

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DER PARAOXONASEN 1, 2 UND 3 IN
KERATINOZYTEN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

SARAH BABUCKE

aus **Bremen**

Kiel **2009**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Schröder

2. Berichterstatter: Prof. Dr.med. Fölster-Holst

Tag der mündlichen

Prüfung: 22.06.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel,

den 22.06.2010

gez. Prof. Dr. rer. nat. Schröder

Prof. Dr.med. Fölster-Holst

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Symbole für den Nukleinsäurecode

1	Einleitung	S.1
2	Material	S.5
2.1	Chemikalien	S.5
2.2	Enzyme	S.6
2.3	Zytokine und weitere Stimuli	S.7
2.4	Oligonukleotide	S.7
2.5	Mikroorganismen & Vektoren	S.8
2.6	Immunhistologie	S.8
3	Methoden	S.8
3.1	Präparation und Kultivierung humaner primärer Keratinozyten und Sebozyten	S.8
3.2	Kollagenbeschichtung von Kulturflaschen und 12-Loch-Kultur-Platten	S.9
3.3	Passagieren der primären Keratinozytenkultur	S.9
3.4	Stimulation	S.10
3.5	Nachweis der Expression von Paraoxonasen in primären Keratinozyten auf RNA- bzw. cDNA-Ebene	S.10
3.5.1	RNA-Isolierung mit Trizol	S.10
3.5.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	S.10
3.5.3	Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)	S.11
3.5.4	„real-time“- PCR	S.11
3.5.5	PCR	S.12
3.5.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	S.12
3.5.5.2	PCR zur Ermittlung der optimalen „Annealingtemperatur“	S.12
3.5.5.3	PCR zur Vorbereitung der Ligation	S.13
3.5.5.3.	Gelextraktion	S.14
3.5.5.4	Kolonie-PCR	S.14
3.5.6	Ligation	S.15
3.5.7	Transformation	S.16
3.5.8	Anlegen einer Glycerinkultur	S.16
3.5.9	Erstellung einer Standardkurve (Vektorverdünnungsreihen)	S.17
3.5.10	Die Umrechnung von µg/ml in Teilchen pro Liter	S.17
3.6	Immunhistologische Anfärbung (Vectastain ABC-System)	S.17
4	Ergebnisse	S.20
4.1	Darstellung der Ergebnisse	S.20

4.2	Generierung eines primerspezifischen Temperaturprofils für die „real-time“-PCR sowie Erstellung primerspezifischer Standardkurven.	S.20
4.2.1	PON1-Expression in primären Keratinozyten	S.20
4.2.2	PON2-Expression in primären Keratinozyten	S.22
4.2.3	PON3-Expression in primären Keratinozyten	S.23
4.2.4	Erstellung der Standardkurven für PON2 und PON3	S.23
4.2.5	PON2 wird in primären Keratinozyten stärker exprimiert als PON3.	S.24
4.3	Stimulationsversuche mit primären Keratinozyten	S.25
4.3.1	Stimulationsversuche mit proinflammatorischen Zytokinen	S.25
4.3.2	Stimulationsversuche mit Bakterienüberständen	S.27
4.3.3	Stimulationsversuche mit 3OC12-HSL	S.27
4.4	Immunhistologischer Nachweis der PON2-Expression auf Proteinebene	S.29
4.5	PON2-Expression in Sebozyten	S.30
4.6	Stimulationsversuche mit proinflammatorischen Zytokinen an Sebozyten	S.30
5	Diskussion	S.32
5.1	Ergebnisdiskussion	S.32
5.2	PON2-Mangel und Infektionen der Haut	S.39
5.3	PON2 als Therapeutikum	S.40
6	Zusammenfassung	S.41
7	Literaturverzeichnis	S.43
8	Danksagungen	S.50
9	Lebenslauf	S.51

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acyl-HSL	Acyl-Homoserinlaktone
AK	Antikörper
AMP	Antimikrobielles Peptid
<i>aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	„mRNA complementary DNA“ = komplementäre DNA
Ca ²⁺	zweiwertiges Calcium
C4-HSL	N-Butyryl-Homoserinlaktone
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle's medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“ = Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> = und andere
FCS	„Fetal calf serum“ = fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
hBD	Humanes Beta-Defensin
HCl	Salzsäure
HSL	Homoserinlaktone
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	Molar (mol/l)
min.	Minute
μ	Mikro

mRNA	„messenger RNA“
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
3OC12-HSL	N-3oxo-12-decanoyl-Homoserinlaktone
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„Phosphat buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“ = Polymerase-Kettenreaktion
P.K.	Primäre Keratinozyten
PON / PONs	Paraoxonase / Paraoxonasen
QS	„Quorum Sensing“
QQ	„Quorum Quenching“
RNA	„Ribonucleic acid“= Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s.	siehe
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
sek.	Sekunde
SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBS	„Tris-buffered saline“
TE	Tris-EDTA
TGF	„Transforming growth factor“
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	„Tryptic soy broth“
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
∞	Unendlich

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenin	C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin	T	Desoxythymidin

1 Einleitung

Wie jedes Lebewesen, so ist auch der Mensch ständig Einflüssen von außen ausgesetzt, die ihn potenziell bedrohen und vor denen sich der Organismus schützen muss. Im Laufe der Evolution haben sich viele Schutzmechanismen entwickelt, die das Fortbestehen und die Weiterentwicklung der eigenen Art ermöglichten. Die Haut stellt die äußerste Barriere zu dieser potenziell bedrohlichen Umwelt dar und ist ein Organ, welches eine Vielzahl von Funktionen erfüllt. Neben der Funktion als Sinnesorgan, das uns das Tasten sowie die Wahrnehmung von Vibration, Druck, Temperatur und Schmerz ermöglicht, wodurch wir uns in der Umwelt zurecht finden und auf Gefahren reagieren können, dient sie dem Schutz gegen mechanische, thermische, chemische sowie mikrobielle Einflüsse.

Obwohl der Mensch in ständigem Kontakt zu Bakterien, Viren und Pilzen steht, kommt es nur in Ausnahmefällen zu Infektionen. Die Haut spielt bei dem Schutz gegen solche den Organismus bedrohenden Mikroorganismen eine entscheidende Rolle. Sie ist aus verschiedenen Schichten aufgebaut; der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, welches die eigentliche Deckschicht des Körpers darstellt. Sie ist mit der darunter liegenden Dermis eng verzahnt. Die Dermis besteht aus Bindegewebe, dient der mechanischen Widerstandsfähigkeit und führt die terminalen Blutgefäße. Die darunter liegende, aus Fett- und Bindegewebe bestehende Subkutis dient als Verschiebeschicht und Druckpolster und verbindet die Kutis mit Faszien und Periost. Haarfollikel und Hautdrüsen liegen in der Dermis und können bis in die Subkutis reichen.

Die intakte Haut stellt eine physikalische Barriere gegen drohenden Pathogenbefall dar. Die Desquamation des Stratum corneums des verhornten Plattenepithels der Epidermis bzw. die Schleimabsonderung der Mukosa bei Schleimhäuten führt zu mechanischer Entfernung adhärerender Mikroorganismen.

Neben der physikalischen Barriere spielt aber auch eine chemische Barriere für die Integrität der Haut eine wichtige Rolle. Eine Komponente dieser chemischen Barriere stellt die Lipidbarriere aus langkettigen Fettsäuren dar, die eine wichtige Schutzfunktion gegen Bakterien erfüllt (1;2). Experimentell applizierte Mikroorganismen zeigten nach Acetonbehandlung der Haut ein stärkeres Wachstum.

Auch der sogenannte Säureschutzmantel dient als chemischer Schutz zur kutanen Infektionsabwehr. Auf der Hautoberfläche bilden Lipide, freigesetzt aus den Talgdrüsen sowie aus den verhornten Keratinozyten (vorwiegend Triglyceride, Wachsester und Cholesterol), zusammen mit in Wasser gelösten Substanzen aus dem Hautschweiß (Carbonsäuren, Aminosäuren und Salze) einen Hydrolipidfilm. Durch Spaltung der Triglyceride in freie Fettsäuren sinkt der pH-Wert der Haut in saure Bereiche. Aufgrund

seines sauren pHs und seiner antibakteriellen Wirkung wurde dieser Hydrolipidfilm 1928 erstmalig von Schade und Marchionini als Säureschutzmantel bzw. - im angelsächsischen Bereich wiederzufinden - als „acid cloak“ oder „acid mantle“ bezeichnet (3).

Eine antibakterielle Wirkung von endogen synthetisierten Proteinen wurde erstmals bereits 1922 als „bakteriolytische Aktivität“ im Nasensekret durch den Nobelpreisträger Alexander Fleming beschrieben (4). Das heute als Lysozym bekannte Protein, auch Muramidase genannt, ist ein in Speichel, Schweiß, Tränen, Ohrenschmalz, Nasen- und Darmschleimhäuten sowie im Blutplasma vorkommendes Enzym, das von großer Bedeutung für die Abwehr bakterieller Infektionen ist. Durch Hydrolyse der Glykosidbindung des Murein-Sacculus bewirkt es eine Zerstörung der Bakterienzellwände. (5) In den letzten Jahrzehnten stellte sich heraus, dass zahlreiche solcher antimikrobiell aktiven Proteine existieren. Sie dienen sowohl einfachen Mehrzellern als auch höheren Organismen als Schutz gegen die ständige Bedrohung durch Mikroorganismen. Diese so genannten antimikrobiellen Peptide (AMPs) sind vom Organismus endogen synthetisierte „Antibiotika“ und werden als Teil der angeborenen Immunität verstanden (6-9). Mittlerweile sind eine große Anzahl AMPs bekannt. Es existiert eine Datenbank, in der diverse AMPs bzw. ihre Sequenzen aufgeführt werden. Des Weiteren wissen wir heute, dass viele AMPs auch immunmodulatorisch aktiv sind, indem sie zum Beispiel zu einer Aktivierung und einem „recruitment“ antigenpräsentierender Zellen führen (10-13). Außerdem spielen einige AMPs auch eine Rolle in der Wundheilung und Angiogenese (14-18).

Im klinischen Alltag zeigt sich ein Problem, welches unter physiologischen Umständen scheinbar keine Rolle zu spielen scheint, die Bildung so genannter Biofilme. Ein Biofilm besteht aus Alginat, einer Art Schleim, der von einigen Bakterien wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* gebildet werden kann und sie wie eine schützende Hülle umgibt (19). *P. aeruginosa* ist ein opportunistischer, menschen- und tierpathogener Krankheitserreger, der durch Hilfe zahlreicher Virulenzfaktoren sowie der Biofilmbildung zu schweren eitrigen und invasiven Lokalinfektionen mit Gefahr der septischen Generalisierung führen kann. Durch die Abschirmung der Keime von ihrer Umgebung führt der Biofilm zu einer phänotypischen Resistenz der umhüllten Bakterien gegen Antibiotika sowie viele körpereigene Abwehrmechanismen (20). Infektionen durch biofilmbildende *P. aeruginosa* sind gerade bei Patienten, deren physiologische Hautbarriere gestört ist, wie dies zum Beispiel bei Verbrennungsoptionen der Fall ist oder bei Patienten die durch Katheter, Tuben oder Drainagen einer Art Verbindung des Körpers zur Außenwelt ausgesetzt sind, eine häufige Komplikation (21;22). Es stellt sich die Frage, welche Mechanismen den Körper im physiologischen Zustand vor derartigen Infektionen schützen.

Früher ging man gemeinhin davon aus, dass Bakterien als einzelne Zellen agieren, die in gegenseitiger Konkurrenz um Lebensraum und Ressourcen stünden. Die Entdeckung von Kommunikationssystemen unter Bakterien, den so genannten Quorum-Sensing-Systemen, führte zu einer Revolutionierung dieser Sichtweise. Es wurde gezeigt, dass Bakterien nicht nur für sich allein lebende Organismen sind, sondern durch Kommunikation über Signalmoleküle, auch als „Autoinducer“ (QS-Signale) bezeichnet, ihre Aktivitäten, wie z.B. die Ausbildung von Virulenzfaktoren, koordinieren. Diese Koordination führt zur Bildung von Gemeinschaften, die durch Synergieeffekte die Gefahr für ihre Umwelt um ein Vielfaches potenzieren können. Die ersten QS-Signale wurden bei *Vibrio fischeri* entdeckt, einem Bakterium, das in symbiotischer Gemeinschaft mit einigen Meerestieren lebt. Bei *Vibrio fischeri* wird die Ausbildung der Lumineszenz durch QS-Signale gesteuert (23;24). Mittlerweile wurden eine Vielzahl solcher Bakterien-Spezies-spezifischen Signale beschrieben (25-30). Das zurzeit wohl am besten erforschte Signalsystem ist das der Acyl-Homoserinlaktone (Acyl-HSL). Wie eine große Anzahl gramnegativer Bakterienspezies, so nutzt auch *P. aeruginosa* die Acyl-HSL, um viele seiner Virulenzfaktoren wie die Ausbildung von Biofilmen über das QS-Signalsystem zu steuern (27;31;32). Bisher ist keine andere Funktion der Acyl-HSL bekannt.

Geht man davon aus, dass diverse Bakterienspezies mithilfe von QS-Systemen kommunizieren und durch Koordination ihrer Virulenzfaktoren einen kompetitiven Vorteil innerhalb ihres Lebensraumes erlangen, so kann man die Hypothese ableiten, dass andere Organismen Mechanismen entwickelt haben, eben diesen Vorteil durch Störung des QS wieder auszugleichen. In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von Quorum-Sensing spaltenden Enzymen, sogenannte Quorum-Quenching-Enzyme, sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten identifiziert (33-35). Allgemein kann man zwischen den Acylasen und den Laktonasen, zu denen die Paraoxonasen zählen, unterscheiden (33;36-38). Die Paraoxonasen sind eine Enzymgruppe, deren physiologische Funktion bisher noch nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Unter den Paraoxonasen wurde PON1 als Erstes entdeckt, es ist das am besten erforschte Protein dieser Enzymgruppe (39). Später wurden zwei humane PON1-ähnliche-Proteine identifiziert und PON2 bzw. PON3 genannt (40). Allen PONs ist gemein, dass sie in der Lage sind, Laktone zu spalten (41;42). PON2 ist das phylogenetisch älteste Mitglied der Paraoxonasen (43;44), zeigt die stärkste Laktonaseaktivität und wird im Gegensatz zu PON1 und PON3 in einer Reihe von humanen Geweben exprimiert (45;46).

Bei der Suche nach der physiologischen Funktion der Paraoxonasen könnte die Entdeckung ihrer die drei Enzyme übergreifenden Laktonasefunktion von großer Bedeutung sein. Es wäre denkbar, dass diese Fähigkeit es dem Menschen ermöglicht, die

Kommunikationsmoleküle der Bakterien, die Acyl-HSL, zu zerlegen, um somit einen Selektionsvorteil im Kampf gegen viele Mikroorganismen zu erlangen.

In menschlichen respiratorischen Epithelien konnte bereits eine Acyl-HSL-spaltende Aktivität festgestellt werden (47). Weitere Studien zeigten, dass diese Aktivität auf Paraoxonasen zurückzuführen ist (42). Aufgrund dieser Entdeckungen stellt sich nun die Frage, ob die Inaktivierung der Quorum-Sensing-Signale eine oder vielleicht sogar die entscheidende biologische Funktion der Paraoxonasen darstellt, durch die sie den Organismus in der Abwehr gegen Mikroorganismen unterstützen. Die angeborene, durch PON-Enzyme vermittelte Laktonaseaktivität, die der Biofilmbildung durch Mikroorganismen entgegenwirkt, könnte dem Menschen als Waffe gegen schwere Infektionen dienen.

Zu Beginn dieser Arbeit bestanden noch keine Erkenntnisse darüber, ob die PON-Enzyme, deren Vorkommen und Bildung bereits in einer Vielzahl humaner Gewebe nachgewiesen werden konnten, ebenfalls in der Epidermis synthetisiert werden (45;46). Es galt herauszufinden, ob auch primäre Keratinozyten PON-Enzyme exprimieren und es somit potenziell möglich ist, dass sie einen weiteren Faktor der angeborenen Immunität der Haut darstellen.

Unsere zentrale Fragestellung und damit Gegenstand der Untersuchung war die Prüfung, ob Keratinozyten PON-Enzyme bilden und ob bzw. wodurch sich die Expression beeinflussen lässt.

2 Material

2.1 Chemikalien

Agarose	Biozym Hess, Oldendorf
Amphotericin B/Penicillin G/Streptomycin-Lösung: (25 µg/ml Amphotericin, 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Gibco, Eggenstein
Bovines Kollagen, Typ I	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
BSA; bovines Serum-Albumin	Sigma, Deisenhofen
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie® Brilliant Blau R250	Fluka, Buchs
DMEM; Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Cellconcepts, Umkirch
DMEM++- enthält als frischen Zusatz: 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ ml Streptomycin, 2 mM der Aminosäure L-Glutamin	
DMEM+++ enthält zusätzlich 10% fetales Kälberserum	
dNTPs	Invitrogen, Karsruhe
DTTs	Invitrogen, Karsruhe
EDTA (Ethylendia-mintetraazetat-Lösung)	Gibco, Eggenstein
EpiLife®	Cascade Biologics, Portland
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidium Bromid	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz
Glycerin	USB, Cleveland, OH, USA
Gold-buffer	Roche Diagnostics, Mannheim
H ₂ O (aqua dest.)	Delta Select, Dreieich
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen
LB-Medium:	
Soja Pepton 1 %	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt 0,5 %	Gibco, Eggenstein
NaCl 1 %	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Eggenstein
Methanol	Promochem GmbH, Wesel
MES-Puffer	Invitrogen, Karsruhe

MgCl	Roche Diagnostics, Mannheim
NucleoSpin Plasmid Quick pure	Macherey-Nagel, Düren
Oligo dTs	Sigma, Taufkirchen
PBS (phosphat buffered saline)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin-Stamm-Lösung :	Gibco , Eggenstein
(5.000 U/ml Penicillin, 5.000 µg/ml Streptomycin)	
Pepton (aus Sojamehl)	Unipath LTD, Hampshire
Puffer H	Roche Diagnostics, Mannheim
2-fach-Puffer	Promega Corporatipon, Madison, WI, USA
Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Smart-Ladder	Eurogentec, Köln
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsinlösung	Gibco , Eggenstein
Nicht aufgeführte Chemikalien wurden über Merck (Darmstadt) oder Sigma-Chemie (Deisenhofen) bezogen.	

2.2 Enzyme

AmpliTaq Gold	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR GreenI	Roche Diagnostics, Mannheim
NdeI	NEB, Schwalbach
NotI	NEB, Schwalbach
PfU-Turbo®Hotstart DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Pfx50-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Primestar-Polymerase	TaKaRa, Saint Germain en Laye, Frankreich
Restriktionsendonukleasen	NEB, Schwalbach
Reverse Transkriptase (SuperskriptII)	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Promega Corporatipon, Madison, WI, USA
Taq-DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City
LA-Taq	TaKaRa, Saint Germain en Laye, Frankreich

2.3 Zytokine & weitere Stimuli

Die in dieser Arbeit verwendeten Stimuli - IL-1 β , IL-17, IFN γ , TNF α , TGF α - wurden über die Firma Cellconcepts (Umkirch) bezogen.

3-oxo-12-decanoyl-HSL wurden uns freundlicherweise von Prof. Eberl aus Zürich zur Verfügung gestellt.

2.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer), die für die reverse Transkription, für die verschiedenen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) und für die Sequenzierungen verwendet wurden, wurden über die Firma Sigma-Genosys (Deisenhofen) bestellt.

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')
PCR:	
PON1-f1	CTGTGGGACCTGAGCACTTT
PON1-r1	TTATGAGCCAGCAACTCAGC
PON2-f1	TTGGACCGGCACATTTCTAT
PON2-r1	CATGAGCCAATATGTCAGCAAC
PON3-f1	TCTTGGATCTTCGCTGGACT
PON3-r1	CCACTAAGGTGCCCAACTGT
pQE TypIII/IV(=f)	CGGATAACAATTTACACAG
pQE2 reversed sequencing	GTTCTGAGGTCATTACTGG
hBD2-for1	GCCTCTTCCAGGTGTTTTTG
hBD2-ra	GAGACCACAGGTGCCAATTT
hBD3-f1	GTGAAGCCTAGCAGCTATGAGGAT
hBD3-r1	TGATTCCTCCATGACCTGGAA
GA-for	CCAGCCGAGCCACATCGCTC
GA-rev	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
HPRT-f	TCAGGCAGTATAATCCAAAGA
HPRT-r	AGTCTGGCTTATATCCAACAC
IL-8 f1	ATGACTTCCAAGCTGGCC
IL-8 r1	TCTCAGCCCTCTTCAAAACTT
IL-1 β f1	GGGCCTCAAGGAAAAGAATC
IL-1 β r1	TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA
TNF α f	TCAGCTTGAGGGTTTGCTACAA
TNF α r	TCTGGCCCAGGCAGTCAGATC
Oligo-dTs	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Sequenzierung und Klonierung:

M13-f	TGTA AACGACGGCCAGT
M13-r	CAGGAAACAGCTATGACC
PON2-pQE2-f	ACTGCATATGCTCAGAAATCGACTTAAAGCC
PON2-pQE2-r	ATTTGCGGCCGCTTAGAGTTCACAATACAAGGCT

Tab. 1: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.5 Mikroorganismen und Vektoren

In dieser Arbeit wurden Mikroorganismen vom Stamm *E. coli* TOP10F', die von der Firma Invitrogen bezogen wurden, und pGEM-T-Vektoren die von Promega Corporation, (Madison, WI, USA) bezogen wurden, verwendet.

2.6 Immunhistologie

Für die immunhistologischen Färbungen dieser Arbeit wurde das Vectastain ABC System, das von Vector Laboratories bezogen wurde, verwendet.

PON2-„rabbit“	Biozol, Eching
„Pig2-anti-rabbit“	Biozol, Eching

Tab. 2: Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

3 Methoden

3.1 Präparation und Kultivierung humaner primärer Keratinozyten und Sebozyten

Humane primäre Keratinozyten wurden aus infantilen Vorhäuten, die bei chirurgisch indizierten Circumcisionen anfielen, isoliert. Nach dem Entfernen von Fett- und Bindegewebe wurden die Präparate in etwa 1-2 cm lange und 2-3 mm breite Streifen geschnitten. Nach Inkubation in 0,125%iger Trypsinlösung bei 4 °C über Nacht und Stoppen der enzymatischen Proteolyse mit FCS-haltigem Nährmedium (DMEM) am nächsten Morgen wurden die epidermalen Zellen durch vorsichtiges Abschaben von der Basalmembran gelöst. Die hierbei entstandene Zellsuspension wurde bei 800 g für 5 min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das verbliebene Zellpellet in 15 ml EpiLife-Keratinozyten-Nährmedium, dem zuvor neben dem mitgelieferten Nährstoffmix (EpiLife Defined Groth Supplement, Calciumchlorid, Cascade Biologics, Portland, USA) Amphotericin 0,25 µg/ml, Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml (APS) hinzugefügt wurde, resuspendiert. Die Keratinozytensuspension wurde in kollagenbeschichtete 75-cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt (vgl. 3.2).

Die humanen Sebozyten der Zelllinie SZ95 erhielten wir freundlicherweise von Prof. Zubulis aus Dessau. Die Kultivierung erfolgte analog zu der der Keratinozyten allerdings in Sebomed, ein speziell an die Bedürfnisse von Sebozyten angepasstes Medium.

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C und einer 5%igen CO₂-Konzentration in einem wasserdampfgesättigten Milieu im Inkubator kultiviert. Das Nährmedium wurde alle 2 Tage durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt.

3.2 Kollagenbeschichtung von Kulturflaschen und 12-Loch-Kultur-Platten

Zur besseren Adhärenz von Keratinozyten wurden sämtliche zur Kultur und Stimulation von Keratinozyten verwendeten 75-cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) und 12-Loch-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) mit Kollagen Typ I beschichtet. Zur Beschichtung wurde eine Stammlösung Bovines Kollagen Typ I (2,9 mg/ml) 1%ig in 0,1 M HCl gelöst. Zellkulturflaschen wurden mit je 5 ml und 12-Loch-Platten mit je 0,5 ml pro Loch dieser Lösung befüllt. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wurden die Flaschen und Platten zweimal mit PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

3.3 Passagieren der primären Keratinozytenkultur

Nach Erreichen einer ca. 80-90%igen Konfluenz wurden die Zellkulturen auf neue Zellkulturflaschen bzw. 12-Loch-Kultur-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) aufgeteilt. Zum Ablösen der adhären wachsenden primären Keratinozyten vom Kulturgefäßboden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 0,1 % Trypsin enthaltenden 0,02%igen EDTA-Lösung im Brutschrank für ca. 10 min. inkubiert. Um die notwendige Einwirkzeit des Trypsins zu verkürzen und somit die enzymatische Schädigung der Zellen möglichst gering zu halten, wurde die Ablösung der Zellen durch mehrmaliges Klopfen an die Kulturflasche beschleunigt. Der Grad der Zellablösung wurde hierbei fortwährend mikroskopisch überprüft. Durch Zugabe von 10ml an FCS-haltigem Medium (DMEM) wurde die enzymatische Trypsinreaktion (Proteolyse) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 800 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das verbliebene Zellpellet mit dem entsprechenden Nährmedium resuspendiert und zur Subkultivierung in sterile Kulturflaschen bzw. für Stimulationsversuche in 12-Loch Kultur-Platten überführt. 75-cm²-Zellkulturflaschen wurden mit 10 ml, 12-Loch-Platten je Loch mit 1 ml dieser Zellsuspension befüllt. Bis zum Erreichen der Stimulationskonfluenz wurde in 12-Loch-Platten täglich das Kulturmedium ausgetauscht. Die Lebensfähigkeit der Keratinozyten limitierte die mögliche Anzahl der Subkultivierungen auf 3 bis 4 Passagierungsdurchläufe.

3.4 Stimulation

Die Stimulation der Keratinozyten sowie der Sebozyten erfolgte in kollagenisierten 12-Loch-Platten, bei einer Konfluenz von etwa 90 %. Vor der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Stimuli wurden in der gewünschten Konzentration direkt in 500 µl serumfreiem, 0,1-%igem BSA-Epilife-Nährmedium pro Well bzw. Sebomed für die SZ95-Zellreihe aufgenommen und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Zugabe von BSA sollte der sonst möglichen Bindung des Stimulus an die Gefäßwand und der damit einhergehenden Reduktion der effektiven Stimuluskonzentration vorbeugen. Als Negativkontrolle zu den stimulierten Proben dienten pro Stimulationsversuch jeweils drei nicht stimulierte Proben. Hierfür wurden die Zellen parallel zu den stimulierten Zellen mit entsprechendem Nährmedium ohne Stimulus inkubiert. Da das Überleben der primären humanen Keratinozyten zeitlich limitiert ist, wurden sie zur Kultivierung kontinuierlich aus zur Verfügung stehenden Vorhäuten neu präpariert. Um bei den Simulationsversuchen eine Spenderabhängigkeit ausschließen zu können, wurde darauf geachtet, dass nur Zellen des gleichen Ursprungs in einem Experiment Verwendung fanden.

3.5 Nachweis der Expression von Paraoxonasen in primären Keratinozyten auf RNA- bzw. cDNA-Ebene

3.5.1 RNA-Isolierung mit Trizol

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Stimulation der primären Keratinozyten beendet und der Überstand für spätere ELISAs eingefroren. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 µl Trizol pro Well und mehrmaliges Aufziehen lysiert. Danach wurden jeweils 100 µl Chloroform hinzugefügt und das Gemisch bei 4 °C und 11.900 g abzentrifugiert. Die resultierende Phasentrennung nach der Wasserlöslichkeit der Bestandteile ermöglichte das Abpipettieren und Überführen der RNA-haltigen, oberen, wässrigen Phase in je 250µl Isopropanol (48). Das nach nochmaligem Zentrifugieren bei 4°C und 11.900 g entstandene Pellett wurde mit 75%igem Ethanol bei 4 °C bei 7500 g für 5 min. gewaschen, um störende Faktoren wie Phenole (im Trizol enthalten) zu beseitigen. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen; die so isolierte RNA wurde in 25%igem Formamidwasser bzw. Wasser (Aqua dest.) aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (A260) bestimmt (Gene Quant II RNA/DNA calculator Pharmacia Biotech, Freiburg), wobei eine A260-Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 41,2 µg/ml entspricht (49). Die

Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (E260/E280) ermittelt.

3.5.3 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)

Die aus Zellen isolierte RNA wurde zur weiteren Analyse in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase (50), welche mittels einer RNA-Vorlage die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert, genutzt. Es handelt sich also um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Für einen Reaktionsansatz wurde 1 µg Gesamt-RNA und 1,5 µl Oligo(dT)-Primer (20 µM) mit H₂O auf ein Volumen von 12,5 µl gebracht. Der Ansatz wurde für 10 min. in einem Thermoblock auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu linearisieren, und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Es wurden hinzugefügt:

4,0 µl 5x Reaktionspuffer für Superscript II

2,0 µl DTT (0,1 M)

1,0 µl dNTPs (10 mM)

0,5 µl Reverse Transkriptase (Superscript II)

Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 °C.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Proben nach der reversen Transkription für 5 min. auf 90 °C erhitzt. Die so gewonnene cDNA wurde mit H₂O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5.4 „real-time“-PCR

Mit der, wie in 3.5.3 erläutert, erhaltenen cDNA wurde mit Hilfe der „real-time“-PCR eine Analyse der relativen Genexpression von PON1, PON2, PON3 sowie von weiteren Genen mit jeweils zwei genspezifischen Primern durchgeführt (vgl. Tab.1). Um cDNA von genomischer DNA unterscheiden zu können, wurden hierbei Intron-überspannende Primer verwendet. Die „real-time“-PCRs erfolgten im Light Cycler® der Firma Roche, Mannheim. Es wurden 10 ng cDNA (entsprechen 1 µl) in einem Reaktionsansatz mit 9 µl Mastermix, bestehend aus 5 µl Sybr-Takara-Mix, 0,2 µl je Primer und 3,6 µl Wasser, pro Probe aufgenommen und die cDNA mit einem jeweils Primer-spezifischen Programm amplifiziert.

Die Fluoreszenz wurde bei 72 °C am Ende jedes Zyklus bestimmt. Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Zur Ermittlung eines internen Standards wurden alle cDNA-Proben ebenfalls bezüglich ihrer cDNA-Konzentration der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse, das konstitutiv von Keratinozyten exprimiert wird, untersucht. Der Vergleich mittels erstellter Standardkurven (vgl. 3.5.8) für die jeweiligen Gene ermöglichte die Berechnung der entsprechenden relativen mRNA Expression sowie unter Einbeziehung der

Molmasse der Transkripte die Berechnung der absoluten mRNA-Konzentration in Molekül-Anzahl/Volumeneinheit mit Hilfe von Plasmid-basierten Standards (vgl. 3.5.8.1).

3.5.5 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (51) ist eine Methode, die es ermöglicht, DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Sie besteht aus den Phasen Denaturierung, Primer-Anlagerung und Kettenverlängerung. Die PCR wurde für die Amplifikation der Gene PON1, PON2 und PON3 verwendet. Des Weiteren diente sie der Überprüfung von Plasmiden auf den Insertionserfolg eines PCR-Produktes. Die Reaktionen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 30 µl oder 50 µl in einem Thermocycler (Trio-Block, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die PCR-Programme wurden in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und den vom Hersteller angegebenen Schmelzpunkten (Sigma-Genosys, Deisenhofen) variiert. Die jeweils optimale Annealingtemperatur für die verschiedenen PON-Gene bzw. -Primer wurden experimentell ermittelt. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tab.1 aufgeführt.

3.5.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld nach Masse aufgetrennt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese in 1-2%igen Agarose-Gelen ermöglichte die Kontrolle der verschiedenen PCRs. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose durch Aufkochen in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 40 mM Essigsäure, 1 mM Na₂EDTA) gelöst. Die flüssige Agarose wurde auf eine Temperatur von ca. 60 °C abgekühlt und nach der Zugabe von 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) in eine horizontale Gießvorrichtung (Horizon 11-14; Life Technologies, Karlsruhe) gegossen. Die DNA wurde mit DNA-Auftragspuffer versetzt (0,1 M EDTA, 50 % Glycerin (v/v), 1 % Bromphenolblau (w/v), 1% Xylencyanol (w/v), 0,1 % SDS (w/v)). Die Elektrophorese erfolgte für etwa 45 min. bei 110V in TAE-Puffer. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar umso langsamer, je größer sie sind. Ethidiumbromid hat die Eigenschaften, sich in DNA zu interkalieren sowie unter UV-Licht (266 nm) zu fluoreszieren. Diese beiden Eigenschaften ermöglichten es, die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente bei 266 nm als Banden mit Hilfe einer BioDoc-Fotodokumentationsanlage (Biometra, Göttingen) darzustellen.

3.5.5.2 PCR zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur

Zur Ermittlung der optimalen „Annealingtemperatur“ wurde die Amplifikation der Gene PON1, PON2 und PON3 parallel in drei verschiedenen Thermoblöcken des Thermocyclers (Trio-

Block, Biometra, Göttingen) mit unterschiedlichen „Annealingtemperaturen“ durchgeführt. Hierfür wurde die Amplitaq-Polymerase verwendet. Die Besonderheit dieses Enzyms besteht darin, dass ein Antikörper die frühzeitige Aktivierung des Enzyms verhindert. Die Denaturierung des Antikörpers bei einer Temperatur von 95 °C zu Beginn dieses PCR-Programms führt zur Enzymaktivierung.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

(30µl-Ansatz):

3 µl	10-fach Puffer
2,4 µl	MgCl
0,6 µl	dNTPs (10mM)
0,6 µl	Forward-Primer (PON1, PON2, PON3) (vgl. Tab. 1)
0,6 µl	Reverse-Primer (PON1, PON2, PON3) (vgl. Tab.1)
3 µl	cDNA
0,15 µl	Amplitaq
19,65 µl	H ₂ O

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

1.)Aktivierung der Amplitaq-Polymerase	95 °C	9 min.
2.)Denaturierung	94 °C	1 min.
3.)„Annealing-Phase“	58 °C / 60 °C / 62 °C	20 sek.
4.)Elongation	72 °C	1,30 min.
5.)	72 °C	3 min.
6.)Lagerung	4 °C	bis zur Weiterverarbeitung

Die Schritte 2.) bis 4.) wurden in 33 Zyklen wiederholt.

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem horizontalen 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt (vgl. 3.5.5.1). Durch den Vergleich der Intensität der verschiedenen Banden konnten Rückschlüsse auf die jeweils optimale „Annealingtemperatur“ gezogen werden. Die Ergebnisse wurden durch weitere PCRs sowie durch „real-time“-PCRs reproduziert und bestätigt.

3.5.5.3 PCR zur Vorbereitung der Ligation

Zur Vorbereitung der Ligation des jeweiligen PON-Gens in einen TA-Vektor (pGem®-T-Vektor, Promega) wurde die Primestar-Polymerase (TaKaRa) verwendet. Im Gegensatz zu Taq-Polymerasen ist die Primestar-Polymerase ein Proof-reading-Enzym. Durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität ist sie in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide zu entfernen, und senkt somit das Risiko von durch die Genamplifikation entstehenden Mutationen.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

(50µl-Ansatz):

10 µl	5-fach PrimeStar buffer
4 µl	dNTPs (2,5mM)
1,5 µl	Forward-Primer (10 µM)
1,5 µl	Reverse-Primer (10 µM)
5 µl	cDNA
0,5 µl	PrimeStar-Polymerase

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

1.)Denaturierung	98 °C	10 sek.
2.)„Annealing-Phase“	62 °C	10 sek. (für PON2)
2.)„Annealing-Phase“	60 °C	10 sek. (für PON3)
3.)Elongation	72 °C	1,30 min.
4.)	72 °C	3 min.
5.)Lagerung	6 °C	bis zur Weiterverarbeitung

Die Schritte 1.) bis 3.) wurden in 32 Zyklen wiederholt.

Anschließend an die PCR wurden die Proben 20 min. bei 72°C mit 0,5 µl Taq-Polymerase (Invitrogen) & 0,5 µl dNTPs (10mM) inkubiert, um A-Enden für die folgende Ligation (vgl. 3.5.6) in den TA-Vektor anzufügen (sog. „sticky-ends“).

Zur Kontrolle der PCR wurden die Produkte elektrophoretisch in einem horizontalen 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Mittels eines mit aufgetragenen molekularen Größen-Standards („Smart Ladder“) konnte so die Größe des jeweiligen PCR-Produktes abgelesen und mit der erwarteten Größe des jeweiligen Gens verglichen werden.

3.5.5.3.2 Gelextraktion

Die Banden mit der richtigen Größe wurden unter UV-Licht-Kontrolle (266 nm) ausgeschnitten. Mit Hilfe des Qiaex Gel Extraction Kit II (Qiagen, Hilden) wurde die cDNA aus der Gel-Bande gelöst. Die Gelextraktion erfolgte wie in dem vom Hersteller mitgelieferten Handbuch beschrieben. Die eluierte cDNA mit den sog. „sticky-ends“ wurde im weiteren Verlauf in einen Vektor ligiert (vgl. 3.5.6), um anschließend in Bakterienzellen transformiert zu werden (vgl. 3.5.7).

3.5.5.4 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Überprüfung einer erfolgreichen Transformation (vgl. 3.5.7), d.h. der Kontrolle, ob die gewachsenen Klone tatsächlich das gewünschte Produkt aus Vektor und dem jeweiligen PON-Fragment enthielten. Hierfür wurde die Amplitaq-Polymerase verwendet.

Bis zu 5 der gewachsenen Kolonien wurden ausgewählt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Zellen aus den Einzelkolonien entnommen und in folgenden PCR-Ansatz überführt:

(20µl Ansatz:)

2 µl	10-fach Puffer	
2 µl	dNTPs (2mM)	
1,6 µl	MgCl	
0,4 µl	Forward-Primer	à für pGEM®-T-Vector M13F (10mM)
0,4 µl	Reverse-Primer	à für pGEM®-T-Vector M13R (10mM)
0,1 µl	Amplitaq	
13,5 µl	H ₂ O	

Eine Übersicht über die verwendeten Primer gibt Tab.1

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

1.)Denaturierung der DNA und

Aktivierung der Amplitaq-Polymerase	95°C	9 min.
2.)Denaturierung	94°C	1 min.
3.)Annealing	58°C	20 sek.
4.)Elongation	72°C	2-5 min.
5.)Lagerung	4°C	bis zur Weiterverarbeitung

Die Schritte 2.) bis 4.) wurden in 35 Zyklen wiederholt

Die Produkte der Kolonie-PCR wurden elektrophoretisch in einem horizontalen 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Mittels eines mit aufgetragenen Standards („Smart Ladder“) konnte so die Größe des jeweiligen PCR-Fragmentes abgelesen und mit der Größe des jeweiligen Inserts verglichen werden. Bei Kolonien, bei denen es zuvor zu einer Transformation eines Plasmids ohne Insert gekommen war, wurde entsprechend nur die Klonierungsstelle amplifiziert. So ließ sich anhand der Länge des entstandenen Produkts erkennen, ob das gewünschte Fragment korrekt in den Vektor kloniert worden war.

3.5.6 Ligation

Die Ligation von PCR-Fragmenten in einen Vektor (vgl. Tab. 2.3.2) erfolgte in einem Volumen von 5 µl, wobei das Insert im Verhältnis zum Vektor in mindestens fünffachem Überschuss vorlag. Hierbei wurde ein reiner TA-Vektor, der pGem®T-Vektor (Promega), verwendet.

In folgendem Ligationsansatz wurden die Proben (vgl. 3.5.5.3.2) über Nacht bei 16 °C inkubiert:

(5 µl Ansatz:)

0,5 µl	H ₂ O
2,5 µl	2-fach Puffer
0,5 µl	Vektor
1 µl	PCR-Produkt (mit „sticky-ends“; zuvor aus Agarose-Gel isoliert)
0,5 µl	T4-DNA-Ligase (1 U)

3.5.7 Transformation

Die Transformation des TA-Vektors mit dem ligierten PCR-Produkt erfolgte auf Eis. Von den über Nacht ligierten Proben wurde 1 µl in 25 µl *E.coli*-Suspension (TOP10F['], Invitrogen, Groningen, Niederlande) überführt und 30 Minuten auf Eis inkubiert, um anschließend für 30 sek. bei 42°C hitzeschockbehandelt zu werden. Nach der Zugabe von 125 µl SOC-Medium (0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) wurden die Proben für 1 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde dann auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit dem für das jeweilige Plasmid selektiven Antibiotikum versetzt waren (100 µg/ml Carbenicillin für den pQE2-Vektor sowie für den pGEM®-T-Vector), und über Nacht bei 37 C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR (vgl. 3.5.5.4) auf das richtige Plasmid überprüft. Die Klone mit einem Insert der spezifischen Länge des jeweiligen Gens wurden in 5 ml TSB-Medium unter Schütteln (250 Upm) im Brutschrank bei 37 °C über Nacht vervielfältigt und die Plasmide über ein Mini-Präparationskit (NukleoSpin®PlasmidQuickPure; Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. 5µl des aufgereinigten Plasmids wurden mit 2 µl Primer (M13f / r) zum Sequenzieren in das Labor Seq-Lab-GmbH-Göttingen versandt.

3.5.8 Anlegen einer Glycerin-Kultur

Von den sequenzierten Klonen mit dem korrekten Insert wurden zur Konservierung Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden die entsprechenden Kolonien auf der zuvor erstellten Masterplatte angeimpft; d.h. mit einer sterilen Pipettenspitze wurden einzelne Zellen in 7 ml LB-Medium, dem zuvor das entsprechende Antibiotikum zugefügt wurde (7 µl Carbenicillin [100 µg/ml] für den pGEM®-T-Vector) überführt und über Nacht bei 37 °C vermehrt. Am nächsten Morgen wurden 900 µl Bakteriensuspension der jeweiligen Bakterienkultur in ein Cryotube (2 ml) mit je 100 µl vorgelegtem Glycerin gegeben, kurz durch Vortexen gemischt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

3.5.9 Erstellung einer Standardkurve (Vektorverdünnungsreihen)

Theoretisch führt jeder PCR-Zyklus zu einer Verdopplung der Menge der amplifizierten Sequenz. Tatsächlich ist die Effizienz jedoch geringer und zudem primer- und sequenzabhängig. Aus diesem Grund ist für jedes Primerpaar die Erstellung einer Standardkurve notwendig. Hierzu wurden „real-time“-PCR-Läufe mit den Verdünnungsreihen (1:10 bis 1:100.000.000) der zuvor sequenzierten Plasmide (pGEM®-T-Vektor) mit korrektem Insert gemacht. Die aus diesen Verdünnungen resultierenden Kurven wurden als Standardkurven für die Gene PON1, PON2 und PON3 verwendet.

3.5.10 Die Umrechnung von µg/ml in Teilchen pro Liter

Ein Basenpaar entspricht durchschnittlich 649 Dalton

(bp Vektor + bp Insert) x 649 Dalton

= Molmasse des Vektors mit Insert

Dabei hatte der pGEM®-T-Vektor ohne Insert 3.000 bp.

Gen	Größe des amplifizierten Teils des Gens:	Vektor + Insert	x 649 Dalton = Dalton x bp = g = 1 mol = Molmasse
PON1	217 bp	3.217 bp	2087833 mol
PON2	213 bp	3.213 bp	2085237 mol
PON3	134 bp	3.134 bp	2033966 mol

Tab. 3: Die Tabelle veranschaulicht die Berechnung der Molmasse des Vektors mit Insert. Sie dient als Grundlage für die Umrechnung von µg/ml in Teilchen pro Liter für PON1, PON2 und PON3.

Anhand der photometrischen Konzentrationsmessung in µg/ml erfolgte dann eine genaue Umrechnung in mol und Teilchen pro Liter auf Grundlage der Avogadroschen Konstante N_A , die definiert ist als:

- $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen
 - Konzentration in Teilchen/l
- $$= (\text{Konzentration in [g/l]} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ Teilchen}) / \text{Molmasse [g]}$$

3.6 Immunhistologische Anfärbung (Vectastain ABC-System)

Hierzu wurde das Vectastain ABC System (Vector Laboratories) verwendet, das sich aus Avidin (Glykoprotein, das eine extrem hohe Affinität zu Biotin besitzt) und einer biotinylierten Alkalischen Phosphatase zusammensetzt. Bei der ABC-Methode handelt es sich um einen Avidin-Biotin-Komplex (C für Complex), bei dem die Affinität des Avidins zum Biotin ausgenutzt wird.

Zunächst werden die Gewebeschnitte mit einem spezifischen primären Antikörper inkubiert (PON2-„rabbit“, Biozol, Eching), der das nachzuweisende Antigen bindet. Es folgt die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der gegen IgGs der Spezies des ersten Antikörpers gerichtet und biotinyliert ist („pig2-anti-rabbit“, Biozol, Eching). Im dritten Schritt werden die Gewebeschnitte mit dem Avidin/Biotin-Enzymkomplex (ABC) inkubiert. Das Avidin dieses Komplexes (ABC) wiederum bindet den biotinylierten Brücken-Antikörper und führt somit zu einer Koppelung der Alkalischen Phosphatase an den Antigen-Antikörper-Komplex. Die Alkalische Phosphatase-Aktivität wird schließlich durch das im Kit mitgelieferte Substrat detektiert, das nach Hämalaun-Färbung eine rote Tönung auf den Schnitten hinterlässt. Als Negativkontrolle wurden Schnitte ohne primären Antikörper inkubiert.

Die PON2-AK-Färbung wurde sowohl an Paraffinschnitten als auch an Kryoschnitten menschlicher Haut durchgeführt.

Zum Entparaffinieren der histologischen Schnitte wurden die Proben eine Stunde im Brutschrank bei 63 °C inkubiert und zwei Mal für 10 min. mit Xylol sowie anschließend in einer Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 80%, 70% ETHO) und dann in Wasser gewaschen. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte 20 min. in Citratpuffer im Dampfgarer gekocht und anschließend eine Stunde abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde der primäre Antikörper gegen PON2 (PON2-„rabbit“, Biozol, Eching) in einer 1:100er- bzw. 1:500er-Verdünnung in TBS-Puffer mit 1% BSA angesetzt.

Die Puffer setzen sich wie folgt zusammen:

Citratpuffer 10mM pH 6:

- 9 ml Stammlsg. A
= 0,1 M Zitronensäure (21,01 g C₆H₈O₇ x H₂O) in 1 l Aqua dest.
- 41 ml Stammlsg. B
= 0,1 m Natriumcitrat (29,41 g C₆H₅O₇ Na³ x 2H₂O) in 1 l Aqua dest.
- 450 ml A.dest.

TSB-Puffer = 10x Puffer pH 7,6:

- 50 mM Tris (6,055 g)
- 150 mM NaCl (8,766 g)

1 x Gebrauchslösung mit physiologischer NaCl -Lösung verdünnen.

Die abgekühlten Schnitte wurden auf dem Deckglas 5 min. in TBS-Puffer geschüttelt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen an endogenes Biotin wurde für 10 min. 12% BSA auf die Schnitte gegeben. Im Anschluss hieran wurde der primäre Antikörper (PON2-„rabbit“, Biozol, Eching) auf die Schnitte gegeben und für 30 min. im Brutschrank bei 37 °C bzw. über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert. Bei der jeweiligen Negativkontrolle bleibt das BSA während der Inkubationszeit auf den Schnitten; es wird kein

primärer AK auf die Negativkontrolle gegeben. Nach der Inkubation erfolgte eine zweimalige Spülung mit TBS-Puffer für 3 min. Der zweite, biotinylierte AK („pig2-anti-rabbit“, Biozol, Eching) wurde für 30 min. bei Raumtemperatur auf die Hautschnitte gegeben. Das AB-Reagenz wurde wie folgt angesetzt: 1000 µl TBS + 10 µl A + 10 µl B (pH 7,6)

Nach der Inkubation mit dem sekundären AK wurden die Proben nochmals zweifach mit TBS-Puffer für jeweils 3 min. gespült und anschließend für 30 min. in einer feuchten Kammer mit AB-Reagenz inkubiert. Dann wurden die Proben drei Mal mit Tris-TBS (pH 8,2-9,5) für 3 min. gespült und währenddessen das Substrat für die alkalische Phosphatase angesetzt. Die Ansetzung des AP-Substrats erfolgte nach Angaben des Herstellers (VectorLaboratories).

Anschließend wurden die histologischen Schnitte im Dunkeln mit dem unmittelbar zuvor angesetzten AP-Substrat für 30 min. in einer feuchten Kammer inkubiert und dann 5 min. mit Wasser gespült und 30 sek. mit Hämalaun (30 ml Hämalaun + 30 ml H₂O) eingefärbt. Nach dem Waschen wurden die Proben zum Entwässern in umgekehrter Reihenfolge in der Alkoholreihe für einige Sekunden inkubiert und abschließend mit Eukitt eingedeckt.

Die gefärbten und eingedeckten Präparate wurden anschließend mit dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 100-200x ausgewertet und fotografiert. Zur Nachbearbeitung der Bilder wurde das Computerprogramm Adobe Photoshop 3.2 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Darstellung der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit abgebildeten Diagramme stellen repräsentative Beispiele für die unabhängig durchgeführten Versuche mit Keratinozyten bzw. Sebozyten dar, die wiederholt vergleichbare Resultate aufwiesen. Die angegebenen Messwerte entsprechen, soweit nicht anders angegeben, den Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. Als Fehlerbalken sind die Standard-Abweichungen („standard deviation“, SD) der Messungen eingezeichnet. Zum statistischen Vergleich und zur Überprüfung der Ergebnisse auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte wurde der Student-T-Test durchgeführt. Im Fall von signifikanten Abweichungen der Varianzen der zu vergleichenden Mittelwerte bei dem zuvor durchgeführten Levene-Test (F-Test) wurde der t-Test für inhomogene Varianzen durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (für ungerichtete Hypothesen) wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.2 Generierung eines primerspezifischen Temperaturprofils für die „real-time“-PCR sowie Erstellung primerspezifischer Standardkurven.

Um die optimale „Annealingtemperatur“ für die jeweiligen Primer (vgl. Tab.1) herauszufinden, wurden Keratinozyten mit proinflammatorischen Zytokinen stimuliert (vgl. 3.1.4). Die RNA der stimulierten Keratinozyten sowie der unstimulierten Kontrollen wurde isoliert (vgl. 3.2) und nach Konzentrationsmessung durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (vgl. 3.3). Mit der so erhaltenen cDNA wurden „real-time“-PCRs mit unterschiedlichen „Annealingtemperaturen“ (58 °C, 60 °C, 62 °C, 64 °C) durchgeführt. Zur Kontrolle der „real-time“-PCR lief immer eine Negativkontrolle mit. Als interner Standard wurde die PCR immer mit den Primern für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; „housekeeping gene“) wiederholt. Dabei geht man von der Annahme aus, dass dieses Gen konstitutiv in einer konstanten Menge transkribiert wird (52;53).

4.2.1 PON1-Expression in primären Keratinozyten

Mehrfache Versuche, eine Expression von PON1 in primären Keratinozyten über „real-time“-PCR nachzuweisen, schlugen fehl. Auch unter Ausnutzung verschiedener Temperaturprofile sowie unter Verwendung von Enzymen unterschiedlicher Hersteller konnte weder in stimulierten noch in unstimulierten Keratinozyten eine Expression von PON1 nachgewiesen werden. Um fehlerhafte Primer auszuschließen, wurden die „real-time“-PCRs mit aus Zellen von Thymus, Knochenmark sowie aus der Milz gewonnener cDNA wiederholt. Bei einer „Annealingtemperatur“ von 60°C konnte PON1 in der aus Thymuszellen gewonnenen cDNA nachgewiesen werden.

Um dennoch eine Standardkurve zu erstellen, wurde mit der Thymus-cDNA (vgl. 3.5.5) eine PCR mit der Amplitaq-Polymerase sowie mit Pfu-Polymerase bei 60 °C durchgeführt. Nach der PCR wurde das Pfu-PCR-Produkt für 20 min. bei 72 °C mit 0,5 µl Taq-Polymerase sowie 0,5 µl dNTPs (2 mM) inkubiert um A-Enden sog. „sticky-ends“ für eine spätere Ligation und Transformation anzufügen.

Zur Kontrolle der Größe wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Größenstandard verglichen.

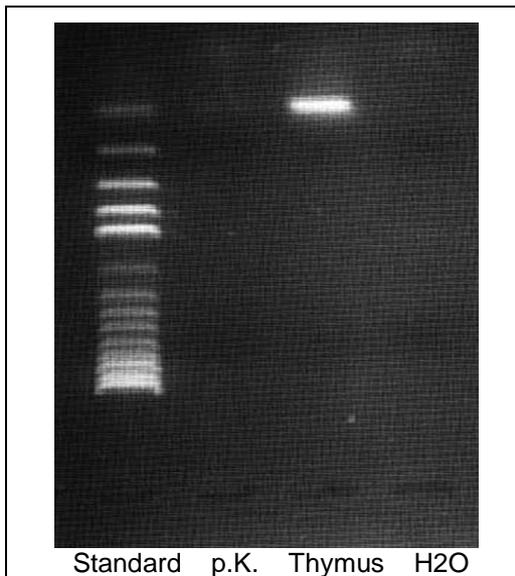


Abb. 1: PON1 wird nicht in primären Keratinozyten, aber in Thymuszellen exprimiert.

Nach dem Versuch der Amplifikation der cDNA aus primären Keratinozyten sowie Amplifikation der cDNA aus Thymuszellen durch PCR mit Amplitaq-Polymerase und PON1-Primern wurde das PCR-Produkt neben einer Negativkontrolle auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der 200bp-Standard dient dem Größenvergleich der PCR-Produkte.

PON1 konnte auf cDNA-Ebene in Thymuszellen, nicht jedoch in primären Keratinozyten nachgewiesen werden. Die in Abb.1 zu sehenden Banden wurden ausgeschnitten und die PCR-Produkte aus dem Agarosegel extrahiert (vgl. 3.5.5.3.2). Anschließend wurden die PCR-Produkte in einen pGEM®-T-Vektor ligiert (vgl. 3.5.6) und damit *E. coli Top10* transformiert (vgl. 3.5.7). Durch Kolonie-PCRs mit folgender elektrophoretischer Auftrennung wurden die gewachsenen Plasmide auf ihre Größe kontrolliert. Dies ermöglichte indirekt eine Aussage über eine gelungene Klonierung. Die Kolonien mit der passenden Größe wurden angeimpft und die Vektoren wurden isoliert und sequenziert (vgl. 3.5.7). Durch die Sequenzierung wurde sichergestellt, dass das amplifizierte, ligierte und transformierte Gen in allen Basenpaaren dem PON1-Gen entsprach. Mutationen konnten somit sicher ausgeschlossen werden.

Zur Erstellung der Standardkurve für die RT-PCR mit PON1-Primern wurde eine Verdünnungsreihe der PON1-Vektoren (pGEM®-T-Vector) mit Verdünnungen von 1:10 bis 1:10.000.000.000 vorgenommen (nicht dargestellt).

4.2.2 PON2-Expression in primären Keratinozyten

Mittels „real-time“-PCR-Analyse wurde die Expression von PON2 in stimulierten sowie unstimulierten primären Keratinozyten mit „Annealingtemperaturen“ von 60 °C, 62 °C sowie 64 °C untersucht. Für PON2 konnte bei allen getesteten „Annealingtemperaturen“ eine eindeutige Expression dargestellt werden. Die besten „Crossingpoints“ zeigten sich für PON2 bei einer „Annealingtemperatur“ von 62 °C.

Das Ergebnis einer deutlichen PON2 Expression wurde in weiteren „real-time“-PCRs sowie in konventionellen PCRs reproduziert.

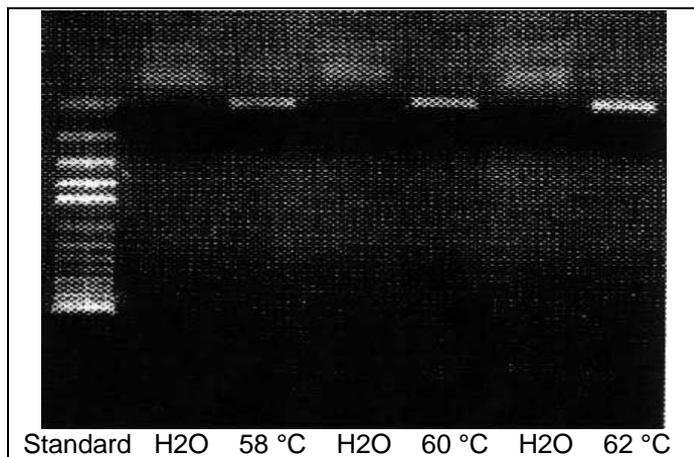


Abb. 2: PON2 wird in primären Keratinozyten exprimiert.

Nach Amplifikation des PON3-Gens durch PCR mit cDNA primärer Keratinozyten bei „Annealingtemperaturen“ von 58 °C, 60 °C u 62 °C wurden die PCR-Produkte auf ein 1%iges Agarose-Gel neben der jeweiligen Negativkontrolle (H₂O) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die deutlich stärkere Fluoreszenz der 62°C-Bande bestätigt die optimale „Annealingtemperatur“ von 62 °C für PON2. Der 200 bp-Standard dient dem Größenvergleich der PCR-Produkte.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurden Banden, die das amplifizierte Gen enthielten aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die cDNA wie in 3.5.5.3.2 beschrieben aus dem Agarosegel extrahiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einen pGEM®-T-Vektor ligiert (vgl. 3.5.6) und damit *E. coli Top10* transformiert (vgl. 3.5.7). Durch Kolonie-PCRs mit folgender elektrophoretischer Auftrennung wurden die gewachsenen Plasmide auf ihre Größe kontrolliert. Dies ermöglichte indirekt eine Aussage über eine gelungene Transformation. Die Plasmide der Kolonien mit passender Größe, wurden nach Isolation zum Sequenzieren in das Labor „Seq-Lab-GmbH Göttingen“ verschickt. Durch die Sequenzierung wurde sichergestellt, dass das amplifizierte, ligierte und transformierte Gen in allen Basenpaaren dem PON2-Gen entsprach. Mutationen konnten somit sicher ausgeschlossen werden.

4.2.3 PON3-Expression in primären Keratinozyten

Mittels „real-time“-PCR-Analyse wurde die Expression von PON3 in stimulierten sowie unstimulierten primären Keratinozyten bei Annealingtemperaturen von 58 °C, 60 °C, 62 °C sowie 64 °C untersucht. Die besten „Crossingpoints“ zeigten sich für PON3 bei einer Annealingtemperatur von 60 °C. Das Ergebnis einer leichten PON3 Expression konnte in weiteren „real-time“-PCRs sowie in konventionellen PCRs reproduziert werden.

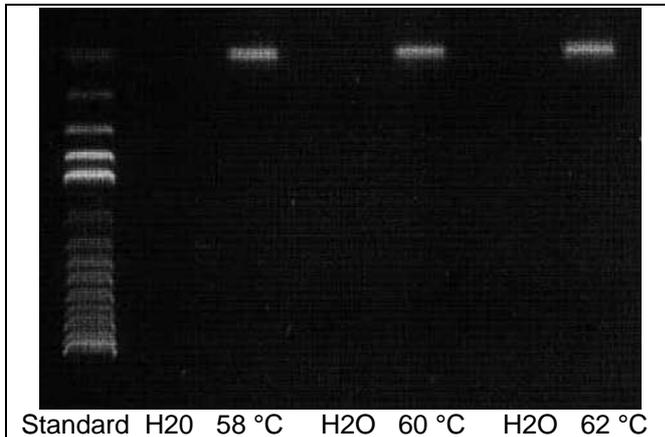


Abb.3: PON3 wird in primären Keratinozyten exprimiert.

Die Abbildung zeigt das durch PCR amplifizierte PON3-Gen bei „Annealingtemperaturen“ von 58°C, 60°C und 62°C, jeweils aufgetragen neben der dazugehörigen Negativkontrolle (H2O). Der 200 bp-Standard dient dem Größenvergleich der PCR-Produkte.

Die in Abb. 3 zu sehenden PON3-Banden wurden ausgeschnitten und die PCR-Produkte aus dem Agarosegel extrahiert (vgl. 3.5.5.3.2). Anschließend wurden die PCR-Produkte in einen pGEM®-T-Vektor ligiert (vgl. 3.5.6) und dann in *E. coli Top10* transformiert (vgl. 3.5.7). Durch Kolonie-PCRs mit folgender elektrophoretischer Auftrennung wurden die gewachsenen Kolonien auf ihre Größe kontrolliert. Dies ermöglichte indirekt eine Aussage über eine gelungene Transformation. Die Plasmide der Kolonien mit passender Größe wurden nach Isolation zum Sequenzieren in das Labor „Seq-Lab-GmbH Göttingen“ verschickt. Durch die Sequenzierung wurde sichergestellt, dass das amplifizierte, ligierte und transformierte Gen in allen Basenpaaren dem PON2-Gen entsprach. Mutationen konnten somit sicher ausgeschlossen werden.

4.2.4 Erstellung der Standardkurven für PON2 und PON3

Zur Erstellung der Standardkurven für die „real-time“-PCR mit PON2 bzw. PON3-Primern wurde eine Verdünnungsreihe der PON2- bzw. PON3-Vektoren (pGEM®-T-Vector) mit Verdünnungen von 1:10 bis 1:10.000.000.000 vorgenommen. Die photometrische Messung ergab eine Konzentration des Plasmids mit PON2-Insert von 118 µg / ml.

Daraus errechnete sich unter Berücksichtigung der Molmasse von 2085237 g bzw. mol eine Konzentration von $3,41 \times 10^{16}$ Teilchen / l (vgl. 3.5.8.1):

$$118 \mu\text{g} / \text{ml} = 0,118 \text{ g} / \text{l} : 2085237\text{g} \times 6,022 \times 10^{23} = 3,41 \times 10^{16} \text{ Teilchen} / \text{l}$$

$$= 3,41 \times 10^{10} \text{ Teilchen} / \mu\text{l}$$

Auf dieser Grundlage erstellen wir eine Standardkurve bei der wir die berechneten Transkripte auf die jeweils dazugehörigen „Crossingpoints“ auftragen. (vgl. Abb. 4)

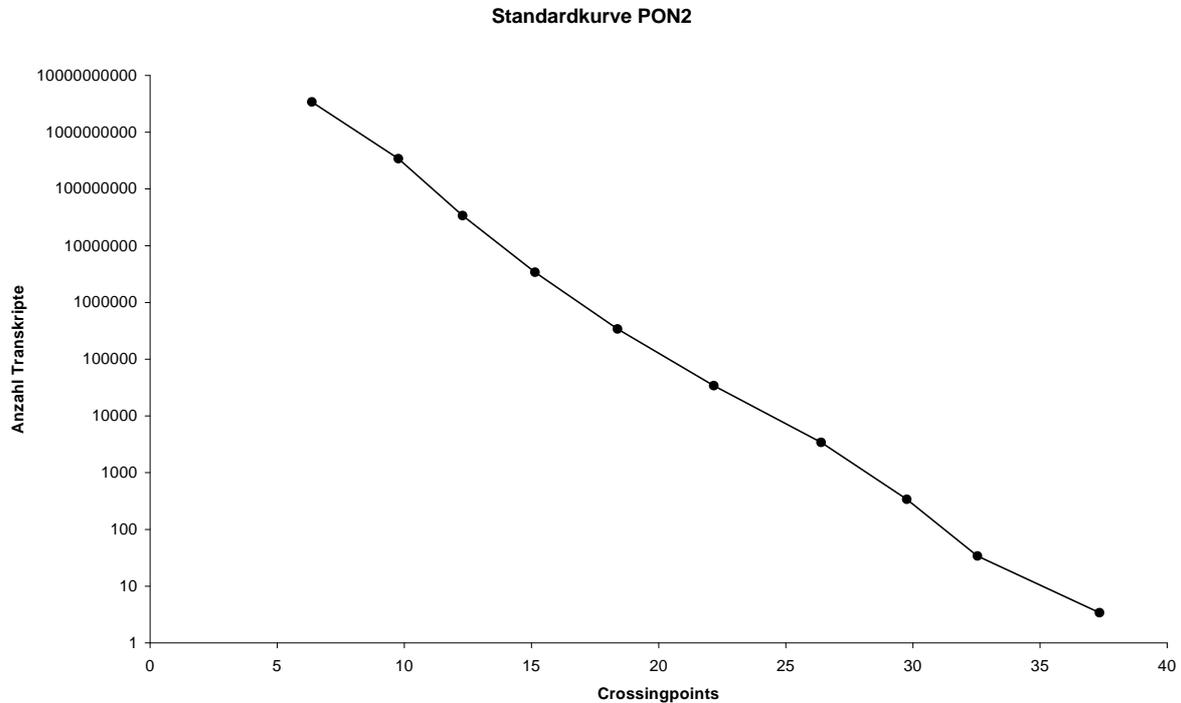


Abb. 4: Standardkurve für die PON2-Amplifikation mittels „real-time“-PCR.

Der Graf zeigt die Anzahl der PON2-Moleküle in logarithmischer Darstellung in Abhängigkeit zu den jeweiligen „Crossingpoints“.

Die Konzentrationsmessung des Plasmids mit PON3-Insert und die anschließende Umrechnung in Transkripte führten zu folgendem Ergebnis.

$$52,5 \mu\text{g} / \text{ml} = 0,0525 \text{ g} / \text{l} : 2033966\text{g} \times 6,022 \times 10^{23} = 1,55 \times 10^{16} \text{ Teilchen} / \text{l}$$

$$= 1,55 \times 10^{10} \text{ Teilchen} / \mu\text{l}$$

Auf dieser Grundlage wurde eine Standardkurve erstellt, bei der die berechneten Transkripte gegen die jeweils dazugehörigen „Crossingpoints“ aufgetragen wurden (nicht abgebildet).

4.2.5 PON2 wird in primären Keratinozyten stärker exprimiert als PON3

Anhand der mit Excel berechneten Funktionsformel der Trendlinie der jeweiligen Standardkurve lässt sich eine Wertetabelle erstellen, mit der sich die erhaltenen „Crossingpoints“ der erfolgten „real-time“-PCRs umrechnen lassen in Transkriptmengen der jeweiligen Proben für PON2 bzw. PON3 der getesteten cDNA.

Dies ermöglichte einen direkten Vergleich der quantitativen PON2-Expression zur PON3-Expression in primären Keratinozyten. Wie in Abb. 5 veranschaulicht, lag die PON2-Expression sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Zellen mit einer absoluten

Molekülzahl von 8000 bis über 10000 im Vergleich zu um die 2000 transkribierten Molekülen PON3 um ein Vielfaches höher.

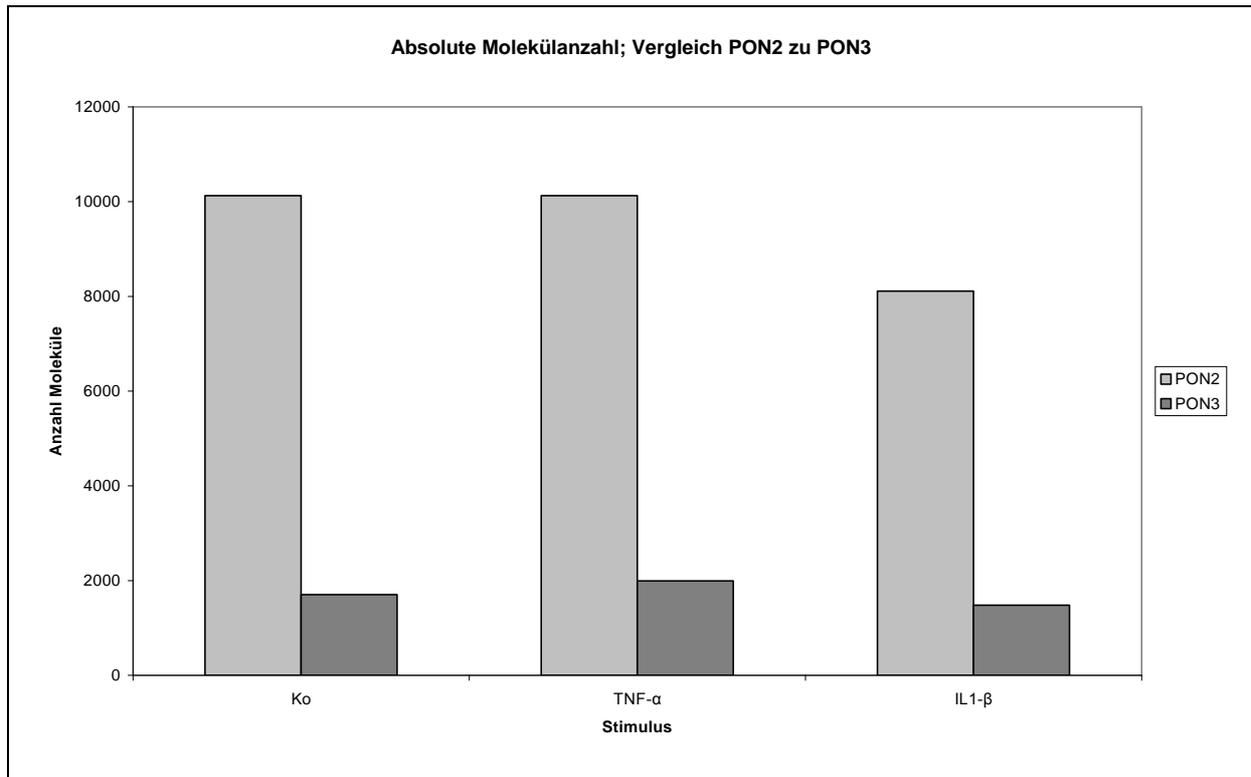


Abb. 5: Exemplarische Darstellung der Absoluten Transkriptanzahl von PON2 und PON3

Anhand der mit Excel berechneten Funktionsformel der Trendlinie wurde eine Wertetabelle erstellt. Die „Crossingpoints“ der erfolgten „real-time“-PCRs wurden so in Anzahl Transkripte für PON2 bzw. PON3 der getesteten cDNA umgerechnet. Die sechs exemplarisch dargestellten Balken stellen jeweils Einzelmessungen von PON2 bzw. PON3 dar. Die Tabelle zeigt eine deutlich geringere PON3-Expression im Vergleich zu PON2.

Da die Expression von PON3 im Vergleich zur PON2-Expression in primären Keratinozyten sehr gering war wurden die weiteren Versuche auf die Untersuchung der PON2-Expression in der Haut fokussiert.

4.3 Stimulationsversuche mit primären Keratinozyten

4.3.1 Stimulationsversuche mit proinflammatorischen Zytokinen

Zur Untersuchung einer möglichen Induktion der PON2-Expression in primären Keratinozyten wurden die Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen IL-17, IL-1 β , TNF- α , IL-1 α (50 ng/ml) über 8 Stunden bzw. mit TGF- α und IFN- γ (mit 50ng/ml) über 3 Tage stimuliert (vgl.3.1). Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels „real-time“-PCR konnte dann die Stimulation untersucht werden. Als Positivkontrolle der Stimulation dienten hierbei Proteine, deren Induktion durch das jeweilige Zytokin bereits bekannt war (vgl. Abb. 7 und 8). Neben leichten Schwankungen in der Expression konnten wir, wie Abb. 7 und Abb. 8 zeigen, keine Induktion der PON2-Expression feststellen. PON2 scheint vielmehr konstitutiv exprimiert zu werden.

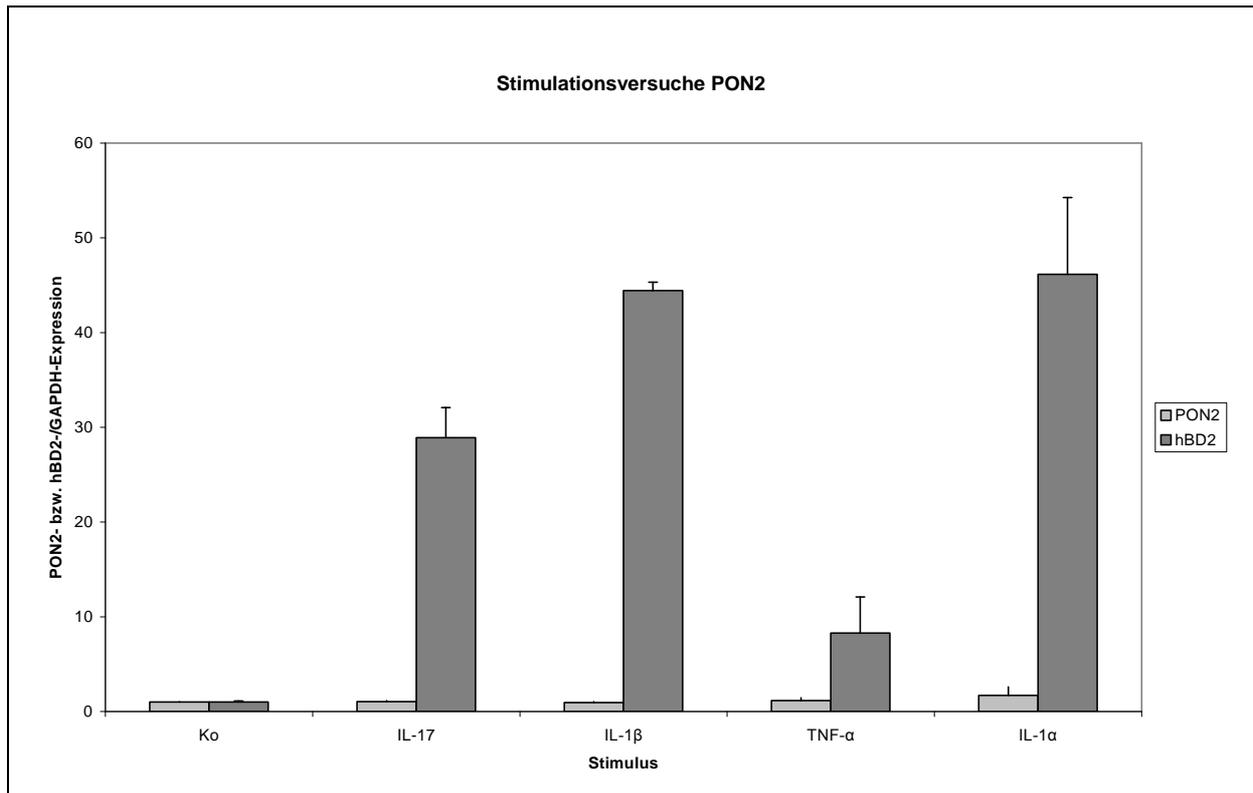


Abb. 6: Die PON2-Expression lässt sich durch Stimulation der primären Keratinozyten mit IL-17, IL-1 β , TNF- α , IL-1 α (50 ng/ml über 8 Stunden) nicht induzieren.

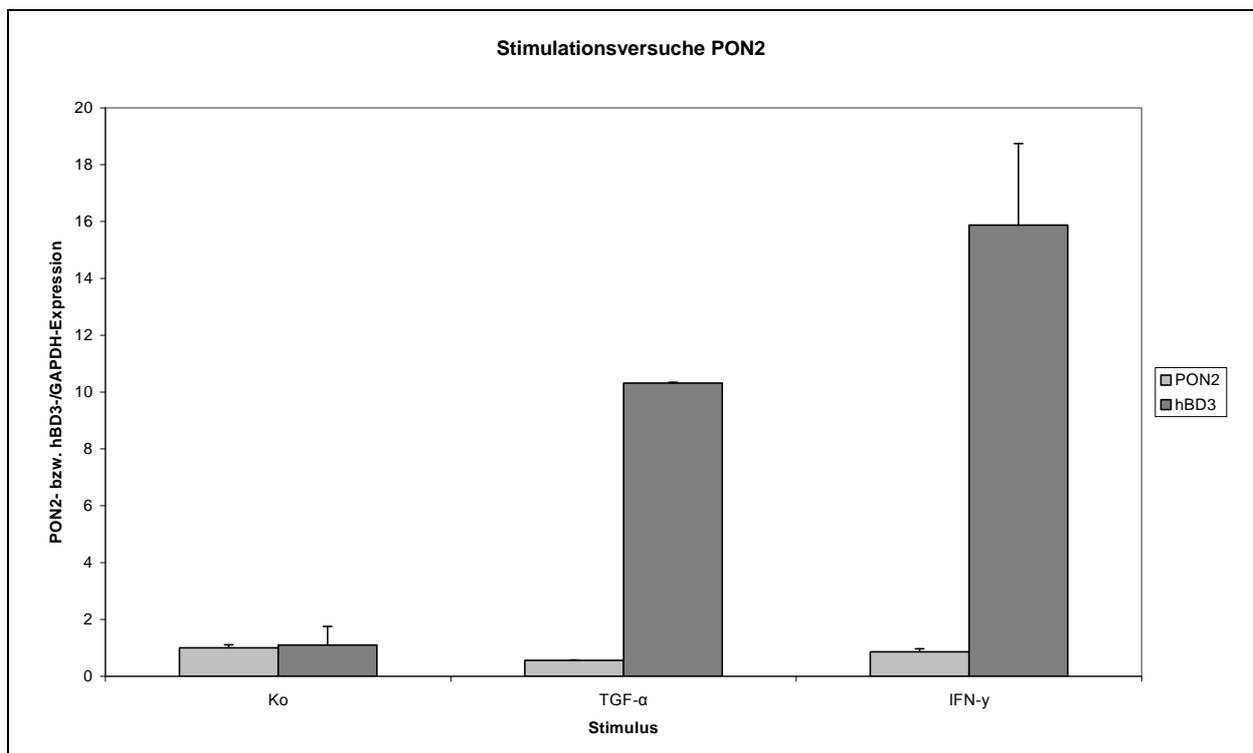


Abb. 7: Die PON2-Expression lässt sich durch Stimulation der primären Keratinozyten mit TGF- α und IFN- γ (mit 50ng/ml über 3 Tage) nicht induzieren.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen die PON2-Expression relativ zu GAPDH in primären Keratinozyten analysiert mittels „real-time“-PCR. Die jeweils daneben aufgetragene hBD2- bzw. hBD3-Expression relativ zu GAPDH dient als Positivkontrolle der Stimulation. (Ko = unstimulierte Kontrolle).

4.3.2 Stimulationsversuche mit Bakterienüberständen

Um zu prüfen, ob die Expression von PON2 induzierbar ist, wurden primäre Keratinozyten für 19 h mit Überständen adhärent gewachsener Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von PON2 mittels „real-time“-PCR analysiert. Hierbei konnte keine Induktion festgestellt werden. Zur Kontrolle der Stimulation wurde die mRNA-Expression von hBD2, welche durch *P. aeruginosa*-Überstände stimuliert wird, mittels „real-time“-PCR erfasst.

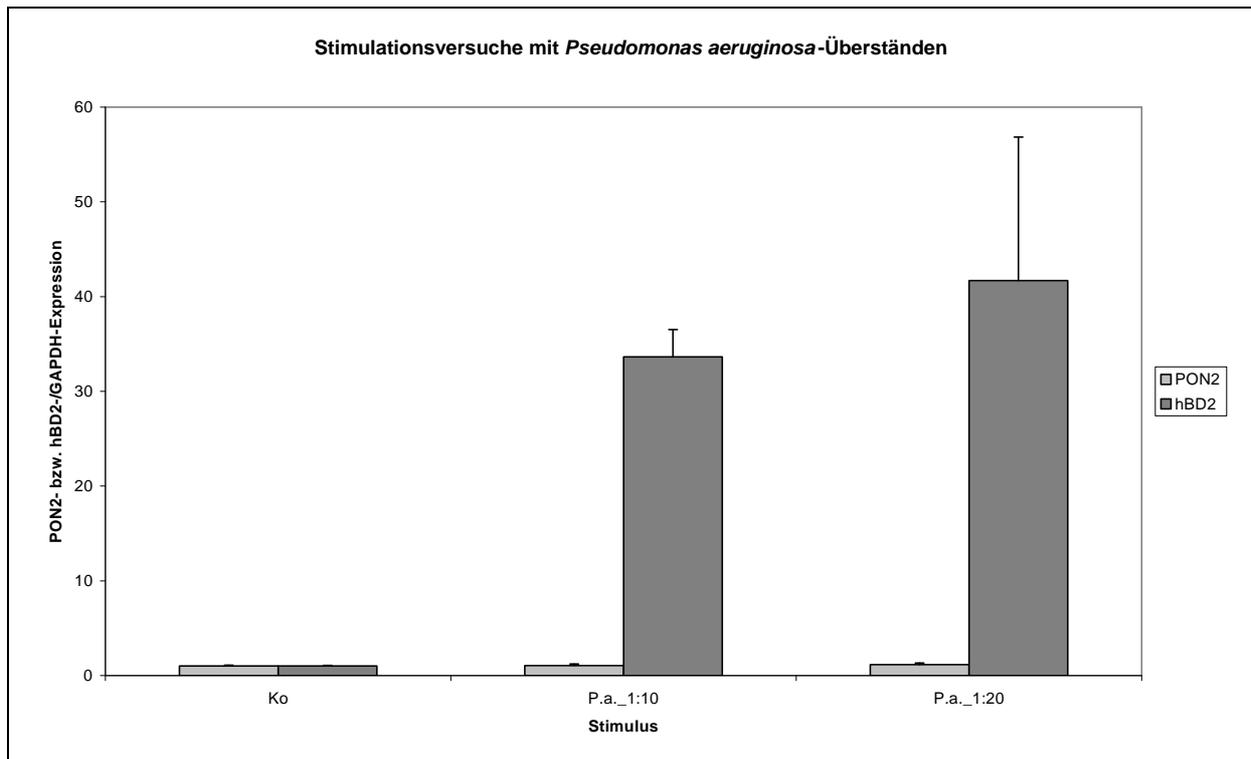


Abb. 8: Die PON2-Expression in primären Keratinozyten wird durch Überstände von adhärent wachsenden *Pseudomonas aeruginosa* nicht stimuliert.

Die Abbildung zeigt die PON2-Expression relativ zu GAPDH in primären Keratinozyten, analysiert mittels „real-time“-PCR. Die jeweils daneben aufgetragene hBD2-Expression relativ zu GAPDH dient als Positivkontrolle der Stimulation. (P.a. = *P. aeruginosa* Kulturüberstand; Ko = unstimulierte Kontrolle).

4.3.3 Stimulationsversuche mit 3OC12-HSL

Auf der Suche nach einem möglichen Induktor für die Expression von PON2 wurden primäre Keratinozyten für 22 h mit N-3-oxododecanoyl-Homoserinlaktone (3OC12-HSL) stimuliert. Das 3OC12-HSL erhielten wir als Eluat von Prof. Eberl aus Zürich. Die 3OC12-HSL-Moleküle wurden gewogen, in Ethylacetat aufgenommen und zur Stimulation der primären Keratinozyten mit Nährmedium auf Konzentrationen von 100 µM, 10 µM und 1 µM verdünnt. Nach Inkubation der Zellen mit den Quorum-Sensing-Molekülen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die mRNA-Expression von PON2 wurde so mittels „real-time“-PCR analysiert. Hierbei konnte keine Induktion der PON2-Expression festgestellt werden (Abb. 9). Zur Kontrolle der Stimulation wurde die mRNA-Expression von IL-8, welche in

Lungenfibroblasten durch 3OC12-HSL stimuliert wird, mittels „real-time“-PCR analysiert (54). Es lässt sich zwar eine leicht erhöhte Expression für IL-8 bei einer Stimulation mit 100 μM beobachten, diese liegt jedoch nach Testung mit dem Student's t-Test im nicht-signifikanten Bereich ($p=0,197$, Abb. 9). Als weitere Positivkontrollen der Stimulation dienten die Analyse der mRNA-Expression von TNF- α sowie IL-1 β . Ein deutlicher Anstieg der Expression dieser Proteine ließ eine fehlerhafte Stimulation ausschließen (nicht dargestellt) (55). Da sich die Frage stellte, ob die QS-Moleküle in der Lage sind, die Expression von antimikrobiellen Peptiden zu induzieren, wurde außerdem eine Analyse der hBD2-mRNA-Expression mittels „real-time“-PCR durchgeführt. Bei hBD2 war bereits bekannt, dass seine Expression durch eine Reihe proinflammatorischer Zytokine sowie durch Bakterienübersäure induziert wird (9;56;57). Es zeigte sich eine Stimulation der mRNA-Expression von hBD2 durch Inkubation der primären Keratinozyten mit 3OC12-HSL bei einer Konzentration von 100 μM , nicht jedoch bei Konzentrationen von 10 μM oder 1 μM .

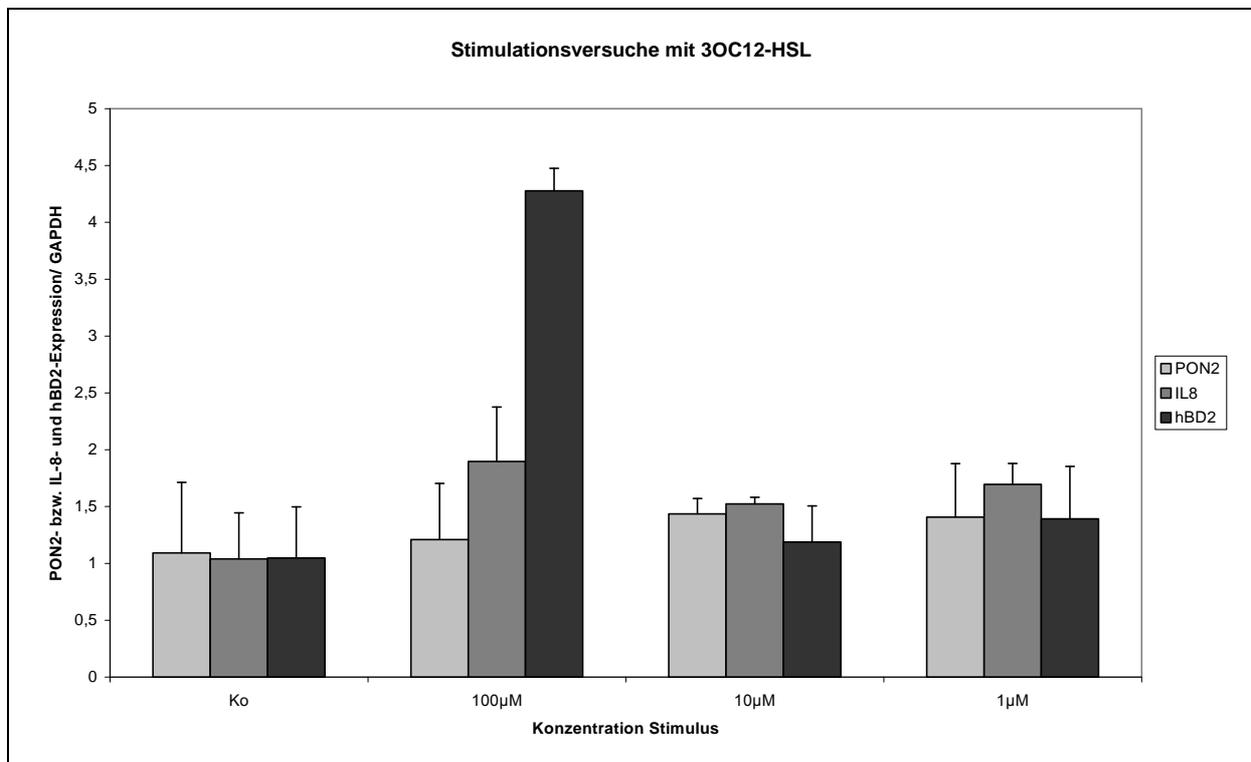


Abb. 9: Es konnte keine Stimulation der PON2-Expression in primären Keratinozyten durch 3OC12-HSL nachgewiesen werden. Eine Stimulation der hBD2-Expression durch 3-OC12-HSL wurde bei einer Konzentration des Stimulus von 100 μM beobachtet.

Die Abbildung zeigt die PON2-, IL-8- und hBD2-Expression relativ zu GAPDH in primären Keratinozyten, analysiert mittels „real-time“-PCR. Es zeigte sich eine Stimulation der IL-8-Expression sowie der hBD2-Expression bei einer 3OC12-HSL-Konzentration von 100 μM , nicht jedoch bei Konzentrationen des Stimulus von 10 μM oder 1 μM .

4.4 Immunhistologischer Nachweis der PON2-Expression auf Proteinebene

Zum immunhistologischen Nachweis der PON2-Expression auf Proteinebene wurden PON2-Antikörper-Färbungen an Paraffinschnitten sowie an Kryoschnitten menschlicher Haut durchgeführt (vgl. 3.13). Auch immunhistologisch konnte eine PON2-Expression in Keratinozyten dargestellt werden. Des Weiteren wurde eine Anfärbung der Talgdrüsen sowie des Epithels ekkriner Schweißdrüsen beobachtet (Abb. 11-14).

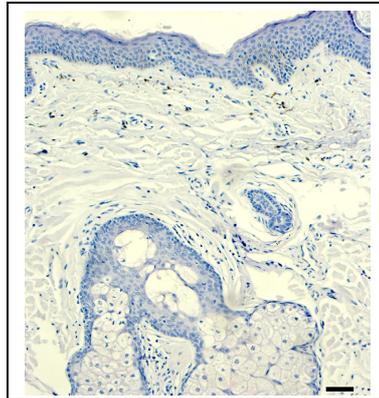


Abb. 10: Nativkontrolle Paraffinschnitt Haut - Negativkontrolle ohne primären Antikörper
Der histologische Paraffinschnitt der Haut zeigt das Oberflächenepithel der Haut sowie Talgdrüsen in der Subkutis. (Maßstabsbalken entspricht 100 µm)

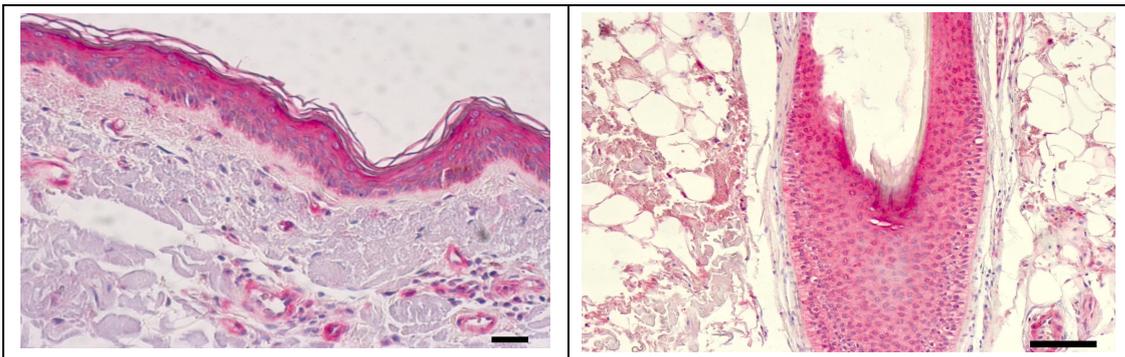


Abb. 11&12: PON2-AK-Färbung Paraffinschnitt Haut

Abb. 11 zeigt eine deutliche Anfärbung des Oberflächenepithels besonders in den obersten Schichten; Abb. 12 zeigt eine deutliche Anfärbung der Bulge-Region des Haarfollikels. (Maßstabsbalken entspricht 100 µm)

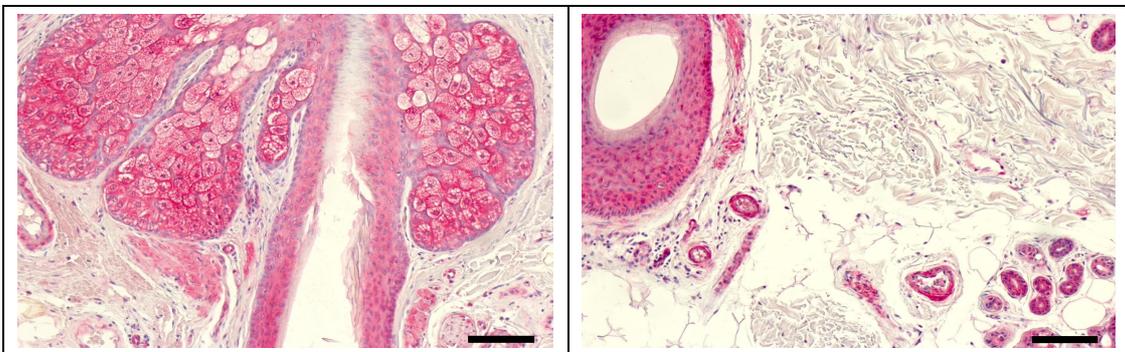


Abb. 13&14: PON2-AK-Färbung Paraffinschnitt Haut

Abb. 13 zeigt eine deutliche Anfärbung der Talgdrüsen und der Haarwurzelscheide; Abb. 14 zeigt eine deutliche Anfärbung Haarwurzelscheide sowie der ekkrinen Schweißdrüsen. (Maßstabsbalken entspricht 100 µm)

4.5 PON2-Expression in Sebozyten

Nachdem in der immunhistologischen Anfärbung neben der PON2-Expression im Oberflächenepithel ebenfalls eine PON2-Expression in den Schweiß- und Talgdrüsen festgestellt werden konnte, wurden außerdem „real-time“-PCRs mit Sebozyten-cDNA und PON2-Primern (Tab. 1) durchgeführt. Die hierbei festgestellte PON2-Expression in Sebozyten auf cDNA-Ebene, ließ sich in weiteren „real-time“-PCRs sowie in konventionellen PCRs bestätigen.

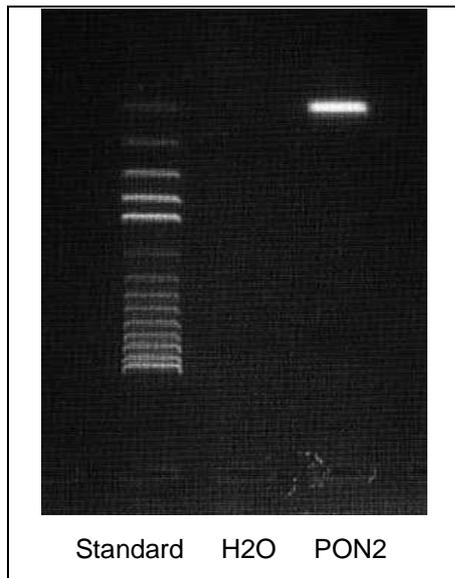


Abb. 15: Pon2 wird in Sebozyten exprimiert.

Die Abbildung zeigt das durch PCR bei einer „Annealingtemperatur“ von 62 °C amplifizierte PON2-Gen aus primären Sebozyten. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Agarose-Gel neben der dazugehörigen Negativkontrolle aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der 200 bp-Standard dient dem Größenvergleich der PCR-Produkte.

4.6 Stimulationsversuche mit proinflammatorischen Zytokinen an Sebozyten

Zur Untersuchung einer möglichen Induktion der PON2-Expression in Sebozyten wurden die Zellen 16 h mit den proinflammatorische Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-17 inkubiert (vgl. 3.4). Anschließend wurde die RNA isoliert (vgl. 3.5.1), in cDNA umgeschrieben (vgl. 3.5.2) und die Stimulation auf cDNA-Ebene mittels „real-time“-PCRs (vgl. 3.5.4) analysiert. Als Positivkontrolle der Stimulation dienten „real-time“-PCRs mit Primern von Genen, deren Induktion durch die jeweiligen Zytokine bereits bekannt war (vgl. Abb.16, Abb.17 und Tab.1). Auch bei den Sebozyten ließ sich keine signifikante Stimulation der PON2-Expression durch diese Zytokine feststellen (Abb. 16,17).

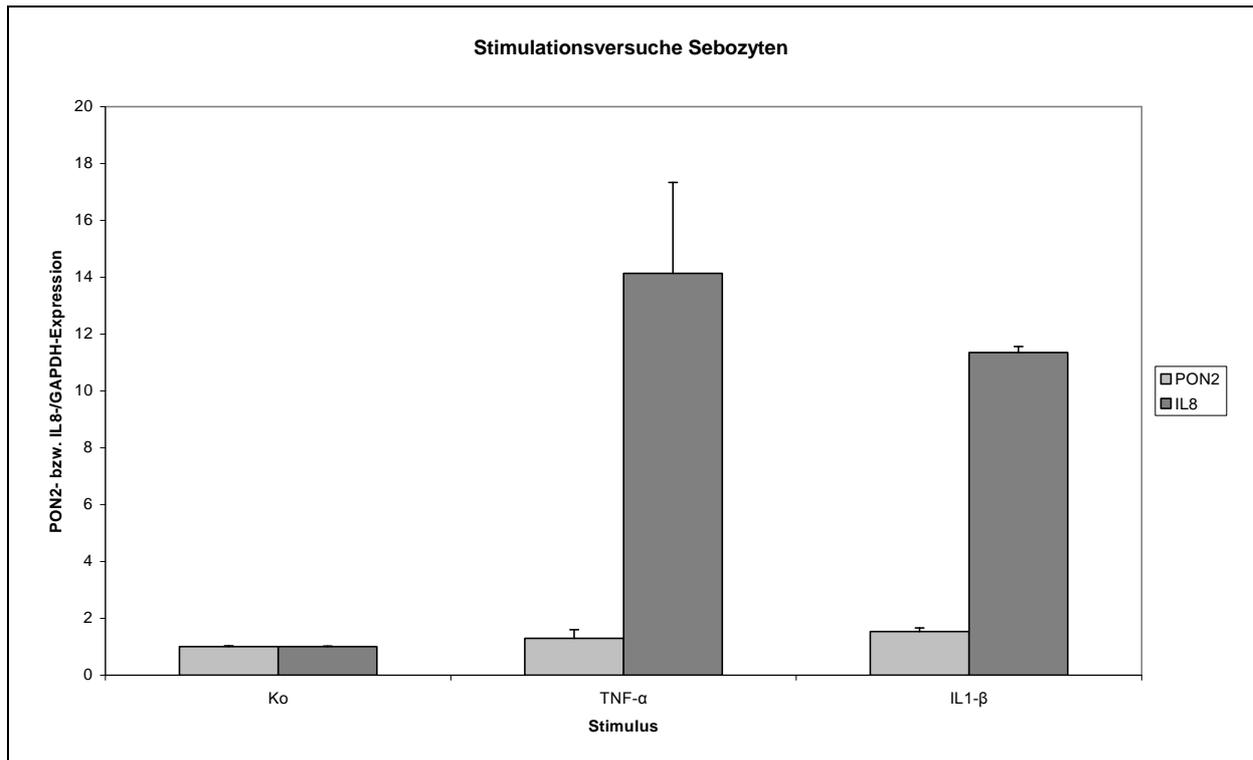


Abb. 16: Die PON2-Expression in Sebozyten lässt sich weder durch TNF- α noch durch IL1- β stimulieren.

Die Abbildung zeigt die PON2-Expression relativ zu GAPDH in Sebozyten, analysiert mittels „real-time“-PCR. Die jeweils daneben aufgetragene IL-8-Expression relativ zu GAPDH dient als Positivkontrolle der Stimulation.

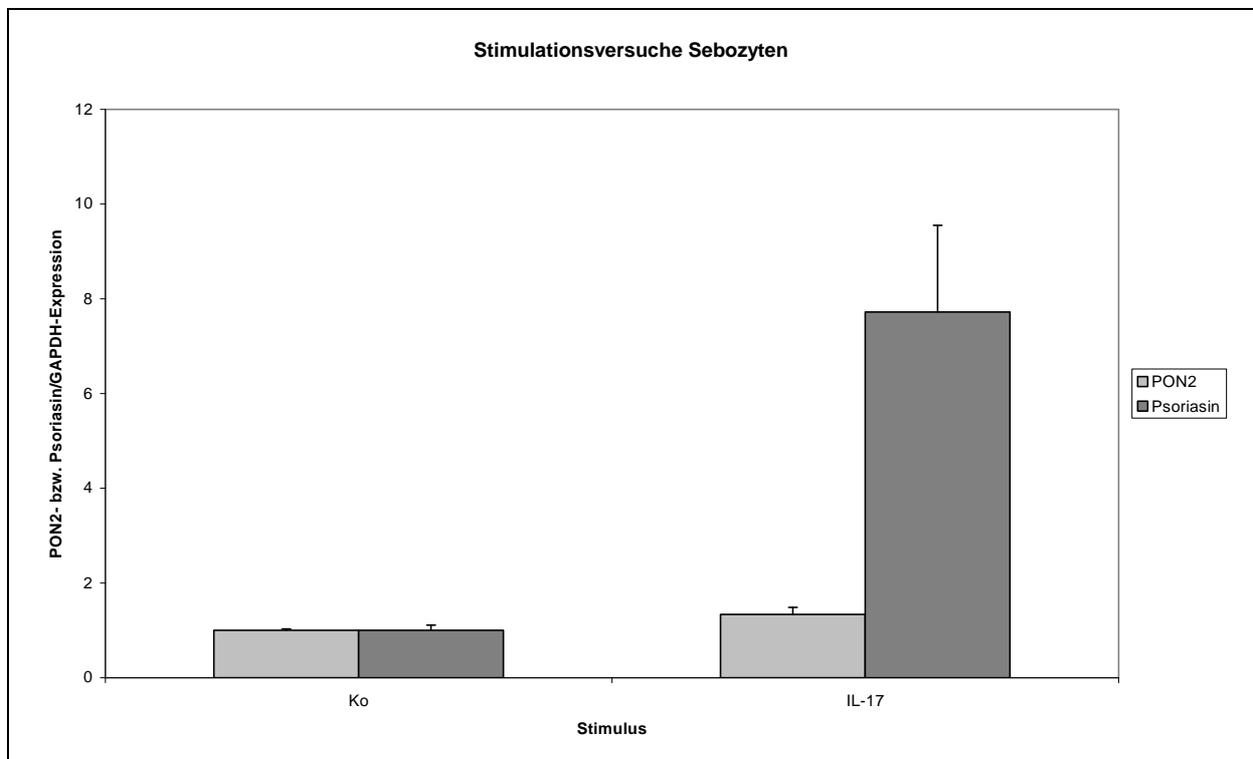


Abb. 17: Die PON2-Expression in Sebozyten lässt sich durch IL17 nicht stimulieren.

Die Abbildung zeigt die PON2-Expression relativ zu GAPDH in Sebozyten, analysiert mittels „real-time“-PCR. Die jeweils daneben aufgetragene Psoriasisin-Expression relativ zu GAPDH dient als Positivkontrolle der Stimulation.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisdiskussion

Paraoxonasen (PON1, PON2 und PON3) sind drei Enzyme einer Genfamilie, die hintereinander auf dem langen Arm des humanen Chromosoms 7 liegen (39). Die physiologische Funktion der Paraoxonasen konnte bisher noch nicht eindeutig bestimmt werden. Das unter den Paraoxonasen als Erstes entdeckte und derzeit am besten erforschte Protein dieser Enzymgruppe, PON1, fiel initial durch seine Fähigkeit auf, Paraoxon (ein toxischer Metabolit des Insektizides Parathion) zu spalten, und wurde nach diesem Charakteristikum benannt (39). Die zwei später identifizierten PON1-ähnlichen-Proteine wurden missverständlicherweise PON2 bzw. PON3 genannt (40). Denn wie sich bei späteren Versuchen zur Substratspezifität herausstellte, sind sich die drei Gensequenzen zwar sehr ähnlich, die entsprechenden Enzyme unterscheiden sich jedoch in ihren Hydrolysefähigkeiten. Im Gegensatz zu PON1 ist weder PON2 noch PON3 in der Lage, Paraoxon zu hydrolysieren (41). Die unterschiedlichen Hydrolysefähigkeiten der drei Enzyme sind ein Hinweis auf voneinander abweichende Funktionen. Unterschiedliche Funktionen von Proteinen spiegeln sich häufig auch in den, an die Aufgaben angepassten, voneinander abweichenden Bildungsgeweben wieder. PON1 und PON3 werden hauptsächlich in der Leber gebildet und in das Serum ausgeschüttet. Hier liegen sie in einer an Lipoproteine (HDL) gebundenen Form vor, dienen ihnen als Oxidationsschutz und scheinen so eine Rolle im körpereigenen Schutz gegen Atherosklerose sowie deren Folgeerscheinungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall zu spielen (44-46;58-63).

Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit ließ sich eine gute Expression von PON2 in primären Keratinozyten und in Sebozyten sowie eine schwache Expression von PON3 in primären Keratinozyten nachweisen (vgl. Abb.6). Eine PON1-Expression konnte in Keratinozyten nicht nachgewiesen werden, während im als Kontrolle fungierenden Thymus-Gewebe eine Expression sichtbar war. Diese Daten lassen vermuten, dass unter den drei Paraoxonasen PON2 eine wichtige Rolle in Keratinozyten besitzen könnte.

Eine starke PON2-Expression sowie eine schwache PON1- und PON3-Expression konnten auch in humanen respiratorischen Epithelien nachgewiesen werden (64). Die Epidermis sowie auch das respiratorische Epithel stellen eine Barriere zur Außenwelt und somit zu den, den Organismus bedrohenden Mikroorganismen dar. Die hohe Expression von PON2 in Keratinozyten und respiratorischen Epithelien ist ein Indiz dafür, dass PON2 eine Bedeutung in der epithelialen Abwehr einnehmen könnte. Es besitzt die stärkste Laktonaseaktivität und ist das phylogenetisch älteste Mitglied der Paraoxonasen (43;44). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Laktonasefähigkeit die ursprüngliche Funktion der Paraoxonasen darstellt. PON1 und PON3 könnten evolutionäre Weiterentwicklungen von PON2 sein und sich in ihren Aufgaben gegenseitig ergänzen. Ein voneinander

abweichendes Funktions- und Expressionsmuster ließe sich mit dieser Theorie erklären. Auch stellt sich die Frage, wieso der Körper drei verschiedene Enzyme mit ein und derselben Funktion synthetisieren sollte. Ein voneinander abweichendes, wenn auch sich überschneidendes Funktions- und Expressionsprofil ist somit auch nicht verwunderlich. Trotzdem bleiben die genauen Aufgaben und Funktionsmechanismen der drei Enzyme in den verschiedenen Geweben noch zu ergründen.

Die potente Laktonasefunktion von PON2 könnte eine wichtige Funktion von PON2 in der epithelialen Abwehr sein, da diese enzymatische Aktivität das Kommunikationssystem von einigen Bakterien stören kann. Die frühere Vorstellung von Bakterien als einzelne Zellen, die in gegenseitiger Konkurrenz um Lebensraum und Ressourcen agieren, musste durch die Entdeckung von Quorum-Sensing-Systemen, den Kommunikationssystemen der Bakterien, völlig erneuert werden. Durch Kommunikation über Signalmoleküle, auch als „Autoinducer“ (QS-Signale) bezeichnet, agieren Bakterien in aufeinander abgestimmten Gemeinschaften. Die Synergieeffekte, ausgelöst durch die Koordination ihrer Aktivitäten, wie z.B. die Ausbildung von Virulenzfaktoren lassen die einzelnen Bakterien als organisierte Bakteriengemeinschaft agieren, mit einer viel höheren Wirkungseffizienz, als dies bei nicht-organisierten Bakterien der Fall wäre (27;31;32). Derzeit sind über 70 hauptsächlich gramnegative Bakterienspezies bekannt, die über das bisher am besten erforschte Signalsystem der Acyl-Homoserinlaktone (Acyl-HSL) miteinander kommunizieren. Der opportunistische menschen- und tierpathogene Krankheitserreger *Pseudomonas aeruginosa* ist hierbei für den medizinischen Bereich von besonderer Bedeutung (65). Der Biofilm, eine Art Schleimhülle bestehend aus Polysacchariden, die von den Bakterien selbst synthetisiert wird und sie schützend umgibt, schirmt die Mikroorganismengemeinschaft von Bedrohungen durch die Umwelt ab. Auf diese Art und Weise führt der Biofilm zu einer phenotypischen Resistenz der Keime gegen Antibiotika sowie viele körpereigene Abwehrmechanismen und macht *P. aeruginosa* zu einem gefürchteten Problemkeim im klinischen Alltag (20). Durch QS-Signale wie Acyl-HSL kontrollieren Bakterien die Expression spezifischer Virulenzfaktoren sowie die Biofilmbildung in Abhängigkeit von ihrer Populationsdichte (66). Eine Mindestanzahl von Bakterienzellen ist nötig, um eine ausreichende Menge von Virulenzfaktoren zur Beeinflussung der Umgebung zu synthetisieren. Da das QS-Signalsystem populationsabhängig ist, ermöglicht es den Bakterien, sich erst zu vermehren, um dann durch die koordinierte Expression von Virulenzfaktoren der Abwehr des Wirtsorganismus entgegenzutreten zu können. Hierbei werden verschiedene Zielgene bei unterschiedlichen Acyl-HSL-Konzentrationen aktiviert (67).

Die enorme Bedeutung der Acyl-HSL für die Virulenz von Bakterien wird durch nachfolgend geschilderte, in der Literatur zu findende Versuche deutlich und ist ein entscheidender Punkt, der zu der Überlegung führt, dass ein Eingreifen auf dieser Ebene -zum Beispiel durch

Paraoxonasen - von höchster Effektivität im Kampf gegen eine sich manifestierende Infektion sein müsste.

Die Acyl-HSL werden durch einzelne Enzyme generiert, denen S-Adenosylmethionin sowie Zwischenprodukte der Fettsäurebiosynthese als Substrate dienen (68-72). Diese Enzyme gehören in der Regel zur LuxI-Familie der Acyl-Homoserin-Lakton-Synthase. Bei *Pseudomonas aeruginosa* katalysiert Las I die Synthese von N-(3-Oxododecanoyl)-HSL (3OC12-HSL). Rhl I katalysiert die Synthese von N-Butyryl-HSL (C4-HSL). Diese beiden Systeme sind in einer hierarchisch angeordneten, regulatorischen Kaskade organisiert. Ansteigende 3OC12-HSL-Konzentrationen führen zu einem Anstieg der C4-HSL-Produktion und etwa 6% der insgesamt ca. 6.000 Gene von *P. aeruginosa* werden durch das QS-System, durch Las I bzw. Rhl I beeinflusst (73-75). Die Acyl-HSL-Rezeptoren gehören zur LuxR-Familie. Hierbei fungiert Las R als Transkriptionsfaktor, der auf 3OC12-HSL reagiert und Rhl R als Transkriptionsfaktor, der auf C4-HSL reagiert (76). Die Bedeutung des Las R-Transkriptionsfaktors für die Virulenz von *P. aeruginosa* konnte in folgendem Versuch deutlich demonstriert werden (77). Unter Laborbedingungen wurden Mäuse-Lungen mit LasR-mutierten *P. aeruginosa* (entspricht defektem LasR-Transkriptionsfaktor, der nun nicht mehr auf 3OC12-HSL reagiert) und die Kontrollgruppe mit Wild-Typ- *P. aeruginosa* infiziert. Während der Wild-Typ die Lunge kolonisierte, zur akuten Pneumonie, Bakteriämie und zum Tod der infizierten Mäuse führte, war bei den LasR-mutierten Bakterien zwar kein Wachstumsdefekt zu vermerken und sie waren ebenfalls zur Invasion der Lunge fähig aber die betroffenen Mäuse wiesen keinerlei Krankheitssymptome auf; es kam weder zur akuten Pneumonie, noch zu einer Bakteriämie mit letalem Ausgang. Den mutierten Bakterien fehlten sozusagen ihre „Waffen“ für eine schwer verlaufende Invasion ihres Wirtes.

Auch die Bedeutung des QS-Signalsystems für die Ausbildung von Biofilmen wurde experimentell untersucht. Die Pathogenese einer üblichen *P. aeruginosa*-Infektion läuft wie folgt beschrieben ab. Die Übertragung erfolgt über Schmier- oder Tröpfcheninfektion, über Fimbrien vermittelt kommt es dann zur Adhäsion des Erregers, wobei eine Vorschädigung der Zielzellen die Adhäsion erleichtert. Der Keim vervielfältigt sich und bildet einen adhärennten „Monolayer“. *P. aeruginosa* synthetisiert Alginate, eine Schleimschicht, die sich um die Bakterien legt und die durch Konfluenz der Bakterien eine Art „primitiven Biofilm“ bildet. Die Ausbildung von Pili (Typ IV) führen zur Motilität und die einzelnen Organismen vereinen sich zu Mikrokolonien. Die Bakterien differenzieren sich weiter und bilden einen ausgereiften Biofilm mit pilzartiger Konfiguration, der die Bakterien umgibt und sie gegen von außen einwirkende Gefahren schützt. Wasserkanäle ermöglichen den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff zu den Mikroorganismen und den Abtransport von Abbauprodukten aus dem Biofilm (19). Las I-mutierte *P. aeruginosa* sind hingegen nicht mehr in der Lage, 3OC12-HSL zu bilden. Bei diesen LasI-mutierten *P. aeruginosa*

überschreitet die Biofilmsynthese das Stadium der Mikrokolonien nicht. Der gebildete Biofilm bleibt flach und undifferenziert. Bei Zugabe von 3OC12-HSL kommt es zur oben beschriebenen Ausbildung eines differenzierten Biofilms (78). Rhl I-mutierte *P. aeruginosa* bilden einen normalen Biofilm aus. Die genauen Gene, die durch 3OC12-HSL-Aktivierung zur differenzierten Biofilmbildung führen, sind bisher noch nicht bekannt (78). Die genannten Versuche und Beobachtungen zeigen indessen die außerordentliche Bedeutung des QS für die Virulenz von Bakterien, hier insbesondere von *P. aeruginosa* und für deren Ausbildung von Biofilmen. Es lässt sich also vermuten, dass auch eine direkte Störung der 3OC12-HSL-Bildung bzw. deren Abbau zu ähnlichen Einschränkungen der Virulenz und Biofilmbildung von *P. aeruginosa* führen würde. Durch ihre Laktonasefunktion wären die Paraoxonasen hierzu durchaus in der Lage. Diese angeborene Laktonaseaktivität, die der Biofilmbildung durch Mikroorganismen entgegenwirkt, könnte somit dem Menschen als Waffe gegen schwere Infektionen dienen.

In Anbetracht des durch die Kommunikationssysteme erlangten kompetitiven Vorteils diverser Bakterienspezies innerhalb ihres Lebensraumes war es unter evolutionstheoretischen Gesichtspunkten evident, dass der Selektionsdruck zur Ausbildung von Ausgleichsmechanismen bei den bedrohten Organismen führte. Hierzu gehören die in den letzten Jahren sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten identifizierten Quorum-Sensing spaltenden Enzyme, die sogenannten Quorum-Quenching-Enzyme (34;35;79). Es war bereits bekannt, dass die Konzentration der QS-Moleküle von essentieller Bedeutung für die Expression der Virulenzfaktoren ist und somit eine Möglichkeit der Infektionskontrolle in der Spaltung der Acyl-HSL liegen könnte (80). Das erste identifizierte Quorum-Quenching-Enzym wurde aus einer grampositiven Bazilluspezies isoliert, es wird durch das *aiiA*-Gen kodiert (80). Eine Reihe von weiteren bakteriellen, Acyl-HSL spaltenden Enzymen konnten aus Boden-, Biofilm- und Pflanzenproben sowie aus bakteriellen Labor-Zelllinien isoliert und untersucht werden. Man differenziert hier zwischen den Acylasen und den Laktonasen (33;36-38).

In menschlichen respiratorischen Epithelien konnte eine 3OC12-HSL-, nicht aber C4-HSL-spaltende Enzymaktivität beobachtet werden (47). Diese Aktivität wurde bei weiteren Studien auf die Paraoxonasen zurückgeführt (42). Alle drei PON-Enzyme hydrolysieren Laktone und weisen antioxidative Eigenschaften auf (44;61;81). Es wird diskutiert, ob die Acyl-HSL die natürlichen Substrate der PON-Enzyme sind (82). Dies würde die These unterstützen, dass die Inaktivierung der Quorum-Sensing-Signale als entscheidende biologische Funktion der Paraoxonasen und damit als weiterer Baustein der angeborenen Immunität zu werten ist.

Im Falle von Acyl-Homoserinlaktonase-produzierenden *Bacillus thuringiensis* konnte bereits gezeigt werden, dass die QS-abhängige Virulenz pflanzenpathogener *Erwinia carotovora* durch Quorum-Quenching unterdrückt wird. *B. thuringiensis* war in der Lage, die Besiedelung

von Tabak-Pflanzen durch *E. carotovora* zu hemmen, während *B. thuringiensis* mit mutiertem *aiiA*-Gen die Überwucherung der Pflanzen nicht beeinflussen konnte. Transformierte *E. carotovora* und *P. aeruginosa*, die selbst das *aiiA*-Gen exprimierten (d.h. sie bauten ihre eigenen Signalmoleküle ab), verloren hierdurch ihre Virulenz, die sie sonst zur Infektion von Tabakpflanzen bzw. Nematoden befähigte, in beträchtlicher Art und Weise (80). Besonders bemerkenswert ist es, dass genmanipulierte Tabakpflanzen, die Acyl-Homoserinlaktidasen synthetisierten, erfolgreich QS-Signale spalteten und sich hierdurch effizient gegen populationsabhängige Infektionen schützen konnten. Nicht-transfizierte Kontrollpflanzen hingegen entwickelten schwere Krankheitssymptome (36;83).

Überträgt man diese Erkenntnisse auf den menschlichen Körper so ist es wahrscheinlich, dass die Bildung von Paraoxonasen den Organismus durch Spaltung der QS-Signale vor schweren Infektionen schützt. Auf diesem Hintergrund macht die beobachtete Expression von PON2, welches wie erwähnt unter den Paraoxonasen die stärkste Laktidaseaktivität vorweist, in primären Keratinozyten sowie in Sebozyten und ekkrinen Schweißdrüsen durchaus Sinn. Der Hauptteil der aus der Haut gewonnenen antimikrobiellen Peptide wird wie PON2 von Keratinozyten gebildet, aber auch die Schweißdrüsen der Haut sind in der Lage, antimikrobielle Proteine zu exprimieren. Ein Beispiel für ein solches, von Sebozyten gebildetes AMP ist Dermcidin, ein anionisches, antimikrobielles Protein, das ausschließlich in menschlichen Schweißdrüsen produziert wird. Seine prozessierte, antimikrobiell aktive Form Dermcidin-1 wird an den Schweiß abgegeben und ist gegen Bakterien wie *E. coli* und *S. aureus* sowie gegen die Hefe *Candida albicans* aktiv (84). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Bildung von PON2 durch humane, primäre Keratinozyten, durch Sebozyten sowie durch Epithelzellen ekkriner Schweißdrüsen immunhistologisch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Auch auf mRNA-Ebene wurde in diesem Rahmen die PON2-Bildung in primären Keratinozyten sowie in Sebozyten durch PCRs und „real-time“-PCRs nachgewiesen. Gerade feuchte und warme Bedingungen, wie sie bei Wärme durch das Schwitzen entstehen, stellen ein ideales Milieu für das Wachstum von Mikroorganismen dar. Eine Expression in ekkrinen Schweißdrüsen sowie durch Sebozyten könnte für eine Ausschüttung von PON2 mit dem Schweiß sprechen. PON2 würde somit die menschliche Haut bedecken und könnte hier optimal als Quorum-Quenching-Enzym agieren.

In bisherigen Studien konnte an respiratorischen Epithelien zwar eine Expression, nicht jedoch eine Sekretion von PON2 nachgewiesen werden (64). PON1 und PON3 hingegen werden in der Leber gebildet und von dort an das Blut abgegeben (59;60). In Anbetracht der Tatsache, dass Paraoxonasen zum Teil sekretorisch aus Zellen abgegeben werden und wir PON2 in der vorliegenden Arbeit sowohl in Sebozyten als auch in Epithelien ekkriner Schweißdrüsen nachweisen konnten (vgl. Kap. 4.6), wäre es interessant, durch weitere Untersuchungen zu erfahren, ob Paraoxonasen durch Schweiß an die Oberfläche der Haut

abgegeben werden und ob Schweiß eine Laktonaseaktivität vorweist. In bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit konnte bisher keine Laktonaseaktivität nachgewiesen werden (47). Auch wäre es von Bedeutung, die hydrolytische Aktivität gegenüber 3OC12-HSL analog zu den Versuchen respiratorischer Epithelzellen an Zellkulturen humaner primärer Keratinozyten sowie auf nativen Hautoberflächen zu bestimmen (64).

In respiratorischen Epithelien konnte bereits durch gezielte Deletion die funktionelle Bedeutung des PON2-Enzyms für Modulation der QS-Regulation gramnegativer, HSL-bildender *P. aeruginosa* gezeigt werden (64). Passend zu den Ergebnissen unserer Versuche zeigte sich auch hier im Gegensatz zum Expressionsprofil in Epithelzellen der Trachea von Mäusen, in denen PON1, PON2 und PON3 alle stark exprimiert wurden, in humanen respiratorischen Epithelzellen eine starke PON2 Expression bei nur leichter Expression von PON1 und PON3. Einige unabhängige Untersuchungen führten bereits zu dem Ergebnis, dass Lakton-Moleküle die natürlichen Substrate von Paraoxonasen sind, wobei die stärkste Laktonaseaktivität bei PON2 zu beobachten ist (41;42;85). Die Spezifität von PON2 für 3OC12-HSL unterstützt außerdem die These, dass dieses QS-Molekül das natürliche Substrat für PON2 darstellt (64).

Bei den Versuchen mit PON1-, PON2- und PON3-„knock-out“-Mäusen, zeigte sich des Weiteren eine verminderte 3OC12-HSL-Inaktivierungsfähigkeit im Zelllysate der PON2-„knock-out“-Mäuse, nicht jedoch der PON1- oder PON3-„knock-out“-Mäuse. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die essenzielle Funktion von PON2 als QQ-Enzym sein. Intakte Mäuse-Trachealepithelzellkulturen behielten allerdings trotz einer gezielten PON1-, PON2- oder PON3-Deletion ihre Fähigkeit zum 3OC12-HSL-Abbau bei (64).

Eine Vielzahl der bekannten AMPs werden konstitutiv in gesunder Haut von Keratinozyten bzw. Schweißdrüsen produziert, hierzu gehören z. B. Lysozym (86), Dermcidin und RNase 7 (84;87). Andere AMPs werden in gesunder Haut nur in sehr geringen Mengen produziert. Ihre Bildung wird erst im Rahmen von Entzündungen oder Infektionen verstärkt aktiviert. Zu diesen induzierbaren AMPs gehören z.B. die humanen Beta-Defensine hBD2 und hBD3 und das Cathelicidin LL-37 (88). In der Vorliegenden Arbeit wurde versucht, die PON2-Expression durch Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen zu stimulieren. Weder durch 8-stündige Inkubation mit 50 ng/ml IL-17, IL-1 β , TNF- α und IL-1 α , noch durch Stimulation mit 50 ng/ml TGF- α und IFN- γ über 3 Tage konnte eine Induktion der PON2-Expression beobachtet werden. Fehler im Versuchsaufbau oder degradierte Zytokine, welche zum völligen Ausbleiben einer Stimulation führen würden, können wir durch Positivkontrollen als Gründe für die gleichbleibende PON2-Expression ausschließen.

Übliche Konzentrationen für Stimulationsversuche finden sich in der Literatur je nach Zytokin üblicherweise bei 20-50 ng/ml, selten bei 100 ng/ml. Denkbar, wenn auch nicht wahrscheinlich, wäre somit, dass die Konzentration von 50 ng/ml zwar zur Stimulation der

als Positivkontrolle verwendeten Gene, nicht jedoch für die Stimulation von PON2 ausreichend hoch war. Um diesen Faktor als möglichen Fehler komplett auszuschließen müssten die Versuche nochmals mit höheren Zytokinkonzentrationen wiederholt werden. Auch könnte man untersuchen, ob kürzere oder längere Stimulationszeiten das Ergebnis beeinflussen würden. Unter Berücksichtigung der Theorie, dass PON2 als Teil der angeborenen Immunität durch den Abbau von QS-Molekülen kontinuierlich und sozusagen präventiv agiert, d.h. eingreift, noch bevor eine Infektion entsteht, ist es jedoch als wahrscheinlich anzusehen, dass PON2 konstitutiv exprimiert wird. Auszuschließen wäre noch, dass der richtige Stimulus nicht getestet wurde. Neben den bereits getesteten Stimuli könnte man daher noch weitere Zytokine sowie Interleukine auf ihre Fähigkeit überprüfen, die PON2- bzw. PON3-Expression zu verstärken.

Bedenkt man die Funktion der AMPs, ist es nicht verwunderlich, dass die Bildung einiger AMPs auch durch Bakterien bzw. durch Bakterienüberstände von beispielsweise *S. aureus* oder *P. aeruginosa* induziert wird. Dies trifft z.B. auf hBD2 (9;56) sowie auf RNase 7 zu. (87) Betrachtet man nun PON2 als Abwehrmolekül, kann man sich vorstellen, dass auch seine Expression durch Überstände von Bakterien stimuliert wird. *S. aureus* nutzen wie auch *P. aeruginosa* ein QS-System, um Virulenzfaktoren zu koordinieren. Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* produziert diese Bakterienart allerdings andere QS-Signale, sog. „Autoinducing Peptides“ (AIP I-IV) (82;89). Da PON2 relativ spezifisch 3OC12-HSL spaltet, welche *P. aeruginosa* als QS-Moleküle dienen und somit in Überständen von *P. aeruginosa*-Kulturen vorhanden sind, wurden für die vorliegende Arbeit Stimulationsversuche primärer Keratinozyten mit *P. aeruginosa*-Überständen durchgeführt, nicht jedoch mit *S. aureus*-Überständen (47;90). Auch bei diesen Versuchen konnte bei eindeutig signifikanter Induktion der Positivkontrolle hBD2 keine Expressionsinduktion von PON2 beobachtet werden. Um auszuschließen, dass eine Stimulation der PON2 Expression durch zu geringe Mengen 3OC12-HSL im Überstand ausblieb, wurden für diese Arbeit primäre Keratinozyten mit in Ethylacetat und Nährmedium aufgenommenen 3OC12-HSL in Konzentrationen von 1 µM, 10 µM und 100 µM über 16 Stunden inkubiert. Es zeigte sich auch hier keine Expressionsstimulation von PON2. Hierbei ist zu bemerken, dass bei diesem Versuch die Testung der Expressionsinduktion von IL-8 als Positivkontrolle diente, da in anderen Studien eine Induktion durch 3OC12-HSL-Moleküle in Lungenfibroblasten und respiratorischem Epithel gezeigt werden konnte. (54) Es ließ sich zwar eine leicht erhöhte Expression von IL-8 durch 100 µM 3OC12-HSL beobachten, diese lag jedoch in einem nicht signifikanten Bereich. Für hBD2 hingegen war zwar bereits eine Stimulation der Expression durch Inkubation mit Bakterienüberständen berichtet worden, nicht jedoch für Stimulationsversuche mit 3OC12-HSL-Molekülen direkt (9;56). Bei der Testung der hBD2-Expression fiel eine signifikante Stimulation durch 3OC12-HSL bei einer Konzentration von 100 µM auf. Da nicht

eindeutig gesagt werden kann, in welchem Zustand die benannten Moleküle erhalten wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese z.T. bereits degradiert waren. Eine zu niedrige Konzentration aktiver Moleküle könnte die ausbleibende Stimulation der Positivkontrolle IL-8 erklären, die möglicherweise weniger sensibel auf diesen Stimulus reagiert als hBD2. Eine weitere Erklärung für die ausbleibende Stimulation könnte darin liegen, dass die vorliegenden Versuche nicht mit respiratorischem Epithel oder Lungenfibroblasten, sondern mit primären Keratinozyten erfolgt sind. Eine unterschiedliche Reaktion auf Stimuli und ein voneinander abweichendes Expressionsmuster der verschiedenen Zellarten sind nicht auszuschließen. Eine solche Beobachtung wurde bereits bei der Testung der ausbleibenden hBD2-Expression in Sebozyten beschrieben. Auch wurde bereits beschrieben, dass die lipophile Substanz 3OC12-HSL in höheren Konzentrationen in wässrigen Medien, wie das verwendete Nährmedium eines ist, schwer löslich ist. (54) Eine weitere Fehlerquelle für die ausgebliebene Stimulation könnte daher auch darin bestehen, dass die Moleküle nicht ausreichend in dem verwendeten Medium gelöst waren.

Bei Versuchen zur Rolle der PON-Enzyme im Abbau der 3OC12-HSL schien die Diffusion dieser großen Homoserinlaktone einen limitierenden Faktor für den verstärkten 3OC12-HSL-Abbau darzustellen (65). Auch für Bakterienmembranen konnte bereits gezeigt werden, dass zwar kleine C4-HSL-Moleküle durch die Bakterienmembran diffundieren können, dass die Membrangängigkeit der größeren 3OC12-HSL-Moleküle jedoch abhängig ist von aktiven Transportmechanismen (91). Es ist daher auch denkbar, dass die Diffusion der 3OC12-HSL-Moleküle über die Keratinozytenmembran ebenfalls ein limitierender Faktor für eine intrazelluläre Expressionsinduktion verschiedener Proteine wie PON2 oder in diesem Fall auch IL-8 ist. Die Aktivität der PON-Enzyme ist außerdem Ca^{2+} -abhängig und die 3OC12-HSL-Moleküle sind insgesamt zwar relativ stabil, der Laktoring öffnet sich allerdings bei alkalischem pH (47;64;65). Um eine Degradierung der verwendeten Moleküle auszuschließen, sollte der Versuch mit neuen 3OC12-HSL wiederholt werden. Hierbei müsste sowohl auf die pH-Bedingungen als auch auf eine ausreichend hohe Ca^{2+} -Konzentration für eine ausreichende PON-Aktivität geachtet werden.

5.2 PON2-Mangel & Infektionen

Ein Zusammenhang zwischen einigen chronischen Erkrankungen und einem Mangel an AMPs konnte in verschiedenen Studien aufgedeckt werden. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Polymorphismen, die zu einer niedrigen hBD2-Expression führen einen prädisponierenden Faktor für die Entstehung von Morbus Crohn darstellen (92). Auch in Untersuchungen an häufig beobachteten Hautinfektionen bei unter atopischer Dermatitis leidenden Patienten konnte eine verminderte Expressionsinduktion humaner β -Defensine und des Cathelicidins LL-37 festgestellt werden. Hier wird vermutet, dass dies in einem

Mangel an proinflammatorischen Zytokinen sowie erhöhten TH₂-Zytokinen begründet liegt (93;94). Eine verminderte hBD2-Expression in chronischen Wunden sowie in Verbrennungswunden konnte ebenfalls festgestellt werden (14;18;95). Diese Studien zeigen, dass eine gestörte angeborene epitheliale Abwehr mit einer erhöhten Infektionsanfälligkeit einhergehen kann. Vor diesem Hintergrund ist es interessant zu spekulieren, dass eine Defizienz in Inhibitoren des QS wie PON2 auch zu einer vermehrten Infektionsanfälligkeit führen könnte.

Eine verstärkte Problematik von Infektionen bei chronischen Wunden und Verbrennungsoptionen besonders mit *P. aeruginosa* ist bekannt. Die Überlebensraten von Verbrennungspatienten sind durch verbesserte Versorgungsmöglichkeiten, fortgeschrittene Kenntnisse über die Pathophysiologie und spezialisierte Zentren stark gestiegen. Derzeit sind 75% der Todesfälle auf Sepsis und andere Komplikationen durch Infektion der Verbrennungswunde sowie auf Inhalationsverletzungen zurückzuführen (96;97). *P. aeruginosa* gehört neben *S. aureus* zu den am häufigsten aus chronischen Wunden und Verbrennungsverletzungen isolierten Erregern (98;99). Die physiologische Epithelbarriere der Haut ist hier gestört. Erreger können einfacher in den Organismus eintreten. Starke thermische Verletzungen induzieren außerdem eine lokale und systemische Immunsuppression, wodurch die Eradikation durch die körpereigene Abwehr behindert und die Ausbreitung der Keime begünstigt wird (99). QS spielt bei der Infektion von Verbrennungswunden eine entscheidende Rolle. Genetisch veränderte *P. aeruginosa*-Stämme, die nicht mehr in der Lage sind, QS-Moleküle zu synthetisieren bzw. zu detektieren, zeigen bei der Infektion von Verbrennungswunden im Versuch mit Mäusen eine signifikant niedrigere Effizienz in ihrer systemischen Ausbreitung (100). Wie die immunhistologischen Bilder dieser Arbeit zeigen, wird PON2 hauptsächlich in Epithelien gebildet. Je nach Schweregrad der Verbrennungen führen diese auch zu Funktionsstörungen der Proteinexpression in Oberflächenepithelien sowie in Talg- und Schweißdrüsen. Das Fehlen der Paraoxonasen könnte somit ein weiterer Faktor sein, der die Ausbreitung der Keime begünstigt.

5.3 PON2 als Therapeutikum

Die Entwicklung von Antibiotika im letzten Jahrhundert stellte eine Revolutionierung in der Medizin und der Bekämpfung von Infektionskrankheiten dar. Viele Krankheiten, die bis dahin durch schwere Verläufe mit häufig letalem Ausgang gekennzeichnet waren, konnten nun therapiert werden. Die Entstehung von Resistenzen mit gehäuftem Auftreten multiresistenter Erreger macht immer deutlicher, dass die Medizin neben einem gewissenhafteren Einsatz dieser Medikamente auch neue Substanzen benötigt, um im Kampf gegen Infektionskrankheiten nicht wieder zurück zu fallen. Übliche Antibiotika greifen Bakterien im

Bereich der DNA-, RNA- oder Proteinsynthese an. Hierbei werden für Wachstum und Überleben der Mikroorganismen essenzielle Mechanismen gehemmt. Diese Blockaden erzeugen einen Selektionsdruck, durch den die Entstehung von Resistenzen provoziert wird. Auf der Suche nach neuen Strategien zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten erkannte man die vielversprechenden Fähigkeiten der Quorum-Quenching-Enzyme, in die Kommunikation der Bakteriengemeinschaften zu interferieren. Man erhofft sich durch den Einsatz von Quorum-Quenching-Enzymen, Infektionen zu attenuieren, ohne einen Selektionsdruck auszuüben, der zu Resistenzentstehungen führt. In einer Reihe von Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Störung des QS-Systems zu einer verminderten Pathogenität der Erreger führt (100;101).

Paraoxonasen sind in der Lage Acyl-HSL zu spalten. Eine Verwendung zum Beispiel in der Therapie von chronischen Wunden oder bei Verbrennungsoptionen, um schweren Infektionen besonders durch *P. aeruginosa* vorzubeugen, wäre theoretisch denkbar. Die Immunfunktion von Verbrennungspatienten unterliegt komplexen Störungen. Eine Therapie kann daher effektiv nur mit multipler Zielsetzung erfolgen. Durch die Störung des QS könnte die Ausbildung von Virulenzfaktoren der Bakterien gehemmt und so u.U. ihre Ausbreitung verhindert werden. Drei Strategien zur QS-Inhibition sind theoretisch möglich: die Blockade der Signalmolekül-Synthese, die Inaktivierung der Signalmoleküle und die Blockade der Rezeptoren. Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich derzeit mit der Entdeckung natürlich vorkommender Quorum-Sensing-Inhibitoren sowie mit der Entwicklung von synthetisch hergestellten Quorum-Sensing-Inhibitoren. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Knoblauch-Extrakt in der Lage ist, QS-regulierte Genexpression zu hemmen (102). Die PON-Enzyme würden bei der Spaltung und Inaktivierung der QS-Moleküle ansetzen. Somit wäre die Applikation von PON-Enzymen und anderen Quorum-Quenching-Enzymen eine denkbare Ergänzung zur bisherigen Therapie von Infektionskrankheiten, deren Effektivität in weiteren Studien zu untersuchen wäre.

6 Zusammenfassung

Paraoxonasen sind drei Enzyme einer Genfamilie, die im Verdacht, als Teil der angeborenen Abwehr zu fungieren. Ihre Laktonaseaktivität befähigt sie, Acyl-Homoserinlaktone abzubauen. Acyl-Homoserinlaktone sind Kommunikationsmoleküle, die einer großen Anzahl gramnegativer Bakterien als Signalsysteme dienen, mit denen die Mikroorganismen die Ausbildung von Virulenzfaktoren und Biofilmen steuern. Über die sogenannten Quorum-Sensing-Signalsysteme (QS) koordinieren Bakterien ihre Aktivitäten und bilden so Gemeinschaften, die durch Synergieeffekte die Gefahr für ihre Umwelt verstärken. Eine Reihe von Quorum-Sensing spaltenden Enzymen konnten bereits in Pro- und Eukaryonten identifiziert werden. Es ist möglich, dass die Paraoxonasen PON1, PON2 und PON3

ebenfalls als Quorum-Sensing spaltende Enzyme, sogenannte Quorum-Quenching-Enzyme, agieren und so den Organismus im kontinuierlichen Kampf gegen Infektionen unterstützen.

Eine Expression von Paraoxonasen in verschiedenen humanen Geweben war zu Beginn der Arbeit bereits bekannt. Über eine mögliche Expression in primären Keratinozyten lagen jedoch noch keine Erkenntnisse vor. Die vorliegende Arbeit sollte überprüfen, ob primäre Keratinozyten PON-Enzyme exprimieren und ob bzw. wodurch sich ihre Bildung beeinflussen lässt.

Hierzu wurden Versuche mit Keratinozytenkulturen gemacht. Zum indirekten Expressionsnachweis der PON-Enzyme wurde mRNA aus den primären Keratinozyten isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch konventionelle PCR und „real-time“-PCR wurde dann die Genexpression der PON-Enzyme untersucht. Eine PON1-Expression durch primäre Keratinozyten konnte nicht beobachtet werden. Weiterhin konnte eine hohe PON2-Expression bei moderater PON3-Expression gezeigt werden. Bei konstanter PON2-Synthese durch primäre Keratinozyten konnte eine Induktion oder Hemmung der PON2-Expression weder durch von Außen auf die Zellen gegebenes IL17, IL-1 β , TNF- α , IL-1 α , TGF- α , IFN- γ noch durch Bakterienüberstände von *Pseudomonas aeruginosa* oder durch die QS-Moleküle 3OC12-HSL provoziert werden.

Durch immunhistologische Anfärbung von Paraffinschnitten und Kryoschnitten menschlicher Haut konnte PON2 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die immunhistologischen Präparate zeigten außerdem eine PON2-Expression in den Sebozyten der Talgdrüsen und in den Epithelien ekkriner Schweißdrüsen. Diese PON2-Bildung ließ sich ebenfalls auf RNA- bzw. cDNA-Ebene durch Versuche mit Sebozytenkulturen nachweisen. Auch hier konnte eine Expressionsinduktion oder Hemmung durch von Außen auf die Zellkulturen gegebenen TNF- α , IL-1 β oder IL-17 nicht beobachtet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine konstitutive PON2-Expression in primären Keratinozyten und in Sebozyten. Eine Beteiligung von PON2 an der angeborenen Abwehr der Haut ist als sehr wahrscheinlich anzusehen. Seine genaue Bedeutung für den konstitutiven Schutz gegen Infektionen, besonders durch QS-bildende Mikroorganismen sowie die genauen Mechanismen, die hinter den beschriebenen Phänomenen stehen, gilt es noch weiter zu erforschen.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Marks R. The stratum corneum barrier: the final frontier. *J Nutr* 2004; 134(8 Suppl):2017S-2021S.
- (2) Elias PM. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 2005; 125(2):183-200.
- (3) Fischer E. Effect of perspiration and pH on the growth of skin-pathogenic fungi. *Dermatologica* 1959; 118(4-5):197-202.
- (4) Alexander Fleming. On a Remarkable Bactiologic Element found in Tissus and Secretions. M.B. FRCS, editor. 1922. *Proceedings of the Royal Society of London*, 93B, S.306-317.
- (5) Hahn. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Falke, Kaufmann, Ullmann, editors. 4, 175-176. 2009. Springer.
- (6) Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 1981; 292(5820):246-248.
- (7) Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985; 76(4):1427-1435.
- (8) Lehrer RI, Daher K, Ganz T, Selsted ME. Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. *J Virol* 1985; 54(2):467-472.
- (9) Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387(6636):861.
- (10) De Y, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 2000; 192(7):1069-1074.
- (11) Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 2002; 106(1):20-26.
- (12) Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* 2003; 170(5):2274-2278.
- (13) Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(4):359-365.
- (14) Ortega MR, Ganz T, Milner SM. Human beta defensin is absent in burn blister fluid. *Burns* 2000; 26(8):724-726.
- (15) Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 2003; 111(11):1665-1672.

- (16) Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N et al. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 2003; 120(3):379-389.
- (17) Sorensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Monch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 2003; 170(11):5583-5589.
- (18) Butmarc J, Yufit T, Carson P, Falanga V. Human beta-defensin-2 expression is increased in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2004; 12(4):439-443.
- (19) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418):1318-1322.
- (20) Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27(4):619-624.
- (21) Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 2004; 125(2):607-616.
- (22) Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(4):1306-1311.
- (23) Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 1979; 43(4):496-518.
- (24) Ruby EG. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50:591-624.
- (25) Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; 176(2):269-275.
- (26) Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50:727-751.
- (27) Fuqua C, Greenberg EP. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1(2):183-189.
- (28) Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2(6):582-587.
- (29) Novick RP, Muir TW. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2(1):40-45.
- (30) Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(20):11229-11234.

- (31) Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R, Palva ET. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J* 1993; 12(6):2467-2476.
- (32) Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(4):551-560.
- (33) Zhang HB, Wang LH, Zhang LH. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(7):4638-4643.
- (34) Zhang LH. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* 2003; 8(5):238-244.
- (35) Zhang LH, Dong YH. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* 2004; 53(6):1563-1571.
- (36) Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 2001; 411(6839):813-817.
- (37) Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR et al. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* 2003; 47(3):849-860.
- (38) Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY et al. AhID, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* 2003; 149(Pt 6):1541-1550.
- (39) Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(4):541-550.
- (40) Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33(3):498-507.
- (41) Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005; 46(6):1239-1247.
- (42) Ozer EA, Pezzulo A, Shih DM, Chun C, Furlong C, Lysis AJ et al. Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 253(1):29-37.
- (43) La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120:379-388.
- (44) Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369(1):78-88.
- (45) Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275(43):33435-33442.

- (46) Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001; 276(48):44444-44449.
- (47) Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(10):3587-3590.
- (48) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-159.
- (49) Sambrook J, Fritsch E MT. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- (50) Gallo RC. Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* 1971; 234(5326):194-198.
- (51) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1:263-273.
- (52) Apostolakos MJ, Schuermann WH, Frampton MW, Utell MJ, Willey JC. Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1993; 213(2):277-284.
- (53) Zhao J, Araki N, Nishimoto SK. Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene* 1995; 155(2):159-165.
- (54) Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol* 2001; 167(1):366-374.
- (55) Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992; 307(1):97-101.
- (56) Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L et al. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 2002; 118(2):275-281.
- (57) Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol* 2004; 173(5):3482-3491.
- (58) Mackness MI, Walker CH. Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. *Biochem J* 1988; 250(2):539-545.
- (59) Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286(1-2):152-154.
- (60) Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN. Is paraoxonase related to atherosclerosis. *Chem Biol Interact* 1993; 87(1-3):161-171.

- (61) Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004; 4(4):211-217.
- (62) Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96(6):2882-2891.
- (63) Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394(6690):284-287.
- (64) Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lulis AJ et al. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(4):L852-L860.
- (65) Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 2007; 153(Pt 12):3923-3938.
- (66) Reading NC, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254(1):1-11.
- (67) Seed PC, Passador L, Iglewski BH. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* 1995; 177(3):654-659.
- (68) Schaefer AL, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Jr., Greenberg EP. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(18):9505-9509.
- (69) Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Jr., Greenberg EP. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(8):4360-4365.
- (70) More MI, Finger LD, Stryker JL, Fuqua C, Eberhard A, Winans SC. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 1996; 272(5268):1655-1658.
- (71) Hanzelka BL, Parsek MR, Val DL, Dunlap PV, Cronan JE, Jr., Greenberg EP. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* 1999; 181(18):5766-5770.
- (72) Hoang TT, Ma Y, Stern RJ, McNeil MR, Schweizer HP. Construction and use of low-copy number T7 expression vectors for purification of problem proteins: purification of mycobacterium tuberculosis RmlD and pseudomonas aeruginosa LasI and RhII proteins, and functional analysis of purified RhII. *Gene* 1999; 237(2):361-371.
- (73) Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 2003; 185(7):2080-2095.

- (74) Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 2003; 185(7):2066-2079.
- (75) Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003; 22(15):3803-3815.
- (76) Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(16):8789-8793.
- (77) Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB et al. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 1996; 64(1):37-43.
- (78) Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; 280(5361):295-298.
- (79) Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112(9):1300-1307.
- (80) Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7):3526-3531.
- (81) Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(2):153-163.
- (82) Dong YH, Wang LY, Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007; 362(1483):1201-1211.
- (83) Dong YH, Zhang XF, Xu JL, Zhang LH. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(2):954-960.
- (84) Schitteck B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2001; 2(12):1133-1137.
- (85) Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005; 44(16):6371-6382.
- (86) Klenha J, Krs V. Lysozyme in mouse and human skin. *J Invest Dermatol* 1967; 49(4):396-399.
- (87) Harder J, Schröder JM. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 2002; 277(48):46779-46784.
- (88) Harder J, Schröder JM. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol* 2005; 77(4):476-486.

- (89) Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21:319-346.
- (90) Yang F, Wang LH, Wang J, Dong YH, Hu JY, Zhang LH. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Lett* 2005; 579(17):3713-3717.
- (91) Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 1999; 181(4):1203-1210.
- (92) Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006; 79(3):439-448.
- (93) de Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk PG, Blokx W et al. High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2005; 125(6):1163-1173.
- (94) Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002; 347(15):1151-1160.
- (95) Milner SM, Ortega MR. Reduced antimicrobial peptide expression in human burn wounds. *Burns* 1999; 25(5):411-413.
- (96) Bang RL, Sharma PN, Sanyal SC, Al N, I. Septicaemia after burn injury: a comparative study. *Burns* 2002; 28(8):746-751.
- (97) Fitzwater J, Purdue GF, Hunt JL, O'Keefe GE. The risk factors and time course of sepsis and organ dysfunction after burn trauma. *J Trauma* 2003; 54(5):959-966.
- (98) Bielecki P, Glik J, Kawecki M, Martins dS, V. Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* 2008; 30(5):777-790.
- (99) Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2):403-434.
- (100) Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* 1999; 67(11):5854-5862.
- (101) Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* 2000; 68(7):4331-4334.
- (102) Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* 2005; 187(5):1799-1814.

8 Danksagung

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

Ein ganz großer Dank geht an Giuliana Vial, die mich während der gesamten Zeit von Studium und Doktorarbeit begleitet hat und auf deren emotionale und praktische Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Für die vielen Tipps und Hilfeleistungen, die unermüdeten Antworten auf Fragen sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor möchte ich mich ganz herzlich bei Bente, Britta, Eske, Elvira, Felix, Heilwig, Kerstin, Manfred, Regine, Stephe und Uli bedanken. Außerdem möchte ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik für die freundliche Unterstützung danken.

Weiterhin gilt mein Dank Christel für die Unterstützung bei der Durchführung von immunhistologischen Anfärbungen.

Für das aufmerksame Durchsehen der Doktorarbeit danke ich Dr. Rüdiger Panzer, Julika Lomas und Ulla Vorwerk.

Ein besonders lieber Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer eine seelische Stütze sind. Meinen Eltern, die mich zu einem neugierigen Menschen erzogen, mir die Möglichkeit zum Studium gegeben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben sowie meiner Schwester, die mir mit ihrer Liebe und ihrem Glauben an mich immer wieder Kraft für neue Herausforderungen gibt.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Sarah Babucke, geb. 08.05.1981 in Vorwerk, Gemeinde Tarmstedt, ledig, keine Kinder

Vater Prof. Dr. Peter Wetzels, geb. 07.05.1959,
Professor für Kriminologie an der Universität Hamburg

Mutter Petra Babucke, geb. 02.10.1961,
Rechtsanwältin

Geschwister Lea Babucke; geb. 17.10.1991

Schulbesuch

1987-1993 Grundschule & Orientierungsstufe, St. Marien-Schule in Bremen

1993-1997 Sekundarstufe I, St. Johannis-Schule in Bremen

1997-2000 Sekundarstufe II, Gymnasium an der Herrmann-Böse-Str. in Bremen

06/2000 Abitur

Praktika und Tätigkeiten

08/2000-01/2001 Krankenpflegepraktikum, Prof. Hess Kinderklinik, pädiatrische
Onkologie; Bremen

03/2001-07/2001 Tätigkeit in der Behindertenpflege, Lebenshilfe Bremen e.V.

01/2006-08/2007 Studentische Hilfskraft in der Dermatologie Kiel, Sfb 617; Projekt:
Molekulare Mechanismen der epithelialen Abwehr

Europäischer Freiwilligendienst

09/2001-09/2002 Beau Rivage, Heim für sozial benachteiligte Jugendliche, Limoges,
Frankreich

Studium der Humanmedizin

Seit 10/2002 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Juli 2004 Physikum

08/2007-12/2007 Auslandstertial Chirurgie am CHU in Yaoundé, Kamerun

05/2009 Staatsexamen

07/2009 Erteilung der Approbation

Dissertation

Seit 10/2005 Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der CAU-Kiel bei
Prof. Dr. J. Harder

03/2007 Poster-Präsentation der Forschungsergebnisse auf der ADF in Freiburg