple Tandem-Sequenzwiederholungen A und B; IFPS-1, -2, -3, -4, -B13, -B14 und -C-Term: rekombinant exprimierte Proteinfragmente.

Der schematische Ablauf einer rekombinanten Expression ist nochmals in Abb. 3.2 dargestellt.



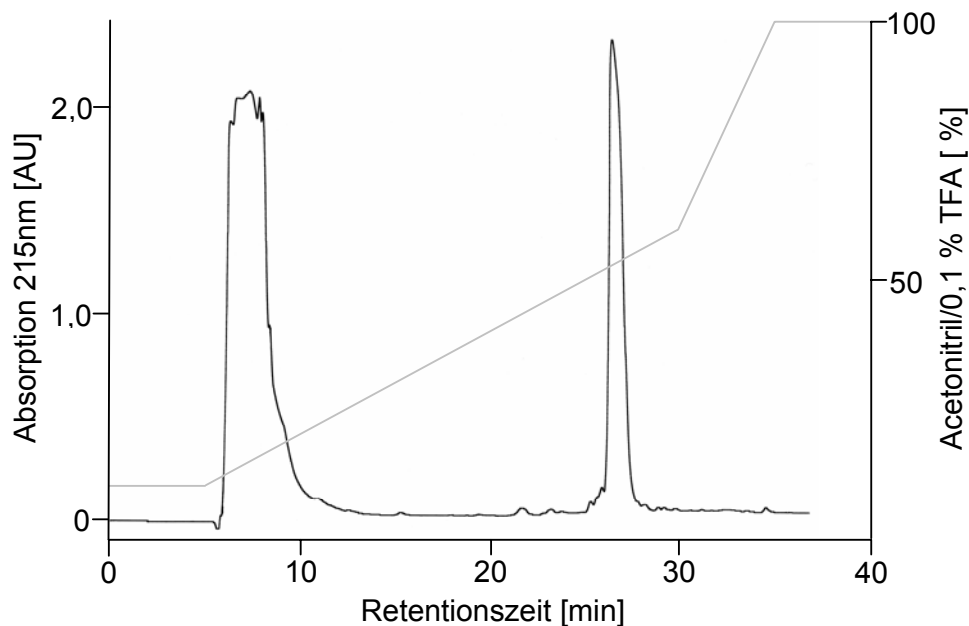
**Abb. 3.2: Schematische Übersicht über die Versuchsabläufe zur Herstellung eines rekombinanten Proteins.** Die verwendeten Methoden werden in Abschnitt 2 unter "Material und Methoden" näher erläutert. IMAC: Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie, HPLC: High Pressure Liquid Chromatography.

### 3.1.1 Expression im pET-32a-System

Das Expressionssystem im pET-32a-Vektor wurde gewählt, da in der Arbeitsgruppe bereits Proteine wie RNase7 und Psoriasisin erfolgreich in diesem System exprimiert wurden. Für die beiden N-terminalen Fragmente, deren Fusionsproteine nach dem verwendeten Vektorsystem pET-IFPS-1 und pET-IFPS-2 benannt wurden, konnte auf bereits klonierte Sequenzteile von Ifapsoriasisin zurückgegriffen werden. Diese Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Zhihong Wu zur Verfügung gestellt. Für die Fragmente der A- und B-Repeats, pET-IFPS-3 und pET-IFPS-4, wurden zunächst von Keratinozyten-cDNA größere Fragmente in einer PCR amplifiziert, um diese als Matrize in einer "Nested PCR" nutzen zu können. Die vier verschiedenen Fragmente wurden in den pGEM-T-Vektor kloniert und durch Restriktionshydrolyse herausgeschnitten, um kompatible Sequenzüberhänge zur Klonierung in den pET-32a-Vektor zu generieren. Plasmide mit fehlerloser Sequenz wurden in *E. coli* BL21 *trxB*(DE3)*pLysS*-Zellen transformiert. Im Fall des IFPS-2-Fragments wurde eine Punktmutation (A→G) in der 462. Base nach dem Translationsstartkodon gefunden. Diese Mutation veränderte das kodierende Basentriplett von AGA zu AGG. Da beide Triplets für die Aminosäure Arginin kodieren, wurde das Nukleotidfragment für die Expression weiter verwendet.

Die Fusionsproteine der Fragmente des N-terminalen Spacers (pET-IFPS-2), der A-Repeat-Sequenz (pET-IFPS-3) und der C-terminalen Sequenz (pET-IFPS-4) wurden erfolgreich exprimiert, während für die N-terminale Region der S100- und EF-Hand-Domänen (pET-IFPS-1) nur minimale Mengen an Fusionsprotein exprimiert werden konnten. Nach Aufreinigung über immobilisierte Metallionenchromatographie und C8-Umkehrphasen-HPLC lag für die Fragmente IFPS-2, -3 und -4 ein sauberes Fusionsprotein vor. Ein typisches Chromatogramm einer C8-Umkehrphasen-HPLC ist in Abb. 3.3 gezeigt.

Nach etwa 7 min war aufgrund der hohen Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie ein Einspritzpeak zu sehen. Das Fusionsprotein eluierte nach etwa 27 min Retentionszeit. Die Retentionszeit des Fusionsproteins variierte je nach exprimiertem Fragment und aufgetragener Proteinmenge zwischen 25 und 28 min.



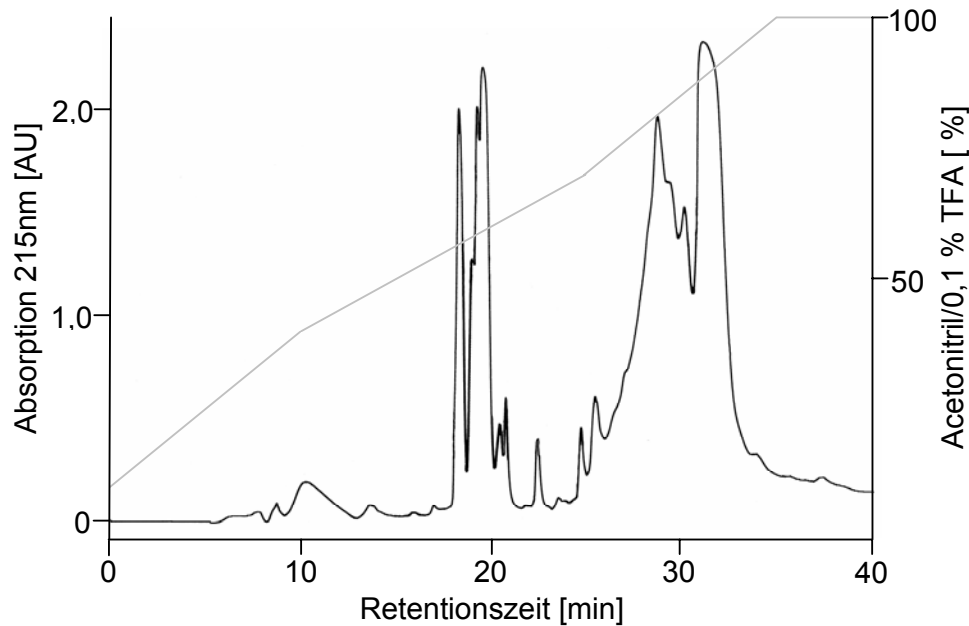
**Abb. 3.3: Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten SUMO-IFPS-4-Fusionsproteins mittels C8-Umkehrphasen-HPLC.** Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die zuvor über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie aufgereinigte Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min auf die C8-Säule aufgetragen und mit einem H<sub>2</sub>O/0,1 % TFA-Acetonitril/0,1 % TFA-Gradienten beschriebener eluiert (siehe 2.10.2).

Nach Hydrolyse des Fusionsproteins mit Enterokinase konnte in darauf folgender C4-Umkehrphasen-HPLC kein definierter Peak für das abgespaltene Ifapsoriasin-Fragment mit der entsprechenden Masse in anschließenden ESI-MS-Analysen identifiziert werden. Ein repräsentatives Chromatogramm für diese C4-Umkehrphasen-HPLC ist in Abb. 3.4 dargestellt.

Da die Hydrolyse der Fusionsproteine im pET-System nicht zur Abspaltung der gewünschten Ifapsoriasin-Fragmente führte, wurden alle vier Fragmente in das pET SUMO-System (Invitrogen) umklont.

Die pET-Fusionsproteine wurden für die spätere Immunisierung zur Gewinnung von Antikörpern verwendet.





**Abb. 3.4: Chromatogramm der Aufreinigung einer Enterokinase-behandelten Probe des pET-IFPS-3-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC.** Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen und mit einem H<sub>2</sub>O/0,1 % TFA-Acetonitril/0,1 % TFA-Gradienten eluiert (siehe 2.10.3).

### 3.1.2 Expression im SUMO-System

Die im pET-32a-System nicht kontrolliert hydrolysierbaren Fragmente wurden in einer "Nested PCR" mit neuen Primern von Gel-eluierten Fragmenten amplifiziert, die zuvor auch für das pET-32a-System benutzt worden waren. Im pET SUMO-System wurde eine modifizierte Klonierungsstrategie angewendet, da die Ligation in den Expressionsvektor hier nicht über Restriktionsüberhänge sondern lediglich über 3'-Desoxythymidinphosphat-Überhänge vermittelt wurde. Eine vorangehende Klonierung in den pGEM-T-Vektor war damit nicht erforderlich. Nach Sequenz-Überprüfung wurde der Expressionsvektor mit den verschiedenen Inserts in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen transformiert und das Fusionsprotein wurde wie zuvor exprimiert.

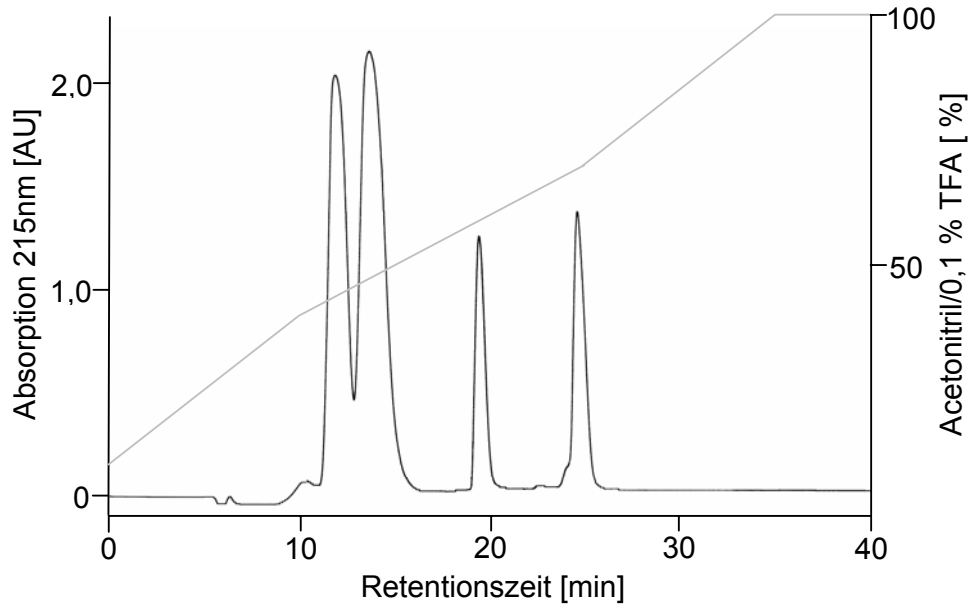
Auch in diesem System war die Expression für die nach dem Vektor benannten Fusionsproteine SUMO-IFPS-2, -3 und -4 erfolgreich, während für das N-terminale Fragment SUMO-IFPS-1 erneut nur minimale Mengen an Fusionsprotein exprimiert wurden. Ein N-terminal verkürztes Fragment, SUMO-sIFPS-1 (Aminosäuren 6 bis 80)

fürte zu keiner Verbesserung der Expression des Fusionsproteins, ebenso wie eine Umklonierung in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3). Da die N-terminale Sequenz des IFPS-1 bzw. des verkürzten Fragments für zwei potenzielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomänen kodiert, wurde vermutet, dass mit beginnender Proteinexpression  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Kultivierungsmedium durch diese Domänen gebunden werden könnten. Die Bakterien würden nicht mehr ausreichend mit diesen Ionen versorgt, es könnte zu verschlechterten Wachstumsbedingungen für die Bakterien und somit keiner ausreichenden Expression des Fusionsproteins mehr kommen. Daher wurde eine Expression mit erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (18 mM) im Kultivierungsmedium durchgeführt. Die Expression konnte jedoch nicht verbessert werden.

Da das IFPS-4-Fragment aus dem letzten B-Repeat und dem kompletten C-Terminus ohne Repeat-Sequenzen besteht, wurde diese Sequenzen nochmals getrennt exprimiert (IFPS-B14 und IFPS-C-Term). Zusätzlich wurde das vorletzte B-Repeat rekombinant hergestellt (IFPS-B13) (Abb. 3.1). Die Klonierung und Expression fand für diese Fragmente im pSUMO3-Vektor statt. Nach Überprüfung der Sequenz wurde der pSUMO3-Vektor mit jeweiligem Insert zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen transformiert (Übersicht siehe Abb. 3.2).

Bei der Sequenzierung der Plasmide wurde eine Punktmutation in der Sequenz des IFPS-C-Term-Fragments gefunden; ein TCA-Kodon, das für die Aminosäure Serin kodierte, war zu einem Stopkodon (TAA) mutiert worden, wodurch ein C-terminal verkürztes Proteinfragment exprimiert wurde (IFPS-C-Term short, Aminosäuren 2244 bis 2376).

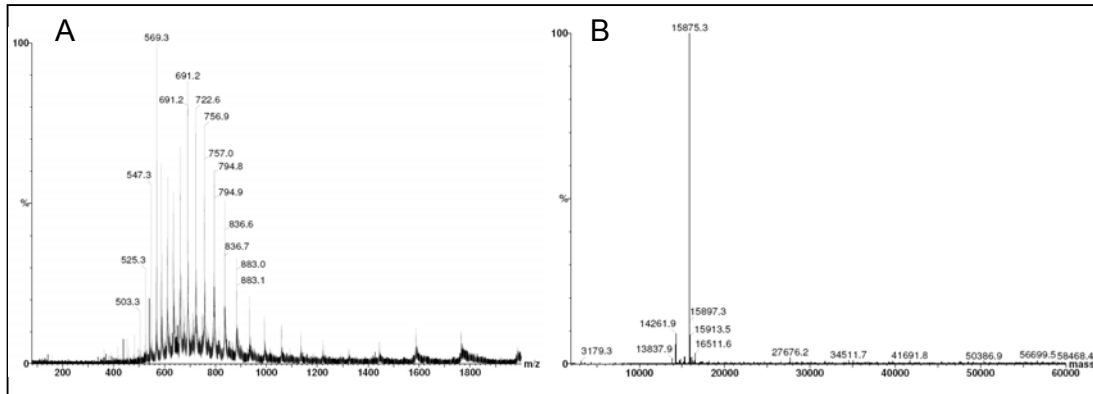
Die Hydrolyse der Ifapsoriasin-Fragmente vom His-SUMO-Anteil des Fusionsproteins erfolgte im SUMO-System mit der SUMO-Protease 1 für die Fragmente, die im pET SUMO-Vektor exprimiert worden waren, bzw. mit der SUMO-Protease 2 für die Fragmente im pSUMO3-Vektor (außer für SUMO-IFPS-C-Term short). Die Hydrolyse-Konditionen wurden für die verschiedenen Fragmente angepasst (siehe Tab. 2.4). Im Anschluss wurden die hydrolysierten Proteine über eine C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt (siehe 2.10.3), um hydrolysiertes Protein vom intakten Fusionsprotein bzw. Fusionstag zu trennen. Ein typisches Chromatogramm ist in Abb. 3.5 dargestellt.



**Abb. 3.5: Chromatogramm der Aufreinigung einer SUMO-Protease 2-behandelten Probe des SUMO-IFPS-B13-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC.** Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen und mit einem H<sub>2</sub>O/0,1 % TFA-Acetonitril/0,1 % TFA-Gradienten wie in 2.10.3 beschrieben eluiert.

Die ersten beiden Peaks bei einer Retentionszeit von etwa 11 und 13 min entstanden durch das in dem PBS enthaltene DTT in reduzierter und oxidiertes Form. Der Peak bei einer Retentionszeit von etwa 19 min (abhängig vom jeweiligen hydrolysierten Protein) beinhaltete das Ifapsoriasin-Fragment, der Peak mit einer Retentionszeit von etwa 24 min entstand durch den Fusionstag. Die kleine Schulter, die vor diesem Peak zu sehen war, entstand durch nicht hydrolysiertes Fusionsprotein.

Die Massen der aufgereinigten Proteine wurden massenspektrometrisch überprüft. Ein repräsentatives Spektrum einer Massenanalyse mittels ESI-MS ist sowohl für ein kumuliertes Spektrum (A) als auch für eine ausgewertete Messung (B) in Abb. 3.6 gezeigt. Hierbei wurden die für jedes Protein typischen Isotopenmuster detektiert, wobei die Masse ins Verhältnis zur Ladung gesetzt worden war (Abb. 3.6 A). Anschließend wurden mit Hilfe des "MassLynx"-Programms diese Signale in Dalton umgerechnet (Abb. 3.6 B).

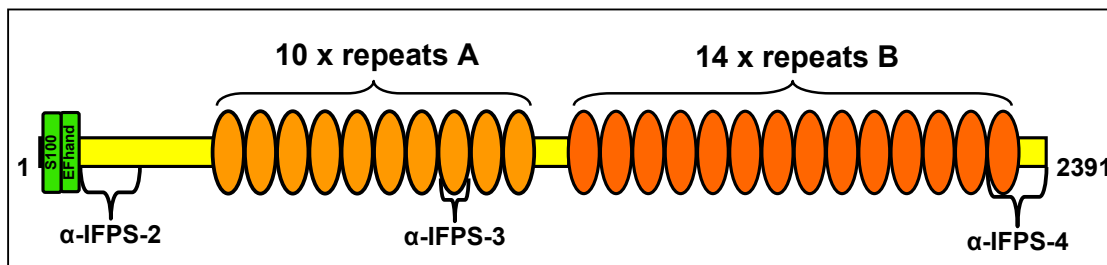


**Abb. 3.6: Massenspektrometrische Daten des IFPS-4-Proteins.** A: kumuliertes Spektrum der gesamten Messung; die Intensität (jeweils in Prozent des höchsten Peaks) ist gegen das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) dargestellt. B: Dekonvolviertes Spektrum von A. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks ist hier gegen die berechnete Masse (mass) in Dalton aufgetragen.

Die Proteinkonzentration der Fraktionen, in denen Proteine mit korrekten Massen detektiert worden waren, wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten bestimmt (siehe 2.11.3.1), die Proben wurden lyophilisiert und zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Eine Übersicht über die Sequenzen, theoretische Massen und pI-Werte der Fusionsproteine, der jeweiligen Fusionstags und Ifapsoriasin-Proteinfragmente in den verschiedenen Expressionssystemen ist im Anhang aufgeführt (siehe 7.3.2 und 7.4).

### 3.2 Generierung polyklonaler Antikörper gegen IFPS-Fragmente

Mit Hilfe polyklonaler Antikörper, die in Ziegen generiert wurden und gegen drei verschiedene Fragmente des Proteins gerichtet waren, wurden Analysen zur Expression und Funktion von Ifapsoriasin vorgenommen.

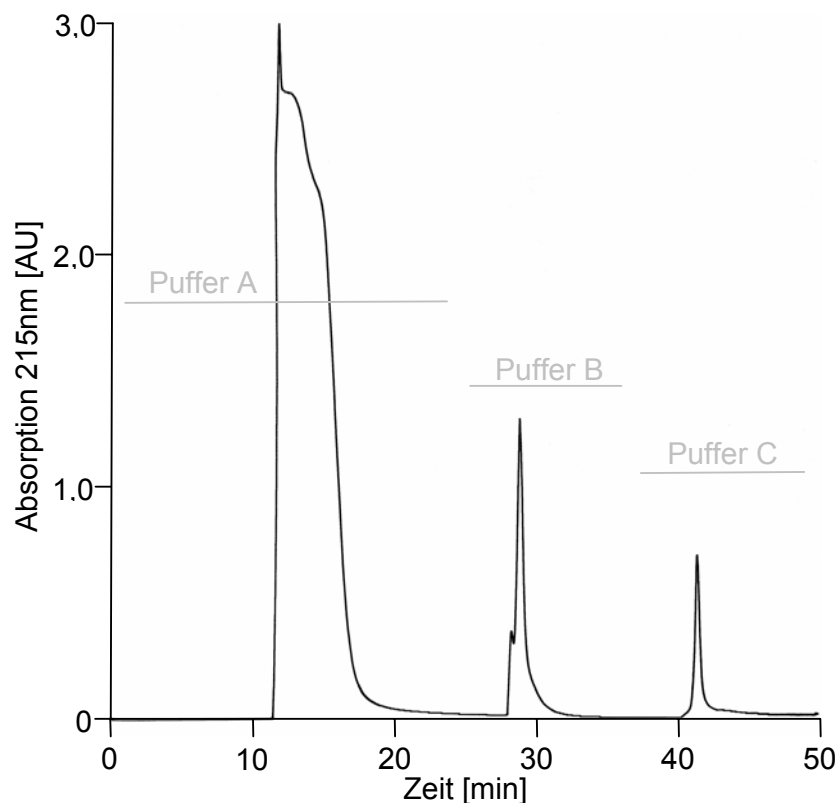


**Abb. 3.7: Übersicht der Ifapsoriasin-Sequenzabschnitte, gegen die Antikörper generiert wurden.** In Ziegen wurden polyklonale Antikörper gegen die drei Fragmente IFPS-2, -3 und -4 generiert. Gelb: Spacer-Sequenzen; hell- und dunkelorange: multiple Tandem- Sequenzwiederholungen A bzw. B; grün: S100- und EF-Hand-Domänen; IFPS-2, -3 und -4: rekombinant exprimierte Proteinfragmente.

Antikörper wurden gegen IFPS-2 (N-terminale Spacer-Region, Aminosäuren 96-235), IFPS-3 (A-Repeat-Region, Aminosäuren 953-1029) und IFPS-4 (letztes B-Repeat inklusive C-Terminus, Aminosäuren 2244-2391) generiert (Abb. 3.7).

### 3.2.1 Aufreinigung des Ziegenserums

Die Ziegen wurden in dreiwöchigen Intervallen mit dem jeweiligen Antigen immunisiert (siehe 2.12.1). Vier Wochen nach der letzten Immunisierung wurde das Serum entnommen und durch Affinitätschromatographie über eine Säule, an die das jeweilige Antigen gekoppelt worden war, aufgereinigt. Die gering affinen Antikörper wurden mit einem 10 mM Natriumphosphatpuffer und 2 M NaCl pH 6,5, die hochaffinen Antikörper mit 0,2 M Glycinpuffer pH 3,0 eluiert (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Chromatogramm der Aufreinigung der polyklonalen IFPS-3-Antikörper mittels Affinitätschromatographie.** Die relative Absorption bei 215 nm in AU ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Serumprobe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Affinitätssäule, an die rekombinantes IFPS-3 gekoppelt worden war, in Puffer A (10 mM Natriumphosphat) aufgetragen. Die Antikörper wurden anschließend mit Puffer B (2 M NaCl, pH 6,5) und Puffer C (0,2 M Glycin, pH 3) eluiert (siehe 2.12.2).

Das Glycinpuffer-Eluat der hochaffinen Antikörper wurde sofort mit 1 M Tris-Lösung abgepuffert und anschließend in PBS umgepuffert, um eine Schädigung der Antikörper zu vermeiden. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Lagerung erfolgte in 50-100 µl-Aliquots in einer Konzentration von 0,8 bis 1,0 mg/ml bei -20 °C.

### 3.2.2 Titrierung der Antikörper-Konzentration

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Antikörper für Blot-Analysen wurde ein Dot Blot (siehe 2.13.1) mit verschiedenen Antikörper- und Antigen-Konzentrationen durchgeführt. Zusätzlich wurden andere Ifapsoriasis-Fragmente, z. T. auch als Fusionsproteine, zur Untersuchung vorhandener Kreuzreaktivitäten aufgetragen. Zur Kontrolle wurde das Präimmenserum auf Reaktivität mit dem Antigen getestet. Es zeigte sich bei keinem der drei getesteten Präseren eine Immunreaktivität, ebenso war keine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen die jeweils anderen rekombinanten Ifapsoriasis-Fragmente oder deren Fusionsproteine nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Für Blot-Analysen wurde eine Antikörper-Konzentration von 0,25 µg/ml für α-IFPS-2 und-4 eingesetzt.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen (siehe 2.13.3) wurde eine Titration mit verschiedenen Antikörper-Konzentrationen durchgeführt, hier erwies sich eine Antikörper-Konzentration von 5 µg/ml für α-IFPS-2 und-4 bzw. 2 µg/ml für α-IFPS-3 als ausreichend (Daten nicht gezeigt).

## 3.3 Proteinexpression von Ifapsoriasis

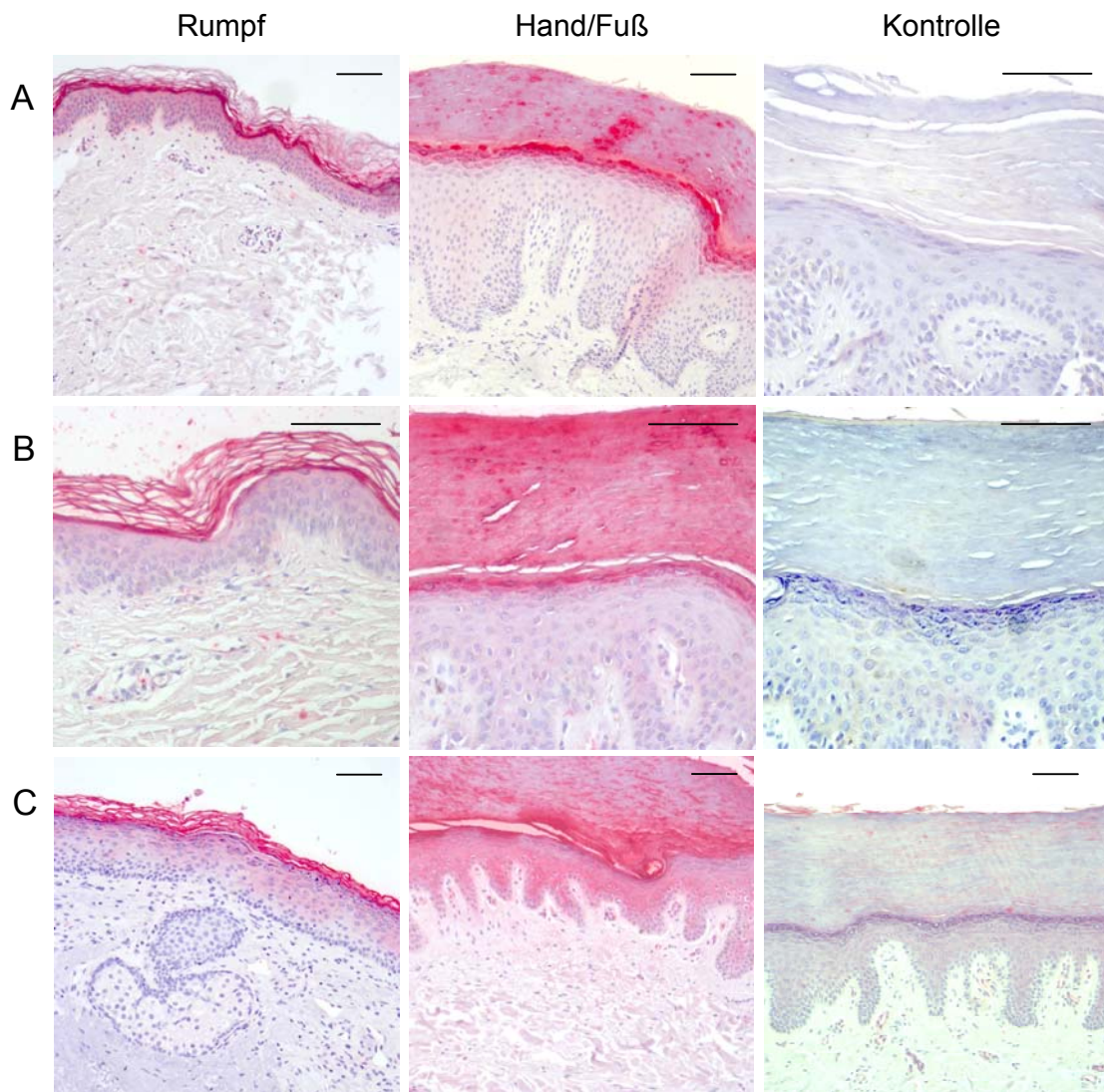
Mit Hilfe der generierten und aufgereinigten Antikörper gegen verschiedene Fragmente des Ifapsoriasis-Proteins wurde im Folgenden die Proteinexpression in unterschiedlichen Hautproben untersucht.

### 3.3.1 Ifapsoriasis ist in gesunder Haut exprimiert

In der Immunhistochemie wurden Schnitte von gesunder Haut verschiedener Lokalisationen wie Rumpf, Oberarm, Oberschenkel, Gesicht, Hand- und Fußflächen mit den verschiedenen Antikörpern gefärbt (Abb. 3.9).

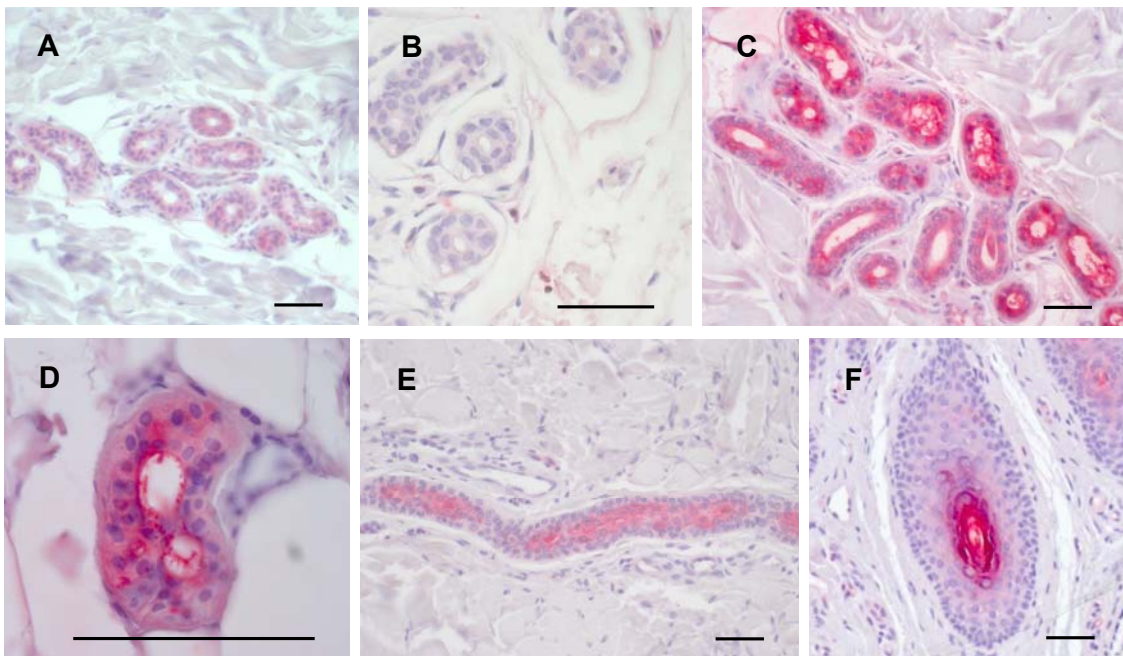
Für alle drei getesteten Antikörper zeigte sich eine Immunreaktivität hauptsächlich im *Stratum granulosum* und im *Stratum corneum*. Im *Stratum basale* und *Stratum*

*spinosum* war kaum bzw. nur eine schwache Färbung zu sehen. Als Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert oder in denen der erste, gegen Ifapsoriasisin-Fragmente gerichtete Antikörper mit dem jeweiligen Antigen vorinkubiert und so geblockt worden war.



**Abb. 3.9: Immunohistochemische Färbungen von Hautgewebeschnitten.** Paraffinschnitte wurden wie beschrieben (siehe 2.13.3) fixiert und gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse ( $n \geq 3$ ). Die Immunfärbung der Ifapsoriasisin-Antikörper ist durch die Substratumsetzung im Vector Red-System rot, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin in blau zu sehen. A: Schnitte gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-2; B: Schnitte gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-3, C: Schnitte gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-4. Gezeigt sind in der ersten Spalte von links Schnitte von verschiedenen Lokalisationen des Rumpfes, in der zweiten Spalte Schnitte der Hand- bzw. Fußfläche, in der rechten Spalte Schnitte mit dem jeweiligen Antigen geblockt bzw. ohne ersten Antikörper. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 60  $\mu$ m.

In ekkrinen Schweißdrüsen wurde für  $\alpha$ -IFPS-2 und  $\alpha$ -IFPS-3 nur eine schwache bzw. keine Färbung detektiert (Abb. 3.10 A und B). Im Gegensatz dazu zeigte der Antikörper gegen IFPS-4 eine intensive Färbung in Zellen der ekkrinen Schweißdrüsen, sowohl in den Zellen der Drüse (Abb. 3.10 C) als auch im Lumen (Abb. 3.10 C und D) und in Zellen des Ausführungsgangs (Abb. 3.10 E). Mit allen Antikörpern wurden zusätzlich Zellen des Haarfollikels vor allem in der inneren Wurzelscheide angefärbt (Abb. 3.10 F), exemplarisch ist hier ein querschnittener Haarschaft gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-4 gezeigt.



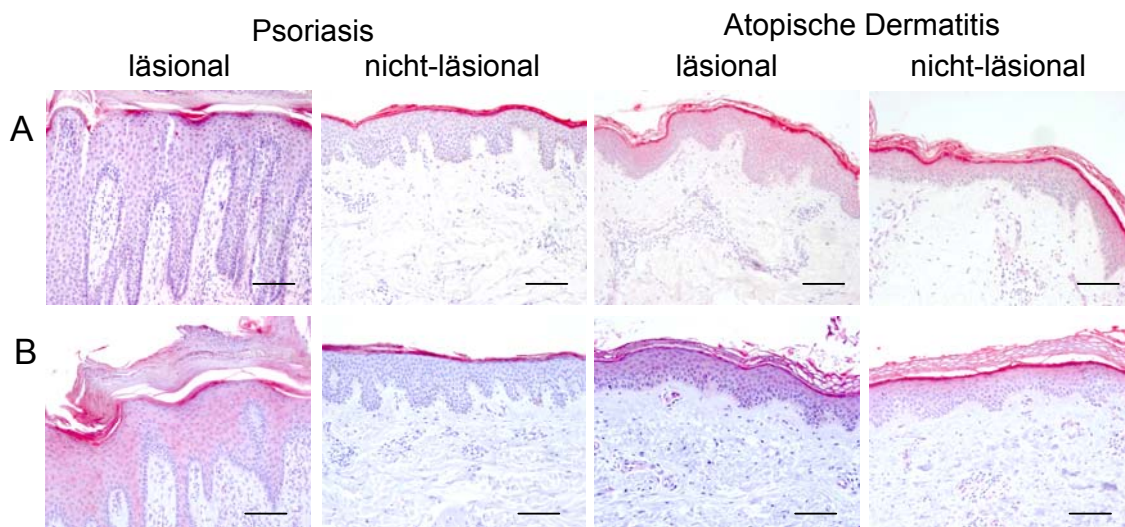
**Abb. 3.10: Immunhistochemische Färbungen von verschiedenen Hautanhangsgebilden.** Paraffinschnitte wurden (siehe 2.13.3) fixiert und gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse ( $n \geq 3$ ). Die Immunfärbung der Ifapsoriasin-Antikörper ist in rot, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin in blau zu sehen. A: Schweißdrüse gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-2; B: Schweißdrüse gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-3; C-F: Schnitte gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-4; C: sekretorisches Drüsenknäuel in der Dermis; D: sekretorischer Anteil vergrößert dargestellt; E: dermaler Ausführungsgang; F: Haar. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

### 3.3.2 Ifapsoriasin ist zum Teil in Hauterkrankungen reguliert

Für Profilaggrin ist bekannt, dass in Atopischer Dermatitis und Ichthyosis vulgaris die Expression bzw. die Prozessierung zu Filaggrin gestört ist und zum Erscheinungsbild dieser Krankheiten beiträgt (Palmer et al., 2006; Smith et al., 2006; Segre, 2006). Da Ifapsoriasin ein Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie ist, zu der auch



Profilaggrin gehört, wurde untersucht, ob in Krankheiten, bei denen eine Barrierefunktionsstörung vorliegt, die Expression im Gegensatz zu gesunder Haut verändert ist. Auf mRNA-Ebene gab es bereits Hinweise, dass die *Ifapsoriasin*-Expression in läsionaler psoriatischer Haut verringert war (Doktorarbeit Z. Wu). Daher wurden Paraffin-Schnitte von Biopsien aus läsionalen und nicht-läsionalen Bereichen von Patienten mit chronisch entzündlichen Krankheiten wie Psoriasis vulgaris bzw. Atopischer Dermatitis immunhistochemisch untersucht. Diese sind in Abb. 3.11 dargestellt.



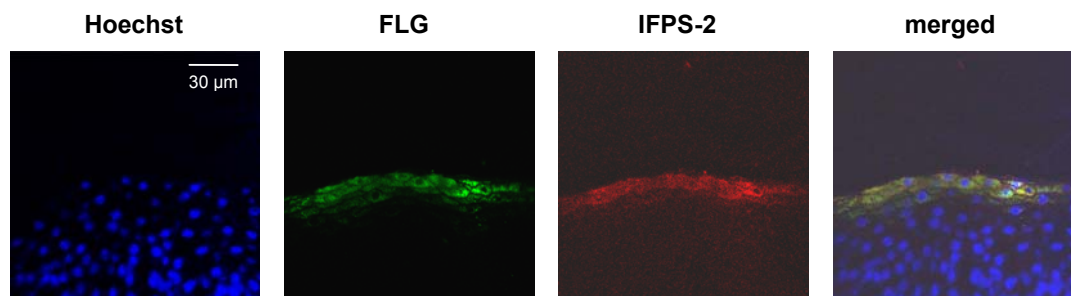
**Abb. 3.11: Immunhistochemische Färbungen von läsionalem und nicht-läsionalem Hautgewebe bei Psoriasis und Atopischer Dermatitis.** Paraffinschnitte wurden wie beschrieben (siehe 2.13.3) fixiert und gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Schnitte ( $n \geq 3$ ). Die Immunfärbung der Ifapsoriasin-Antikörper ist durch die Substratumsetzung im Vector Red-System rot, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin in blau zu sehen. A: Schnitte gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-2; B: Schnitte gefärbt mit  $\alpha$ -IFPS-4. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 60  $\mu$ m.

In Bereichen von psoriatischen Läsionen war im Gegensatz zu gesunder Haut (siehe Abb. 3.9) eine verringerte Immunreaktivität für beide Antikörper nachweisbar. Nicht-läsionale Haut der gleichen Patienten zeigte für beide Antikörper hingegen eine ähnliche Färbung wie in gesunder Haut. Schnitte von Atopischer Dermatitis-Haut wiesen keinen Unterschied zwischen nicht-läsionaler und läsionaler Haut bzw. gesunder Haut auf.

### 3.3.3 Ifapsoriasin ist räumlich ähnlich exprimiert wie Filaggrin

Immunfluoreszenzfärbungen wurden angefertigt, um die Expression von Ifapsoriasin mit einem weiteren Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie, Filaggrin, zu vergleichen. Die Färbungen wurden wie beschrieben hergestellt (siehe 2.13.4.1) und im konfokalen Laser Scanning-Mikroskop untersucht (Abb. 3.12 und 3.13).

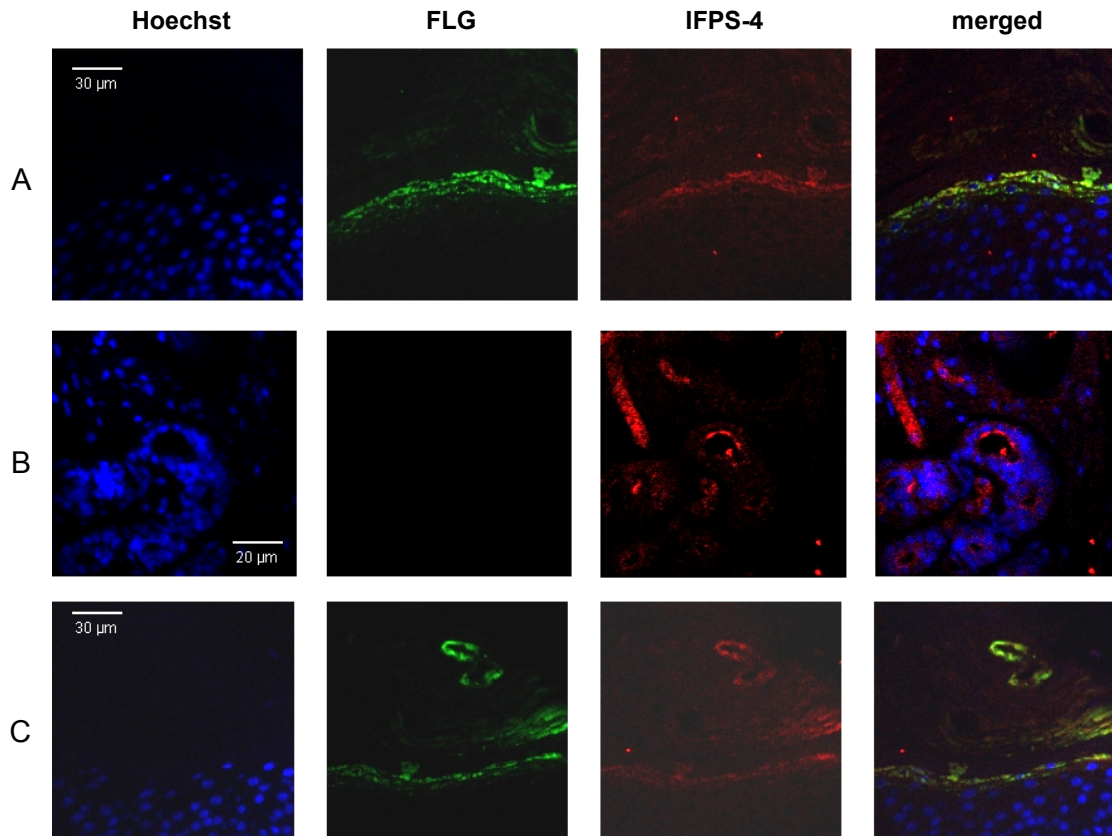
Die Schnitte sind mit dem *Stratum basale* nach unten und dem *Stratum corneum* nach oben orientiert dargestellt. Eine Färbung mit dem DNA-spezifischen Farbstoff Hoechst 33258 (blau in Abb. 3.12 und 3.13) zeigte eine Abnahme der Zellkerne, je weiter die Keratinozyten ausdifferenziert sind. Im *Stratum corneum* waren keine Zellkerne mehr nachweisbar. Eine Färbung wurde für Filaggrin (grün in Abb. 3.12 und 3.13) im oberen *Stratum granulosum* und beginnenden *Stratum corneum* detektiert. Die Färbung für IFPS-2 (rot in Abb. 3.12) wie auch für IFPS-4 (rot in Abb. 3.13) zeigte ein mit Filaggrin vergleichbares Muster. Weder für Filaggrin noch für Ifapsoriasin wurde eine Färbung im Bereich der Zellkerne beobachtet. Die übereinander gelagerten Bilder (Abb. 3.12 und 3.13, rechts) verdeutlichen nochmals eine räumlich ähnliche Verteilung von Filaggrin und Ifapsoriasin.



**Abb. 3.12: Immunfluoreszenzfärbungen mit  $\alpha$ -Filaggrin und  $\alpha$ -IFPS-2 in Haut.** Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Schnitten aus gesunder Haut des Rumpfes mit einer Mischung aus  $\alpha$ -FLG und  $\alpha$ -IFPS-2 angefertigt ( $n \geq 3$ ). Gefärbt wurden die Zellkerne mit einem DNA-spezifischen Farbstoff ("Hoechst" 33258, blau), Filaggrin ("FLG", FITC, grün), IFPS-2 (Alexa Fluor 594, rot). In der rechten Spalte sind die übereinander gelagerten Bilder gezeigt ("merged").

Da in den immunhistochemischen Färbungen ebenfalls Immunreaktivität in den Schweißdrüsen zu sehen war, wurden diese auch in der Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 3.13 B und C). Für den Antikörper gegen IFPS-2 wurde in den Fluoreszenzfärbungen keine Immunreaktivität im Bereich der Schweißdrüsen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Der Antikörper gegen das C-terminale IFPS-4-

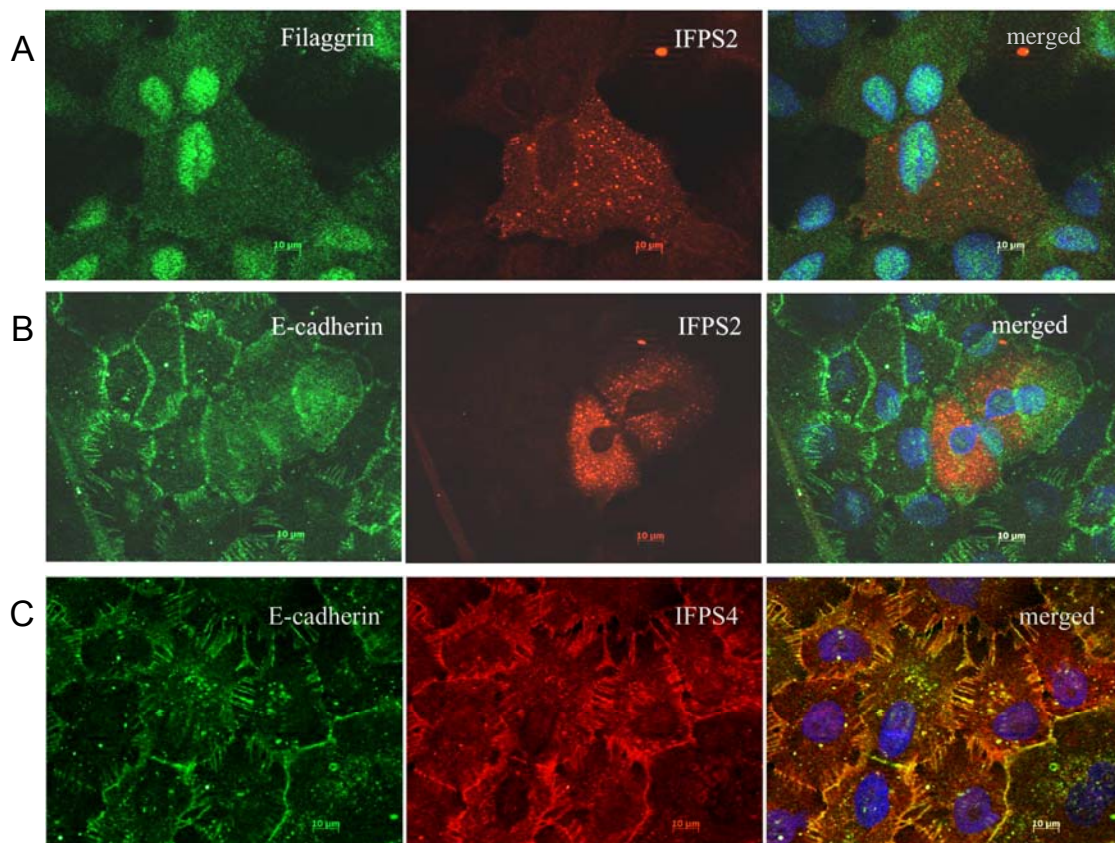
Fragment dagegen zeigte eine Färbung im Bereich der Schweißdrüsen (Abb. 3.13 B). Für Filaggrin war in diesem Bereich keine Färbung zu erkennen. Ebenso war eine Färbung im epidermalen, gewundenen Teil des Ausführungsganges für IFPS-4 vorhanden (Abb. 3.13 C). Die Färbung für Filaggrin war in diesem Bereich ähnlich (Abb. 3.13 A).



**Abb. 3.13: Immunfluoreszenzfärbungen mit  $\alpha$ -Filaggrin und  $\alpha$ -IFPS-4 in Haut.** Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Schnitten aus gesunder Haut der Hand mit einer Mischung aus  $\alpha$ -FLG und  $\alpha$ -IFPS-4 angefertigt ( $n \geq 3$ ). Gefärbt wurden die Zellkerne mit einem DNA-spezifischen Farbstoff (Hoechst 33258, blau; linke Spalte), Filaggrin (FITC, grün, zweite Spalte von links), IFPS-2 (Alexa Fluor 594, rot, zweite Spalte von rechts). In der rechten Spalte sind die übereinander gelagerten Bilder gezeigt ("merged"). A: epidermaler Teil der Haut, B: vergrößerte Aufnahme einer Schweißdrüse und eines Ausführungsganges in der Dermis, C: epidermaler Teil des Schweißdrüsenausführungsganges (Acrosyngium).

### 3.3.4 Ifapsoriasisin-Antikörper zeigen auf zellulärer Ebene unterschiedliche Verteilungsmuster

Immunfluoreszenz-Analysen wurden auf zellulärer Ebene mit auf Objektträgern kultivierten, humanen primären Keratinozyten durchgeführt (siehe 2.13.4.2). Neben den verschiedenen Ifapsoriasisin-Antikörpern wurden auch Antikörper gegen Filaggrin und gegen E-Cadherin eingesetzt (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: Immunfluoreszenzfärbungen mit  $\alpha$ -IFPS-2 bzw.  $\alpha$ -IFPS-4 und  $\alpha$ -Filaggrin bzw.  $\alpha$ -E-Cadherin.** Die Signale der Antikörper gegen Filaggrin bzw. E-Cadherin sind in grün (FITC), die Signale der Antikörper gegen Ifapsoriasisin sind jeweils in rot (Alexa Fluor 594) und die Zellkerne in blau (DAPI) dargestellt. A: Lokalisation von Filaggrin und IFPS-2; B: Lokalisation von E-Cadherin und IFPS-2; C: Lokalisation von E-Cadherin und IFPS-4. In der rechten Spalte sind jeweils die übereinander gelagerten Bilder gezeigt.

Die Färbung für Filaggrin war sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 3.14 A, in grün). E-Cadherin hingegen wies eine Färbung im Bereich der Zellperipherie an der Zytoplasmamembran auf (Abb. 3.14 B und C, in grün). Die Färbung für die beiden Ifapsoriasisin-Fragmente zeigte eine unterschiedliche Verteilung. Während IFPS-2 eher granulär im Zytoplasma

vereinzelter Zellen vorlag (Abb. 3.14 A und B, in rot), war IFPS-4 ähnlich der Färbung für E-Cadherin peripher im Bereich der Plasmamembran in allen Zellen lokalisiert (Abb. 3.14 C, in rot). Weder IFPS-2 noch IFPS-4 zeigten eine Lokalisation im Zellkern, wie sie für Filaggrin beobachtet werden konnte (Abb. 3.14 A).

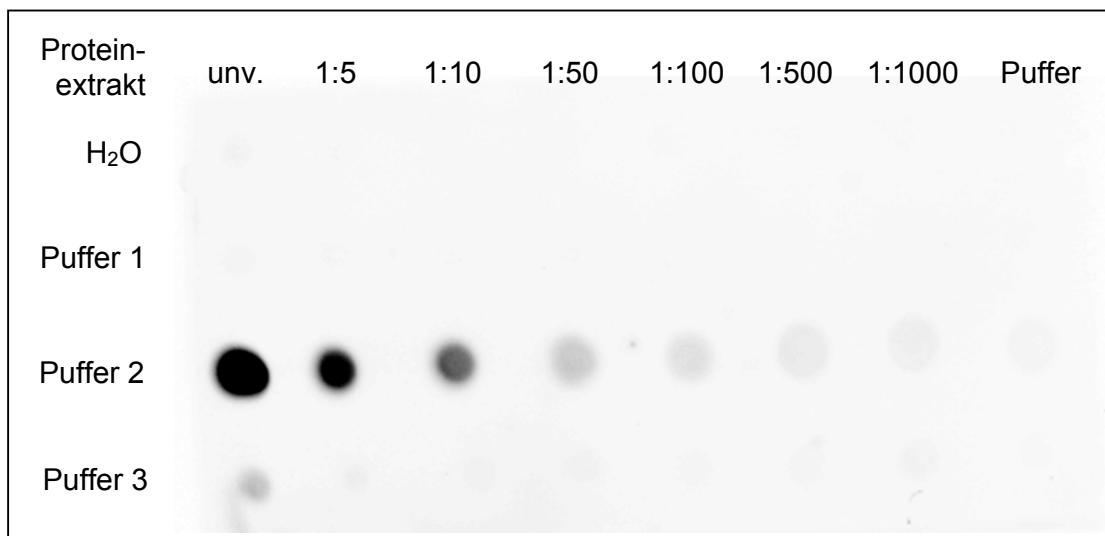
### **3.3.5 Ifapsoriasisin ist in Proteinextrakten der Haut nachweisbar**

Sowohl in der Immunhistologie als auch in der Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten und Keratinozyten war eine ausgeprägte Färbung für die verschiedenen Ifapsoriasisin-Antikörper sichtbar. Für Profilaggrin, ebenfalls ein Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie, ist bekannt, dass nach der Proteinsynthese als Proprotein die funktionellen Filaggrin-Untereinheiten durch Prozessierung entstehen. Verschiedene Proteasen wie Matriptase (List et al., 2003), Profilaggrin Endoproteinase 1 (Resing et al., 1995b), Furin (Pearton et al., 2001) und Caspase 14 (Denecker et al., 2008) sind vermutlich daran beteiligt. Proteinextrakte aus verschiedenen Hautproben wurden daher hergestellt, um auch für Ifapsoriasisin zu überprüfen, ob dieses 248 kDa große Protein in der Haut prozessiert wird.

Dazu wurden *Stratum corneum*-Proteinextrakte, die mit Citrat-EtOH-Puffer extrahiert worden waren, über eine Affinitätssäule gegeben, an die Antikörper gegen das IFPS-2- und -4-Fragment gekoppelt worden waren. Die Herstellung dieser Affinitätssäule erfolgte wie für die Antikörper-Aufreinigung (siehe 2.12.2), nur wurden hier die Antikörper statt der Antigene an die Säule gekoppelt. Für die Kopplung wurden je 500 µg der Antikörper  $\alpha$ -IFPS-2 und -4 verwendet. Durch die Antikörper gebundene Proteine eines mit Citrat-EtOH-Puffer hergestellten *Stratum corneum*-Extraktes wurden hier nur mit 0,2 M Glycinpuffer pH 3,0 eluiert. Da die Antikörper gegen Fragmente des Ifapsoriasisins gerichtet sind, sollte entweder das intakte Protein isoliert werden können oder im Fall einer Prozessierung Fragmente, die Epitope besitzen, die von den Antikörpern erkannt wurden. Die mit Glycinpuffer eluierte Fraktion wurde weiter über eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt (siehe 2.10.4) und alle Fraktionen wurden auf Immunreaktivität getestet. Es konnte jedoch keine positiv getestete Fraktion gefunden werden, obwohl die eluierten Proteine mit Hilfe der  $\alpha$ -IFPS-Antikörper aus *Stratum corneum*-Gesamtprotein extrahiert worden waren (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurden unterschiedlich zusammengesetzte Puffer getestet, die bereits in der Literatur verwendet worden waren, um andere Proteine der "S100 Fused Type

Protein"-Familie aufzureinigen (siehe 2.11.1). Da im *Stratum corneum* Immunreaktivität in den immunhistochemischen Färbungen für Ifapsoriasin nachgewiesen worden war, wurde zunächst versucht, das Protein aus Vollhaut (Epidermis und Dermis)-Proben wie in 2.11.1 beschrieben aufzureinigen. Getestet wurden neben H<sub>2</sub>O auch 10 mM Tris/5 mM EDTA/ pH 7,4 (Puffer 1), 62,5 mM Tris/5 % SDS/ 10 % Glycerin, pH 6,8 (Puffer 2) und 50 mM Tris/8 M Urea/pH 7,6 (Puffer 3). Die extrahierten Proteine wurden in einer Verdünnungsreihe im Dot Blot auf Immunreaktivität mit  $\alpha$ -IFPS-2 und -4 getestet (Abb. 3.15).

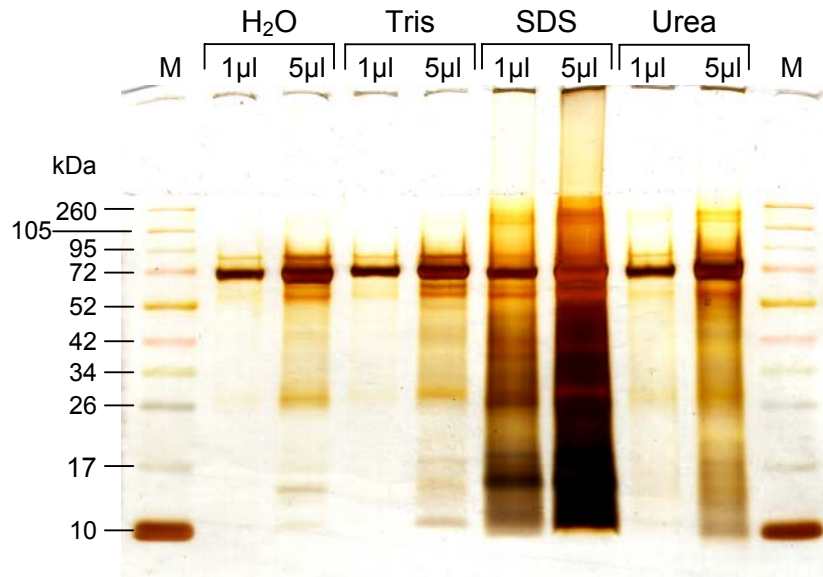


**Abb. 3.15: Dot Blot der Proteinextrakte aus Vollhaut mit unterschiedlichen Puffern.** Die Proteinextraktion wurde mit zuvor gemörserter Vollhaut durchgeführt (siehe 2.11.1). Verschiedene Verdünnungen wurden im Dot Blot aufgetragen, mit einem primären Antikörper-Gemisch aus  $\alpha$ -IFPS-2 und -4 (je 0,25 ng/ml) und sekundärem Peroxidasegekoppeltem Maus- $\alpha$ -Ziege IgG (1:20000) detektiert. Unv.: unverdünnt, Puffer 1: 10 mM Tris/ 5 mM EDTA; Puffer 2: 62,5 mM Tris/5 % SDS/10 % Glycerin; Puffer 3: 50 mM Tris/ 8 M Urea.

Die Vollhaut-Extrakte, die mit SDS und Glycerin hergestellt wurden, wiesen bis zu einer Verdünnung von 1:500 ein ausgeprägtes Signal für Ifapsoriasin auf, während in den Proteinextrakten, die mit H<sub>2</sub>O bzw. Tris/EDTA hergestellt wurden, keine Immunreaktivität nachgewiesen wurde. In den Extrakten, die in Anwesenheit von Harnstoff hergestellt worden waren, wurde nur in der unverdünnten Probe ein Signal detektiert.

Zur genaueren Identifizierung der immunreaktiven Proteine wurde ein Western Blot zunächst mit einem in unserer Arbeitsgruppe standardmäßig verwendeten Transferpuffer (3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 % Ethanol, pH 10,4) angefertigt.

Außer den Positivkontrollen der rekombinant hergestellten Proteine IFPS-2 und -4 konnte trotz der Signale im Dot Blot im Western Blot kein weiteres Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt), während im Silbergel, das als Beladungskontrolle angefertigt wurde, Proteinbanden sichtbar waren (Abb. 3.16).

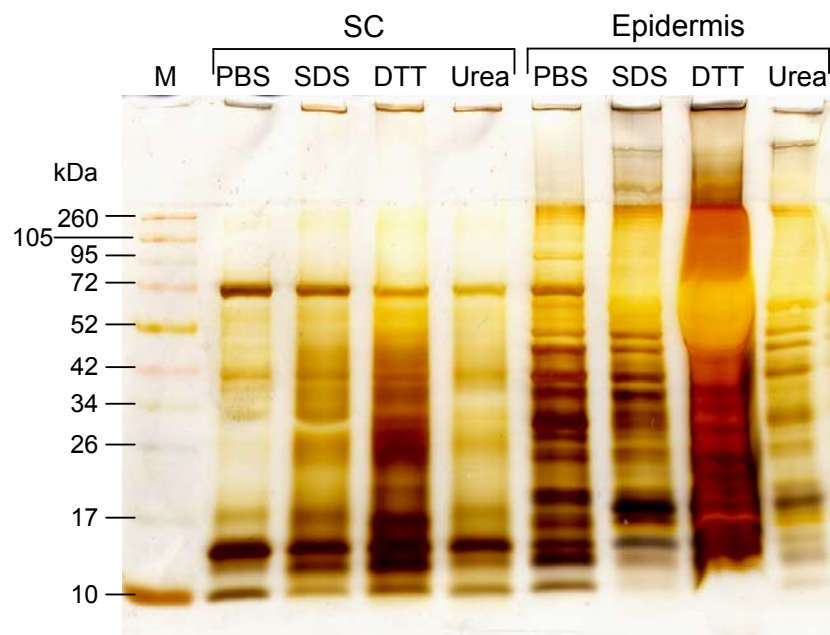


**Abb. 3.16: Silber-gefärbte SDS-PAGE der Proteinextrakte aus Vollhaut-Proben.** Die Vollhaut-Proben wurden entweder mit H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O), 10 mM Tris/5 mM EDTA (Tris), 62,5 mM Tris/5 % SDS/10 % Glycerin (SDS) oder 8 M Urea/50 mM Tris (Urea) behandelt (siehe 2.11.1). Nach der Inkubation im jeweiligen Puffer wurden die Überstände durch Zentrifugation abgetrennt. Von jedem Überstand wurden je 1 µl und 5 µl aufgetragen und in einer 10 %igen SDS-PAGE getrennt. M: Molekulargewichtsstandard.

Weitere Extrakte wurden sowohl aus *Stratum corneum*- als auch aus Epidermis-Proben hergestellt, um zu untersuchen, ob sich in den unterschiedlichen Proben Ifporsiasin-Fragmente nachweisen ließen. Dazu wurden *Stratum corneum*- und Epidermis-Proben hergestellt und mit verschiedenen Puffern extrahiert (siehe 2.11.1). Vom *Stratum corneum*-Material wurden hier nur die feinen, pulverigen Bestandteile verwendet, die durch ein Sieb von den größeren Bestandteilen abgetrennt worden waren. Sowohl die *Stratum corneum*- als auch die Epidermis-Proben wurden in einem "Potter" in dem jeweiligen Puffer extrahiert. Es wurden PBS, 62,5 mM Tris/5 % SDS/10 % Glycerin, 62,5 mM Tris/5 % SDS/10 % Glycerin/10 mM DTT und 8 M Urea/10 mM EDTA/50 mM Tris verwendet. Von den Extrakten, die durch Zentrifugation vom Probensediment getrennt worden waren, wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen jeweils 10 µg in einer SDS-PAGE

aufgetrennt. Die Gele wurden mit Silber gefärbt (Abb. 3.17) bzw. im Western Blot analysiert (Abb. 3.18).

In allen Extrakten wurden in der Silberfärbung Banden nachgewiesen. Das Bandenmuster innerhalb der jeweiligen *Stratum corneum*- und Epidermis-Proben war ähnlich, wenn auch in der Intensität unterschiedlich, während das Bandenmuster zwischen *Stratum corneum*- und Epidermisproben verschieden war. In den Epidermis-Proben waren über einen größeren Bereich (im gesamten Trenngel bis 10 kDa) mehr Banden zu erkennen als in den *Stratum corneum*-Proben, bei denen die Banden im Bereich zwischen 10 und 200 kDa lagen (Abb. 3.17).

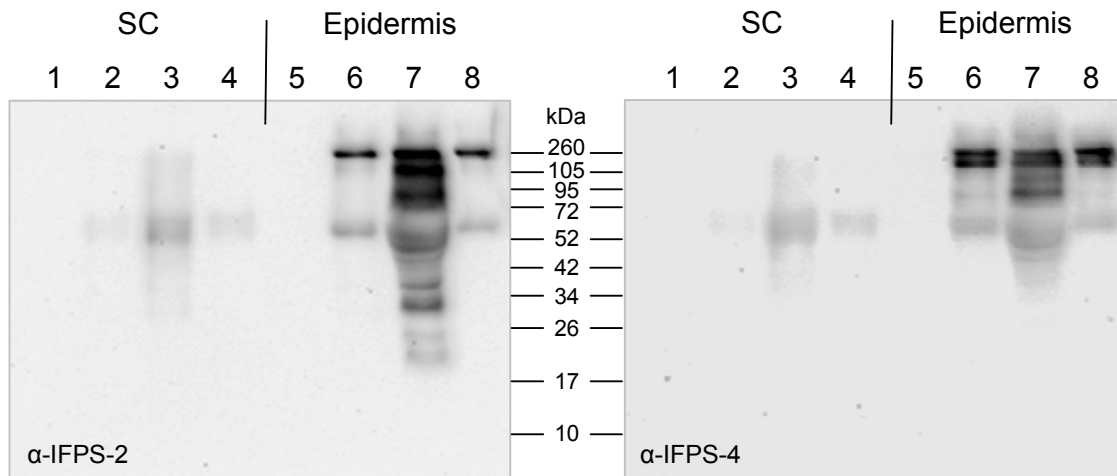


**Abb. 3.17: Silber-gefärbte SDS-PAGE der Proteinextrakte aus *Stratum corneum*- und Epidermis-Proben.** Die *Stratum corneum*- und Epidermis-Proben einzeln mit PBS (PBS), 62,5 mM Tris/5 % SDS/ 10 % Glycerin (SDS), dem gleichen Puffer mit 10 mM DTT (DTT) und 8M Urea/10 mM EDTA/50 mM Tris (Urea) behandelt (siehe 2.11.1). Nach der Inkubation im jeweiligen Puffer wurden die Überstände durch Zentrifugation abgetrennt. Von jedem Überstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt, 10 µg aufgetragen und in einer 10 %igen SDS-PAGE getrennt. M: Molekulargewichtsstandard.

Zunächst wurde auch im Western Blot kein immunreaktives Signal in diesen Proteinextrakten mit den Ifapsoriasin-Antikörpern nachgewiesen, obwohl im Dot Blot Signale detektiert worden waren (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde ein anderer Transferpuffer zum Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrozellulose-Membran getestet (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS, 20 % EtOH). Mit



diesem Puffer konnte immunreaktives Ifapsoriasin mit beiden Antikörpern detektiert werden (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Western Blot-Analysen verschiedener *Stratum corneum*- und Epidermis-Proteinextrakte.** Epidermis und *Stratum corneum*-Proben wurden wie beschrieben behandelt (siehe 2.11.1). Vom *Stratum corneum* wurden hier die feinen, pulverigen Bestandteile zur Extraktion verwendet. Die Proteine wurden mit unterschiedlichen Puffern nicht sequentiell extrahiert. Die Epidermis-Proben sind in den Spuren 1-4 aufgetragen, die *Stratum corneum*-Proben in den Spuren 5-8. Von jeder Probe wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein aufgetragen. Spur 1 und 5: PBS-Extrakt, Spur 2 und 6: Tris/SDS/Glycerin-Extrakt, Spur 3 und 7: Tris/SDS/Glycerin/DTT-Extrakt, Spur 4 und 8: Harnstoff-Extrakt. Von den Extrakten wurden 10 µg Gesamtprotein in einer 10 %-SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend geblottet und mit  $\alpha$ -IFPS-2 bzw. -4 als Primärantikörper inkubiert.

Im Western Blot zeigten beide Antikörper in den Proben der *Stratum corneum*-Proteinextrakte (SC, Spuren 2-4) ein ähnliches Bandenmuster; nur im PBS-Extrakt (Spur 1) wurden keine Signale detektiert. Sowohl in den Extrakten des SDS-, SDS/DTT- und Harnstoff-Puffers zeigte sich eine Doppelbande von unterschiedlicher Intensität bei etwa 65 kDa, die von diffusen Signalen umgeben war.

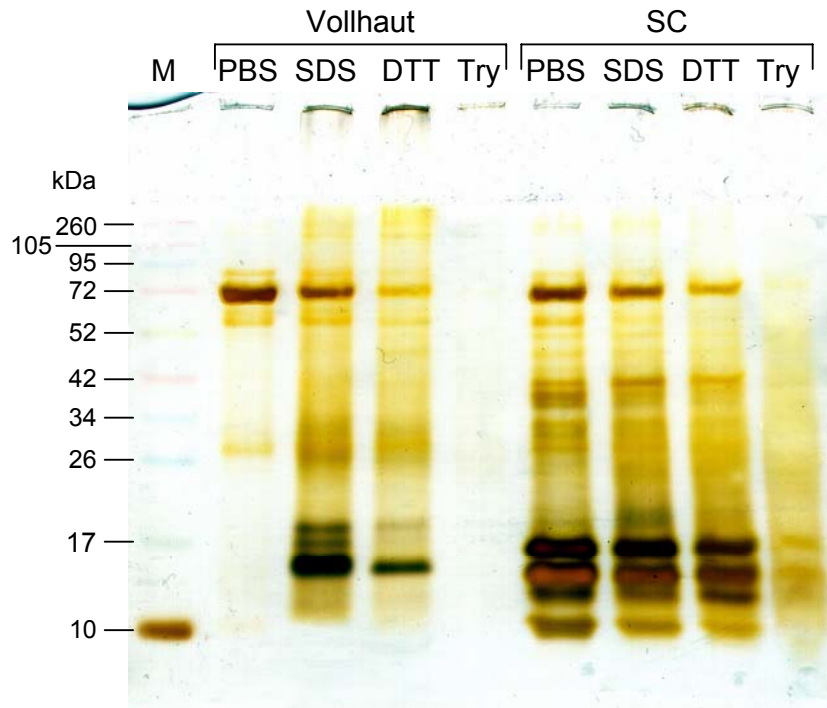
In den Proteinextrakten der Epidermis-Proben (Spuren 5-8) unterschied sich das Muster der Banden für die beiden Antikörper. In den PBS-Proteinextrakten (Spur 5) wurde weder für  $\alpha$ -IFPS-2 noch für  $\alpha$ -IFPS-4 ein Signal detektiert. In den SDS- und Harnstoff-Proben (Spur 6 und 8) waren mit  $\alpha$ -IFPS-2 Banden bei 65 kDa und bei 260 kDa sowie eine weniger intensive Bande bei etwa 105 kDa nachweisbar. Die SDS/DTT-Probe (Spur 7) hingegen zeigte ein Bandenmuster mit einer Bande ebenfalls bei etwa 260 kDa und weiteren Banden bei 105, 80, 65,65, 50, 45, 40, 30, 25 und 20 kDa. Für  $\alpha$ -IFPS-4 ließ sich ebenfalls für den SDS- und Harnstoff-Extrakt (Spur 6 und 8) ein ähnliches Muster mit Banden bei 260, bei etwa 200, 90 und einer

Doppelbande bei etwa 65 kDa beobachten. Auch hier unterschieden sich die Banden zu dem SDS/DTT-Extrakt (Spur 7), der im Bereich von 260, etwa 200, 100, 95, 50 und 45 kDa Banden zeigte.

Des Weiteren wurden Proteinextrakte hergestellt, bei denen die Proben nacheinander mit den unterschiedlichen Puffern behandelt werden sollten. So wurde versucht, die Extrahierbarkeit von Ifapsoriasin näher zu analysieren und eventuell natürliche Fragmente aufzureinigen zu können. Die Proteine wurden sequenziell extrahiert. Da Ifapsoriasin nicht effizient mit PBS extrahiert werden konnte, sollten diese PBS-löslichen Proteine aus der Menge der Gesamtproteine zunächst depletiert werden, um die Identifizierung von Ifapsoriasin oder Ifapsoriasin-Fragmenten zu erleichtern. Nach Zentrifugation wurden die zuvor mit PBS behandelten Proben nacheinander mit SDS/Glycerin-Puffer, SDS/Glycerin/DTT-Puffer und im Anschluss an einige Waschschriffe 3 h mit Trypsin inkubiert (siehe Abb. 2.2). Damit konnte überprüft werden, ob sich noch weiteres immunreaktives Ifapsoriasin aus dem Hautmaterial extrahieren ließ, welches sich weder durch SDS- noch DTT-Behandlung extrahieren ließ.

Neben Vollhaut wurde auch grobes *Stratum corneum*, das in flüssigem Stickstoff mit HCl-gereinigtem Seesand mechanisch zerkleinert worden war, verwendet. Die durch die unterschiedlichen Puffer extrahierten Proteinüberstände wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, mit Silber angefärbt (Abb. 3.19) und im Western Blot mit den verschiedenen Antikörpern untersucht (Abb. 3.20).

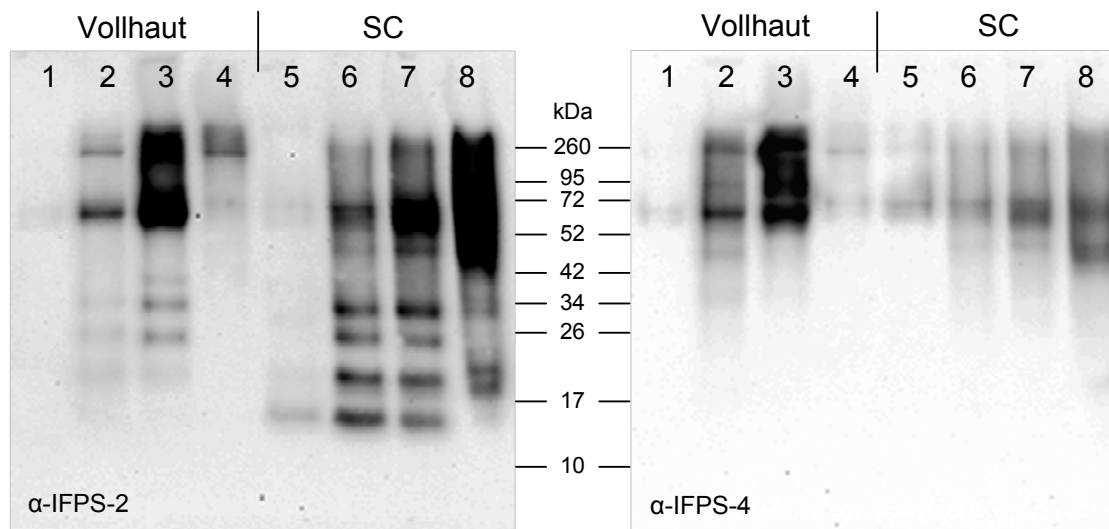
In der SDS-PAGE-Analyse konnten in allen Proteinextrakten Banden mit Hilfe der Silberfärbung detektiert werden. In der mit Trypsin hydrolysierten Vollhaut-Probe waren die Signale im Vergleich zu allen anderen Proben weniger ausgeprägt (Abb. 3.19). Auch hier zeigten sich Ähnlichkeiten im Bandenmuster innerhalb der Vollhaut- und *Stratum corneum*-Proben. Im Gegensatz zur den Vollhaut-Extrakten zeigten sich in den *Stratum corneum*-Extrakten vermehrt einige niedermolekulare Banden im Bereich zwischen 10 und 17 kDa.



**Abb. 3.19: Silber-gefärbte SDS-PAGE der Proteinextrakte aus Vollhaut- und *Stratum corneum*-Proben.** Die Vollhaut- und *Stratum corneum*-Proben wurden wie unter 2.11.1 beschrieben aufeinander folgend mit PBS (PBS), 62,5 mM Tris/5 % SDS/ 10 % Glycerin (SDS) und dem gleichen Puffer mit 10 mM DTT (DTT) behandelt. Nach mehreren Waschschritten wurden die Proben mit Trypsin hydrolysiert (Try). Nach jeder Behandlung wurden die Überstände durch Zentrifugation abgetrennt. Von jedem Überstand wurden 5  $\mu$ l aufgetragen und in einer 10 %igen SDS-PAGE getrennt. M: Molekulargewichtsstandard.

Im Western Blot wiesen die beiden Antikörper in den verschiedenen Proben ein unterschiedliches Bandenmuster auf (Abb. 3.20). Für  $\alpha$ -IFPS-2 konnte in den Proben des PBS-Extraktes für Vollhaut (Spur 1) ein Signal bei etwa 65 kDa detektiert werden, in der *Stratum corneum*-Probe (Spur 5) zeigte sich in diesem Extrakt eine ausgeprägte Bande im Bereich von etwa 15 kDa. In dem Extrakt der Vollhaut-Proben mit SDS (Spur 2) waren dagegen Banden im Bereich von 260 kDa und 65 kDa und weniger intensiv ein leiterähnliches Muster mit vier Banden bei etwa 30, 25, 20 und 15 kDa zu sehen. Dieses Bandenmuster wiederholte sich in der Probe des SDS/DTT-Extraktes (Spur 3), nur waren die Banden intensiver als in den SDS-Extrakten und es wurde eine zusätzliche Bande bei etwa 40 kDa detektiert. Statt einer Bande bei 260 kDa konnten zwei Banden direkt über und unter 260 kDa nachgewiesen werden. In der mit Trypsin hydrolysierten Vollhaut-Probe (Spur 4) gab es außer einer Bande bei etwa 260 kDa und einer Bande im Bereich von etwa 70 kDa keine ausgeprägten immunreaktiven Signale mehr. In keinem der

Proteinextrakte der *Stratum corneum*-Proben (Spuren 5-8) wurde eine Bande bei 260 kDa nachgewiesen. Im SDS-Extrakt (Spur 6) zeigte sich ein diffuses Färbungsmuster, das oberhalb von 260 kDa begann und in einer Doppelbande bei etwa 65 kDa endete. Eine sehr schwache Bande war bei etwa 50 kDa zu sehen. Auch in dieser SDS-extrahierten Probe konnte ein ähnliches Bandenmuster wie in den Vollhaut-Proben beobachtet werden. Statt der Bande bei 40 kDa zeigte sich in diesem Extrakt eine Bande bei etwa 50 kDa zusätzlich zu den vier Banden bei etwa 30, 25, 20 und 15 kDa. Die gleichen Banden wie im SDS-Extrakt zeigten sich ebenfalls im SDS/DTT-Extrakt (Spur 7); auch hier waren vergleichbar mit den Vollhaut-Proben intensiver als im SDS-Extrakt. Die Probe des mit Trypsin hydrolysierten *Stratum corneums* (Spur 8) wies neben einigen kaum erkennbaren Banden unter 30 kDa ab etwa 40 kDa bis über 260 kDa eine breite, diffuse Färbung auf.



**Abb. 3.20: Western Blot-Analysen verschiedener Vollhaut- und *Stratum corneum*-Proteinextrakte.** Vollhaut und *Stratum corneum*-Proben wurden wie beschrieben behandelt (siehe 2.11.1). Die Proteine wurden nacheinander mit unterschiedlichen Puffern extrahiert. Die Vollhaut-Proben sind in den Spuren 1-4 aufgetragen, die *Stratum corneum*-Proben in den Spuren 5-8. Von jeder Probe wurden jeweils 5  $\mu$ l aufgetragen. Spur 1 und 5: PBS-Extrakt, Spur 2 und 6: Tris/SDS/Glycerin-Extrakt, Spur 3 und 7: Tris/SDS/Glycerin/DTT-Extrakt, Spur 4 und 8: Trypsin-Hydrolyse. Die Extrakte wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend geblottet und mit  $\alpha$ -IFPS-2 bzw. -4 als Primärantikörper inkubiert.

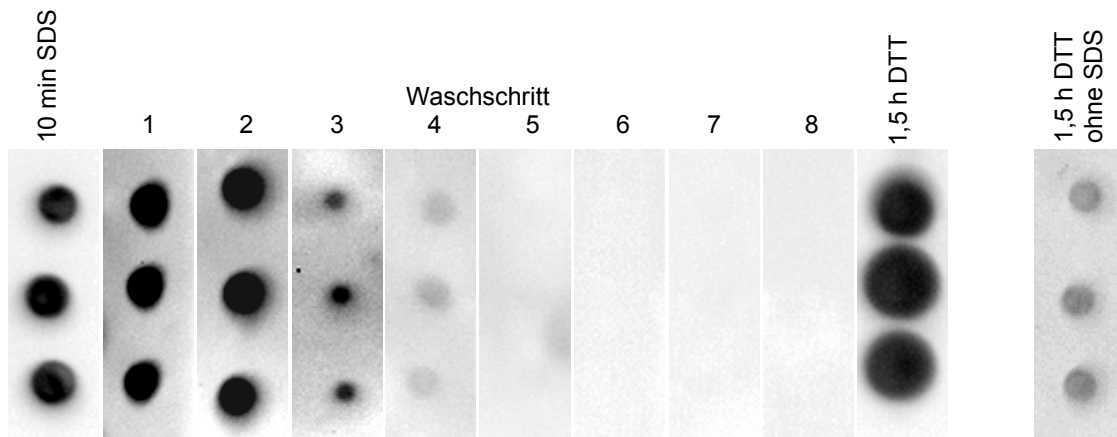
Mit dem Antikörper gegen das C-terminale Fragment von Ifapsorin ( $\alpha$ -IFPS-4) wurde in den Proteinextrakten in PBS für Vollhaut (Spur 1) nur eine kaum sichtbare

Bande bei etwa 65 kDa detektiert. Im SDS-Extrakt der Vollhaut-Probe (Spur 2) zeigten sich Banden bei 260 und 65 kDa und schwächere bei 95, 50 und 35 kDa. Im SDS/DTT-Extrakt der Vollhaut (Spur 3) wurde bei geringerer Belichtungszeit ein ähnliches Bandenmuster detektiert wie im SDS-Extrakt, es zeigte sich zusätzlich eine Bande bei etwa 105 kDa. In der Probe der mit Trypsin behandelten Vollhaut (Spur 4) ließen sich wenig intensive Banden bei etwa 260 kDa und eine Doppelbande bei etwa 65 kDa nachweisen. Die *Stratum corneum*-Extrakte wiesen mit dem  $\alpha$ -IFPS-4-Antikörper ein anderes Bandenmuster auf als mit dem  $\alpha$ -IFPS-2-Antikörper. Generell waren in allen der vier Extrakte (Spuren 5-8) keine Banden unterhalb von 40 kDa nachweisbar. Im PBS-Extrakt (Spur 5) waren eine Bande bei 260 kDa und eine Doppelbande bei etwa 65 kDa sichtbar. Im SDS-Extrakt (Spur 6) wiederholte sich dieses Muster. Die Bande bei 260 kDa war weniger intensiv ausgeprägt; zusätzlich wurde noch eine Bande bei etwa 50 kDa detektiert. Sowohl im SDS/DTT- (Spur 7) als auch im Extrakt des mit Trypsin inkubierten *Stratum corneum* (Spur 8) zeigte sich dieses Bandmuster, hier war kaum noch eine bzw. keine Bande bei 260 kDa zu detektieren. Die Signale waren in diesen Extrakten insgesamt ausgeprägter. Zwischen den Banden war in allen Proben eine diffuse Färbung zu erkennen.

Da sich die SDS-Extrakte und die darauf folgenden SDS/DTT-Extrakte im Bandenmuster recht ähnlich waren, wurde untersucht, ob es sich bei den SDS/DTT-Signalen um noch im Probensediment vorhandenes immunreaktives Ifapsorin oder neu extrahiertes handelte. Dazu wurden *Stratum corneum*-Proben, die bereits zuvor mit Citrat-EtOH-Puffer behandelt worden waren, mit SDS inkubiert, anschließend mehrmals gewaschen und im Anschluss mit DTT behandelt. Parallel wurde eine Probe ohne vorangegangene SDS-Inkubation mit DTT behandelt. Von den Proben wurde 1  $\mu$ l im Dot Blot mit einer Mischung aus  $\alpha$ -IFPS-2 und -4 analysiert (Abb. 3.21).

Durch eine zehnminütige Inkubation mit SDS wurde bereits immunreaktives Ifapsorin aus dem *Stratum corneum* gelöst ("10 min SDS"). Bis zum vierten Waschschriff war eine abnehmende Immunreaktivität zu sehen; ab dem fünften Waschschriff war keine Immunreaktivität mehr nachweisbar. Nach anschließender Inkubation der *Stratum corneum*-Probe über 1,5 h bei Raumtemperatur mit 10 mM DTT/62,5 mM Tris ("1,5 h DTT") wurden erneut intensive Signale detektiert. Es wurde also weiteres immunreaktives Ifapsorin extrahiert, welches hauptsächlich durch die Inkubation mit DTT und nicht mehr durch das SDS in Lösung gebracht wurde.

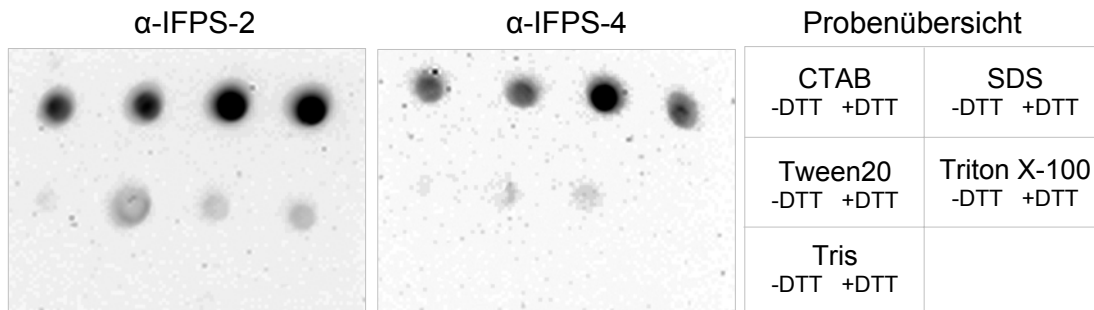
Eine parallele Inkubation von *Stratum corneum* über 1,5 h mit 10 mM DTT/62,5 mM Tris zeigte nur eine wenig ausgeprägte Immunreaktivität ("1,5 h DTT ohne SDS").



**Abb. 3.21 Vergleichende Dot Blot-Analysen von *Stratum corneum*-Extrakten.** *Stratum corneum*-Proben wurden zunächst mit 5 % SDS für 10 min inkubiert ("10 min SDS"). Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet achtmal mit 62,5 mM Tris gewaschen. Die Überstände der Waschschr tte wurden nacheinander folgend aufgetragen ("Waschschr tt 1-8"). Darauf folgte eine Inkubation in 62,5 mM Tris/10 mM DTT für 1,5 h ("1,5 h DTT"). Parallel wurde eine *Stratum corneum*-Probe nur mit 62,5 mM Tris/10 mM DTT ohne vorherige SDS-Behandlung für 1,5 h inkubiert ("1,5 h DTT ohne SDS"). Von den gewonnenen Überständen wurde je dreimal 1  $\mu$ l auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Immunreaktives Ifapsoriasin wurde mit einer Antikörper-Mischung aus  $\alpha$ -IFPS-2 und -4 als Primärantikörper und Peroxidase-gekoppeltem Maus- $\alpha$ -Ziege-IgG als Sekundärantikörper detektiert.

Bei der Extraktion von immunreaktivem Ifapsoriasin schien also der Zusatz von SDS notwendig zu sein, um das Probenmaterial effektiv aufzuschließen. Da SDS schwer wieder aus den Proben zu entfernen war, wurden noch weitere Detergenzien getestet. Bereits mit Citrat-EtOH-Puffer behandelte *Stratum corneum*-Proben wurden mit verschiedenen Detergenzien jeweils ohne und mit 10 mM DTT in 62,5 mM Tris-Puffer für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert, die Überstände nach Zentrifugation abgenommen und im Dot Blot analysiert (Abb. 3.22). Die Konzentration der Detergenzien wurde zehnfach höher als die angegebene CMC ("Critical Micelle Concentration") bei Raumtemperatur in wässriger Lösung gewählt. Für CTAB wurden 0,37 %, für SDS 2,9 %, für Tween 20 0,59 % und für Triton X-100 0,56 % eingesetzt. CTAB gehört zur Gruppe der kationischen, SDS zur Gruppe der anionischen, Tween 20 und Triton X-100 zur Gruppe der ungeladenen Detergenzien. Als Negativkontrolle diente eine *Stratum corneum*-Probe, die lediglich mit 62,5 mM Tris

ohne und mit 10 mM DTT behandelt wurde. Jeweils 1 µl der entsprechenden Proteinextrakte wurde auf eine Nitrozellulose-Membran aufgebracht.



**Abb. 3.22: Dot Blot-Analysen von Detergenzien-behandeltem *Stratum corneum*.** *Stratum corneum*-Proben, die zuvor mit Citrat-EtOH-Puffer behandelt worden waren, wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit unterschiedlichen Detergenzien jeweils ohne und mit 10 mM DTT inkubiert. Die Detergenzien wurden jeweils in einer Konzentration eingesetzt, die zehnfach höher war als die CMC.

Ausgeprägte Immunreaktivität wurde in den Extrakten der geladenen Detergenzien CTAB und SDS sowohl ohne als auch mit DTT nachgewiesen. In den mit ungeladenen Detergenzien extrahierten Proben wurden nur weniger intensive bzw. gar keine immunreaktiven Signale mehr detektiert.

### 3.3.6 Ifapsoriasin ist im Schweiß nachweisbar

In den immunhistologischen Schnitten wurde in Schweißdrüsenzellen, Zellen des Ausführungsgangs und im Lumen selber eine ausgeprägte Immunreaktivität für Ifapsoriasin, vor allem für das IFPS-4-Fragment, nachgewiesen (siehe Abb. 3.10). Dot Blot-Analysen wurden für beide Antikörper, α-IFPS-2 und -4, Signale detektiert (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde eine Schweißprobe nach Ansäuerung und Zentrifugation über eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden im Dot Blot mit einem Antikörper-Gemisch aus α-IFPS-2 und -4 analysiert. Immunreaktive Fraktionen wurden massenspektrometrisch analysiert, allerdings wurde in keiner Fraktion eine Masse, die mit Ifapsoriasin oder Ifapsoriasin-Fragmenten korrelierte, gefunden. Neben Lysozym wurden fünf Fragmente von Dermcidin, DCD-1, LEK26, LEK42, LEK43 und SSL25 (Rieg et al., 2005; Rieg et al., 2006), im Schweiß identifiziert (Daten nicht gezeigt).

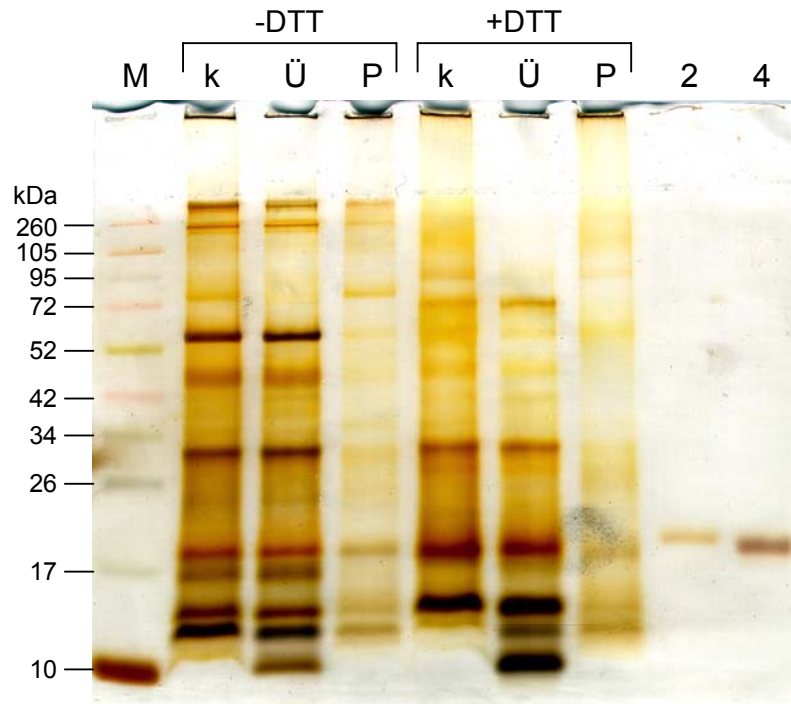
Mit Hilfe des Dot Blots wurden im Schweiß immunreaktive Signale für Ifapsoriasin nachgewiesen. Daher wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt, um Aufschluss über die Größe der Ifapsoriasin-Proteine zu erhalten. Im Western Blot wurden zunächst außer den Positivkontrollen keine Signale detektiert (Daten nicht gezeigt). Da im Dot Blot immunreaktives Ifapsoriasin nachweisbar war, wurde angenommen, dass immunreaktive Fragmente an größere Partikel des Schweißes gebunden sein könnten und somit im Western Blot nicht detektierbar wären, da sie aufgrund ihrer Größe nicht in das Polyacrylamidgel migrieren würden. Zudem hatten die vorherigen Extraktionsversuche aus *Stratum corneum*-, Epidermis- und Vollhaut-Proben gezeigt, dass die Zugabe von DTT die Extraktion von immunreaktivem Ifapsoriasin positiv beeinflussen kann (siehe Abb. 3.21). Die Schweißproben wurden daher mit 10 mM DTT für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Western Blot analysiert. Durch diese Zugabe von DTT wurden Signale im Bereich von 260, 105, etwa 80 und 70 kDa detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die Schweißproben waren sehr trübe und enthielten partikuläre Bestandteile. Zur Überprüfung, ob Ifapsoriasin oder Ifapsoriasin-Fragmente in der flüssigen oder partikulären Fraktion der Schweißproben vorhanden waren, wurden Schweißproben durch Zentrifugation in Überstand und Sediment getrennt. Das Sediment wurde im gleichen Volumen PBS resuspendiert. Diese Proben und eine nicht getrennte Schweißprobe wurden für 1,5 h bei Raumtemperatur ohne und mit 10 mM DTT parallel inkubiert. Anschließend wurde eine SDS-PAGE-Analyse durchgeführt. Die Gele wurden mit Silber angefärbt (Abb. 3.23) bzw. im Western Blot analysiert (Abb. 3.24).

Im Silber-gefärbten Gel wurde für die Schweißproben, die nicht mit DTT behandelt worden waren, der größere Anteil der anfärbbaren Proteine in der wässrigen Fraktion nachgewiesen. Die Bandenmuster der kompletten Schweißproben unterschieden sich kaum vom Muster der Proteine in den Überständen. Das resuspendierte Pellet zeigte eine ähnliche Verteilung des Bandenmusters, nur dass die Intensität der Banden weniger ausgeprägt war als in den Proben des kompletten Schweißes bzw. des Überstandes. Lediglich eine Bande bei etwa 75 kDa schien sich ausschließlich im Pellet zu befinden. Beim Vergleich von DTT-unbehandelten und -behandelten Proben unterschieden sich die Bandenmuster. Einige Banden waren unverändert, während andere verschwunden waren, zusätzlich wurden einige Banden, die in den DTT-unbehandelten Proben nicht vorhanden waren, in den mit DTT behandelten



Proben angefärbt. Die aufgetragenen rekombinanten Proteine, je 200 ng IFPS-2 und IFPS-4 als Kontrollen, zeigten jeweils eine Bande bei etwa 20 bzw. 19 kDa. Mit einer theoretischen Größe von 15,66 kDa für IFPS-2 bzw. 15,88 kDa für IFPS-4 migrierten sie also etwas langsamer als ihre berechneten Massen vermuten ließen (Abb. 3.23).



**Abb. 3.23: Silber-gefärbte SDS-PAGE unterschiedlich behandelter Schweißproben.**

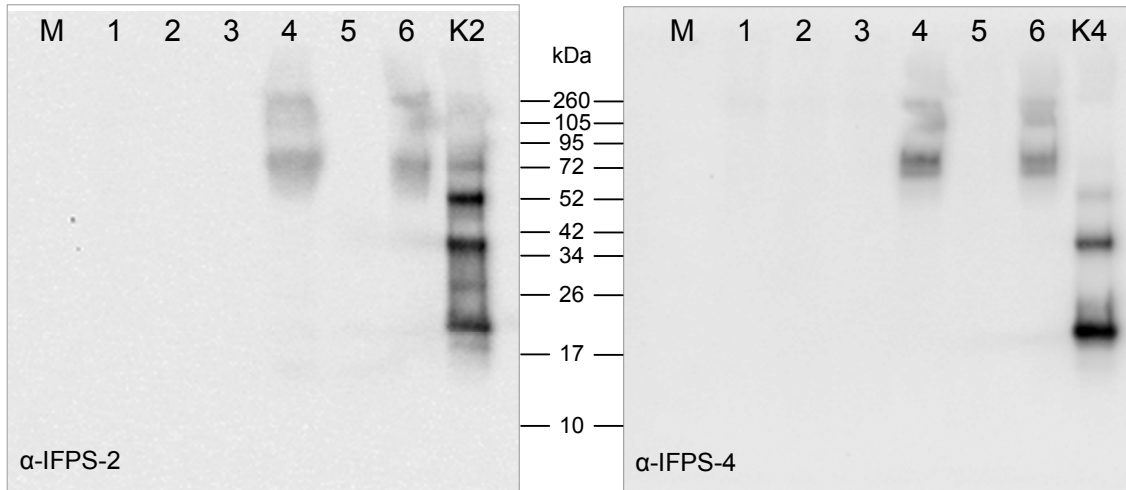
Die Schweißproben wurden zum einen komplett inkubiert (k), oder durch Zentrifugation in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen. Proben wurden für 1,5 h entweder ohne oder mit 10 mM DTT inkubiert (-DTT bzw. +DTT). Es wurden jeweils 10 µl Schweiß und als Kontrollen je 200 ng rekombinantes IFPS-2 (2, 15,66 kDa) und IFPS-4 (4, 15,88 kDa) aufgetragen und in einer 10 %igen SDS-PAGE getrennt. M: Molekulargewichtsstandard.

Im Western Blot wurden für beide Antikörper Signale ausschließlich in den DTT-behandelten Schweißproben nachgewiesen, und zwar für die Proben des kompletten Schweißes und des resuspendierten Pellets (Abb. 3.24).

In den unbehandelten Schweißproben war für keinen der beiden Antikörper ein Signal zu detektieren. In den behandelten Proben wurden für  $\alpha$ -IFPS-2 wenig ausgeprägte und eher diffuse Banden bei etwa 72, 105 und 260 kDa, für  $\alpha$ -IFPS-4 Banden im Bereich von etwa 70, 80, 105 und 260 kDa nachgewiesen.

Die Positivkontrollen, für die je 200 ng rekombinantes IFPS-2 bzw. -4 aufgetragen worden waren, zeigten statt einer Bande im Bereich von 20 bzw. 19 kDa, wie im

Silber-gefärbten Gel (Abb. 3.23), im Western Blot mehrere Banden. Für IFPS-2 lagen diese Banden bei etwa 17, 20, 29, 40, 55 und 72 kDa, für IFPS-4 bei 20, 40, 60 und 75 kDa.



**Abb. 3.24: Western Blot-Analysen unterschiedlich behandelter Schweißproben.** Von mehreren Personen vereinigte Schweißproben wurden unterschiedlich behandelt. Es wurden je 10  $\mu$ l Probe aufgetragen. Der Schweiß wurde zum einen gesamt aufgetragen (Spur 1 und 4) bzw. durch Zentrifugation in Überstand und Pellet getrennt (Spuren 2 und 5 bzw. 3 und 6). Das Pellet wurde in der gleichen Menge an PBS aufgenommen. Je ein Ansatz dieser Proben wurde anschließend mit 10 mM DTT versetzt und inkubiert (Spuren 4-5), während die Parallelproben ohne Zusatz aufgetragen wurden (Spuren 1-3). Zur Kontrolle wurde jeweils 200 ng IFPS-2 (K2) bzw. IFPS-4 (K4) aufgetragen. Als Primärantikörper wurde  $\alpha$ -IFPS-2 bzw.  $\alpha$ -IFPS-4 verwendet. M: Molekulargewichtsstandard.

### 3.4 Identifizierung natürlich vorkommender Ifapsoriasin-Fragmente

Im Western Blot waren sowohl in *Stratum corneum*-Material als auch in Vollhaut und Epidermis immunreaktive Banden nachweisbar. Detaillierte Analysen, um welche Fragmente des Ifapsoriasin-Proteins es sich handelte, wurden bisher nicht durchgeführt, da alle hergestellten Extrakte aufgrund verschiedener Pufferzusätze nicht kompatibel für direkte massenspektrometrische Analysen waren. Daher sollte natürliches Ifapsoriasin bzw. vorhandene Fragmente aus *Stratum corneum* isoliert und für massenspektrometrische Analysen weiter aufgereinigt werden. Da die Extrakte, die Immunreaktivität zeigten, SDS und auch DTT enthielten, konnten sie nicht über eine Affinitätssäule, an die  $\alpha$ -IFPS-2 und -4 gekoppelt worden war,

aufgereinigt werden. DTT würde die Disulfid-Brücken, die die leichte und die schwere Kette der Antikörper verbinden, irreversibel zerstören. Zudem sind vermutlich Ifapsoriasin-Fragmente in Mizellen des SDS eingeschlossen, was die Epitop-Erkennung erschweren könnte. Die Aufreinigung über Umkehrphasen-HPLC war ebenfalls nicht durchführbar, da die Säulenmatrix nicht mit Detergenzien kompatibel ist und durch diese geschädigt werden könnte. Es wurde daher versucht, die Proteinextrakte, die mit SDS/DTT-Puffer hergestellt worden waren, über einen Größenfilter aufzukonzentrieren, dabei die hohe SDS-Konzentration durch mehrmaliges Waschen mit großen Volumina zu verringern, und gleichzeitig das DTT abzutrennen. Proteinextrakte wurden von mehreren Gramm bereits mit Citrat-EtOH-Puffer behandeltem *Stratum corneum* hergestellt (siehe 2.11.1). Nach Extraktion mit SDS/DTT-Puffer wurden in einer Hälfte des erhaltenen Proteinextraktes freie SH-Gruppen mit Iodacetamid alkyliert. Danach wurden sowohl der alkylierte als auch der unbehandelte Proteinextrakt mit Hilfe eines 2 kDa-Größenfilters mit PBS gewaschen und aufkonzentriert. Im Verlauf der Waschschriffe gelierten beide Proben und konnten nur noch durch Abkratzen von den Filtern gelöst werden. Dieser "Gelee" war weder durch Erwärmen noch kräftiges Mischen wieder in Lösung zu bringen.

Daraufhin wurde versucht, natürlich vorkommendes Ifapsoriasin aus Schweißproben zu isolieren, da hier immunreaktive Fragmente durch Behandlung mit DTT extrahiert werden konnten. Eine zuvor mit DTT behandelte Schweißprobe wurde angesäuert, abzentrifugiert und mit Hilfe einer C2/C18-Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden im Dot Blot getestet. Es konnte jedoch für keinen der beiden Antikörper ein immunreaktives Signal nachgewiesen werden. Das durch Zentrifugation getrennte Pellet wurde daher nochmals in PBS aufgenommen und im Dot Blot getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass sich die Immunreaktivität immer noch ausschließlich im Pellet befand (Daten nicht gezeigt). Es konnten daher bislang keine natürlich auftretenden Ifapsoriasin-Fragmente identifiziert werden.

### **3.5 Antimikrobielle Aktivität von Ifapsoriasin**

Über eine mögliche antimikrobielle Aktivität von Mitgliedern der "S100 Fused Type Protein"-Familie sind bisher kaum Daten bekannt. In unserer Arbeitsgruppe wurden allerdings anhand antimikrobiell aktiver HPLC-Fractionen von aufgereinigten *Stratum corneum*-Proteinextrakten Fragmente des humanen Hornerin identifiziert. Da

Ifapsoriasin vor allem im Bereich der A-Repeat-Regionen hohe Sequenzähnlichkeit zu Hornerin aufweist, wurden auch die rekombinant hergestellten Ifapsoriasin-Fragmente auf mögliche antimikrobielle Aktivität untersucht. Nicht nur Ifapsoriasin, sondern auch Hornerin ist in gesunder Haut exprimiert (Wu et al., 2008). Die Haut stellt die erste Barriere gegen die Umwelt dar, und es könnte vermutet werden, dass Hornerin und eventuell auch Ifapsoriasin oder andere "S100 Fused Type Protein"-Familienmitglieder, wie Profilaggrin, Trichohyalin, Cornulin und Repetin, die ebenfalls in der Haut exprimiert werden (Lynley und Dale, 1983; Rothnagel und Rogers, 1986; Huber et al., 2005; Contzler et al., 2005), an der antimikrobiellen Abwehr der Haut beteiligt sein könnten.

Zur Analyse der antimikrobiellen Aktivität wurden für die rekombinant exprimierten Ifapsoriasin-Fragmente Mikrodilutions- und Radialdiffusionstests im Institut für Infektionsmedizin durchgeführt.

### 3.5.1 Ifapsoriasin-Fragmente besitzen antimikrobielle Aktivität

Die antimikrobielle Aktivität wurde für den Mikrodilutionstest als LD<sub>90</sub> (Konzentration, bei der 90 % oder mehr der Bakterien abgetötet wurden), für den Radialdiffusionstest als MEK (minimale effektive Konzentration, berechnet aus den Hemmhöfen bei verschiedenen Verdünnungen) angegeben.

Zunächst wurden die Fragmente IFPS-2, IFPS-3 und IFPS-4 im Mikrodilutionstest gegen *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 33348 sowie parallel im Radialdiffusionstest gegen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11303 bzw. ATCC 11775 und *Candida albicans* ATCC 24433 getestet (Tab. 3.1). Hierbei wies keines der Fragmente in den eingesetzten Konzentrationen antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 6538 und *C. albicans* ATCC 24433 auf.

IFPS-3 zeigte auch gegen *E. coli* ATCC 11303, *P. aeruginosa* ATCC 10145 und *P. aeruginosa* ATCC 33348 weder in Radialdiffusions- noch Mikrodilutionstest Aktivität. Gegen *E. coli* ATCC 11775 war nur eine sehr schwache Aktivität mit einer MEK von 7,0 µM im Radialdiffusionstest vorhanden. Zudem wurde im Hemmhof eingeschränktes Wachstum der Bakterien beobachtet.

IFPS-2 zeigte im Radialdiffusionstest eine sehr geringe (14,8 µM) Aktivität gegen *E. coli* ATCC 11303, gegen *E. coli* ATCC 11775 konnte die MEK nicht berechnet werden, da nur für die höchste eingesetzte Konzentration ein Hemmhof vorhanden

war. Im Mikrodilutionstest wurde mit jeweils 1,6 µM eine moderate Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und *P. aeruginosa* ATCC 33348 beobachtet, während die Aktivität gegen *E. coli* ATCC 11775 mit 0,4 µM im Bereich des antimikrobiellen Proteins Psoriasin lag (Gläser et al., 2005).

**Tab. 3.1: Antimikrobielle Aktivität verschiedener Ifapsoriasin-Fragmente.**

Bakterienstamm	Mikrodilutionstest (LD <sub>90</sub> [µM])			Radialdiffusionstest (MEK [µM])						
	IFPS-2	IFPS-3	IFPS-4	IFPS-2	IFPS-3	IFPS-4	B13	B14	C-Term	C-Term short
<i>S. aureus</i> ATCC 6538				>63,9	>132,9	>63,0				
<i>E. coli</i> ATCC 11303				14,8 <sup>*</sup>	>132,9 <sup>*</sup>	5,9 <sup>*</sup>				
<i>E. coli</i> ATCC 11775	0,4 <sup>*</sup>	>13,3 <sup>*</sup>	0,8	n. b.	7,0	4,3	>126,9 <sup>**</sup>	>127,0	11,9	>166,2
<i>C. albicans</i> ATCC 24433				>63,9	>132,9	>63,0				
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	1,6 <sup>*</sup>	>13,3 <sup>*</sup>	1,1	>63,9	n. b.	3,5				
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 33348	1,6 <sup>*</sup>	>13,3 <sup>*</sup>	0,3			1,1	>126,9 <sup>**</sup>	>127,0	8,0 <sup>**</sup>	n. b. <sup>**</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 33354			0,4 <sup>*</sup>			1,0	>126,9 <sup>**</sup>	>127,0 <sup>**</sup>	7,9	12,9
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 33358						4,3				
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 39324						3,4				
<i>P. syringae</i> ATCC 10205						2,1	>126,9	>127,0	2,8 <sup>**</sup>	9,6 <sup>**</sup>
<i>P. stutzeri</i> RV A2/1990			0,2 <sup>**</sup>			0,4	>126,9 <sup>**</sup>	>127,0 <sup>**</sup>	1,2	2,1
<i>P. paucimobilis</i> RV A2/1994						3,3				
<i>P. fluorescens</i> ATCC 10038			>3,2 <sup>**</sup>							
<i>P. fluorescens</i> ATCC 49323						9,2				
<i>P. putida</i> RV A1/2000			0,8 <sup>**</sup>			17,2				
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416			>3,2 <sup>**</sup>							
<i>X. maltophilia</i> ATCC 13637			>3,2 <sup>*</sup>			n. b.				
<i>X. maltophilia</i> ATCC 17666			>3,2 <sup>*</sup>			n. b.				

LD<sub>90</sub>: "Lethal Dose", Abtötung von über 90 % der Mikroorganismen; MEK: minimale effektive Konzentration. Die MEK wurde über die grafische Auswertung über den Schnittpunkt der jeweiligen Regressionsgerade mit der Abszissen-Achse berechnet (nach Steinberg und Lehrer, 1997). Hellgrau unterlegte Felder markieren Versuche, in denen die Hemmhofe bewachsen waren. Außer durch Sternchen angegeben (\*: Einzelwert, \*\*: Doppelwerte) stellen alle Werte Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dar; n. b.: Regressionsgerade konnte nicht berechnet werden, da nur bei der höchsten Proteinkonzentration ein Hemmhof messbar war.

IFPS-4 zeigte im Radialdiffusionstest mit einer MEK von 5,9 und 4,3 µM eine geringe Aktivität gegen *E. coli* ATCC 11303 und *E. coli* ATCC 11775; im Mikrodilutionstest zeigte sich eine moderate Aktivität gegen *E. coli* ATCC 11775 mit einer LD<sub>90</sub> von

0,8  $\mu\text{M}$  und gegen *P. aeruginosa* ATCC 10145 mit einer  $\text{LD}_{90}$  von 1,1  $\mu\text{M}$ . Die Aktivität gegen den getesteten *P. aeruginosa* ATCC 33348 lag mit 0,3  $\mu\text{M}$  sehr hoch. Für IFPS-4 wurde eine besonders ausgeprägte Färbung in den Schweißdrüsen und auch im Lumen des Ausführungsganges in der Immunhistologie nachgewiesen. Die Schweißdrüse würde als feuchter, warmer Ort einen idealen Ort für Pseudomonaden, die als typische Bodenbakterien eine feuchte Umgebung zum Wachstum brauchen, bieten. Daher wurde IFPS-4 gegen weitere Vertreter der Gattung *Pseudomonas* und der Gruppe der nicht-fermentierenden Bakterien getestet.

Hier wurde im Mikrodilutionstest vor allem gegen Pseudomonaden wie *P. aeruginosa* ATCC 33354 mit einer  $\text{LD}_{90}$  von 0,4  $\mu\text{M}$  und *P. stutzeri* RV A2/1990 mit 0,2  $\mu\text{M}$  sowie *P. putida* RV A1/2000 mit 0,8  $\mu\text{M}$  eine hohe Aktivität festgestellt. Auch im Radialdiffusionstest zeigte IFPS-4 mit einer MEK von 0,4  $\mu\text{M}$  gegen *P. stutzeri* RV A2/1990 eine hohe antimikrobielle Aktivität. Mit MEKs zwischen 3,5 und 1,1  $\mu\text{M}$  wies es auch gegen die Stämme *P. aeruginosa* ATCC 10145, *P. aeruginosa* ATCC 33348, *P. aeruginosa* ATCC 33354, *P. aeruginosa* ATCC 39324, *P. syringae* ATCC 10205 und *P. paucimobilis* RV A2/1994 eine moderate Aktivität auf. Gegen *P. aeruginosa* ATCC 33358 wurde mit einer MEK von 4,3  $\mu\text{M}$  und *P. fluorescens* ATCC 49323 mit 9,2  $\mu\text{M}$  nur eine sehr geringe Aktivität nachgewiesen. Gegen *P. fluorescens* ATCC 49323 wurde im Mikrodilutionstest keine Aktivität festgestellt, ebenso wie gegen *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 und *Xanthomonas maltophilia* ATCC 13637 bzw. ATCC 17666. Im Radialdiffusionstest war gegen *P. putida* RV A1/2000 mit einer berechneten MEK von 17,2  $\mu\text{M}$  kaum Aktivität vorhanden, hier zeigte sich ebenfalls ein bewachsener Hemmhof. Auch gegen *X. maltophilia* ATCC 13637 und ATCC 17666 wurde keine Aktivität von IFPS-4 nachgewiesen.

### **3.5.2 Ein C-terminaler Sequenzabschnitt ist verantwortlich für die antimikrobielle Aktivität gegen Pseudomonaden**

Da das analysierte IFPS-4-Fragment aus dem letzten B-Repeat und dem C-terminalen Sequenzende von Ifapsoriasin besteht, sollte die antimikrobielle Aktivität genauer lokalisiert werden. Es wurden daher das letzte B-Repeat (IFPS-B-14) und der C-terminale Teil (IFPS-C-Term) als einzelne Proteine rekombinant exprimiert; zusätzlich wurde auch das vorletzte B-Repeat rekombinant hergestellt (IFPS-B-13, siehe 2.9). Durch eine Mutation (S2377Stop) im C-terminalen

Fragment IFPS-C-Term wurde ein zusätzliches, um 15 Aminosäuren verkürztes, C-terminales Fragment exprimiert (IFPS-C-Term short). Getestet wurden diese Proteinfragmente gegen die bereits zuvor verwendeten Keime, allerdings ausschließlich im Radialdiffusionstest (Tab. 3.1).

Weder für das vorletzte noch das letzte B-Repeat (IFPS-B13 und IFPS-B14) wurde gegen die untersuchten Keime *E. coli* ATCC 11775, *P. aeruginosa* ATCC 33348, *P. aeruginosa* ATCC 33354, *P. syringae* ATCC 10205 und *P. stutzeri* RV A2/1990 im Bereich der eingesetzten Konzentrationen antimikrobielle Aktivität festgestellt. Im Gegensatz dazu ließ sich sowohl für das komplette als auch für das verkürzte C-terminale Fragment Aktivität gegen verschiedene Pseudomonaden wie *P. aeruginosa* ATCC 33348, *P. aeruginosa* ATCC 33354, *P. syringae* ATCC 10205 und *P. stutzeri* RV A2/1990 nachweisen. Hierbei wies das verkürzte Fragment IFPS-C-Term short im Gegensatz zu IFPS-C-Term eine erniedrigte Aktivität mit MEKs zwischen 9,6 und 2,1  $\mu\text{M}$  auf, während die des kompletten C-terminalen Fragments MEKs mit Werten zwischen 8,0 und 1,2  $\mu\text{M}$  zeigte. Für beide Fragmente lag die MEK insgesamt höher als für das IFPS-4-Fragment. Gegen *E. coli* ATCC 11775 konnte für IFPS-C-Term nur eine geringe Aktivität mit einer MEK von 11,9  $\mu\text{M}$  gezeigt werden, IFPS-C-Term short zeigte keine Aktivität mehr.

Die antimikrobielle Aktivität wurde also ausschließlich im Bereich des C-Terminus lokalisiert, aber die Effizienz der antimikrobiellen Aktivität nahm mit zunehmender Verkürzung der Sequenz ab.

### 3.6 Sequenzanalysen

Die antimikrobielle Aktivität ließ sich ausschließlich im Sequenzbereich des C-Terminus lokalisieren. Daher wurde mit der C-terminalen Sequenz (RQRHGSSQVWKHGSYGPAEYDYGHTGYGPPSGGSR) nach putativen Orthologen innerhalb der Spezies, deren genomische Sequenzen verfügbar waren bzw. anhand von ESTs gesucht (siehe 2.11.7).

#### 3.6.1 Ein Teil des C-Terminus ist hochkonserviert in 25 Säugetier-Spezies

Durch diese Sequenzanalysen wurden in allen verfügbaren Säugetier-Spezies mit Ausnahme des Dreizehnstreifenziegels Sequenzen gefunden, die eine hohe Ähnlichkeit mit der C-terminalen Sequenz des humanen Ifapsoriasins aufwiesen und

in den meisten Fällen in der gefundenen Proteinsequenz eher C-terminal lokalisiert waren. Von gefundenen Sequenzen, die einen "Expectation value" von unter  $10^{-6}$  und eine Identität auf Proteinebene von mindestens 50 % aufwiesen, wurde ein Sequenzvergleich erstellt (Abb. 3.25).

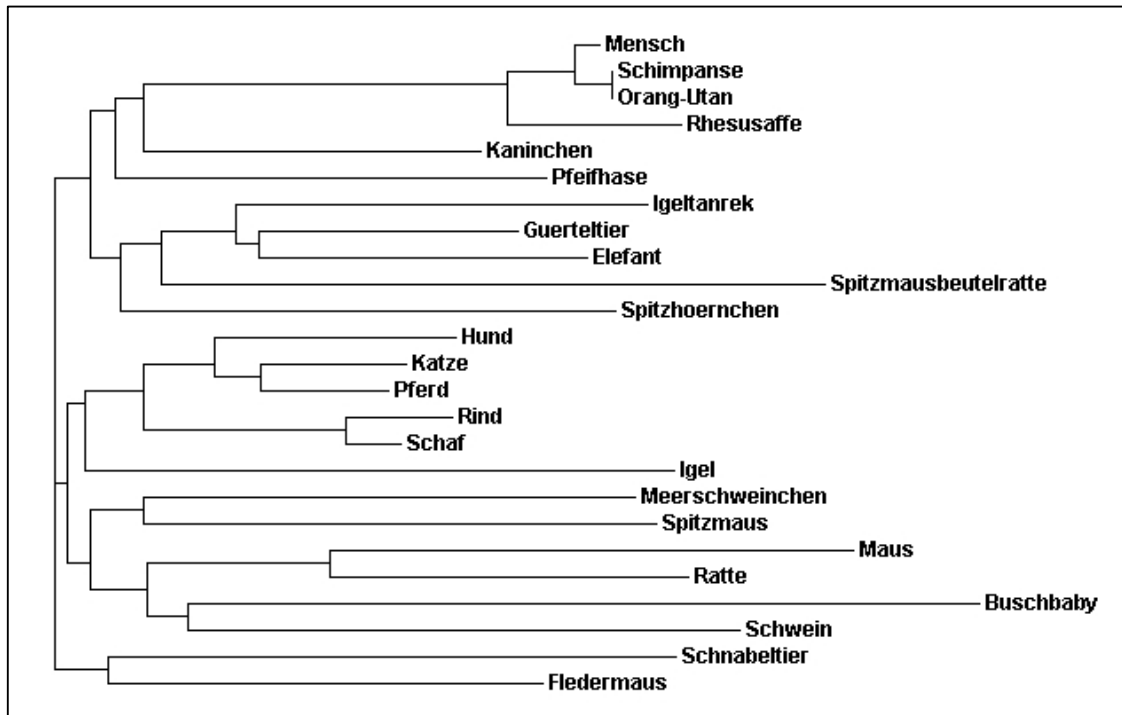
Mensch	...SSRASHFQSHSSERQRHGSSQVWKHGSYGP	AEYDYGHTGYGPGSGGSRKSI	NSHLSWSTDSTANKQLSRH
Schimpanse	...SSRTSHFQSHSSERQRHGSSQVWKHGSYGP	AEYDYGHTGYGPGSGGSRKSI	NSHLSWSTDSTANKQLSRH
Orang-Utan	...SSRTSHFQSHSSERQRHGSSQVWKHGSYGP	AEYDYGHTGYGPGSGGSRKSI	NSHLSWSTDSTANKQLSRH
Rhesusaffe	...STRTSHFQSRSSERQRHGSSHVWKHGSYGP	AEYDYGHTGYGPGSGGRRKSI	CNSHLSWSTIDSATNEQLSRH
Buschbaby	.....WKTKTRVKSQWTHGSGYGRAGYDYGQ	SGYGPSGAAEQKPFQAFWRF	HKGKEQTVVPH
Spitzhörnchen	...QSESHFQSHNNRRSRHGSSQGWKHSYGR	SEYDYGHSYGYGPSGD	SRSSNYNSPLRSTYSTISKLDSY...
Fledermaus	...QSGDTYKHGQAAGRQNRSSQRWRHGSYGC	AGYDYGQSGYGPSGG	SRTSSHNSSPVRPFRNRTENKQVSVH...
Igel	...RVPTAHNHSQIHRRSRSSNEGWRHGSYGS	ADYDYGQYGFRRP	SGGSQTSRNPSPFRRSADTSTNKHVRRA
Igeltanrek	...QSRASHQSLLGGVQRHGSSQRWTHGSYGN	SAYDYGQSGYGPSGDKQ	TRNHNSSHEQMSYYSH
Spitzmaus	...GVGKCTNHSESSGGHTHGSSQSWRHGSYGR	AEYDYGQHGYP	SSGSRANSRNPPLRSDRFTSQRVSSGQ...
Katze	...RSRVHSQSLSGRQRHGSSQGWKHSYGS	AEYDYGQSGYGPSGG	SRTSSHNSSPLRSTERAANNQVSTHG
Hund	...HQSRVHSQSQHSQKQRHGSSQGWKHSYGS	AEYDYGQSGYGPSGG	SRTSSRNSSPLRSLDRAENNVSTH...
Rind	...HFGKSHSTSQISGRQRHRSQAWRHGSYGS	AEYDYGQSGYGPSGG	SRTSSHNSSPFRSTDQAATKRASSH...
Schaf	.....RHSTSQISGRQRHRSQAWRHGSYGS	AEYDYGQSGYGPSGG	SRTSSRNSSPFRSTDRATTKRASSH...
Schwein	...QSGIGHSQTHISKRQRNISGQWRHGSYGR	EYDYGQSGYGPSGD	ITISQSESDSERHSGASQRHSAS...
Pferd	...QSGISHSQSLTGRQRHGSSQGWKHSYGS	AEYDYGQSGYGPSGD	SRTSSRNSSPLRSTERVANKQVSRH...
Elefant	...QPGANHSQSWSSQRQRHGSSQGWKHSYGR	AAAYDYGESGYGPSGG	SRASNHNSSQEQRCYYFD
Maus	...HYGRNHFQS-TISGNQYDSSQSSRHGSYGP	QDYDYGQSGYGPSGRL	RSNSQSSIPFSSAHRATNMEVLPC...
Ratte	...QSGTKHFQS-PISGNQYDSSQHWRHGSYGR	EYDYGQTYGPGSGG	SGTNSHNSSPMRSTHSTATNQASQR...
Meerschweinchen	...QYGSKHSQFNNGKHKHGSQGWKHSYGS	SEYDYGQSGYAP	QASRTNSQNSLRSPTDITSTETSSY...
Kaninchen	...PSGTRHFHSQSSGRQRHGSSQVWRHGSYGC	AEYDYGQSGYGPSGG	SRTSSHNSSIPVRTDILVSTQVYRHA
Pfeifhase	...QSGSRHFQSHSTGRQRYSNQKWRHGSYGN	SAYDYGHFYGYGPS	SAGSRTSSRNSSPEGQDILASNKQMCIH...
Gürteltier	...XXXNHSQSWVSEKQRHGSSQGWTHGSYGN	TAYDYGQSGYGPS	SRGSQ
Spitzmausbeutelratte	...AYGTRQGHSLSEKQYGSYGNWKHGSYGN	ADYDYGQTYGHS	RDNRSTNSNSPQPQDITFSILSRHG...
Schnabeltier	...QSGTSYVQTGGRQRQRSGQSWRHGSYGN	LAYDYGESGFGQSGH	SRTSGSRNSSPGQSSGRTGRQSSH...

**Abb. 3.25: Vergleich von C-terminalen Sequenzabschnitten in putativen Ifapsoriasin-Orthologen.** Die Sequenzen, die anhand der C-terminalen Ifapsoriasin-Sequenz mit Hilfe des BLAST-Programms von NCBI gesucht wurden, zeigten in einem Bereich von 53 Aminosäuren (schwarz umrahmt) eine hohe Konservierung. Aminosäuren, die in 13-23 Sequenzen identisch sind, wurden hellgrau markiert; Aminosäuren, die in 24 oder 25 Sequenzen identisch sind, wurden dunkelgrau markiert.

Die Sequenzvergleiche zeigten, dass ein Bereich von 53 Aminosäuren (schwarz umrahmt) in allen Sequenzen eine hohe Identität aufwies (markiert durch graue Schattierungen). Bestimmte Aminosäuren waren in 24 von 25 bzw. in allen gefundenen Sequenzabschnitten komplett identisch (dunkelgrau markiert).

Anhand dieser Sequenzen wurde im Programm ClustalW ein Stammbaum von diesem Abschnitt erstellt (Abb. 3.26). Dieser Stammbaum spiegelte zum einen etwa die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse der Säugetiere wider, wie z. B. in der Gruppe der Primaten mit Mensch, Schimpanse, Orang-Utan und Rhesusaffe, der Nagetiere mit Ratte und Maus, oder der Rinderartigen mit Rind und Schaf; zum anderen aber entsprachen die Verwandtschaftsverhältnisse nicht den tatsächlichen, wie z. B. für Schnabeltier, das zu den eierlegenden Kloakentieren gehört, und Fledermaus, die zu der Ordnung der Flattertiere gehört. Ebenso wird das Pferd als Unpaarhufer nicht zur Ordnung der Raubtiere wie Hund und Katze gezählt.

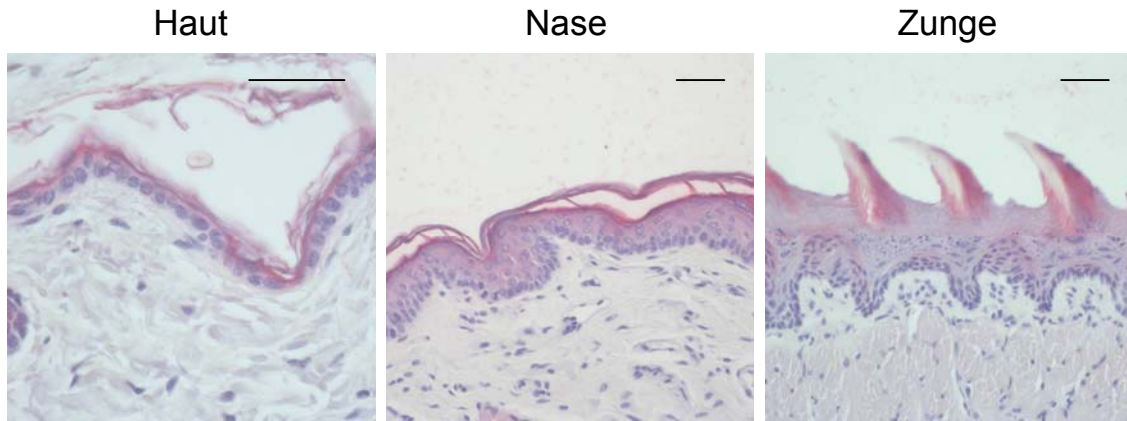




**Abb. 3.26: Phylogramm der putativen Orthologe des Ifapsoriasin-C-Terminus.** Das Phylogramm der Abb. 3.25 analysierten Sequenzen wurde mit Hilfe des ClustalW-Programms unter Verwendung der Standardeinstellungen ("guide tree") erzeugt.

Da die Maus- und Mensch-Sequenzen im Vergleich einige identische Aminosäuren in Folge besitzen, wurde vermutet, dass der gegen IFPS-4 gerichtete Antikörper mit diesem Bereich des Maus-Ifapsoriasin kreuzreagieren könnte. Aufgrund der hohen Konservierung dieser C-terminalen Sequenz wurden immunhistochemische Färbungen von unterschiedlichen Epithelien der Maus angefertigt (Abb. 3.27).

Ebenso wie in humaner Haut wurden auch die äußeren Zellschichten der Maushaut, das *Stratum granulosum* und das *Stratum corneum*, angefärbt. Positive Färbungen wurden auch im Bereich des Ballens und des Ohres beobachtet (Daten nicht gezeigt). Neben diesen verschiedenen Hautschnitten ließ sich auch in den Schnitten der Zunge eine positive Färbung detektieren. Hier waren vor allem die filiformen Papillen angefärbt. In Schnitten von Dünn- und Dickdarm, Lunge und Milz zeigte sich hingegen keine Färbung (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.27: Immunohistochemische Färbungen verschiedener Epithelien von Mäusen.** Schnitte verschiedener Gewebe wurden von Balb/c-Mäusen angefertigt (siehe 2.13.3), mit  $\alpha$ -IFPS-4 angefärbt und mit Hilfe des Vector Red-Systems detektiert. Positive Ifapsoriasin-Färbung sind in rot zu sehen, eine Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 30  $\mu$ m.

## 4 Diskussion

Ifapsoriasin wurde als ein neues Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie identifiziert. Sowohl die genomische als auch die Protein-Struktur von Ifapsoriasin entspricht dem für diese Familie typischen Aufbau (Lee et al., 1993; Krieg et al., 1997; Xu et al., 2000; Makino et al., 2001; Toulza et al., 2007). Die transkribierte mRNA-Sequenz enthält drei Exons, von denen das erste eine nicht-kodierende Sequenz trägt, das zweite beinhaltet das Translationsstartkodon und die kodierende Sequenz für die S100-Domäne, während die restliche kodierende Sequenz im dritten Exon lokalisiert ist. Auf Proteinebene besitzen alle Mitglieder dieser Familie sowohl eine S100- als auch EF-Hand-Domäne und eine unterschiedliche Anzahl von Tandemsequenzwiederholungen, die von Spacer-Regionen amino- und carboxyterminal flankiert werden.

Humanes Ifapsoriasin wurde in dieser Arbeit auf Protein-Ebene näher untersucht. Da das Expressionsmuster für einige der "S100 Fused Type Protein"-Mitglieder gut untersucht ist, wurde mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern zunächst die Expression von Ifapsoriasin in der Haut analysiert. Insgesamt wurden Antikörper gegen drei unterschiedliche sequenztypische Fragmente von Ifapsoriasin generiert: gegen den N-terminalen Spacer, die B8-Repeat-Domäne und die B14/C-Terminus-Region (siehe Abb. 3.7).

In immunhistochemischen Analysen wurde mit Hilfe der polyklonalen Antikörper die Expression von Ifapsoriasin im oberen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* in der Epidermis nachgewiesen (Abb. 3.9). Eine Expression in diesem Bereich ist auch für weitere Mitglieder der "S100 Fused Type Protein"-Familie bekannt. Trichohyalin, Repetin, Hornerin, Profilaggrin und Cornulin werden vorrangig in verhornenden Epithelien und deren Anhangsgebilden exprimiert und scheinen strukturelle Funktionen während der Differenzierung der Epithelzellen zu haben (Rogers et al., 1977; Rothnagel und Rogers, 1986; Steven et al., 1990; Krieg et al., 1997; Ishida-Yamamoto et al., 1997; Makino et al., 2001; Steinert et al., 2003; Huber et al., 2005; Contzler et al., 2005; Wu et al., 2008). In der Epidermis ist diese wichtige Funktion während der terminalen Differenzierung der Keratinozyten vor allem für Filaggrin bekannt. Filaggrin ist in der Lage, Keratinfilamente zu aggregieren und verursacht einen Kollaps des Zytoskeletts (Dale et al., 1978; Dale et al., 1997). Dies ist ein wichtiger Schritt während der terminalen Differenzierung, in der sich Zellen des

*Stratum granulosum* abflachen und im *Stratum corneum* verhornt sind. Ifapsoriasin könnte also ebenso wie einige andere Mitglieder der Proteinfamilie an der terminalen Differenzierung beteiligt sein. Die verstärkte Expression im Bereich der Haarfollikel und inneren Wurzelscheide zeigt, dass Ifapsoriasin nicht nur an der Differenzierung der Haut selber sondern auch der Haare beteiligt sein könnte. Der Haarfollikel stellt eine Einstülpung der Epidermis dar, die tief bis in die Dermis versenkt ist. Für weitere Mitglieder der "S100 Fused Type Protein"-Familie konnte ebenfalls eine Expression im Bereich der Haarfollikel nachgewiesen werden, so für Trichohyalin im Bereich der inneren Wurzelscheide und der Medulla (Rothnagel und Rogers, 1986) sowie für Hornerin im Bereich der äußeren Wurzelscheide (Wu et al., 2008). Die verschiedenen "S100 Fused Type Protein"-Mitglieder besitzen also während der Differenzierung in der Region des Haarfollikels verschiedene Aufgaben, was die unterschiedliche Lokalisation vermuten lässt. Die Expression von Ifapsoriasin im Bereich der inneren Wurzelscheide ist ähnlich der des Trichohyalins, was auf eine ähnliche oder unterstützende Funktion während der Differenzierung innerhalb der inneren Wurzelscheide hindeutet. Insgesamt zeigte Ifapsoriasin eine typische Färbung, wie auch für die bisher untersuchten Mitglieder der "S100 Fused Type Protein"-Familie bekannt, hauptsächlich in den äußeren Schichten von Epithelien, so in der Haut und im Bereich der inneren Haarwurzelscheide. Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung am Prozess der Differenzierung von Keratinozyten nahe. Die Expression von Ifapsoriasin in der Haut wies eine ähnliche räumliche Verteilung wie für Filaggrin und Hornerin auf (Lynley und Dale, 1983; Kanitakis et al., 1988; Wu et al., 2008). Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen wurden Doppelfärbungen mit Filaggrin durchgeführt, um nähere Hinweise auf die Lokalisation von Ifapsoriasin zu bekommen und mit Filaggrin zu vergleichen (Abb. 3.12 und 3.13). In der Epidermis zeigte sich für beide verwendeten Ifapsoriasin-Antikörper im Vergleich zu Filaggrin eine räumlich ähnliche Expression. Ifapsoriasin wird erst während der terminalen Differenzierung exprimiert und besitzt ein mit Filaggrin vergleichbares Expressionsmuster. Da für Filaggrin bekannt ist, dass es auf zellulärer Ebene in den so genannten F-Keratohyalin-Granula als phosphoryliertes Proprotein unlöslich vorliegt, wurde ebenfalls mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen die zelluläre Lokalisation analysiert (Abb. 3.14). Auf mRNA-Ebene wurde bereits die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Expression von Ifapsoriasin nachgewiesen (Doktorarbeit Z. Wu), daher wurde eine Regulation ähnlich der "S100 Fused Type Protein"-Mitglieder

vermutet, die hauptsächlich in differenzierenden Zellen exprimiert werden. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierten Keratinozyten durchgeführt. Hierbei zeigte sich in kultivierten humanen Keratinozyten jedoch für die beiden verwendeten Ifapsoriasis-Antikörper eine unterschiedliche Färbung. Der gegen die N-terminale Spacer-Region gerichtete Antikörper  $\alpha$ -IFPS-2 zeigte innerhalb vereinzelter Zellen eine eher granuläre, aber zytoplasmatische Verteilung. Die Doppelfärbung mit Filaggrin zeigte keine Überlappung der räumlichen Verteilung von Ifapsoriasis und Filaggrin. Es kann daher vermutet werden, dass zumindest der N-terminale Teil des Ifapsoriasis-Proteins nicht in Keratohyalin-Granula gelagert wird oder mit diesen assoziiert ist. Doppelfärbungen gegen den C-terminalen Teil von Ifapsoriasis mit Filaggrin bzw. E-Cadherin zeigten, dass sich dieses Expressionsmuster ebenfalls nicht mit dem des Filaggrins überlagerte, sondern mit dem Expressionsmuster des E-Cadherins. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass offensichtlich auch der C-terminale Teil des Ifapsoriasis nicht in Keratohyalin-Granula exprimiert wurde oder mit diesen assoziiert ist. Die Lokalisation an der Zellperipherie deutete darauf hin, dass Ifapsoriasis Aufgaben im Bereich der Zell-Zell-Kontakte ähnlich wie E-Cadherin übernehmen könnte oder eventuell als Bestandteil des "Cornified Cell Envelope" während der terminalen Differenzierung eine Funktion besitzt. Bei der Ausbildung des "Cornified Cell Envelope" werden zunächst Keratinfilamente aggregiert, eine Eigenschaft, die bisher *in vitro* nur für Filaggrin (Dale et al., 1978) und eine rekombinant hergestellte Untereinheit des Maus-Ifapsoriasis nachgewiesen wurde (Listwan und Rothnagel, 2004). Anschließend werden zur Verstärkung dieser Zellstruktur verschiedene andere Proteine über Transglutaminasen kovalent miteinander verknüpft. Eine Beteiligung am Aufbau des "Cornified Cell Envelope" konnte für Filaggrin und Trichohyalin gezeigt werden (Simon et al., 1996; Steinert et al., 1998). Diese beiden Mitglieder der "S100 Fused Type Protein"-Familie werden offenbar u. a. mit Loricrin, verschiedenen "Small Proline-rich"-Proteinen, Envoplakin, Involucrin, Keratinen, und Lysin-reichen Proteinen wie P-Cystatin über Transglutaminasen verknüpft (Takahashi et al., 1994; Steinert et al., 1998; Candi et al., 2005). Transglutaminasen sind in der Lage, Glutamin- und Lysin-Reste über eine  $\text{N}\epsilon(\gamma\text{-Glutamy})\text{l}ysyl\text{-Isopeptid}$ -Bindung kovalent zu verknüpfen (Übersicht in Lorand und Graham, 2003). Ifapsoriasis besitzt zwar nur einen relativ geringen Anteil an Lysin (1,3 %), aber einen großen Anteil an Glutaminen in der Proteinsequenz (10,2 %) und könnte daher als Substrat für

Transglutaminasen fungieren. Für Filaggrin zeigte sich im gesamten Zytoplasma eine granuläre Färbung und im Zellkern wie bereits zuvor beschrieben (Dale et al., 1997; Zhang et al., 2002), während weder für  $\alpha$ -IFPS-2 noch -4 Signale im Zellkern detektiert wurden. Der N-Terminus von Filaggrin wird unterteilt in die S100- und EF-Hand-Domänen (A-Domäne) und die B-Domäne, welche die darauf folgenden 212 Aminosäuren bis zur ersten trunkierten Filaggrin-Untereinheit beinhaltet (Presland et al., 1992; Presland et al., 1997). *In vitro*-Experimente gaben Hinweise darauf, dass die Hydrolyse dieser N-terminalen Sequenz durch die Profilaggrin Endoproteinase PEP1 erfolgt (Presland et al., 1997). Diese N-terminale Sequenz wird vermutlich weiter in A- und B-Domäne prozessiert, da Fragmente nachgewiesen werden konnten, die nur mit einem Antikörper gegen die A-Domäne reagierten und eine Größe von etwa 16 und 18 kDa aufwiesen (Presland et al., 1997). Des Weiteren wurde in transfizierten COS-7-Zellen gezeigt, dass ein GFP-Fusionsprotein des N-terminalen Bereiches bis zur 137. Aminosäure des humanen Profilaggrins, der eine Kernlokalisationssequenz enthielt, hauptsächlich im Kern lokalisiert wurde, während ein GFP-Konstrukt mit mutierter bzw. nicht mehr vorhandener Kernlokalisationssequenz hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert war (Pearton et al., 2002). Eine ähnliche Lokalisation der Filaggrin-Domäne wurde in differenzierenden murinen Keratinozyten nachgewiesen (Zhang et al., 2002). Diese Translokation des Filaggrin-Fragments wurde bisher aber nur *in vitro* in kultivierten Keratinozyten oder anderen Zelllinien gezeigt, nicht aber *in vivo*. Weder die N-terminale Spacer-Sequenz, gegen die  $\alpha$ -IFPS-2 gerichtet ist, noch die C-terminale Sequenz, gegen die  $\alpha$ -IFPS-4 gerichtet ist, weist eine Kernlokalisationssequenz auf. In keiner der immunhistochemischen Untersuchungen wurden Signale für Ifapsoriasin im Kern nachgewiesen. Die N-terminale Domäne des Ifapsoriasin besitzt wahrscheinlich eine andere Funktion als die des Filaggrins. Da die verwendeten Antikörper  $\alpha$ -IFPS-2 und -4 gegen unterschiedliche Bereiche des Ifapsoriasins gerichtet sind, aber eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Zellen zeigten, kann angenommen werden, dass Ifapsoriasin eventuell in differenzierenden Zellen exprimiert und durch weitere Prozessierungsschritte der N-terminale vom C-terminalen Teil getrennt wird. Die verschiedenen Sequenzabschnitte könnten so unterschiedliche Aufgaben innerhalb der Zellen erfüllen. Eine posttranslationale Prozessierung durch Phosphatasen und vor allem Proteasen ist für Profilaggrin bekannt (Kam et al., 1993; Resing et al., 1995b; Yamazaki et al., 1997; Denecker et al., 2008). So könnte der

N-terminale Teil des Ifapsoriasins Aufgaben im Zytoplasma übernehmen, wie z. B. Regulation von weiteren Proteinen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der N-terminale Teil von Ifapsorasin nur eine geringe Halbwertszeit besitzt und innerhalb kurzer Zeit nach Translation des Proteins degradiert wird, da in kultivierten Keratinozyten auch nur vereinzelte Zellen mit dem N-terminalen Antikörper angefärbt wurden. In Gewebeschnitten wurde dieses nur vereinzelte Vorkommen des N-terminalen Fragments nicht beobachtet, hier wurden mit Hilfe des Antikörpers durchgängig die Zellen des oberen *Stratum granulosums* und *Stratum corneums* angefärbt (Abb. 3.9 und 3.12). Offensichtlich unterscheidet sich die Regulation des Proteins in Keratinozyten der Haut und kultivierten Keratinozyten. Der C-terminale Teil könnte an der Formation des "Cornified Cell Envelope" während der Differenzierung oder an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sein, wofür die Lokalisation im Bereich der Zytoplasmamembran sprechen würde.

Für Filaggrin ist eine intensive Prozessierung des Proproteins zu funktionellen Untereinheiten seit langem bekannt. Zur Aufklärung, ob diese Prozessierung auch eine Rolle für Ifapsorasin spielt, wurde versucht, das Protein aus verschiedenen Probenmaterialien zu isolieren. Mit wässrigen Puffern wie Tris-Puffer oder PBS wurde Ifapsorasin weder aus dem verwendeten *Stratum corneum* noch aus Haut extrahiert (Abb. 3.15, 3.18, 3.20). Erst durch Zusatz von SDS gelang die Extraktion sowohl aus *Stratum corneum* als auch aus Haut (Abb. 3.15, 3.18, 3.20). Diese Eigenschaft könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch Ifapsorasin als wasserunlösliches Molekül in der Zelle vorliegt, wie auch für Filaggrin und Trichohyalin bekannt (Tarcza et al., 1996; Tarcza et al., 1997; Dale et al., 1997). Zusätzlich war auch der Transfer mit Hilfe eines Detergenzien-freien Transferpuffers (3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 % Ethanol, pH 10,4) auf eine Nitrozellulose-Membran im Western Blot nicht erfolgreich. Erst nach Austausch des Natriumcarbonat-Puffers gegen einen Tris/Glycin/SDS-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS, 20 % EtOH, pH 9,0) wurden offenbar die natürlich vorkommenden Ifapsorasin-Proteine auf die Membran transferiert. Einer der Hauptunterschiede dieser Puffer lag in dem Zusatz von dem Detergenz SDS, so dass dies ein weiterer Hinweis darauf sein könnte, dass Ifapsorasin-Proteine natürlicherweise nicht wasserlöslich sind, sondern erst durch Zugabe von Detergenzien in Lösung gebracht werden können. Die rekombinant hergestellten Proteinfragmente von Ifapsorasin zeigten allerdings keinen Unterschied in Bezug auf den Transfer auf die Nitrozellulose-Membran und waren

auch problemlos in wässrigen Puffern löslich. Eventuell beruht das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten von rekombinanten und natürlich vorkommenden Fragmenten auf verschiedenen biochemischen Eigenschaften der Fragmente oder z. B. posttranslationalen Modifikationen. So liegt z. B. Profilaggrin als über 400 kDa großes, hochphosphoryliertes und unlösliches Vorläufer-Molekül in den Keratohyalin-Granula der Zellen vor und ist erst nach extensiver Prozessierung durch Phosphatasen und verschiedenen Proteasen löslich, so dass es in der Lage ist, Keratinfilamente zu aggregieren. Immunreaktives Ifapsoriasin konnte ebenfalls nicht aus *Stratum corneum*-Extrakten, die in unserer Arbeitsgruppe regelmäßig mit EtOH-Citrat-Puffer hergestellt werden, isoliert werden. Diese Ergebnisse deckten sich mit der Vermutung, dass natürlich vorkommendes Ifapsoriasin nur schlecht wasserlöslich ist.

Durch weitere Zugabe von DTT wurden zusätzlich Ifapsoriasin-Fragmente aus *Stratum corneum* und Haut isoliert (Abb. 3.18 und 3.20). DTT als Reduktionsmittel ist in der Lage, Disulfid-Brücken zu reduzieren. Ifapsoriasin ist also vermutlich nicht nur wasserunlöslich, sondern auch über Disulfid-Brücken verknüpft. Für den Aufbau und die Funktion des "Cornified Cell Envelope" ist es unerlässlich, dass die Keratinfilamente aggregiert werden. Innerhalb dieser wohl hauptsächlich durch Filaggrin verursachten Bündelung werden die Keratinfilamente zu Stabilisierung der Struktur über Disulfid-Brücken verknüpft (Matoltsy, 1976; Sun und Green, 1978). Ebenso wie Filaggrin ist zumindest ein rekombinantes murines Ifapsoriasin-Fragment *in vitro* in der Lage, Keratinfilamente zu bündeln (Dale et al., 1978; Listwan und Rothnagel, 2004). Daher könnte es als strukturelle Komponente des "Cornified Cell Envelope" ebenfalls über Disulfid-Brücken mit am Aufbau dieser Struktur beteiligt sein. Ifapsoriasin besitzt insgesamt 24 Cysteine, die ausschließlich in der N-terminalen Hälfte des Moleküls lokalisiert sind: ein Cystein befindet sich innerhalb der S100-Domäne, 19 innerhalb der aminoterminalen Spacer-Region (Aminosäuren 81-336), zwei im ersten A-Repeat und jeweils eins im A2- und A10-Repeat. Weder die Sequenzen der B-Repeats noch der C-terminale Teil des Proteins besitzen Cysteine. Daher wurden Banden im Bereich unterhalb von 40 kDa vermutlich ausschließlich mit dem Antikörper gegen den N-terminalen Spacer nach Zusatz von DTT detektiert, da alle Cystein-Reste in der N-terminalen Hälfte der Ifapsoriasin-Sequenz lokalisiert sind. Generell deutete die Existenz von Banden, die eine geringere Größe als das komplette Ifapsoriasin-Protein aufwiesen, auf



posttranslationale Prozessierung, wahrscheinlich durch Proteasen, hin. Da alle Extrakte in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren durchgeführt wurden, fand diese Prozessierung vermutlich vor der Extraktion während der Differenzierung der Zellen statt und könnte für die Funktion von Ifapsoriasin in der Zelle erforderlich sein. Durch Inkubation des bereits durch SDS und DTT behandelten Probenmaterials mit Trypsin ließ sich nochmals weiteres immunreaktives Ifapsoriasin extrahieren. Offenbar scheinen Ifapsoriasin-Fragmente nicht nur über Disulfid-Brücken sondern auch über weitere kovalente Bindungen verknüpft zu sein. Dies könnte bedeuten, dass Ifapsoriasin auch über z. B. Transglutaminierung am Aufbau des "Cornified Cell Envelope" beteiligt ist, worauf auch schon die Lokalisation in der Zellperipherie in kultivierten Keratinozyten hinwies. Die in den Western Blots analysierten Trypsin-hydrolysierten Extrakte zeigten statt der erwarteten niedermolekularen Banden vermehrt Signale im höhermolekularen Bereich von 45 kDa bis über 260 kDa. Trypsin schneidet C-terminal von Lysin- und Arginin-Resten und Ifapsoriasin besitzt über 150 theoretische Schnittstellen für dieses Enzym. Die entstehenden kleineren Ifapsoriasin-Fragmente würden vermutlich ihre Immunreaktivität verlieren, da sie zum Teil kleiner als zehn Aminosäuren sind; die größeren Fragmente besäßen eine Masse von etwa 8,5 kDa. Durch die Hydrolyse mit Trypsin jedoch wurden größere immunreaktive Fragmente extrahiert, die eventuell nicht weiter durch Trypsin in kleinere Fragmente gespalten werden konnten, weil sie durch Modifikationen wie z. B. durch Glykosylierung vor Protease-Aktivität geschützt waren. Diese hochmolekularen Signale könnten aber auch darauf hindeuten, dass kleinere Ifapsoriasin-Fragmente in der Lage sind, miteinander zu interagieren und Aggregate mit anderen Proteinen zu bilden. Das Auftreten solcher hochmolekularen Proteinaggregate wurde ebenfalls für das "S100 Fused Type Protein"-Mitglied Hornerin beschrieben (Wu et al., 2008). Darauf wiesen auch die immunreaktiven Signale der im Western Blot als Positivkontrollen verwendeten rekombinanten Ifapsoriasin-Fragmente (Abb. 3.24). Sie zeigten im Gegensatz zu einer einzigen Bande ein Muster aus mehreren Banden, die alle langsamer im Gel migrierten als von der theoretischen Masse des monomeren Proteinfragments her erwartet wurde. Diese Eigenschaften könnten durch so genannte "Glycin-Loops" zustande kommen. Ein Großteil des Ifapsoriasin-Moleküls besteht aus diesen quasi-repetitiven Glycin- und Serin-reichen "Glycin-Loops", die neben einer gewissen Anzahl an aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin auch einige langkettige

aliphatische Aminosäuren wie Valin, Isoleucin und Leucin besitzen (Steinert et al., 1991). Diese Struktur motive kommen vor allem in verschiedenen Intermediärfilamenten wie Keratinen und Laminen (Steinert et al., 1983; Steinert et al., 1991) sowie Loricrin (Hohl et al., 1991) und Corneodesmosin (Jonca et al., 2002) vor. Solche Glycin-reichen Sequenzen sollen für elastische, aber stabile Eigenschaften von verschiedenen Molekülen verantwortlich sein, so z. B. bei der Spinnenseide der Spinnenfäden (Xu und Lewis, 1990; Altman et al., 2003). Ifapsoriasin könnte damit mitverantwortlich sein für die Flexibilität der Haut, die erhöhtem mechanischen Stress standhalten muss. Eine immunreaktive Bande, deren Größe vermutlich der des intakten Ifapsoriasin-Proteins entsprach, wurde hauptsächlich in den Extrakten von Vollhaut und Epidermis nachgewiesen. Da Ifapsoriasin offensichtlich eine Rolle während der Differenzierung spielt, könnte das darauf hindeuten, dass Ifapsoriasin während der Differenzierung innerhalb des *Stratum granulosum* wie Profilaggrin prozessiert wird und daher im *Stratum corneum* als intaktes Molekül nicht mehr nachgewiesen werden konnte. In einigen Extrakten wurden Banden, die eine identische Größe aufwiesen, von beiden verwendeten Antikörpern erkannt. Ein Ifapsoriasin-Fragment, welches Epitope für diese Antikörper besäße, hätte eine theoretische Größe von etwa 238 kDa. Da das IFPS-4-Fragment das letzte der B-Repeats und den C-Terminus beinhaltet, könnte eine Kreuzreaktivität mit anderen B-Repeats bestehen, die wegen der großen Ähnlichkeit der B-Repeats untereinander (58-89 %) nicht ausgeschlossen werden kann. Doch selbst ein Molekül, das Epitope der Spacer-Region und des ersten B-Repeats besäße, hätte eine theoretische Größe von etwa 127 kDa. Diese Banden hauptsächlich im Bereich um 65 kDa können also nicht von einem Fragment stammen, welches Epitope für beide Antikörper trägt, es sei denn, dieses Molekül weist außergewöhnliche Mobilitätseigenschaften auf, so dass es im Western Blot bei einer wesentlich geringeren Größe in Bezug auf den Molekulargewichtsstandard detektiert wird. Eine Kreuzreaktivität der beiden Antikörper wurde zuvor mit dem jeweils anderen rekombinant exprimierten Protein untersucht und war nicht nachweisbar. Eine weitere Erklärung für diese Detektion der Banden wäre, dass Fragmente mit ähnlichen Massen bzw. Laufeigenschaften, jedoch unterschiedlichen Sequenzen in den Extrakten vorlagen, so dass beide Antikörper verschiedene Fragmente erkannten, die im Gel ähnliche Massen aufwiesen. Alternativ wäre denkbar, dass kleinere Ifapsoriasin-Fragmente miteinander interagieren, wie auch für

die rekombinanten Ifapsoriasin-Fragmente im Western Blot gesehen. Diese Banden könnten von zwei oder mehreren kleineren Fragmenten stammen, von denen einige Epitope besitzen, welche vom gegen den N-terminalen Spacer gerichteten Antikörper  $\alpha$ -IFPS-2 erkannt wurden, und anderen, die Epitope besitzen, welche vom gegen den C-terminalen Teil gerichteten Antikörper  $\alpha$ -IFPS-4 erkannt wurden. Solche Interaktionen, die selbst in der SDS-PAGE nicht unterbunden werden, wurden auch für humanes Hornerin nachgewiesen (Wu et al., 2008) und zeigten sich ebenfalls schon für Ifapsoriasin-Fusionsproteine. Anhand verschiedener Fusionsproteine des Corneodesmosin wurde zudem gezeigt, dass ein Serin- und Glycin-reicher N-terminaler Sequenzbereich für Interaktionen mit anderen Corneodesmosin-Molekülen verantwortlich ist und so die Ausbildung von Oligomeren begünstigt (Caubet et al., 2004).

Einige Hautkrankheiten zeigen eine massive Störung in der Ausbildung einer normalen Barriere im Sinne von ausdifferenzierenden Keratinozyten. So ist z. B. die Zeitspanne, die ein Keratinozyt normalerweise vom Verlassen des *Stratum basale* bis hin zur Abschuppung als toter Korneozyt benötigt, oftmals verändert, der Ablauf der Differenzierung ist gestört, die Haut ist entzündet. Einige chronisch entzündliche Hautkrankheiten stehen vermutlich in Bezug zu Mutationen im Bereich des epidermalen Differenzierungskomplexes, so wie Atopische Dermatitis, Ichthyosis vulgaris und eventuell Psoriasis (Übersicht in Hoffjan und Stemmler, 2007). Filaggrin-Mutationen werden als hauptauslösende genetisch bedingte Faktoren mit Atopischer Dermatitis und Ichthyosis vulgaris in Zusammenhang gebracht (Nirunskisiri et al., 1995; Seguchi et al., 1996; Gruber et al., 2007; Stemmler et al., 2007). Diese Mutationen des *Filaggrin*-Gens führen zu einem funktionslosen Protein oder zu einem Protein mit eingeschränkter Funktion und stellen daher eine Prädisposition sowohl für Atopische Dermatitis (O'Regan et al., 2008) als auch Ichthyosis vulgaris (Smith et al., 2006) dar. Bei diesen chronisch entzündlichen Hautkrankheiten kommt es zu verminderter bzw. gestörter Filaggrin-Expression, die eine normale Differenzierung der Keratinozyten behindert und eine Ausbildung der Barrierefunktion der Haut einschränkt. Da Ifapsoriasin ähnliche strukturelle Eigenschaften und Expressionsmuster im Vergleich zu Filaggrin zeigte, wurde die Immunreaktivität von Ifapsoriasin mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen in den chronisch entzündlichen Hautkrankheiten Psoriasis und Atopischer Dermatitis untersucht (Abb. 3.11). Die Färbungen von läsionalen und nicht-läsionalen Bereichen in

Psoriasis und Atopischer Dermatitis zeigten eine Verringerung der Proteinexpression von Ifapsorin in psoriatischen Läsionen, während die Expression in Atopischer Dermatitis nicht verändert zu sein schien (Abb. 3.11). Für beide Antikörper  $\alpha$ -IFPS-2 und -4 zeigte sich hierbei für die Antigene ein identisches Expressionsmuster. Offensichtlich scheint in Atopischer Dermatitis keine Beteiligung von Ifapsorin vorzuliegen, da die Expression in Bereichen von läsionaler und nicht-läsionaler Haut keinen Unterschied im Vergleich zu gesunder Haut aufwies. Nicht alle Atopische Dermatitis- oder Ichthyosis vulgaris-Patienten besitzen Mutationen im *Filaggrin*-Gen. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Expression von *Filaggrin* unter dem Einfluss der Interleukine IL-4 und IL-13 reduziert wird (Howell et al., 2007). Diese Interleukine werden den Th2-Zytokinen zugeordnet, das heißt, diese Zytokine werden hauptsächlich von T-Helferzellen des Typs 2 sekretiert. In Atopischer Dermatitis scheint das Gleichgewicht der T-Helferzellen zugunsten der Th2-Zellen verschoben zu sein (Übersicht in Böhm und Bauer, 1997; Ogg, 2008). Für Atopische Dermatitis wird auch vermutet, dass Th2-Zytokine an der Reduktion der Expression von antimikrobiellen Peptiden beteiligt sind (Ong et al., 2002; Nomura et al., 2003; Howell et al., 2005). Ob auch eine Regulation von Ifapsorin durch diese Zytokine erfolgt, ist nicht bekannt; auf Protein-Ebene zeigte sich kein Einfluss auf die Expression durch die Erkrankung. In Psoriasis wurde zwar eine verringerte Expression von Filaggrin gezeigt (Kanitakis et al., 1988), aber eine direkte Verbindung zwischen der Erkrankung und Filaggrin-Mutationen ist bisher nicht erbracht worden (Zhao et al., 2007). Es wird über eine Beteiligung der Genloci im Bereich des epidermalen Differenzierungskomplexes auf Chromosom 1q21.3 an der Entwicklung von Psoriasis diskutiert (Übersicht in Hoffjan und Stemmler, 2007). Im Gegensatz zu der Beteiligung von Th2-Zytokinen in Atopischer Dermatitis wird bei Psoriasis der Einfluss von Th1-Zytokinen als auslösende Faktoren angesehen (Ghoreschi et al., 2007). Diese Zytokine, zu denen auch das Interferon IFN- $\gamma$  zählt, steigern die Expression von Filaggrin (Howell et al., 2007), obwohl eine verminderte Präsenz des Proteins nachgewiesen wurde (Kanitakis et al., 1988). Für Trichohyalin konnte sowohl in Haut von Psoriasis als auch Ichthyosis vulgaris eine geringe Expression festgestellt werden (Ishida-Yamamoto et al., 1997; Lee et al., 1999). Die Expression von Hornerin ist in läsionaler Haut sowohl in Psoriasis als auch in Atopischer Dermatitis vor allem im *Stratum corneum* reduziert (Wu et al., 2008). Die verringerte Immunreaktivität in psoriatischen Läsionen aber nicht in unbetroffenen

Hautregionen zeigte sich ähnlich für Ifapsoriasin. Allgemein kann das verminderte Vorkommen dieser Proteine durch erhöhte proteolytische Aktivität in Hautläsionen bedingt sein (Wiedow et al., 1992; Ekholm und Egelrud, 1999) und muss nicht mit einer Mutation des Gens assoziiert sein. Offensichtlich werden die verschiedenen Mitglieder der "S100 Fused Type Protein"-Familie in den untersuchten Barrierestörungen unterschiedlich reguliert, wobei eventuell auch kompensatorische Mechanismen in Kraft treten, da trotz einer Störung in z. B. der Filaggrin-Expression oder Prozessierung immer noch eine, wenn auch gestörte, Barrierefunktion vorhanden ist.

Bei gestörter Filaggrin-Expression ist ebenfalls der Anteil der "Natural Moisturizing Factors" der Haut stark verringert, da diese hauptsächlich aus Abbauprodukten der Filaggrin-Untereinheiten gebildet werden (Kezic et al., 2008; Harding et al., 2000). Zu diesen natürlichen Feuchtigkeitsspeichern gehören vor allem Pyrrolidincarbonsäure und Urocaninsäure, Abbauprodukte der Aminosäuren Glutamin bzw. Glutaminsäure und Histidin sowie Laktat und Harnstoff (Harding et al., 2000). Der Beitrag dieser natürlichen Feuchtigkeitsspeicher ist nicht nur für die Flexibilität des *Stratum corneums* selbst und als Schutz vor Austrocknung wichtig, sondern diese Faktoren sind auch indirekt an der Aktivität verschiedener Proteasen beteiligt, die über den Wassergehalt der verschiedenen Zellschichten in der Haut reguliert werden bzw. die in der Abwesenheit von Wasser nicht aktiv sein können (Harding et al., 2000). Ifapsoriasin könnte wie Filaggrin eine Bedeutung als Lieferant und Vorläufer der "Natural Moisturizing Factors" in der Haut haben, da der Anteil mit insgesamt 25,4 % an Glutamin, Glutaminsäure und Histidin wie bei Filaggrin sehr hoch ist.

In den immunhistochemischen Untersuchungen und in der Immunfluoreszenz zeigte sich eine intensive Färbung hauptsächlich gegen den C-terminalen Teil von Ifapsoriasin sowohl in den ekkrinen Schweißdrüsenzellen als auch in den Zellen der Ausführgänge und dem Lumen selbst (Abb. 3.10, 3.13 B und C). Für einen kommerziell erwerblichen Antikörper gegen Filaggrin ("AKH1") wurde ebenfalls eine Färbung in Schweißdrüsen und im Bereich des epidermalen Ausführganges, dem Acrosyringium, gezeigt (Vigneswaran et al., 1987; Kanitakis et al., 1988). Dieser Antikörper wies allerdings Kreuzreaktivität mit Glykogen auf, so dass nach Blockierung des Antikörpers mit Glykogen keine Färbung im Bereich des Acrosyringiums mehr zu detektieren war (Vigneswaran et al., 1987). Eine Färbung der ekkrinen Drüsenzellen im Bereich der apikalen Membran konnte jedoch nicht

blockiert werden, so dass diese für spezifisch erachtet wurde (Vigneswaran et al., 1987). Das Epitop des in den hier vorliegenden Färbungen (Abb. 3.12 und 3.13) verwendeten monoklonalen Antikörpers gegen Filaggrin wurde vom Hersteller nicht näher definiert, so dass eine Kreuzreaktivität wie zuvor beschrieben nicht ausgeschlossen werden kann. Jedoch zeigte der hier verwendete Antikörper vermutlich aufgrund unterschiedlicher Epitope lediglich eine Färbung in den Zellen des Acrosyringiums, nicht aber im dermalen Abschnitt der ekkrinen Schweißdrüse (Abb. 3.13 B und C). Ifapsoriasin könnte als Protein an der strukturellen Integrität der Schweißdrüsenzellen und Zellen des Ausführungsganges beteiligt sein, obwohl die Zellen der ekkrinen Schweißdrüsen und deren Ausführungsgängen nicht verhornen. Eine wie für einen Filaggrin-Antikörper beschriebene Kreuzreaktivität kann auch für den Antikörper gegen den C-terminalen Teil von Ifapsoriasin nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der intensiven Färbung im Lumen der ekkrinen Schweißdrüse und auch im Lumen der Ausführungsgänge wurde auch sekretierter Schweiß untersucht (Abb. 3.24). Bisher wurde im ekkrinen Schweiß selbst kein Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie nachgewiesen. Immunreaktive Signale von Ifapsoriasin wurden ausschließlich in mit DTT inkubierten Schweißproben detektiert. In den Schweißproben befanden sich Partikel unterschiedlicher Größe, die abzentrifugierbar waren. Die immunreaktiven Proteine schienen sich in der partikulären Fraktion der Schweißproben zu befinden, denn nach Trennung in Überstand und Sediment durch Zentrifugation und anschließender DTT-Behandlung war Immunreaktivität für Ifapsoriasin nur in der resuspendierten Sediment-Probe nachzuweisen. Auch im Schweiß schien Ifapsoriasin nicht wasserlöslich vorzuliegen, sondern war vermutlich über Disulfid-Brücken oder andere durch DTT oxidierbare kovalente Bindungen mit weiteren Molekülen verknüpft. So könnten sich wasserunlösliche Partikel bilden, die das trübe und partikuläre Erscheinungsbild der gesammelten Schweißproben ausmachen. Selbst nach DTT-Behandlung befanden sich nach Zentrifugation immunreaktive Ifapsoriasin-Fragmente erneut ausschließlich im Sediment, woraus sich schließen ließ, dass auch die Hydrolyse von Disulfid-Brücken die Löslichkeit der Fragmente nicht erhöhte. Zudem könnten weitere, nicht kovalente Wechselwirkungen die Ursache dafür sein, dass Ifapsoriasin-Proteine zwar nach DTT-Behandlung im Western Blot detektiert wurden, aber sich dennoch mit der partikulären Fraktion abzentrifugieren ließen. Diese Wasser-Unlöslichkeit selbst im wässrigen Schweiß könnte zur Folge haben, dass Ifapsoriasin-Fragmente nicht

sofort von der Haut gewaschen werden, sondern eine längere Verweildauer auf der Hautoberfläche aufweisen. Im Gegensatz zu z. B. Psoriasin, das ein antimikrobiell aktives S100-Protein der Haut darstellt (Gläser et al., 2005), kann Ifapsoriasin in wässrigen Spüllösungen nicht detektiert werden. Vermutlich soll diese Unlöslichkeit verhindern, dass Ifapsoriasin-Fragmente vorschnell von der Hautoberfläche entfernt werden. Eine Isolierung der immunreaktiven Fragmente für Strukturanalysen war auch aus Schweißproben bisher nicht erfolgreich, denn selbst in mit DTT behandeltem Schweiß befand sich das gesamte immunreaktive Ifapsoriasin im wasserunlöslichen Sediment. Eine Hydrolyse durch eine Endoprotease mit einer geringen Anzahl an Schnittstellen in der Proteinsequenz könnte eventuell Fragmente von Ifapsoriasin generieren, die wasserlöslich wären und sich anschließend mit Hilfe von Umkehrphasen-HPLC auftrennen und massenspektrometrisch analysieren ließen. So könnten genauere Aussagen über die Identität der natürlich vorkommenden Ifapsoriasin-Fragmente getroffen werden.

Hornerin-Fragmente, die aus *Stratum corneum* extrahiert worden waren, wurden in HPLC-Fractionen mit antimikrobieller Aktivität identifiziert (Doktorarbeit Z. Wu.). Ifapsoriasin zeigt vor allem in den Bereichen der A-Repeats eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Hornerin. Zusätzlich zeigte Ifapsoriasin in der Haut vorrangig eine Expression im oberen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*, also direkt an einer der Oberflächen, die am häufigsten mit potenziellen Pathogenen in Kontakt treten. Daher wurde überprüft, ob rekombinante Ifapsoriasin-Fragmente antimikrobielle Aktivität besitzen, die zur Barriere- und Abwehrfunktion der Haut beitragen könnte. Dabei wurden typische Vertreter der gram-positiven und gram-negativen Bakterien und *Candida albicans* als Hefe getestet. Für IFPS-3, welches die Region der A-Repeats repräsentierte, konnte in keinem der angewendeten Testsysteme antimikrobielle Aktivität festgestellt werden (Tab. 3.1). Das IFPS-2-Fragment mit einer Teilsequenz des N-terminalen Spacers zeigte eine mit Psoriasin vergleichbar hohe Aktivität gegen *E. coli*. Das C-terminale Fragment IFPS-4, das die letzte B-Repeat-Region und den kompletten C-Terminus beinhaltetete, zeigte vorrangig hohe Aktivität gegen Pseudomonaden wie verschiedene *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme sowie *Pseudomonas stutzeri*. Anhand der zusätzlich in rekombinanter Form hergestellten Ifapsoriasin-Fragmente, die sowohl das vorletzte B-Repeat (IFPS-B13) als auch das letzte B-Repeat (IFPS-B14) und den C-Terminus (IFPS-C-Term) umfassten, konnte die antimikrobielle Aktivität

ausschließlich im Bereich des C-Terminus lokalisiert werden. Dieses IFPS-C-Term-Fragment war wie das zuvor getestete IFPS-4-Fragment vorrangig gegen Pseudomonaden aktiv, wenn auch die berechneten bakteriziden Konzentrationen höher lagen als für IFPS-4. Ein durch Mutation nochmals carboxyterminal verkürztes Fragment des IFPS-C-Term-Fragments zeigte ebenfalls Aktivität gegen Pseudomonaden, aber in nochmals erhöhten Konzentrationen. Mit Verkürzungen der Sequenz wurde die antimikrobielle Aktivität geringer; auch wenn die fehlenden Sequenzteile wie im Fall der B-Repeats selber keine Aktivität zeigten, schienen sie doch die Abtötungseffizienz des C-terminalen Fragments zu steigern. Mit der Verkürzung der Sequenz des C-terminalen Fragments erniedrigte sich auch der theoretisch berechnete pI-Wert des Proteins. Während das IFPS-4-Fragment noch einen pI-Wert von 10,18 besitzt, verringerte dieser sich für IFPS-C-Term auf 9,87 und für IFPS-C-Term short auf 9,69. Da viele der antimikrobiell aktiven Proteine kationisch sind (Hancock und Diamond, 2000), könnte durch diese Erniedrigung des pI-Wertes zumindest ein Teil der antimikrobiellen Aktivität des Ifapsoriasin-C-Terminus vermindert werden.

Das C-terminale Ifapsoriasin wurde mit Hilfe des Antikörpers  $\alpha$ -IFPS-4 anhand einer intensiven Färbung in ekkrinen Schweißdrüsen, in Zellen der Ausführungsgänge und im Lumen selbst angefärbt. Dies deutet auf eine Sekretion des C-terminalen Fragments hin. Ekkrine Schweißdrüsen weisen die höchste Dichte in den Handinnenflächen und Fußsohlen auf, also in Bereichen des Körpers die regelmäßig mit Erdboden in Kontakt kommen, wenn der Schutz dieser Körperteile durch Kleidung nicht vorhanden wäre. Pseudomonaden sind typische Bodenbakterien, die vor allem mit diesen Körperregionen in Berührung kommen. Da die Schweißdrüsen über eine physikalisch ungeschützte direkte Öffnung nach außen verfügen, stellt diese Pore für potenziell pathogene Mikroorganismen eine Möglichkeit dar, in die Haut einzudringen. Die Schweißdrüsen bzw. deren Ausführungsgänge bieten Bakterien hinreichende Wachstumsbedingungen. Durch die Sekretion von Schweiß, der unterschiedliche Salze sowie Proteine und auch Lipide enthält (Takemura et al., 1989; Schitteck et al., 2001), stehen den Bakterien verschiedene Moleküle als Nahrungsquelle zur Verfügung, die Absenkung der Schweißdrüsengänge bietet Schutz gegenüber der Umwelt und es herrscht eine relativ gleich bleibende Temperatur, die vom Wirt reguliert wird. Der Körper besitzt im Gegenzug wenn auch keine physikalische, eine chemische Barriere in Form von antimikrobiellen Proteinen



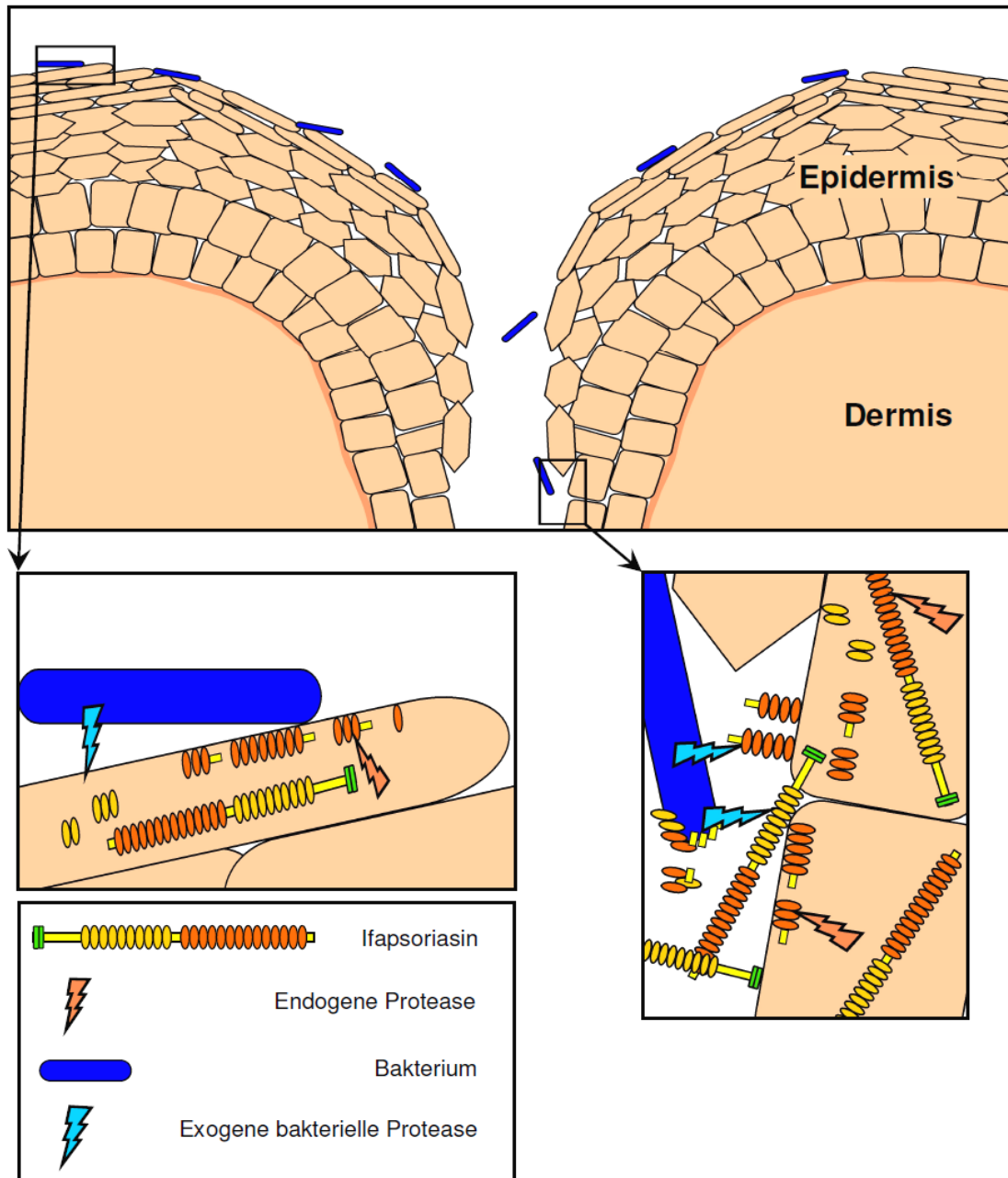
(Harder und Schröder, 2002; Gläser et al., 2005; Harder et al., 2007; Schitteck et al., 2008). Im Schweiß wurde als antimikrobielles Protein bisher nur Dermcidin und daraus entstehende Proteinfragmente nachgewiesen (Rieg et al., 2005; Rieg et al., 2006). Eine Expression des Cathelicidins LL-37 wurde zunächst sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in den Zellen der Schweißdrüsen und Ausführungsgänge sowie im Schweiß selber nachgewiesen (Murakami et al., 2002), die jedoch in aktuelleren, massenspektrometrischen Analysen nicht bestätigt wurde (Rieg et al., 2006). Hier wurde weder das intakte LL-37 noch Proteinfragmente detektiert. Dermcidin und daraus entstehende Proteinfragmente werden vermutlich zum Teil durch die Protease Cathepsin D gebildet, welche ebenfalls im ekkrinen Schweiß nachweisbar war (Baechle et al., 2006). Die aus dieser Prozessierung resultierenden Proteinfragmente von Dermcidin, die auch in den hier verwendeten Schweißproben teilweise identifiziert wurden (siehe 3.3.6), zeigten unterschiedliche Effektivität in ihrer antimikrobiellen Aktivität, jedoch wies keines der untersuchten Dermcidin-Fragmente Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* auf (Steffen et al., 2006). Ifapsoriasin bzw. ein C-terminales Fragment wäre hier in der Lage, das antimikrobielle Spektrum im ekkrinen Schweiß mit Aktivität vorrangig gegen Pseudomonaden und eventuell auch andere Bodenbakterien zu ergänzen und erweitern.

Der C-terminale Sequenzbereich könnte also eine wichtige Funktion in der antimikrobiellen Abwehr der Haut einnehmen. Daher wurde die humane C-terminale Ifapsoriasin-Aminosäuresequenz zunächst mit der murinen Sequenz verglichen. Eine Region von 53 Aminosäuren erwies sich im Vergleich zwischen Mensch und Maus als sehr konserviert. Mit dieser Sequenz wurde in den zur Verfügung stehenden Datenbanken auf genomischer Ebene und in ESTs nach putativen Orthologen gesucht, um die Konservierung dieser C-terminalen Sequenz innerhalb verschiedener Spezies beurteilen zu können. In dieser Datenbanksuche wurden weitere Sequenzen von allen untersuchten Säugetierspezies mit Ausnahme des Dreizehnstreifenziesel gefunden (Abb. 3.25). Diese insgesamt 25 Sequenzen wiesen einen C-terminalen 53-Aminosäuren-langen Bereich auf, der in allen Spezies hochkonserviert ist. Außerhalb der Klasse der Säugetiere konnten keine weiteren putativen Orthologe gefunden werden. Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der konservierten Sequenz waren zum Teil ähnlich mit den tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnissen (Abb. 3.26).

Sollte der C-terminale Teil tatsächlich physiologisch relevante antimikrobielle Aktivität gegen Pseudomonaden oder andere Bodenbakterien besitzen, ist auffällig, dass diese C-terminale konservierte Sequenz offenbar nur innerhalb der Säugetiere verbreitet ist. Säuger sind die einzige Tierklasse, die ekkrine Schweißdrüsen besitzen. Dies könnte bedeuten, dass die nachgewiesene Expression in Schweißdrüsen und Schweiß selbst im Zusammenhang mit der Entwicklung von Schweißdrüsen steht. Bei Menschen sind die Schweißdrüsen zwar über den ganzen Körper verteilt, besitzen aber die höchste Dichte in den Handflächen und Fußsohlen. Diese Körperregionen kommen hauptsächlich in Kontakt mit dem Erdboden. Ähnlich verhält es sich auch bei anderen Säugern. Ekkrine Schweißdrüsen kommen im Allgemeinen vor allem in den Körperbereichen vor, die nicht von Fell bedeckt sind. Das sind bei vielen Tieren hauptsächlich die Bereiche der Pfoten und Schnauzen, also die Körperteile, die während der Fortbewegung oder Nahrungssuche auch in Kontakt mit dem Erdboden kommen. Eine mögliche antimikrobielle Aktivität des C-terminalen Ifapsoriasins könnte also einhergehen mit der Evolution von Schweißdrüsen und der sich daraus ergebenden Notwendigkeit, die Drüsen vor eindringenden Mikroorganismen schützen zu müssen.

Aufgrund dieser C-terminalen Sequenzkonservierung wurde untersucht, ob der gegen das C-terminale Fragment gerichtete Antikörper  $\alpha$ -IFPS-4 Kreuzreaktivität gegen das Ifapsoriasin der Maus besitzt. Immunhistochemische Untersuchungen wurden an verschiedenen Geweben der Maus durchgeführt (Abb. 3.27). Das Expressionsmuster deckte sich mit dem des humanen Ifapsoriasins. Eine Immunfärbung war im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* nachweisbar. Zusätzlich wurde eine Expression in den filiformen Papillen der Zunge gezeigt, wo auch alle bisher untersuchten "S100 Fused Type Protein"-Mitgliedern exprimiert werden. Die Zunge, die während Nahrungssuche und -aufnahme ebenfalls in Kontakt mit dem Erdboden kommt, könnte so gegen potenziell pathogene Bodenkeime geschützt sein. Die Zungenoberfläche stellt ebenso wie die Haut eine Barriere dar, die verstärkt mit Bodenbakterien in Kontakt kommt und auch das Zungenepithel enthält eine Vielzahl an Drüsen die ähnlich wie Schweißdrüsen vor dem Eindringen von Mikroorganismen geschützt werden müssen. Da der verwendete Antikörper aber nicht spezifisch gegen die murine Sequenz generiert oder aufgereinigt wurde, muss die Spezifität weitergehend untersucht werden.

Aufgrund der Protein-Analysen könnte Ifapsoriasin in gesunder Haut strukturelle Funktionen während der terminalen Differenzierung von Keratinozyten übernehmen und ist vermutlich ein Bestandteil des "Cornified Cell Envelope", der während dieses Prozesses aufgebaut wird. Hinweise auf endogene Prozessierung in kleinere Fragmente vermutlich im *Stratum granulosum* lassen darauf schließen, dass Ifapsoriasin durch körpereigene Proteasen kontrolliert hydrolysiert wird (Abb. 4.1). Eine Sekretion von Ifapsoriasin oder Fragmenten wurde im *Stratum corneum* nicht nachgewiesen. In den Schweißdrüsen bzw. deren Ausführungsgang sind die äußersten Zellen nicht verhornt. Hier wird Ifapsoriasin nicht nur in den Zellen synthetisiert, sondern auch über den Schweiß vermutlich in das Lumen abgegeben. Zusätzlich zu alternativen Strukturfunktionen könnte es hier eventuell auch zur antimikrobiellen Abwehr beitragen. Die Generierung von antimikrobiell aktiven Fragmenten könnte statt durch körpereigene endogene auch durch von Bakterien sezernierten exogenen Proteasen erfolgen. Da Ifapsoriasin auch im Schweiß gefunden wurde, kommt es in den Schweißdrüsen und Ausführungsgängen direkt mit Bakterien in Kontakt (Abb. 4.1). Nicht nur Ifapsoriasin könnte als Vorläufer-Molekül für antimikrobielle Peptide dienen, sondern auch weitere Proteine, die im Schweiß oder im Ausführungsgang vorhanden sind. Für die Generierung von antimikrobiell aktiven Fragmenten kämen aber auch körpereigene Proteasen in Frage, wie z. B. das im Schweiß nachgewiesenen Cathepsin D. Ifapsoriasin-Fragmente, die als Fusionsproteine im pET-System exprimiert wurden, wiesen bei der Hydrolyse mit Enterokinase eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber des Enzyms auf (siehe Abb. 3.4). Lediglich der Thio-redoxin-Fusionsteil wurde in einigen Fraktionen der C4-Umkehrphasen-HPLC nachgewiesen, nicht aber ein intaktes Ifapsoriasin-Fragment. Daher kann vermutet werden, dass Ifapsoriasin-Fragmente auch *in vivo* bereits durch geringe endogene oder exogene Protease-Konzentrationen hydrolysiert werden könnten. Verschiedene Aggregate unterschiedlicher Fragmente von Ifapsoriasin oder auch anderen Proteinen könnten zusätzlich die antimikrobielle Aktivität verstärken. Bei einer gestörten Barrierefunktion sind Bakterien oftmals in der Lage, die Haut zu kolonisieren. Zerstören sie hierbei die Zellen des *Stratum corneums*, könnten sie auch hier ähnliche antimikrobielle Proteine aus Ifapsoriasin-Fragmenten generieren.



**Abb. 4.1: Potenzielle Funktionen von Ifapsorin in der Haut.** Dargestellt ist schematisch eine Schweißpore in der Haut (oben). Im *Stratum corneum* wurde keine Sekretion von Ifapsorin oder dessen Fragmenten nachgewiesen. Dort übernimmt es wahrscheinlich in gesunder Haut vorrangig die Funktion eines Strukturproteins (linke Vergrößerung). Ifapsorin wird vermutlich durch endogene Proteasen prozessiert, mit bakteriellen Proteasen kommt es nur bei einer Zerstörung des *Stratum corneum*s durch Bakterien in Kontakt. In der Schweißdrüse bzw. dessen Ausführungsgang sind die äußersten Zellen nicht verhornt, hier wird Ifapsorin nicht nur in den Zellen synthetisiert, sondern auch über den Schweiß vermutlich in das Lumen abgegeben (rechte Vergrößerung). Zusätzlich nimmt es hier eventuell auch an der antimikrobiellen Abwehr teil. Die Generierung von antimikrobiell aktiven Fragmenten könnte entweder durch körpereigene endogene oder von Bakterien sezernierten exogenen Proteasen stattfinden. Verschiedene Aggregate oder Fragmente von Ifapsorin oder auch anderen Proteinen könnten die antimikrobielle Aktivität verstärken.

## 4.1 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Expression von humanem Ifapsoriasin untersucht und wurde vorrangig in der Haut im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* sowie in ekkrinen Schweißdrüsen lokalisiert. Für einige Mitglieder der "S100 Fused Type Protein"-Familie ist eine Expression in oder Assoziation mit Keratohyalin- oder Trichohyalin-Granula nachgewiesen worden. Da es in den Immunfluoreszenz-Untersuchungen erste Hinweise auf unterschiedliche Lokalisationen von verschiedenen Sequenzteilen des Ifapsoriasin-Proteins gab, können Doppelfärbungen mit Zellkompartiment-spezifischen Antikörpern und Ifapsoriasin-Antikörpern weiteren Aufschluss über die genaue Lokalisation der Fragmente geben. Die Proteinexpression kann durch immunhistochemische Färbungen von zusätzlichen Geweben genauer untersucht und mit den Mitgliedern der Proteinfamilie verglichen werden. Da die Ifapsoriasin-Antikörper gegen Bereiche der Proteinsequenz generiert wurden, die eine hohe Identität zur Maus-Sequenz aufweisen, zeigt vermutlich nicht nur der gegen den C-Terminus gerichtete Antikörper Kreuzreaktivität, so dass die Möglichkeit besteht, weitere Mausgewebe zu untersuchen. Ferner sollten Expressionsanalysen in der Maus auch auf mRNA-Ebene ausgeweitet werden, um mehr Aufschluss über die Regulation des Expressions- und Prozessierungsmuster des murinen Ifapsoriasins zu gewinnen. Bereits mRNA-Daten aus Zhihong Wus Doktorarbeit weisen darauf hin, dass auch die Ifapsoriasin-Expression  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig reguliert ist, wie es auch für Trichohyalin, Repetin, Hornerin, Filaggrin und Cornulin gezeigt wurde (Dale et al., 1983; Ishida-Yamamoto et al., 1997; Makino et al., 2001; Huber et al., 2005; Contzler et al., 2005). Auf Proteinebene wurden dazu noch keine Analysen durchgeführt.

Die Extraktion von Ifapsoriasin aus gesunder Haut war zwar erfolgreich, dennoch konnte trotz verschiedenster Extraktionen noch kein natürliches Ifapsoriasin-Fragment zur Sequenzidentifizierung isoliert werden. Durch Behandlungen von Haut- oder Schweißproben mit verschiedenen Endoproteasen wären Ifapsoriasin-Fragmente eventuell ohne interferierende Pufferbestandteile in Lösung zu bringen und für weitere Analysen verfügbar.

Der  $\alpha$ -IFPS-4-Antikörper ist sowohl gegen das letzte B-Repeat als auch den C-Terminus gerichtet. Beide Sequenzteile wurden bereits separat erfolgreich exprimiert, so dass über eine weitere Aufreinigung des Antikörpers spezifische Antikörper für die B-Repeats und den C-Terminus getrennt isoliert werden können.

---

Darüber hinaus wurde in antimikrobiellen Tests eine hohe Aktivität des N-terminalen Spacers gegen *E. coli* und des C-terminalen Fragments vorrangig gegen Pseudomonaden gezeigt. Diese antimikrobielle Aktivität sollte auf Salz- und pH-Wert-Empfindlichkeit und gegen weitere typische Bodenbakterien untersucht werden, um die physiologische Relevanz im Detail zu analysieren.

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnte also ein erster Einblick in die Expression und Funktion des humanen Ifapsoriasins erlangt werden; allerdings stehen noch weitere Analysen aus, um den Beitrag des Proteins zur Barrierefunktion der Haut und anderer Epithelien genauer zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Die "S100 Fused Type"-Proteine sind strukturell sich nahe stehende Mitglieder einer Proteinfamilie, die hauptsächlich in Haut und Hautanhangsgebilden exprimiert werden und am Prozess der terminalen Differenzierung von Keratinozyten beteiligt sind. Ifapsoriasin (auch Filaggrin-2 genannt) zeigt als Mitglied die für diese "S100 Fused Type Protein"-Familie typische Proteinstruktur. Neben N-terminalen S100- und EF-Hand-Domänen besitzt Ifapsoriasin eine N-terminale Spacer-Region gefolgt von zwei Arten multipler Tandemsequenzwiederholungen (A und B) und einer C-terminalen Region.

In dieser Arbeit konnten Teile dieses Proteins näher charakterisiert werden. Immunhistochemische Analysen mit Antikörpern, die gegen unterschiedliche Ifapsoriasin-Teilstrukturen generiert worden waren, zeigten eine Expression in der Haut hauptsächlich in den ausdifferenzierenden Keratinozyten des oberen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* sowie in ekkrinen Schweißdrüsen und deren Ausführungsgängen. Ifapsoriasin wies somit ein ähnliches Färbungsmuster wie die bisher analysierten Mitglieder der "S100 Fused Type Protein"-Familie wie Trichohyalin, Repetin, Hornerin, Filaggrin und Cornulin auf. Ifapsoriasin könnte daher ein struktureller Bestandteil des "Cornified Cell Envelope", einer unlöslichen Anordnung untereinander kovalent verknüpfter Proteine, die während der terminalen Differenzierung von Keratinozyten sukzessive die Plasmamembran ersetzt, sein. Natürliches Ifapsoriasin ist vermutlich ein in Wasser unlösliches Protein, das über Disulfid-Brücken und möglicherweise auch andere kovalente Bindungen wie Transglutaminase-Vernetzungen verknüpft ist, um zum Aufbau des "Cornified Cell Envelope" beizutragen.

In Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von Ifapsoriasin wurde keine Aktivität innerhalb der A- oder B-Repeat-Sequenzen nachgewiesen, allerdings zeigte der C-terminale Sequenzteil eine hauptsächlich gegen Pseudomonaden gerichtete Aktivität. Pseudomonaden sind Bakterien, die typischerweise in Boden und Wasser vorkommen und daher Feuchtigkeit zum Wachstum benötigen – eine Bedingung, die in Schweißdrüsen vorherrscht. Schweißdrüsen besitzen mit der Schweißpore eine physikalisch ungeschützte Öffnung für Mikroorganismen, bieten diesen Nahrung, Schutz und ausreichend Feuchtigkeit und stellen daher einen idealen Platz für eine Kolonisation dar. Schweißdrüsen besitzen in menschlicher Haut die höchste Dichte

in den Handinnenflächen und Fußsohlen, also in Körperregionen, die häufig in Kontakt mit dem Erdboden kommen. Ifapsoriasin-Fragmente könnten daher als antimikrobielle Peptide fungieren, die vor allem in Hautregionen vorhanden sind, die eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen durch Bodenbakterien aufweisen. Die C-terminale und antimikrobiell aktive Sequenz des Ifapsoriasins zeigte eine hohe Konservierung innerhalb aller untersuchten Säugetier-Spezies mit lediglich einer Ausnahme. Interessanterweise ist die Klasse der Säugetiere die einzige Klasse des Tierreichs, die ekkrine Schweißdrüsen entwickelt haben. Diese befinden sich vor allem in Körperbereichen, die nicht mit Fell bedeckt sind. Die Präsenz dieser konservierten C-terminalen Sequenz ausschließlich in Säugetieren könnte also mit der Evolution von ekkrinen Schweißdrüsen korrelieren, die gegen das Eindringen von Mikroorganismen geschützt werden müssen.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Proteine, für die bisher vorrangig eine Beteiligung an morphologischen und strukturellen Veränderungen von Keratinozyten während der Differenzierung gezeigt worden war, auch als aktive Faktoren in der Barrierefunktion der Haut in Betracht gezogen werden könnten.



## 6 Summary

The S100 Fused Type Proteins are a family of structurally related proteins that are mainly expressed in skin or skin appendages and are known to contribute to the process of terminal differentiation of keratinocytes in mammalian skin. A member of this family, Ifapsoriasin (also termed Filaggrin-2), shows on protein level the typical conserved structure of the "S100 Fused Type Proteins". It has N-terminal S100- and EF-hand domains, followed by an N-terminal spacer region, two kinds of multiple tandem repeats (A and B) and a C-terminal region.

In this study parts of the Ifapsoriasin protein could be further characterized. With antibodies generated against different domains of Ifapsoriasin, immunohistochemical analyses revealed protein expression in skin, mainly in the differentiating keratinocytes of the upper *stratum granulosum* and *stratum corneum*, and in eccrine sweat glands and ducts. The Ifapsoriasin protein shows a similar expression pattern in comparison to the other characterized members of the "S100 Fused Type Protein" family such as Trichohyalin, Repetin, Hornerin, Filaggrin, and Cornulin. Ifapsoriasin may be a part of the cornified cell envelope, an insoluble highly crosslinked protein structure that replaces the plasma membrane of keratinocytes during the process of terminal differentiation. Extraction analyses suggest that the Ifapsoriasin protein is naturally insoluble and might be covalently bound via disulfide bonds and other covalent bonds, possibly transglutaminase crosslinkage, to participate to the structure of the cornified cell envelope.

Antimicrobial activity analyses of Ifapsoriasin fragments did not show any activity of the repeat domains but localized a preferentially pseudomonads-killing activity solely to the C-terminus. The pseudomonads are bacteria typically found in soil and water and thus require humidity for their growth – a predominant condition in sweat glands and ducts. Especially sweat glands offer with the sweat pore a physically unprotected entrance for micro-organisms into the host and provide nutrition, shelter and humidity, therefore being an ideal place for colonization by micro-organisms. Sweat glands show highest density in human skin in the palm of hands and sole of feet - areas frequently in contact with soil. Ifapsoriasin fragments may represent antimicrobial peptides that show strongest expression at skin areas that are principally prone for infection by soil bacteria. The C-terminal and antimicrobial active part of Ifapsoriasin was highly conserved among all analyzed mammalian species

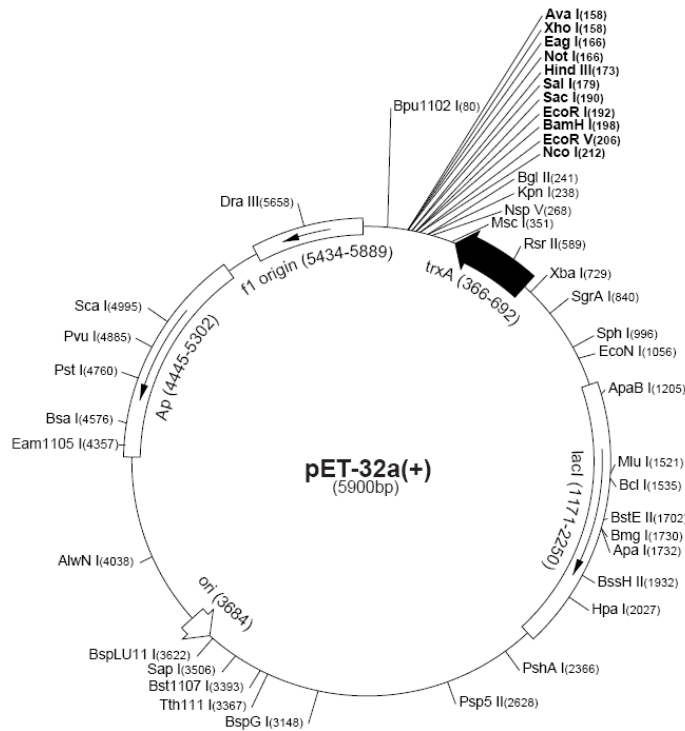
with only one exception. Interestingly, the class of mammals is the only class in animal kingdom that developed eccrine sweat glands, mainly at parts of the body that are not covered with fur. This implicates a correlation between the presence of this conserved C-terminal sequence only in mammalian species and the evolution of sweat glands that have to be protected against invading micro-organisms.

In conclusion, these results show that proteins known primarily to be involved in the morphological and structural changes of keratinocytes during differentiation of skin or hair should be considered to contribute to the skin's defense barrier.

## 7 Anhang

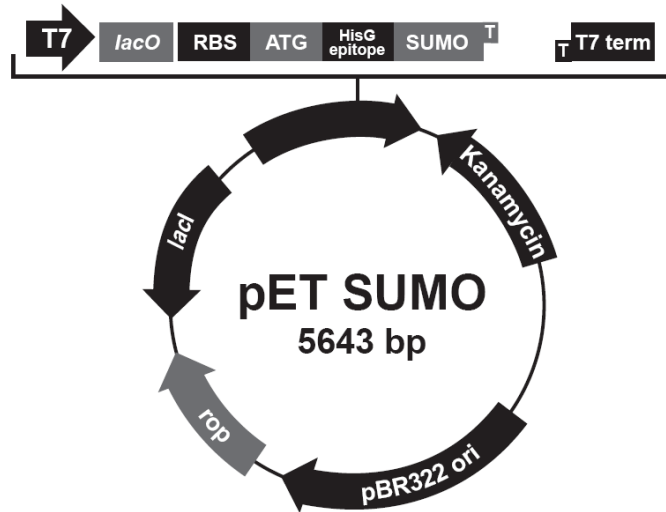
### 7.1 Vektorkarten

#### 7.1.1 pET-32a-Vektor



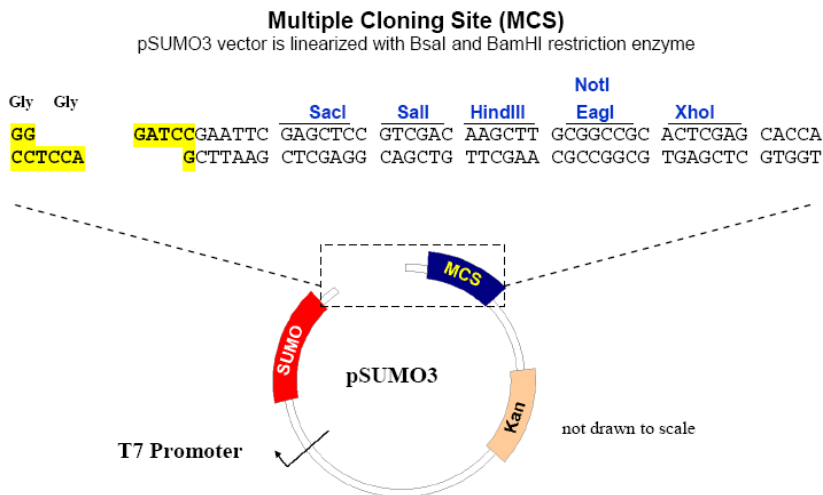
**Abb. 7.1: Schematische Darstellung des pET-32a-Expressionsvektors.** Eingezeichnet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme und als Kästen bzw. Pfeile markiert verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Die Ausrichtung der Pfeile gibt die Orientierung der Gensequenz wieder. Ap: *bla*-kodierende Sequenz verantwortlich für die Ampicillin-Resistenz; f1 origin: Replikationsursprung für f1-Phagen; lacI: *lacI*-kodierende Sequenz; ori: Replikationsursprung für *E. coli*; trxA: kodierende Sequenz für den Thioredoxin-Abschnitt. (Aus: pET system manual, 11th edition, Novagen.)

### 7.1.2 pET SUMO-Vektor



**Abb. 7.2: Schematische Darstellung des pET SUMO-Expressionsvektors.** Eingezeichnet sind als Kästen bzw. Pfeile verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Die Ausrichtung der Pfeile gibt die Orientierung der Gensequenz wieder. Kanamycin: Gen für die Kanamycin-Resistenz; lacI: *lacI*-kodierende Sequenz; pBR322 ori: Replikationsursprung; rop: kodierende Sequenz für das "repressor of primer"-Protein verantwortlich für Anzahl der Plasmidkopien; T7: T7 Promotor; *lacO*: *lac*-Operator; RBS: "ribosomal binding site", Ribosomenbindungsstelle; ATG: Startkodon; HisG epitope: N-terminale Polyhistidin-Glycin-kodierende Sequenz; SUMO: SUMO-kodierende Sequenz; T7 term: T7 Terminator-Sequenz. (Aus: Champion™ pET SUMO Expression System manual, Invitrogen.)

### 7.1.3 pSUMO3-Vektor



**Abb. 7.3: Schematische Darstellung des pSUMO3-Expressionsvektors.** Eingezeichnet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme und als Kästen verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Kan: Gen für Kanamycin-Resistenz; MCS: "Multiple Cloning Site"; SUMO: SUMO-Gensequenz. (Aus: Polylinker map (pSUMO3 vector, T7 Kan), LifeSensors.)

## 7.2 Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleinsäuren

Tab. 7.1: Abkürzungen der Aminosäuren

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Iso	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Try	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Tab. 7.2: Abkürzungen der Nukleinsäuren

Base	Nukleosid	Abk.
Adenin	Adenosin	A
Guanin	Guanosin	G
Cytosin	Cytidin	C
Thymin	Thymidin	T

## 7.3 Sequenzen

### 7.3.1 cDNA- und Protein-Sequenz des humanen Ifapsoriasins

Die cDNA-Sequenz umfasst 9147 bp, die Protein-Sequenz 2391 Aminosäuren. Sowohl die cDNA- als auch die Protein-Sequenz des humanen Ifapsoriasins sind über die NCBI-Zugangsnummer AY827490 auf der NCBI-Seite unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> verfügbar.

### 7.3.2 Übersicht der rekombinanten Proteinfragmente von Ifapsorin

#### 7.3.2.1 IFPS-1

Nukleotidsequenz (bp 76-312)

```
accgacctcttgagaagtgtgtgtcaccgtaattgatggttttctacaaatacaccaagcaagatgggga
gtgtggcacactgagcaaggggtgaactaaaggaacttctggagaaagagcttcatccagttctgaaga
accagatgatccagacacagtgatgtcatcatgcatatgctggatcgagatcatgacagaagattg
gactttactgagtttcttttgatgatattcaag
```

**Proteinsequenz (Aminosäuren 2-80)**

TDLLRSVVTVIDVFYKYTKQDGECSGLSKGELKELLEKELHPVLKPNPDDPDTVDVIMHMLDRDHDRRL  
DFTEFLLMIFK

**7.3.2.2 IFPS-2****Nukleotidsequenz (bp 358-777)**

gcttcagggtcaaagaagcataggcgtggtcaccgacaccaagaagaagaaagtgaaacagaagagga  
tgaagaggatacaccaggacataaatcaggttacagacattcaagttggagtgagggagaggagcatg  
gatatagttctgggactcaaggggaactgtgaaatgtagacatgggtccaactccaggaggctagga  
agacaaggtaatttatccagctctgggaaccaagaggatctcagaaaagataccacaggtccagctg  
tggctattcatggagtgggtggcaagacagacatgggtccagctctgtagaactgagagaaagaataa  
acaagtcacacattagcccttctagggaaatctggggaggagtatgaatctggatctggatcaaacagt  
tgggaaaggaaa

**Proteinsequenz (Aminosäuren 96-235)**

ASGSKKHRRGRHRHQEESETEDEEDTPGHKSGYRHSWSEGEHGYSSGHSRGTVKCRHGNSRRLG  
RQGNLSSSGNQEGSQKRYHRSSCGHSWSGGKDRHGSSVELRERINKSHISPSRESGEEYESGSGSNS  
WERK

**7.3.2.3 IFPS-3****Nukleotidsequenz (bp 2928-3159)**

tcaggctcaggccaatcctctggctttggccaacatggatcaggctcaggctcagtcctctggctttgg  
acaacatgagtcaggctcaggaaaatcctctggctttggacagcatgagtcctagatcaagtcagtcct  
attatggccaacatgggtctctggctcaagtcagtcctctggctatgggtcaacatgggtctagttcagga  
cagacaactggctttggacaacacagg

**Proteinsequenz (Aminosäuren 953-1029)**

SGSGQSSGFGQHSGSGQSSGFGQHESGSGKSSGFGQHESSRSQSNYQHGSGSSQSSGYQHSGSSG  
QTTGFGQHR

**7.3.2.4 IFPS-4****Nukleotidsequenz (bp 6802-7248)**

gggtccaggacaactggaagaaggggatctggccacagtgagtcagtgacagtgaaagtcactcatg  
gggtcacacacacattcaggacacattcaggccaagctggatctcaacaaagacagccaggatcca  
cagttcatgggagactggaaactactcatggacagacaggagataccactagacatggcattctgggt  
tatggacaatccacacagacaggtccagatctagtagagcaagtcattttcagtcacatagtagtga  
aaggcaaaggcatggatcaagtcaggtttggaacatggcagctatggacctgcagaatagactatg  
ggcactgggtatgggccttctgggtggcagcagaaaaagcatcagtaattctcacctttcatgggtca  
acagacagcactgcaaaacaagcaactgtctagacattga

**Proteinsequenz (Aminosäuren 2244-2391)**

GSRTTGRRGSGHSESSDSEVHSWGSHTHSGLHIQQAGSQQRQPGSTVHGRLETTGQTDTRRHGSG  
YGQSTQTGSRSSRASHFQSHSSERQRHGSSQVWKHGSYGAPEYDYGHTGYGPGSGSRKSISSNHLWS  
TDSTANKQLSRH

### 7.3.2.5 IFPS-B13

#### Nukleotidsequenz (bp 6586-6810)

Acaactggaagacaaagatctagt cacagtgagtc cagtgatagtg aagtgcactc agaggcctcacc  
cacacattcaggacacactcacagccaagccggatctcgacatggacagtcaggatcctcaggtcatg  
ggagacagggaaactactcatggacagacaggagataccactagacatgcccactatggttatggacaa  
tccacacagagaggggtccagg

#### Proteinsequenz (Aminosäuren 2172-2246)

TTGRQRSSHSESSDSEVHSEASPTHSGHTHSQAGSRHGQSGSSGHGRQGTTHGQTGDTTRHAHYGYGQ  
STQRGSR

### 7.3.2.6 IFPS-B14

#### Nukleotidsequenz (bp 6811-7035)

acaactggaagaaggggatctggccacagtgagtc cagtgacagtg aagtgcactcatggggctcaca  
cacacattcaggacacattcagggccaagctggatctcaacaaagacagccaggatccacagttcatg  
ggagactggaaactactcatggacagacaggagataccactagacatggccattctggttatggacaa  
tccacacagacaggttccaga

#### Proteinsequenz (Aminosäuren 2247-2321)

TTGRRSGHSESSDSEVHSWGSHTHSGHIQQQAGSQRQPGSTVHGRLETTGQTGDTTRHGHSGYGQ  
STQTGSR

### 7.3.2.7 IFPS-C-Term

#### Nukleotidsequenz (bp 7036-7245)

tctagtagagcaagtcattttcagtcacatagtagtgaaaggcaaaggcatggatcaagtcaggtttg  
gaaacatggcagctatggacctgcagaatagactatgggcacactgggtatgggccttctgggtggca  
gcagaaaaagcatcagtaattctcacctttcatggtcaacagacagcactgcaaacaagcaactgtct  
agacat

#### Proteinsequenz (Aminosäuren 2322-2391)

SSRASHFQSHSSERQRHGSSQVWKHGSYGPAEYDYGHTGYGPPSGSRKSI SNSHLSWSTDSTANKQLS  
RH

### 7.3.2.8 IFPS-C-Term short

#### Nukleotidsequenz (bp 7036-7245)

tctagtagagcaagtcattttcagtcacatagtagtgaaaggcaaaggcatggatcaagtcaggtttg  
gaaacatggcagctatggacctgcagaatagactatgggcacactgggtatgggccttctgggtggca  
gcagaaaaagcatcagtaattctcacctttaa

#### Proteinsequenz (Aminosäuren 2322-2376)

SSRASHFQSHSSERQRHGSSQVWKHGSYGPAEYDYGHTGYGPPSGSRKSI SNSHL

## 7.4 Biochemische Eigenschaften der rekombinanten IFPS-Fragmente

### 7.4.1 Übersicht über die Massen rekombinanter Ifapsoriasin-Fragmente

Tab. 7.3: Massen der rekombinant exprimierten IFPS-Proteinfragmente in Dalton.

Fragment	pET-System	SUMO-System	IFPS-Fragment
IFPS-2	32586,4	28927,1	15660,3
IFPS-3	24451,5	20792,2	7525,4
IFPS-4	32800,5	29141,3	15874,5
IFPS-B13	-	19382,7	7878,9
IFPS-B14	-	19377,8	7874,1
IFPS-C-Term	-	19221,9	7718,1
IFPS-C-Term short	-	17522,1	6018,3
Fusionstag	16944,0	pET SUMO 13284,8	
		pSUMO3 11518,8	

### 7.4.2 Übersicht über die pI-Werte rekombinanter Ifapsoriasin-Fragmente

Tab. 7.4: pI-Werte der rekombinant exprimierten IFPS-Proteinfragmente.

Fragment	pET-System	SUMO-System	IFPS-Fragment
IFPS-2	6,39	6,71	8,64
IFPS-3	6,07	6,38	8,94
IFPS-4	6,94	8,13	10,18
IFPS-B13	-	6,53	9,95
IFPS-B14	-	6,38	8,59
IFPS-C-Term	-	6,77	9,87
IFPS-C-Term short	-	6,55	9,69
Fusionstag	5,48	pET SUMO 5,88	
		pSUMO3 6,23	



### 7.4.3 Übersicht über die molaren Extinktionskoeffizienten rekombinanter Ifapsoriasin-Fragmente

**Tab. 7.5: Molare Extinktionskoeffizienten der rekombinant exprimierten IFPS-Proteinfragmente.**

Fragment	pET-System	SUMO-System	IFPS-Fragment
IFPS-2	36440 (36690)	24075	22460 (22585)
IFPS-3	16960 (17085)	4470	2980
IFPS-4	37930 (38055)	25440	23950
IFPS-B13	-	4470	2980
IFPS-B14	-	8480	6990
IFPS-C-Term	-	18450	16960
IFPS-C-Term short	-	12950	11460
Fusionstag	14105 (13980)	pET SUMO 1490	
		pSUMO3 1490	

In Klammern sind die Extinktionskoeffizienten im Fall von geschlossenen Disulfid-Brücken angegeben.

## 8 Literatur

- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B., Normark, S., 2007. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J. Intern. Med.* 261, 511.
- Alonso, L. und Fuchs, E., 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 Suppl 1, 11830.
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D. L., 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24, 401.
- Baechle, D., Flad, T., Cansier, A., Steffen, H., Schitteck, B., Tolson, J., Herrmann, T., Dihazi, H., Beck, A., Mueller, G. A., Mueller, M., Stevanovic, S., Garbe, C., Mueller, C. A., Kalbacher, H., 2006. Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *J. Biol. Chem.* 281, 5406.
- Bikle, D. D., Oda, Y., Xie, Z., 2005. Vitamin D and skin cancer: a problem in gene regulation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 97, 83.
- Böhm, I. und Bauer, R., 1997. Th1-Zellen, Th2-Zellen und Atopische Dermatitis. *Hautarzt* 48, 223.
- Boman, H. G., 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* 173, 5.
- Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 328.
- Caubet, C., Jonca, N., Lopez, F., Esteve, J. P., Simon, M., Serre, G., 2004. Homo-oligomerization of human corneodesmosin is mediated by its N-terminal glycine loop domain. *J. Invest Dermatol.* 122, 747.
- Chapman, S. J. und Walsh, A., 1990. Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 282, 304.
- Contzler, R., Favre, B., Huber, M., Hohl, D., 2005. Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. *J. Invest Dermatol.* 124, 990.
- Dale, B. A., Holbrook, K. A., Steinert, P. M., 1978. Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature* 276, 729.
- Dale, B. A., Presland, R. B., Lewis, S. P., Underwood, R. A., Fleckman, P., 1997. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J. Invest Dermatol.* 108, 179.
- Dale, B. A., Scofield, J. A., Hennings, H., Stanley, J. R., Yuspa, S. H., 1983. Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium. *J. Invest Dermatol.* 81, 90s.
- Darragh, J., Hunter, M., Pohler, E., Nelson, L., Dillon, J. F., Nenutil, R., Vojtesek, B., Ross, P. E., Kernohan, N., Hupp, T. R., 2006. The calcium-binding domain of the stress protein SEP53 is required for survival in response to deoxycholic acid-mediated injury. *FEBS J.* 273, 1930.
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2008. Caspase-14 reveals its secrets. *J. Cell Biol* 180, 451.
- Drake, D. R., Brogden, K. A., Dawson, D. V., Wertz, P. W., 2008. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J. Lipid Res.* 49, 4.
- Duncan, R. C., Wijeyewickrema, L. C., Pike, R. N., 2008. The initiating proteases of the complement system: controlling the cleavage. *Biochimie* 90, 387.

- Eckert, R. L., Crish, J. F., Robinson, N. A., 1997. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev.* 77, 397.
- Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., Lippens, S., Vandenabeele, P., Tschachler, E., 2000. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J. Invest Dermatol.* 115, 1148.
- Egelrud, T., 2000. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm. Venereol. Suppl (Stockh)* 208, 44.
- Ekholm, E. und Egelrud, T., 1999. Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 291, 195.
- Elias, P. M., 2005. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J. Invest Dermatol.* 125, 183.
- Elias, P. M., 2008. Skin barrier function. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 8, 299.
- Fluhr, J. W. und Elias, P. M., 2002. Stratum corneum pH: Formation and Function of the 'Acid Mantle'. 1, 163.
- Fuchs, E., 2008. Skin stem cells: rising to the surface. *J. Cell Biol* 180, 273.
- Ghoreschi, K., Weigert, C., Rocken, M., 2007. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin. Dermatol.* 25, 574.
- 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.
- Gruber, R., Janecke, A. R., Fauth, C., Utermann, G., Fritsch, P. O., Schmuth, M., 2007. Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 179.
- Hamilton, E. H., Payne, R. E., Jr., O'Keefe, E. J., 1991. Trichohyalin: presence in the granular layer and stratum corneum of normal human epidermis. *J. Invest Dermatol.* 96, 666.
- Hancock, R. E. W. und Diamond, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* 8, 402.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J. M., 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861.
- Harder, J., Gläser, R., Schröder, J. M., 2007. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J. Endotoxin. Res.* 13, 317.
- Harder, J. und Schröder, J. M., 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* 277, 46779.
- Harding, C. R., 2004. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol. Ther.* 17 Suppl 1, 6.
- Harding, C. R., Watkinson, A., Rawlings, A. V., Scott, I. R., 2000. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int. J. Cosmet. Sci.* 22, 21.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R., 1985. Simplified Method for Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels and the Mechanism of Silver Staining. *Electrophoresis* 6, 103.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R., 1988. Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in Phastsystem Development Unit .1. Staining of Sodium Dodecyl-Sulfate Gels. *Electrophoresis* 9, 28.
- Hoffjan, S. und Stemmler, S., 2007. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 157, 441.

- Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M. L., Roop, D. R., Steinert, P. M., 1991. Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 6626.
- Houben, E., De Paepe, K., Rogiers, V., 2007. A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol. Physiol* 20, 122.
- Howell, M. D., Kim, B. E., Gao, P., Grant, A. V., Boguniewicz, M., Debenedetto, A., Schneider, L., Beck, L. A., Barnes, K. C., Leung, D. Y., 2007. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 150.
- Howell, M. D., Novak, N., Bieber, T., Pastore, S., Girolomoni, G., Boguniewicz, M., Streib, J., Wong, C., Gallo, R. L., Leung, D. Y., 2005. Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis. *J. Invest Dermatol.* 125, 738.
- Huber, M., Siegenthaler, G., Mirancea, N., Marenholz, I., Nizetic, D., Breitkreutz, D., Mischke, D., Hohl, D., 2005. Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *J. Invest Dermatol.* 124, 998.
- Imai, F. L., Uzawa, K., Nimura, Y., Moriya, T., Imai, M. A., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., Tanzawa, H., 2005. Chromosome 1 open reading frame 10 (C1orf10) gene is frequently down-regulated and inhibits cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 37, 1641.
- Ishida-Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Manabe, M., O'Guin, W. M., Dale, B. A., Iizuka, H., 1997. Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation. *Br. J. Dermatol.* 137, 9.
- Jackson, B., Tilli, C. M., Hardman, M. J., Avilion, A. A., MacLeod, M. C., Ashcroft, G. S., Byrne, C., 2005. Late cornified envelope family in differentiating epithelia--response to calcium and ultraviolet irradiation. *J. Invest Dermatol.* 124, 1062.
- Jonca, N., Guerrin, M., Hadjiolova, K., Caubet, C., Gallinaro, H., Simon, M., Serre, G., 2002. Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties. *J. Biol. Chem.* 277, 5024.
- Kam, E., Resing, K. A., Lim, S. K., Dale, B. A., 1993. Identification of rat epidermal profilaggrin phosphatase as a member of the protein phosphatase 2A family. *J. Cell Sci.* 106 ( Pt 1), 219.
- Kanitakis, J., Ramirez-Bosca, A., Reano, A., Viac, J., Roche, P., Thivolet, J., 1988. Filaggrin expression in normal and pathological skin. A marker of keratinocyte differentiation. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 412, 375.
- Kezic, S., Kemperman, P. M., Koster, E. S., de Jongh, C. M., Thio, H. B., Campbell, L. E., Irvine, A. D., McLean, W. H., Puppels, G. J., Caspers, P. J., 2008. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J. Invest Dermatol.* 128, 2117.
- Koch, P. J., de Viragh, P. A., Scharer, E., Bundman, D., Longley, M. A., Bickenbach, J., Kawachi, Y., Suga, Y., Zhou, Z., Huber, M., Hohl, D., Kartasova, T., Jarnik, M., Steven, A. C., Roop, D. R., 2000. Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J. Cell Biol* 151, 389.
- Krieg, P., Schuppler, M., Koesters, R., Mincheva, A., Lichter, P., Marks, F., 1997. Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* 43, 339.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., Vandenabeele, P., 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death. Differ.* 9, 358.

- Lee, S. C., Kim, I. G., Marekov, L. N., O'Keefe, E. J., Parry, D. A., Steinert, P. M., 1993. The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J. Biol Chem.* 268, 12164.
- Lee, S. C., Lee, J. B., Seo, J. J., Kim, Y. P., 1999. Expression of trichohyalin in dermatological disorders: a comparative study with involucrin and filaggrin by immunohistochemical staining. *Acta Derm. Venereol.* 79, 122.
- Leonhardt, H., 1990. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, 8. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death. Differ.* 12 Suppl 2, 1497.
- Lippens, S., Kockx, M., Knaapen, M., Mortier, L., Polakowska, R., Verheyen, A., Garmyn, M., Zwijsen, A., Formstecher, P., Huylebroeck, D., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2000. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death. Differ.* 7, 1218.
- List, K., Szabo, R., Wertz, P. W., Segre, J., Haudenschild, C. C., Kim, S. Y., Bugge, T. H., 2003. Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J. Cell Biol.* 163, 901.
- Listwan, P. und Rothnagel, J. A., 2004. Keratin bundling proteins. *Methods Cell Biol.* 78, 817.
- Little, T. J., Nelson, L., Hupp, T., 2007. Adaptive evolution of a stress response protein. *PLoS. ONE.* 2, e1003.
- Lorand, L. und Graham, R. M., 2003. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140.
- Luo, A., Kong, J., Hu, G., Liew, C. C., Xiong, M., Wang, X., Ji, J., Wang, T., Zhi, H., Wu, M., Liu, Z., 2004. Discovery of Ca<sup>2+</sup>-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* 23, 1291.
- Lynley, A. M. und Dale, B. A., 1983. The characterization of human epidermal filaggrin. A histidine-rich, keratin filament-aggregating protein. *Biochim. Biophys. Acta* 744, 28.
- Makino, T., Takaishi, M., Morohashi, M., Huh, N. H., 2001. Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J. Biol Chem.* 276, 47445.
- Makino, T., Takaishi, M., Toyoda, M., Morohashi, M., Huh, N. H., 2003. Expression of hornerin in stratified squamous epithelium in the mouse: a comparative analysis with profilaggrin. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 485.
- Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D., Butt, T. R., 2004. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* 5, 75.
- Mathur, P., Murray, B., Crowell, T., Gardner, H., Allaire, N., Hsu, Y. M., Thill, G., Carulli, J. P., 2004. Murine peptidoglycan recognition proteins Pglyrplalpha and Pglyrplbeta are encoded in the epidermal differentiation complex and are expressed in epidermal and hematopoietic tissues. *Genomics* 83, 1151.
- Matoltsy, A. G., 1976. Keratinization. *J. Invest Dermatol.* 67, 20.
- Menon, G. K., Grayson, S., Elias, P. M., 1985. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J. Invest Dermatol.* 84, 508.

- Mischke, D., Korge, B. P., Marenholz, I., Volz, A., Ziegler, A., 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J. Invest Dermatol.* 106, 989.
- Moseley, W. S. und Seldin, M. F., 1989. Definition of mouse chromosome 1 and 3 gene linkage groups that are conserved on human chromosome 1: evidence that a conserved linkage group spans the centromere of human chromosome 1. *Genomics* 5, 899.
- Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R. A., Schitteck, B., Garbe, C., Gallo, R. L., 2002. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J. Invest Dermatol.* 119, 1090.
- Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M., 2008. *Janeway's Immunobiology*, Seventh Edition, Garland Science, New York.
- Mutyambizi, K., Berger, C. L., Edelson, R. L., 2008. The balance between immunity and tolerance: The role of Langerhans cells. *Cell Mol. Life Sci.*
- Nemes, Z. und Steinert, P. M., 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* 31, 5.
- Nirunskisiri, W., Presland, R. B., Brumbaugh, S. G., Dale, B. A., Fleckman, P., 1995. Decreased profilaggrin expression in ichthyosis vulgaris is a result of selectively impaired posttranscriptional control. *J. Biol Chem.* 270, 871.
- 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.
- O'Keefe, E. J., Hamilton, E. H., Lee, S. C., Steinert, P., 1993. Trichohyalin: a structural protein of hair, tongue, nail, and epidermis. *J. Invest Dermatol.* 101, 65S.
- O'Regan, G. M., Sandilands, A., McLean, W. H., Irvine, A. D., 2008. Filaggrin in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Ogg, G., 2008. Role of T cells in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*
- Olson, B. J. und Markwell, J., 2007. Assays for determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 3, Unit.
- Ong, P. Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R. L., Leung, D. Y., 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1151.
- Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W. H., 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* 38, 441.
- Pearson, D. J., Dale, B. A., Presland, R. B., 2002. Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J. Invest Dermatol.* 119, 661.
- Pearson, D. J., Nirunskisiri, W., Rehemtulla, A., Lewis, S. P., Presland, R. B., Dale, B. A., 2001. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp. Dermatol.* 10, 193.
- Polakowska, R. R., Piacentini, M., Bartlett, R., Goldsmith, L. A., Haake, A. R., 1994. Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev. Dyn.* 199, 176.

- Presland, R. B., Haydock, P. V., Fleckman, P., Nirunskisiri, W., Dale, B. A., 1992. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J. Biol Chem.* 267, 23772.
- Presland, R. B., Kimball, J. R., Kautsky, M. B., Lewis, S. P., Lo, C. Y., Dale, B. A., 1997. Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. *J. Invest Dermatol.* 108, 170.
- Rawlings, A. V., Scott, I. R., Harding, C. R., Bowser, P. A., 1994. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J. Invest Dermatol.* 103, 731.
- Resing, K. A., Johnson, R. S., Walsh, K. A., 1995a. Mass spectrometric analysis of 21 phosphorylation sites in the internal repeat of rat profilaggrin, precursor of an intermediate filament associated protein. *Biochemistry* 34, 9477.
- Resing, K. A., Thulin, C., Whiting, K., al Alawi, N., Mostad, S., 1995b. Characterization of profilaggrin endoproteinase 1. A regulated cytoplasmic endoproteinase of epidermis. *J. Biol Chem.* 270, 28193.
- Resing, K. A., Walsh, K. A., Dale, B. A., 1984. Identification of two intermediates during processing of profilaggrin to filaggrin in neonatal mouse epidermis. *J. Cell Biol* 99, 1372.
- Rieg, S., Seeber, S., Steffen, H., Humeny, A., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Kimura, A., Garbe, C., Schitteck, B., 2006. Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites. *J. Invest Dermatol.* 126, 354.
- Rieg, S., Steffen, H., Seeber, S., Humeny, A., Kalbacher, H., Dietz, K., Garbe, C., Schitteck, B., 2005. Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J. Immunol.* 174, 8003.
- Rogers, G. E., Harding, H. W., Llewellyn-Smith, I. J., 1977. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. *Biochim. Biophys. Acta* 495, 159.
- Rothnagel, J. A. und Rogers, G. E., 1986. Trichohyalin, an intermediate filament-associated protein of the hair follicle. *J. Cell Biol* 102, 1419.
- Schitteck, 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.
- Schitteck, B., Paulmann, M., Senyurek, I., Steffen, H., 2008. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect. Disord. Drug Targets.* 8, 135.
- Schröder, J. M., 1999. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57, 121.
- Schröder, J. M., Gregory, H., Young, J., Christophers, E., 1992. Neutrophil-activating proteins in psoriasis. *J. Invest Dermatol.* 98, 241.
- Schröder, J. M. und Harder, J., 2006. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 469.
- Segre, J. A., 2006. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J. Clin. Invest* 116, 1150.
- Seguchi, T., Cui, C. Y., Kusuda, S., Takahashi, M., Aisu, K., Tezuka, T., 1996. Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch. Dermatol. Res.* 288, 442.
- Shaw, J. L., Smith, C. R., Diamandis, E. P., 2007. Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid. *J. Proteome. Res.* 6, 2859.

- Simon, M., Haftek, M., Sebbag, M., Montezin, M., Girbal-Neuhauser, E., Schmitt, D., Serre, G., 1996. Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis. *Biochem. J.* 317 ( Pt 1), 173.
- Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O'Regan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, P., McLean, W. H., 2006. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat. Genet.* 38, 337.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76.
- Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H. G., Peschel, A., Gotz, F., Garbe, C., Schitteck, B., 2006. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2608.
- Steinberg, D. A. und Lehrer, R. I., 1997. Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. *Methods Mol. Biol.* 78, 169.
- Steinert, P. M., Kartasova, T., Marekov, L. N., 1998. Biochemical evidence that small proline-rich proteins and trichohyalin function in epithelia by modulation of the biomechanical properties of their cornified cell envelopes. *J. Biol Chem.* 273, 11758.
- Steinert, P. M., Mack, J. W., Korge, B. P., Gan, S. Q., Haynes, S. R., Steven, A. C., 1991. Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 13, 130.
- Steinert, P. M., Parry, D. A., Marekov, L. N., 2003. Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. *J. Biol Chem.* 278, 41409.
- Steinert, P. M., Rice, R. H., Roop, D. R., Trus, B. L., Steven, A. C., 1983. Complete amino acid sequence of a mouse epidermal keratin subunit and implications for the structure of intermediate filaments. *Nature* 302, 794.
- Stemmler, S., Parwez, Q., Petrasch-Parwez, E., Epplen, J. T., Hoffjan, S., 2007. Two common loss-of-function mutations within the filaggrin gene predispose for early onset of atopic dermatitis. *J. Invest Dermatol.* 127, 722.
- Steven, A. C., Bisher, M. E., Roop, D. R., Steinert, P. M., 1990. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J. Struct. Biol* 104, 150.
- Sun, T. T. und Green, H., 1978. Keratin filaments of cultured human epidermal cells. Formation of intermolecular disulfide bonds during terminal differentiation. *J. Biol Chem.* 253, 2053.
- Sybert, V. P., Dale, B. A., Holbrook, K. A., 1985. Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. *J. Invest Dermatol.* 84, 191.
- Takahashi, H., Aoki, N., Nakamura, S., Asano, K., Ishida-Yamamoto, A., Iizuka, H., 2000. Cornified cell envelope formation is distinct from apoptosis in epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 23, 161.
- Takahashi, M., Tezuka, T., Kakegawa, H., Katunuma, N., 1994. Linkage between phosphorylated cystatin alpha and filaggrin by epidermal transglutaminase as a model of cornified envelope and inhibition of cathepsin L activity by cornified envelope and the conjugated cystatin alpha. *FEBS Lett.* 340, 173.



- Takaishi, M., Makino, T., Morohashi, M., Huh, N. H., 2005. Identification of human hornerin and its expression in regenerating and psoriatic skin. *J. Biol Chem.* 280, 4696.
- Takemura, T., Wertz, P. W., Sato, K., 1989. Free fatty acids and sterols in human eccrine sweat. *Br. J. Dermatol.* 120, 43.
- Tarcsa, E., Marekov, L. N., Andreoli, J., Idler, W. W., Candi, E., Chung, S. I., Steinert, P. M., 1997. The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. *J. Biol Chem.* 272, 27893.
- Tarcsa, E., Marekov, L. N., Mei, G., Melino, G., Lee, S. C., Steinert, P. M., 1996. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J. Biol Chem.* 271, 30709.
- Toulza, E., Mattiuzzo, N. R., Galliano, M. F., Jonca, N., Dossat, C., Jacob, D., de Daruvar, A., Wincker, P., Serre, G., Guerrin, M., 2007. Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol* 8, R107.
- Vanhoutteghem, A., Djian, P., Green, H., 2008. Ancient origin of the gene encoding involucrin, a precursor of the cross-linked envelope of epidermis and related epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*
- Vigneswaran, N., Haneke, E., Peters, K. P., 1987. Cross-reaction of a monoclonal anti-filaggrin antibody with glycogen. *Histochemistry* 87, 597.
- Volz, A., Korge, B. P., Compton, J. G., Ziegler, A., Steinert, P. M., Mischke, D., 1993. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics* 18, 92.
- Wagner, D. K. und Sohnle, P. G., 1995. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 317.
- Weerheim, A. und Ponc, M., 2001. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch. Dermatol. Res.* 293, 191.
- Wiedow, O., Wiese, F., Streit, V., Kalm, C., Christophers, E., 1992. Lesional elastase activity in psoriasis, contact dermatitis, and atopic dermatitis. *J. Invest Dermatol.* 99, 306.
- Wu, Z., 2005. Analysis of two human gen clusters involved in innate immunity. (Doktorarbeit)
- Wu, Z., Meyer-Hoffert, U., Reithmayer, K., Paus, R., Hansmann, B., He, Y., Bartels, J., Gläser, R., Harder, J., Schröder, J. M., 2008. Highly Complex Peptide Aggregates of the S100 Fused-Type Protein Hornerin Are Present in Human Skin. *J. Invest Dermatol.*
- Xu, M. und Lewis, R. V., 1990. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 7120.
- Xu, Z., Wang, M. R., Xu, X., Cai, Y., Han, Y. L., Wu, K. M., Wang, J., Chen, B. S., Wang, X. Q., Wu, M., 2000. Novel human esophagus-specific gene c1orf10: cDNA cloning, gene structure, and frequent loss of expression in esophageal cancer. *Genomics* 69, 322.
- Yagui-Beltran, A., Craig, A. L., Lawrie, L., Thompson, D., Pospisilova, S., Johnston, D., Kernohan, N., Hopwood, D., Dillon, J. F., Hupp, T. R., 2001. The human oesophageal squamous epithelium exhibits a novel type of heat shock protein response. *Eur. J. Biochem.* 268, 5343.
- Yamazaki, M., Ishidoh, K., Suga, Y., Saido, T. C., Kawashima, S., Suzuki, K., Kominami, E., Ogawa, H., 1997. Cytoplasmic processing of human profilaggrin by active mu-calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 652.
- Ye, H., Yu, T., Temam, S., Ziober, B. L., Wang, J., Schwartz, J. L., Mao, L., Wong, D. T., Zhou, X., 2008. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC. Genomics* 9, 69.

- 
- Zhang, D., Karunaratne, S., Kessler, M., Mahony, D., Rothnagel, J. A., 2002. Characterization of mouse profilaggrin: evidence for nuclear engulfment and translocation of the profilaggrin B-domain during epidermal differentiation. *J. Invest Dermatol.* 119, 905.
- Zhao, Y., Terron-Kwiatkowski, A., Liao, H., Lee, S. P., Allen, M. H., Hull, P. R., Campbell, L. E., Trembath, R. C., Capon, F., Griffiths, C. E., Burden, D., McManus, R., Hughes, R., Kirby, B., Rogers, S. F., Fitzgerald, O., Kane, D., Barker, J. N., Palmer, C. N., Irvine, A. D., McLean, W. H., 2007. Filaggrin null alleles are not associated with psoriasis. *J. Invest Dermatol.* 127, 1878.

## 9 Danksagung

Zu dieser Doktorarbeit haben viele Personen ihren Beitrag geleistet, sei es durch stete Hilfsbereitschaft, unterstützende Worte oder bloße Anwesenheit. Ich danke daher allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und auch der Hautklinik, die diese Arbeit möglich gemacht haben. Bei einigen Personen möchte ich mich jedoch besonders bedanken.

Prof. Dr. Jens-Michael Schröder danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit. Ich wurde mit offenen Armen in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und habe von ihm gelernt, Dinge aus anderen Blickwinkeln zu betrachten. Vor allem die inspirierenden Diskussionen lassen neue Ideen nie knapp werden. Die jährlichen Führungen durch seinen selbst angelegten Botanischen Garten waren immer ein Highlight jeden Betriebsausflugs.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch bedanke ich mich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung und das Interesse an meiner Doktorarbeit. In seiner Arbeitsgruppe habe ich die Grundlagen der Laborarbeit lernen und so meine ersten eigenen Schritte im Laborleben unternehmen dürfen.

Für die Unterstützung im Labor und die Einarbeitung in die unendlichen Weiten der HPLC und Immunhistochemie bedanke ich mich bei Anke, Christel, Claudia, Julia, Jutta, Marlies und Ulf. Trotz meiner hartnäckigen Fragen wart ihr immer sehr geduldig und nachsichtig mit mir.

Für die kritische Durchsicht und hilfreichen Anregungen zu dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Uli, Ulf, Rüdiger und Manfred. Es war ein steiniger Weg.

Ohne Schweiß keinen Preis. Daher danke ich besonders Christel und Ulf für das ausgiebige Schwitzen im Dienste der Wissenschaft, ohne welches die Analysen der wertvollen Schweißproben nicht möglich gewesen wären.

Dr. Regine danke ich für die individuelle ärztliche Betreuung und Behandlung nach der alternativen Erdnussbutter-Therapie.

Für das angenehme Arbeiten im Labor, die Diskussionsbereitschaft, Hilfe, Rat und Tat möchte ich mich bei Anke, den Claudias, Doris, Elvira, Felix, Graziella, Heilwig, Jutta, Joachim, Jürgen, Maren, Marlies und Zhihong bedanken.

Vor allem aber Bente, Eske, Kerstin, Manfred und Ties danke ich für ihre Ausdauer. Liebe Bente, mit Dir war der Whisky in Paris gleich doppelt so gut (Deshalb am besten gleich einen Doppelten!) und Du warst immer eine angenehme Zimmergenossin. Ohne Dich sind Tagungen nicht mehr dasselbe. Liebe Eske, Du hast mich besonders herzlich hier in der Arbeitsgruppe aufgenommen und mir gleich die guten Tipps gegeben. Ewig dankbar werde ich Dir natürlich für Folge 29 sein! Lieber Ties, auch Dir vielen Dank für Deine Unterstützung vor allem beim Ausmisten der Schränke und Schubladen. ("Hier kommt nichts weg!") Sehr beeindruckt hat mich

besonders Dein bemerkenswerter Laborgeräte-Basteldrang. Liebe Kerstin, Dir danke ich für den regen beruflichen und persönlichen Informationsaustausch, auch wenn "Die drei Fragezeichen" manchmal eher meinen momentanen Gehirnzustand beschrieben haben als meine privaten Interessen. Lieber Manfred, Dir danke ich für Deine ganz besondere Ausgeglichenheit, die mich das ein oder andere Mal von meiner Palme geholt hat. Aber bitte keine Caipis mehr. ("Bitte lassen Sie mich!") Ihr alle habt mich nie den Spaß an meiner Arbeit verlieren lassen.

Meiner Familie möchte ich danken, weil sie mich zu dem Menschen gemacht hat, der ich jetzt bin. Ich konnte mich immer auf Euren Rückhalt verlassen, ihr habt mich auf meinem Weg unterstützt und wart immer da, wenn ich Euch brauchte. Danke dafür!

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch Uli. Du hast mich mit unendlich viel Geduld und Ruhe während der gesamten Doktorarbeit unterstützt, hast mir in allen Lebenslagen tatkräftig zur Seite gestanden und immer ein offenes Ohr für mich mit meinen Problemen und Sorgen gehabt. Jede meiner Launen hast Du (fast) ohne Murren ertragen, es immer wieder geschafft, mich aus meinen Frustrationstälern herauszuholen und nach jedem Regen die Sonne wieder scheinen zu lassen. "Das kriegen wir schon hin!"

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Britta Hansmann  
Geburtsdatum: 09.08.1976  
Geburtsort: Hameln  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Derzeitige Anschrift: Jungmannstr. 26, 24105 Kiel

### Schulbildung

1983 - 1987 Grundschohle Bodenwerder  
1987 - 1989 Orientierungsstufe Bodenwerder  
1989 - 1996 Albert-Einstein-Gymnasium Hameln  
Abschluss: Abitur

### Weiterer Bildungsweg

1999 - 2005 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
2001 Biologie-Vordiplom (Zoologie, Botanik, Genetik, Zellbiologie, Physik, Physikalische Chemie, Mathematik)  
Juni 2004 Biologie-Diplom (Zellbiologie, Zoologie, Biochemie)  
Juli 2004 - Juni 2005 Diplomarbeit am Institut für Zoologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: "Interaktionen zwischen symbiontischen Chlorellen und *Hydra*-Polypen auf molekularer Ebene" unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. T. C. G. Bosch  
Juli 2005 Beginn der Doktorarbeit an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel, im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 617, Teilprojekt A2 (Untersuchungen zur Rolle neuer antimikrobieller Peptide der menschlichen Haut): "Proteinexpressionsanalysen und Funktionsuntersuchungen von Ifapsoriasin in der menschlichen Haut" in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.-M. Schröder unter externer Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. T. C. G. Bosch

## 11 Erklärung

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

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Kiel, den

---

Britta Hansmann

### Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

Wu, Z., **Hansmann, B.**, Schröder, J.-M., 2006. Identification of Ifapsoriasin as a novel and putative new member of the "S100 fused type protein" family. J. Invest. Dermatol. 126(S3), s13, Abstract 065.

**Hansmann, B.**, Meyer-Hoffert, U., Schröder, J.-M., 2007. Human Ifapsoriasin, a novel member of the "S100 fused type protein" family, is expressed in healthy skin. J. Invest. Dermatol. 127(S2), S61, Abstract 363.

**Hansmann, B.**, Wu, Z., Meyer-Hoffert, U., Schröder, J.-M., 2008. A C-terminal Ifapsoriasin fragment is a selectively *Pseudomonas aeruginosa*-killing peptide. Exp. Dermatol. 17(3), 261, Abstract P116.

**Hansmann, B.**, Wu, Z., Meyer-Hoffert, U., Gläser, R., Schröder, J.-M., 2008. A conserved C-terminal fragment of Ifapsoriasin is a selectively *Pseudomonas* ssp.-killing antimicrobial peptide. J. Invest. Dermatol. 128(S1), S182, Abstract 1089.