

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG ZUR ROLLE DER PROFILAGGRIN-PEPTIDE
FLG₈₇₋₁₂₂ UND FLG₁₂₃₋₂₀₀ IN DER KUTANEN ABWEHR**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
CHRISTIAN FELIX SCHULZ
aus Kiel

Kiel 2010

1. Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Schröder
2. Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Grötzing
Tag der mündlichen Prüfung:	03.02.2011
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	03.02.2011
gez.	Herr Prof. Dr. Dr. Cascorbi

Meinen Eltern,
meiner Schwester Mia und
meinem Bruder Tobias

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DIE HAUT	1
1.1.1 <i>Aufbau der menschlichen Haut</i>	1
1.1.1.1 Der „Epidermale Differenzierungskomplex“	4
1.1.1.2 Die „S100-Fused-Type-Protein“-Familie	4
1.1.1.3 Profilaggrin.....	5
1.2 DIE IMMUNABWEHR DER HAUT	7
1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	9
2 MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1 CHEMIKALIEN.....	10
2.2 VEKTOREN.....	10
2.3 OLIGONUKLEOTIDE.....	11
2.4 ENZYME.....	11
2.5 PUFFER UND LÖSUNGEN	12
2.6 NÄHRMEDIEN	13
2.7 EINWEGMATERIAL.....	14
2.8 KITS.....	14
2.9 GERÄTE	14
2.10 MIKROORGANISMEN	16
2.11 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	17
2.11.1 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	17
2.11.1.1 Standard-PCR.....	17
2.11.1.2 „Nested-PCR“.....	18
2.11.1.2.1 Design der Primerpaare für die „Nested-PCR“	19
2.11.1.3 „Colony-check-PCR“ zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung	20
2.11.2 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	21
2.11.3 <i>Gel-Extraktion</i>	22
2.11.4 <i>Ligation</i>	22
2.11.5 <i>Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen</i>	23
2.11.6 <i>Transformation</i>	23
2.11.7 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i>	24
2.11.8 <i>DNA-Sequenzierung</i>	25
2.11.9 <i>Restriktionsverdau von Plasmid-DNA</i>	25
2.12 REKOMBINANTE EXPRESSION VON PFLG-1 UND PFLG-2 IN <i>E. COLI</i>	26
2.12.1 <i>Struktur des Expressionsvektors</i>	26
2.12.2 <i>Durchführung der Expression</i>	26

2.12.2.1	Übernachtskulturen	27
2.12.2.2	Bestimmung der Bakteriendichte.....	27
2.12.2.3	Induktion und Zellkultivierung	27
2.12.3	<i>Proteolyse der exprimierten Fusionsproteine</i>	28
2.13	CHROMATOGRAPHISCHE AUFREINIGUNG VON PROTEINEN	28
2.13.1	<i>Aufreinigung von rekombinantem PFLG-1 und PFLG-2</i>	28
2.13.2	<i>Nickel-Affinitätssäule</i>	29
2.13.3	<i>C8-Umkehrphasen-HPLC</i>	29
2.13.4	<i>C4-Umkehrphasen-HPLC</i>	30
2.13.5	<i>C2/C18-Umkehrphasen-HPLC</i>	30
2.14	PROTEINANALYTIK	31
2.14.1	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i>	31
2.14.2	<i>Massenspektrometrie</i>	31
2.14.3	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	32
2.15	ANTIMIKROBIELLE TESTVERFAHREN	32
2.15.1	<i>Radialer Plattendiffusionstest</i>	33
3	ERGEBNISSE	35
3.1	REKOMBINANTE EXPRESSION VON PFLG-1 UND PFLG-2 IM pSUMO3-SYSTEM	35
3.1.1	<i>Amplifizierung der PFLG-1- und PFLG-2-Gensequenzen mittels PCR</i>	35
3.1.2	<i>Klonierung im pGEM-T-Vektorsystem</i>	37
3.1.3	<i>Klonierung im pSUMO3-Vektorsystem</i>	38
3.1.4	<i>Expression der PFLG-1- und PFLG-2-Fusionsproteine</i>	41
3.1.5	<i>Aufreinigung der rekombinant exprimierten PFLG-1- und PFLG-2-Fusionsproteine</i>	42
3.1.6	<i>Aufreinigung von rekombinant exprimiertem PFLG-1 und PFLG-2</i>	44
3.2	ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT VON PFLG-1 UND PFLG-2	47
3.2.1	<i>Antimikrobielle Aktivität von PFLG-1 im radialen Plattendiffusions-test</i>	48
3.2.2	<i>Antimikrobielle Aktivität von PFLG-2 im radialen Plattendiffusions-test</i>	49
4.	DISKUSSION	51
4.1	PFLG-1 UND PFLG-2 LASSEN SICH IN <i>E. COLI</i> REKOMBINANT EXPRIMIEREN	52
4.2	PFLG-2 BESITZT ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT	54
4.3	WIRKMECHANISMEN VON ANTIMIKROBIELLEN PROTEINEN.....	58
4.4	ANTIMIKROBIELLE PROTEINE ALS THERAPEUTIKA	60
4.5	ROLLE VON PROFILAGGRIN IM RAHMEN VON ERKRANKUNGEN	61
4.6	AUSBLICK	63
5.	ZUSAMMENFASSUNG	66
6.	ANHANG	67
6.1	VEKTORKARTE DES pSUMO3-EXPRESSIONSVEKTORS	67
6.2	SEQUENZEN	67

6.2.1	<i>cDNA und Proteinsequenz des humanen Profilaggrin</i>	67
6.2.2	<i>Übersicht der rekombinanten Proteinfragmente von Profilaggrin</i>	68
6.2.2.1	PFLG-1.....	68
6.2.2.2	PFLG-2.....	68
6.3	ABKÜRZUNGEN DER AMINOSÄUREN UND NUKLEINSÄUREN.....	68
7.	LITERATUR	69
8.	DANKSAGUNG	80
9.	LEBENS LAUF	82
10.	ERKLÄRUNG	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	„American Type Culture Collection“
AU	Fläche unter der Kurve („area under the curve“)/ Absorptionseinheit („absorption unit“)
β	Beta
<i>Bam</i> H	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
bp	Basenpaare
<i>Bsa</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
° C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g/ x g	Gramm / Erdbeschleunigung
h	Stunden
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
LB	„Lysogenic Broth“
M	molar
MEK	Minimale Effektive Konzentration
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MS	Massenspektrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	„Phosphate-Buffered Saline Solution“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFLG	Profilaggrin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TFA	Triflouressigsäure
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Einheiten ("units")
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-Galaktopyranosid

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut gehört mit einer Oberfläche von ca. 1,5-2 m² und einem Gewicht von ca. 3 kg (ohne Einrechnen des subkutanen Fettgewebes) zu den größten Organen des Menschen (Alonso und Fuchs, 2003). Sie bildet die Grenzschicht zwischen der Umwelt und dem Körperinnern und übernimmt trotz ihrer geringen Dicke von nur 1,5-4 mm eine Vielzahl komplexer Funktionen zur Sicherung verschiedener Prozesse der Homöostase. Von besonderer Bedeutung ist die Barrierefunktion der Haut. Das mehrschichtig verhornte Plattenepithel schützt vor Austrocknen des Körpers durch Wasserverlust, bietet einen wirksamen mechanischen Schutz, ist durch seine Gefäßarchitektur und Schweißdrüsen an der Thermoregulation beteiligt und feilt vor chemischen Noxen aus der Umwelt (Lüllmann-Rauch, 2003). Mit Hilfe von verschiedenen in der Haut lokalisierten Mechanorezeptoren und Nozizeptoren der somatoviszeralen Sensibilität (z. B. Merkel-Zellen, Ruffini-Körperchen und freie Nervenendigungen) werden verschiedene Reize wie Hitze, Kälte und Schmerz aus der Umwelt vermittelt. Außerdem besitzt die Haut wichtige Funktionen in Zusammenhang mit der angeborenen Immunität und der Verbindung von angeborenem und adaptivem Immunsystem.

Diese zahlreichen Funktionen machen deutlich, dass die Haut eine wichtige Rolle bei der Anpassung an das terrestrische Leben spielt (Harding, 2004; Elias, 2005; Elias, 2008) und dass Verletzungen oder ernsthafte Störungen der Haut schwerwiegende, z. T. lebensbedrohliche Folgen haben können. So ist es nicht verwunderlich, dass bereits geringgradige Affektionen wie z. B. oberflächliche Hautabschürfungen einen Reparaturmechanismus induzieren (Ekanayake-Mudiyanselage et al., 1998), um die Integrität wiederherzustellen und damit verbunden die zahlreichen lebenswichtigen Funktionen aufrechtzuerhalten.

1.1.1 Aufbau der menschlichen Haut

Die Hautdecke des Menschen gliedert sich in Kutis (Haut) und Subkutis (Unterhaut). Die Kutis lässt sich weiterhin in Dermis (Lederhaut) und Epidermis (Oberhaut) unterteilen, die durch die Basallamina voneinander getrennt werden. Entwicklungsgeschichtlich entsteht die

Kutis aus zwei Komponenten: die Epidermis differenziert sich aus dem Ektoderm (äußeres Keimblatt), die Dermis aus dem darunterliegenden Mesoderm (mittleres Keimblatt) (Sadler, 2004).

Die Subkutis setzt sich aus lockerem Bindegewebe und je nach Körperregion unterschiedlich großen Anteilen von Fettgewebe, in welchem die epifaszialen Leitungsbahnen (Nerven, Blut- und Lymphgefäße) verlaufen, zusammen. Mit Hilfe von Bindegewebszügen, die das Fettgewebe durchziehen, wird die Kutis mit tieferliegenden Strukturen wie z. B. Muskelfasern verbunden. Das Fettgewebe dient als Energiespeicher, Wärmeisolator und Druckpolster (Lüllmann-Rauch, 2003).

Die aus Bindegewebe bestehende Dermis liegt zwischen Epidermis und Subkutis, verleiht der Kutis die mechanische Widerstandsfähigkeit und führt die Blutgefäße, über die die gefäßfreie Epidermis ernährt wird, sowie afferente freie Nervenendigungen zur Aufnahme von Reizen aus der Umgebung und efferente Nerven zur Innervation der in der Dermis gelegenen Blutgefäße, Haarfollikel und Schweißdrüsen (Lüllmann-Rauch, 2003).

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel mit einer Dicke von 0,1 bis 1 mm, das die eigentliche Deckschicht des Körpers bildet und sich histologisch von basal nach superfizial in die vier Schichten *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* gliedern lässt (Abb. 1.1). Dieses Schichtbild kommt dadurch zustande, dass sich Zellen desselben Differenzierungsgrades jeweils auf einer Höhe befinden. Die Hauptpopulation der Epidermis bilden die Keratinozyten, die durch Zellteilung im *Stratum basale* entstehen, während der Wanderung nach superfizial ansteigende Reifegrade durchlaufen und schließlich als tote Hornzellen im *Stratum corneum* das Ziel der Differenzierung erreichen und der Haut ihre physikalische und chemische Widerstandsfähigkeit verleihen. Dieser Prozess der terminalen Differenzierung dauert ca. vier Wochen und endet mit der Desquamation der Hornzellen des *Stratum corneum*. In diesem Rahmen wird eine Vielzahl von Proteinen vermehrt exprimiert, deren gemeinsame Aufgabe die Beteiligung an der Ausbildung des *Stratum corneum* ist (Mischke et al., 1996). Ein Großteil der für diese Proteine kodierenden Gene ist gemeinsam in der Region 1q21.3 des humanen Chromosoms 1 lokalisiert. Dieser Abschnitt wird als „Epidermaler Differenzierungskomplex“ (1.1.1.1) bezeichnet (Mischke et al., 1996).

Weitere in der Epidermis vorkommende Zelltypen sind Pigment-bildende Melanozyten, zum Immunsystem gehörende Langerhans-Zellen und der Oberflächensensibilität dienende Merkel-Zellen (Lüllmann-Rauch, 2003).

Im Folgenden werden nun die einzelnen Schichten der Epidermis genauer erläutert. Das *Stratum basale* setzt sich aus einer Lage prismatischer Zellen, die direkt der Basallamina aufsitzen und somit die erste Schicht über der Dermis bilden, zusammen. Sie enthält auch die Stammzellen, aus denen durch mitotische Teilung, welche in gesunder Epidermis

hauptsächlich in dieser Schicht stattfindet, die Keratinozyten hervorgehen. Darüber liegt das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht). Es besteht aus zwei bis fünf Lagen polygonaler Zellen, die vermehrt durch Desmosomen in Kontakt stehen. Lichtmikroskopisch zeigt sich diese Zellschicht aufgrund artifizierlicher Schrumpfung der Zellen und in der Folge deutlicher hervorgehobener Desmosomenkontakte als Stachelzellschicht (Lüllmann-Rauch, 2003). Das *Stratum granulosum* setzt sich aus drei Lagen von Zellen zusammen. Hier wird das Intermediärfilament-assoziierte Protein Profilaggrin (1.1.1.3), welches in F-Kerato-hyalin granula gelagert wird, exprimiert (Candi et al., 2005). Im weiteren Verlauf der terminalen Differenzierung wird Profilaggrin in Filaggrin-Monomere gespalten, welche die Keratinfilamente bündeln. (Candi et al., 2005). Dies fördert den Zusammenfall der Zellen mit Ausbildung der flachen für die Korneozyten des *Stratum corneum* typischen Zellform (Candi et al., 2005). Das *Stratum corneum* wird von ca. 25-100 Lagen avitaler Zellen (Korneozyten), die weder Zellkern noch andere Organellen enthalten, gebildet. Die Korneozyten weisen die Form polygonaler Plättchen auf. Sie bestehen hauptsächlich aus Keratin-Intermediärfilamenten, die in eine Filaggrin-Matrix eingebettet sind und von unlöslichen Lipiden umgeben werden (Candi et al., 2005). Untereinander werden die Korneozyten durch Korneodesmosomen zusammengehalten, welche in den obersten Schichten des *Stratum corneum* proteolytisch gespalten werden, um die Desquamation zu ermöglichen (Serre et al., 1991). Dieses System aus verhornter Zellhülle („Cornified Cell Envelope“), Korneodesmosomen und extrazellulären Lipiden sorgt also für die Verbindung der abgestorbenen Keratinozyten und verleiht der Epidermis ihre Barrierefunktion. Es wird als „brick and mortar“-Modell beschrieben (Nemes und Steinert, 1999).

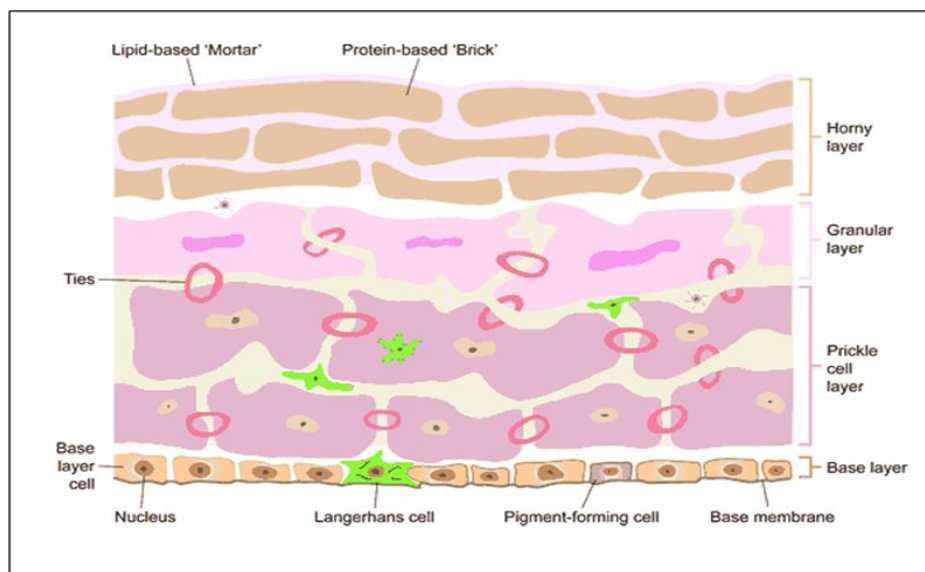


Abb. 1.1: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Epidermis. Die menschliche Epidermis gliedert sich in die folgenden vier Schichten: *Stratum basale* („Base layer“), *Stratum*

spinosum („Prickle cell layer“), *Stratum granulosum* („Granular layer“) und *Stratum corneum* („Horny layer“). Neben den Keratinozyten zeigt die Abbildung weitere in der Epidermis vorkommende Zellen, wie die zum Immunsystem gehörenden Langerhans-Zellen („Langerhans cell“) und die Pigmentbildenden Melanozyten („Pigment-forming cell“). Des Weiteren wird das „brick and mortar“-Modell veranschaulicht: Die Keratinozyten sind durch eine verhornte Zellhülle, den sogenannten "Cornified Cell Envelope", und die lipidreiche extrazelluläre Matrix sowie Korneodesmosomen miteinander verbunden (Quelle: <http://www.hse.gov.uk/skin/professional/causes/understand.htm>).

1.1.1.1 Der „Epidermale Differenzierungskomplex“

Genfamilien, deren Mitglieder hohe Sequenzhomologien aufweisen und auf einem Chromosom dicht beieinander liegen, werden als Gencluster bezeichnet und kommen im menschlichen Genom recht häufig vor (Mischke et al., 1996). In der Region 1q21.3 kommen mehrere solcher Cluster vor. Hier sind viele Gene der Proteine lokalisiert, die verstärkt während der Differenzierung der Epidermis exprimiert werden und stabilisierende, interagierende sowie regulatorische Aufgaben übernehmen. Bei diesen Genen handelt es sich um Mitglieder verschiedener Genfamilien, deren Mitglieder jeweils als Cluster vorliegen. Die Gene der verschiedenen Familien sind an einer gemeinsamen, übergeordneten Aufgabe beteiligt, der Ausbildung der Epidermis (Mischke et al., 1996). Eine solche Anordnung wird im Allgemeinen als Genkomplex bezeichnet. Dementsprechend werden die Genfamilien der Region 1q21.3 als „Epidermaler Differenzierungskomplex“ definiert (Mischke et al., 1996). Dieser umfasst einen Abschnitt von etwa 1,7 Mb (Moseley und Seldin, 1989; Volz et al., 1993).

Die Proteine, die in dieser Region kodiert werden, lassen sich in vier Familien einteilen: S100-Proteine, „Late-Cornified-Envelope-Proteine“, „Cornified-Cell-Envelope-Precursor-Proteine“ und „S100-Fused-Type-Proteine“ (Mischke et al., 1996; Jackson et al., 2005).

1.1.1.2 Die „S100-Fused-Type-Protein“-Familie

Zur Familie der humanen „S100-Fused-Type-Proteine“ gehören Profilaggrin, Trichohyalin (Lee et al., 1993), Trichohyalin-like 1, Repetin (Krieg et al., 1997), Hornerin (Makino et al., 2001), Filaggrin-2 (Wu et al., 2009) und Cornulin (Xu et al., 2000). Ihnen gemeinsam ist, dass sie charakteristische Sequenzmerkmale der S100-Proteine (N-terminale potenzielle Ca²⁺-Bindungsdomänen: S100- und EF-Hand-Domäne) und der „Cornified-Cell-Envelope-Precursor-Proteine“ (unterschiedliche Anzahl an Tandem-Sequenzwiederholungen)

aufweisen (Huber et al., 2005; Segre, 2006). Auf genomischer Ebene setzen sich alle Mitglieder dieser Protein-Familie aus drei Exons, die durch zwei Introns voneinander getrennt sind, zusammen. Exon 1 ist nicht kodierend. Während Exon 2 das Translationsstartkodon beinhaltet und für die S100-Domäne kodiert, ist die gesamte restliche kodierende Sequenz in Exon 3 lokalisiert. Die Proteinstruktur ist gekennzeichnet durch eine N-terminale S100- sowie eine EF-Hand-Domäne, gefolgt von verschiedenen Tandem-Sequenzwiederholungen, die je nach Protein in ihrer Länge und Zusammensetzung variieren und jeweils N- und C-terminal von unterschiedlichen Spacer-Sequenzen flankiert werden. Eine weitere Eigenschaft dieser Protein-Familie ist ihre Ca^{2+} -abhängige Expression (Dale et al., 1983; Ishida-Yamamoto et al., 1997; Makino et al., 2001; Contzler et al., 2005, Huber et al., 2005).

1.1.1.3 Profilaggrin

Profilaggrin ist eines der am längsten bekannten Mitglieder der „S100-Fused-Type-Proteine“ und als quantitativ dominierendes Protein dieser Gruppe ein wichtiger Bestandteil der epidermalen Barriere (Dale, 1997). Das aus 4061 Aminosäuren bestehende, ca. 400 kDa schwere humane Profilaggrin wird als unlösliches und hochphosphoryliertes Proprotein im *Stratum granulosum* der Epidermis exprimiert (Resing et al., 1995). Profilaggrin wird vom *Filaggrin-* (*FLG-*) Gen, das im Bereich des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ auf Chromosom 1q21.3 lokalisiert ist, kodiert. Das *FLG*-Gen setzt sich aus drei Exons und zwei Introns zusammen (Presland et al., 1992; Markova et al., 1993). Exon 1 ist nicht kodierend. Während die Proteintranslation in Exon 2 initiiert wird, findet sich der Hauptteil der für das Profilaggrin-Protein kodierenden Sequenz in Exon 3. Humanes Histidin-reiches Profilaggrin setzt sich aus zehn bis zwölf identischen 324 Aminosäuren großen Filaggrin-Einheiten, die miteinander verbunden sind, zusammen. Diese Filaggrin-Polymere werden von partiellen Filaggrin-Einheiten flankiert und von einer N- und einer C-terminalen Domäne begrenzt (Gan et al., 1990; McKinley-Grant et al., 1989; Presland et al., 1992; Abb. 1.2). Jede Filaggrin-Einheit enthält eine Verbindungsregion, die während der Freisetzung der einzelnen Filaggrin-Monomere im Rahmen der terminalen Differenzierung der Keratinozyten proteolytisch gespalten wird. Die Filaggrin-Einheiten bündeln Keratinfilamente, was zum Kollaps des Zytoskeletts führt und die Ausbildung der für das *Stratum corneum* typischen abgeflachten Zellform fördert (Dale et al., 1997; Candi et al., 2005). Die N-terminale Domäne von Profilaggrin umfasst 293 Aminosäuren und lässt sich in eine 81 Aminosäuren große A- und eine 212 Aminosäuren große B-Domäne unterteilen (Pearson et al., 2002; Presland et al., 1992). Die A-Domäne enthält zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen (Presland et al., 1995), die

Gemeinsamkeiten mit den „EF-Händen“ der S100-Domäne der S100-Proteine aufweist. Dies impliziert, dass Ca^{2+} eine Schlüsselrolle während der Prozessierung von Profilaggrin zukommt. Die B-Domäne enthält eine Signalsequenz, die die Translokation der N-terminalen Domäne in den Nucleus während der terminalen Differenzierung ermöglicht (Ishida-Yamamoto et al., 1998; Pearton et al., 2002; Zhang et al., 2002). Dies scheint wichtig zu sein für die Umwandlung der vitalen kernhaltigen Keratinozyten des *Stratum granulosum* in die toten Korneozyten des *Stratum corneum*. So konnte gezeigt werden, dass Zellkerne apoptotischer Keratinozyten während der Umwandlung von vitalen Keratinozyten in avitale kernlose Korneozyten positiv mit spezifischen gegen die N-terminale Domäne gerichteten Antikörpern reagieren (Ishida-Yamamoto et al., 1998).

Die C-terminale Domäne besteht aus 157 Aminosäuren (Presland et al., 1992). Ihre Funktion ist bisher nicht hinreichend geklärt, aber die Expression scheint für die Prozessierung von Profilaggrin in die Filaggrin-Monomere von Bedeutung zu sein (Sandilands et al., 2007). Nach proteolytischer Spaltung von Profilaggrin in die Filaggrin-Monomere während der Differenzierung der Keratinozyten zu Korneozyten werden die Filaggrin-Monomere weiter in Aminosäuren und deren Derivate wie z. B. die Pyrrolidoncarbonsäure prozessiert, die der Haut als „Natural Moisturizing Factors“ dienen. An der Prozessierung sind u. a. folgende Enzyme beteiligt: Matriptase, Endoproteinase 1, Furin und Caspase 14 (Resing et al., 1995b; Pearton et al., 2001; List et al., 2003; Denecker et al., 2008).

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *FLG*-Gen eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener Hauterkrankungen, v. a. Ichthyosis vulgaris und Atopische Dermatitis, spielen (Smith et al., 2006; Sandilands et al., 2007). So exprimieren Patienten mit Mutationen im *FLG*-Gen ein Profilaggrin-Protein, das zwar in der Lage ist, ein *Stratum granulare* der Epidermis, welches deutlich dünner ist als in gesunder Haut, mitzuformen, aber dieses mutierte Profilaggrin-Protein kann nicht in die Filaggrin-Monomere prozessiert werden (Sandilands et al., 2007).

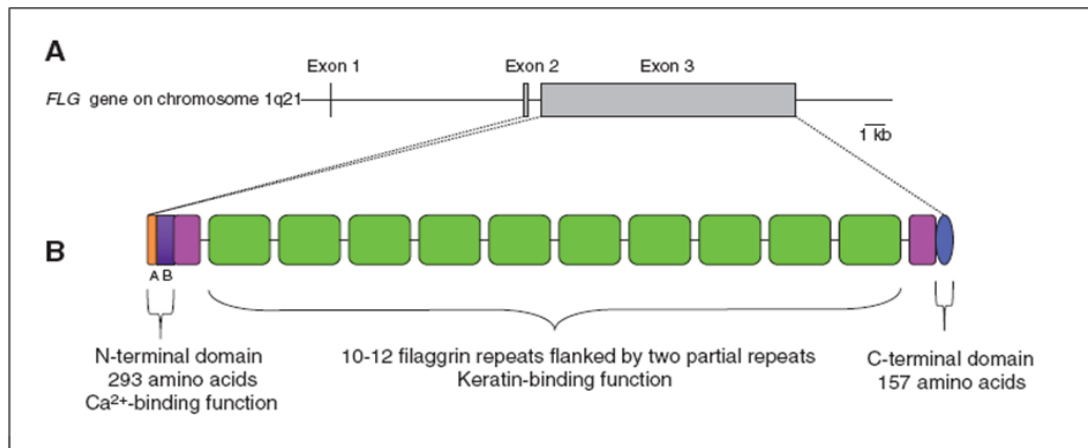


Abb. 1.2: Aufbau des *FLG*-Gens und Proteinstruktur von Profilaggrin. A: Das *FLG*-Gen ist auf Chromosom 1q21.3 im Bereich des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ lokalisiert und besteht aus drei Exons und zwei Introns. Exon 3 kodiert für den Hauptteil des Profilaggrin-Proteins. B: Gezeigt ist die Proteinstruktur von Profilaggrin: Es setzt sich aus zehn bis zwölf identischen 324 Aminosäuren großen Filaggrin-Einheiten, die miteinander verbunden sind, zusammen. Auf beiden Seiten werden diese Filaggrin-Polymere von trunkierten Filaggrin-Einheiten flankiert und von einer N- und einer C-terminalen Domäne begrenzt (aus Sandilands et al., 2009).

1.2 Die Immunabwehr der Haut

Die Haut des Menschen ist als äußere Begrenzung zur Umwelt einer Vielzahl schädlicher Einflüsse ausgesetzt, zu denen auch verschiedenste potenziell pathogene Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilze zählen. Trotz einer ständigen Besiedelung der Haut mit ca. 10^2 - 10^7 Mikroorganismen/cm² kommt es beim gesunden Menschen nur selten zu Hautinfektionen (Fitzpatrick, 1993).

Einen wesentlichen Beitrag hierzu leistet eine intakte physikalische Barriere, gebildet durch das *Stratum corneum* des mehrschichtig verhornten Plattenepithels sowie durch die Schleimschicht im Bereich der Mucosa. Desquamation und Schleimbildung sorgen für eine regelmäßige Erneuerung der Oberfläche und eliminieren auf diese Weise adhärierende Mikroorganismen. Ein relativ niedriger pH-Wert der Haut von 4,5-5 („Säureschutzmantel“) sowie eine Lipidbarriere aus langkettigen Fettsäuren erschweren zusätzlich das Eindringen von Mikroorganismen (Übersicht in Fluhr und Elias, 2002; Candi et al., 2005).

Diese epitheliale Barriere muss zur erfolgreichen Infektionsabwehr und Wahrung der Integrität der Haut, die sie allein nicht zu leisten imstande ist (Weinberg und Swartz, 1993), durch weitere Mechanismen ergänzt werden.

Neben der beschriebenen epithelialen Barriere verfügen Wirbeltiere zum Schutz vor Infektionen durch Mikroorganismen über ein Arsenal aus humoralen und zellulären Mechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Das phylogenetisch ältere angeborene Immunsystem schützt den Organismus in der Frühphase, bis das bei den Wirbeltieren vorkommende adaptive Immunsystem aktiv wird. Es besteht größtenteils aus zellulären, phagozytierenden Elementen (Makrophagen, Natürliche Killerzellen, Granulozyten) sowie dem auf dem alternativen Weg aktivierten Komplementsystem. Seine Hauptfunktion liegt in der Erkennung konservierter, artfremder Strukturen von Pathogenen wie z. B. Lipopolysacchariden (Harder et al., 2007; Albiger et al., 2007; Murphy et al., 2008; Duncan et al., 2008).

Das adaptive Immunsystem ist im Gegensatz zur angeborenen Immunität hochvariabel, anpassungsfähig und in der Lage, ein „immunologisches Gedächtnis“ aufzubauen. Die Haupteffektorzellen sind T- und B-Lymphozyten, die durch den Kontakt mit Antigenen aktiviert werden. T-Lymphozyten lysieren als zytotoxische T-Zellen körpereigene Zellen, die von intrazellulären Erregern befallen sind, und aktivieren als T-Helfer-Zellen Makrophagen und B-Zellen, die sich dann in Antikörper-produzierende Plasmazellen umwandeln.

Von besonderer Bedeutung ist zusätzlich die „chemische Barriere“ aus antimikrobiellen Peptiden und Proteinen, die als eine Komponente der angeborenen Immunität gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen wirksam ist und somit einen wesentlichen Schutz vor Infektionen darstellt (Harder et al., 1997; Ganz und Lehrer, 1998; Boman, 2000; Harder und Schröder, 2002; Gläser et al., 2005). Die Bedeutung der antimikrobiellen Peptide lässt sich besonders gut am Beispiel wirbelloser Organismen demonstrieren. Diese verfügen im Gegensatz zu den Wirbeltieren nur über eine angeborene und nicht über eine adaptive Immunität. Auch Pflanzen produzieren antimikrobielle Peptide, die eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen aufweisen und somit für einen wirkungsvollen Schutz der Pflanzen vor Infektionen sorgen (Broekaert et al., 1997). Mit der Beobachtung, dass menschliches Nasensekret antimikrobielle Eigenschaften aufweist, lieferte Alexander Fleming bereits 1922 erste Hinweise für die Existenz antimikrobieller Peptide beim Menschen. Das von ihm nachgewiesene Protein wurde später als Lysozym, das in seinen Eigenschaften als Muraminidase die Zellwand von Bakterien zerstören kann, nachgewiesen.

Durch chemotaktische und immunmodulatorische Wirkung (Harder et al., 2007) sorgen die antimikrobiellen Peptide zusätzlich für eine Interaktion zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem.

Vorwiegend handelt es sich bei den antimikrobiellen Peptiden um kleinere (3-5 kDa) kationische Polypeptide (Hancock und Diamond, 2000), die sich nach dem derzeitigen Wissenschaftsstand in vier Hauptgruppen einteilen lassen: Defensine, Cathelicidine,

Ribonukleasen und S100-Proteine. Zu den bisher entdeckten antimikrobiellen Peptiden der Haut zählen u.a. Lysozym, Antileukoprotease und die humanen β -Defensine hBD-1 bis hBD-4 (Chen et al., 1986; Wiedow et al., 1998; Harder et al., 2007). Einige dieser antimikrobiellen Proteine werden konstitutiv in der Haut exprimiert, während andere induzierbar sind (Harder und Schröder, 2002).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Untersuchungen von Proteinextrakten des *Stratum corneums* gesunder Menschen nach Auftrennung durch HPLC zeigten neben den drei dominierenden antimikrobiellen Peptiden RNase 7, Psoriasin und Lysozym noch weitere Proteine und Peptide. Dabei wurden in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe antimikrobielle Eigenschaften für die „S100-Fused-Type-Proteine“ Hornerin und Ifapsoriasin/Filaggrin-2 nachgewiesen. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass auch andere „S100-Fused-Type-Proteine“ antimikrobielle Aktivität aufweisen könnten.

Da Profilaggrin zum einen das dominierende „S100-Fused-Type-Protein“ der Haut ist und zum anderen bei HPLC-Analysen von antimikrobiell aktiven Fraktionen aus *Stratum corneum*-Extrakten Polypeptide entdeckt wurden, die der N-terminalen Region von Profilaggrin zugeordnet werden konnten, war das Ziel dieser Arbeit, die beiden N-terminal lokalisierten Profilaggrin-Fragmente FLG₈₇₋₁₂₂ (PFLG-1) und FLG₁₂₃₋₂₀₀ (PFLG-2) rekombinant zu exprimieren, aufzureinigen und hinsichtlich möglicher antimikrobieller Eigenschaften zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

1 kb-DNA-Größenstandard	NEB, Ipswich
100 bp-DNA-Größenstandard	NEB, Ipswich
Acetonitril	Promochem GmbH, Wesel
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
dNTPs	GE Healthcare, Freiburg
EDTA	Gibco, Eggenstein
Glycerin	USB, Cleveland, USA
H ₂ O (für HPLC)	Promochem GmbH, Wesel
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
MES	Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue® Plus2-Größenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Smart-DNA-Größenstandard	Eurogentec, Köln
Trifluoressigsäure	Promochem GmbH, Wesel
TSB	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal	Boehringer, Ingelheim

2.2 Vektoren

pGEM-T-Vektor	Promega, Mannheim
pSUMO3-Vektor	Life Sensors, Malvern, USA

2.3 Oligonukleotide

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

Bezeichnung 5'-3'-Sequenz

Primer für Standard-PCR

PFLG-157bp-F	TTTCGGCAAATCCTGAAGAATCCAG
PFLG-714bp-R	TGGCAATATGGCCTGATTGTATCCAT

pSUMO3-System

SUMO3-PFLG-1-F	GCAGGTCTCAAGGTGAGTCTACCAGAAAAGAGAATT
SUMO3-PFLG-1-R	GCAGGATCCTTATCTGTTTTCTTTGTTTTCTTCCT
SUMO3-PFLG-2-F	GCAGGTCTCAAGGTAAAAGACCCTCAAGTCTGGAA
SUMO-PFLG-2-R	GCAGGATCCTTATAGCCTCTTCCTATTGTCTCC

Vektorprimer für „Colony-check-PCR“ und Sequenzierungen

M13-F	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
T7-Term-short	CTAGTTATTGCTCAGCGG
T7-SUMO-reverse	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

2.4 Enzyme

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase + Puffer	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsenzyme (<i>Bsal</i> , <i>Bam</i> HI)	NEB, Schwalbach
SUMO Protease 2	LifeSensors, Malvern, USA
T4-DNA-Ligase + Ligation Buffer	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase + Puffer	Invitrogen, Karlsruhe

2.5 Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer L IV für Agarose-Gele (6x) :	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin 10 mM Tris/ HCl (pH 7)
LEW-Puffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl pH 8,0
MES-SDS-Laufpuffer (20fach):	1 M MES 1 M Tris 69,3 mM SDS 20,5 mM EDTA pH 7,4
TAE-Puffer (50 fach):	24,2 g Tris-Base (2 M) 5,71 g Natriumacetat (1 M) 10 ml EDTA (0,5 M ; pH 8)
Coomassie-Färbelösung:	25 % Ethanol 7 % Essigsäure 0,2 % Coomassie Brilliant Blau R250
Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8,0
Entfärbelösung (nach Coomassie-Färbung):	25 % Isopropanol 7 % Essigsäure
TFA-Lösungen:	
Puffer A:	0,1% Trifluoressigsäure in H ₂ O

Puffer B (C4/C8):

0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril

Puffer B (C2/C18):

0,1% Trifluoressigsäure in 80% Acetonitril

2.6 Nährmedien

Lysogenic-Broth (LB)-Medium:

1 % Sojamehlpepton

0,5 % NaCl

0,5 % Hefe-Extrakt

ad 1000 ml mit H₂O,

pH 7,4 mit HCl eingestellt,

autoklaviert

LB-Agar:

LB-Medium

15 g Agar/l

Trypticase-Soy-Broth (TSB)-Medium:

30 g TSB

ad 1000 ml mit H₂O,

pH 7,4 mit HCl eingestellt,

autoklaviert

TSB-Agar:

TSB-Medium

15 g Agar/l

SOC-Medium :

2 % Pepton

0,5 % Hefe-Extrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

nach Autoklavieren:

20 mM Glukose

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

2.7 Einwegmaterial

Küvetten für Photometer	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Probengefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Probengefäße (Tubes, 1,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter, Filtropur 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht

2.8 Kits

NucleoSpin [®] Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren
Protino [®] Ni-TED packed columns	Macherey-Nagel, Düren
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.9 Geräte

Gefrierschränke/ -truhen

Kryosafe (-80 °C)	Hans Schröder GmbH, Hamburg
Premium	Liebherr, Bieberach

Geldokumentationsanlage und Auswertungssoftware	Biometra, Göttingen
--	---------------------

Gelkammern

Horizon 11-14	Invitrogen, Karlsruhe
---------------	-----------------------

HPLC

Gradientenpumpen	
Liquid Chromatograph LC-10AT VP	Shimadzu, Duisburg
FCV-10 AL VP	Shimadzu, Duisburg
SpectraSystem P4000	Spectra Physics, Darmstadt

Detektor	
UV-VIS Detector SPD-10A VP	Shimadzu, Duisburg
Entgaser	
Degasser DG-4	Henggeler, Riehen, Schweiz
Integratoren	
SP 4270 Integrator	Spectra Physics, Darmstadt
SP 4290 Integrator	Spectra Physics, Darmstadt
Trennsäulen	
SP 250/10 NUCLEOSIL 300 - 7 C8	Macherey-Nagel, Düren
Vorsäule SP 50/10	Macherey-Nagel, Düren
Jupiter 5u C4 300 A	Phenomenex, Aschaffenburg
μRPC C2/C18 SC 2.1/10	Pharmacia, Freiburg
Konzentratoren	
Lyophilisator Alpha 2-4 LSC	Christ, Osterode
Vakuumpumpe KAS 16	Pfeiffer Vacuum, Asslar
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Gel Pump GP 100	Savant, Gaithersburg, USA
Laborwaage	Kern, Albstadt
Massenspektrometer	
„QTOF II“	Micromass, Manchester, UK
Photometer	
150-20 Spectrophotometer	Hitachi, Wiesbaden
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Rotationsschüttler (Vortexer)	Janker und Kunkel, Staufen
Thermoblock	
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

Thermocycler

PTC-200 DNA-Engine
T3 Thermocycler

MJ Research, Waltham, USA
Biometra, Göttingen

Ultraschall

Sonopuls GM70

Bandelin Elektronik, Berlin

UV-Tisch

high performance transilluminator

Ultraviolet products, LLC Upland, USA

Zentrifugen

Centrifuge 5417 R
Centrifuge 5804 R

Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg

2.10 Mikroorganismen

<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11303	
	BL21(DE3)pLysS	Novagen/Merck, Darmstadt
	TOP10F'	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	

Alle ATCC-Stämme wurden freundlicherweise vom Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, bereitgestellt.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis *et al.*, 1986) lassen sich DNA-Fragmente *in vitro* spezifisch amplifizieren.

Die PCR diente der Amplifikation der PFLG-1- und PFLG-2-Gensequenzen und wurde zur Überprüfung von Plasmiden auf ein inseriertes PCR-Produkt genutzt. Die Reaktionen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 20 bzw. 50 μl in einem Thermocycler durchgeführt. Bestehend aus den Phasen Denaturierung, Primer-Anlagerung und Strangverlängerung wurde die PCR in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produkts und der Spezifität der Oligonukleotid-Primer in Bezug auf die vom Hersteller angegebenen Schmelzpunkte variiert. Die für die PCR verwendeten Primer sind unter 2.3 aufgeführt. Die verschiedenen PCR-Anwendungen werden im Folgenden erläutert.

2.11.1.1 Standard-PCR

Mittels Standard-PCR wurde zunächst unter Verwendung der beiden spezifischen Primer PFLG-157 bp-F und PFLG-714 bp-R ein 558 bp großes Fragment von Keratinozyten-cDNA amplifiziert, welches in einer weiteren PCR („Nested-PCR“; 2.11.1.2) als Matrize zur Herstellung der PFLG-1 und PFLG-2 Fragmente diente. Es wurde eine *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Diese aus *Pyrococcus furiosus* stammende DNA-Polymerase besitzt im Gegensatz zu der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, durch welche falsch eingebaute Nukleotide entfernt werden können („proof reading“) und somit die Genauigkeit der DNA-Synthese erhöht wird (Kunkel, 1992). Die Fehlerrate ist etwa sechsfach niedriger als bei *Taq*-DNA-Polymerasen.

Für die Standard-PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 2,0 μl 10x *Pfu*-cloned-buffer
- 0,4 μl dNTPs (10 mM)
- 0,5 μl PFLG-157bp-F-Primer (10 μM)
- 0,5 μl PFLG-714bp-R-Primer (10 μM)
- 0,5 μl cDNA
- 14,1 μl H₂O
- 0,2 μl *Pfu*-Polymerase (2,5 U/ μl), in 1,8 μl H₂O, Zugabe erst bei 85 °C

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C - 2 min	
85 °C - 1 min	Zugabe der <i>Pfu</i> -Polymerase
95 °C - 30 s	} 35 Zyklen
61 °C - 30 s	
72 °C - 2 min	
72 °C - 5 min	
4 °C - ∞	

2.11.1.2 „Nested-PCR“

Die „Nested-PCR“ ist eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion, bei der ein mittels Standard-PCR (2.11.1.1) erzeugtes cDNA-Fragment als Matrize zur Generierung kleinerer, innerhalb der Sequenz liegender PCR-Fragmente dient. Dieses Verfahren bietet den Vorteil einer höheren Spezifität. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn die verwendeten Primer zusätzlich zu den genspezifischen Sequenzen weitere nichtspezifische Ankersequenzen beinhalten, da es zur Amplifikation unspezifischer Produkte kommen kann. Da bei einer „Nested-PCR“ nur noch ein Fragment als Matrize vorliegt, wird die Amplifizierung unspezifischer Banden vermieden. Mit Hilfe der sequenzspezifischen Primer (SUMO-PFLG-1-F bzw. SUMO-PFLG-2-F und SUMO-PFLG-1-R bzw. SUMO-PFLG-2-R) wurden die zu klonierenden cDNA-Sequenzen amplifiziert. Zur Amplifikation der PFLG-1- und PFLG-2-Genabschnitte wurde analog zur Standard-PCR die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet.

Für die „Nested-PCR“ wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

-2,0	µl 10x <i>Pfu</i> -cloned-buffer
-0,4	µl dNTPs (10 mM)
-0,5	µl pSUMO-PFLG-1-F- bzw -PFLG-2-F- Primer (10 µM)
-0,5	µl pSUMO-PFLG-1-R- bzw -PFLG-2-R- Primer (10 µM)
-5,0	µl DNA (1:100; aus der ersten PCR, mittels Gel-Extraktion gewonnen)
-9,6	µl H ₂ O
-0,5	µl <i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ µl; Stratagene), in 1,5 µl H ₂ O, Zugabe erst bei 85 °C

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C - 2 min	
85 °C - 1 min	Zugabe der <i>Pfu</i> -Polymerase
95 °C - 30 s	} 7 Zyklen
53 °C - 30 s	
72 °C - 1 min	

95 °C - 30 s
72 °C - 1 min 15 s } 25 Zyklen

72 °C - 5 min

4 °C - ∞ Zugabe von 0,5 µl *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) zur
Generierung von 3'-A-Überhängen zur Ligation in pGEM-T-
Vektor mit 3'-T-Überhängen

72 °C - 20 min

2.11.1.2.1 Design der Primerpaare für die „Nested-PCR“

Um die PFLG-1- und PFLG-2-Gensequenzen für die spätere Klonierung im pGEM-T-Vektorsystem, die Restriktionshydrolyse aus dem pGEM-T-Vektor und die Ligation in den pSUMO3-Expressionsvektor zu amplifizieren, wurden an die beiden SUMO-PFLG-Vorwärtsprimer jeweils eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bsal* (GGTCTC) sowie der zur Ligation in den pSUMO3- Vektor nötige komplementäre Überhang (AGGT) zum Überhang des pSUMO3-Vektors im Bereich der Multiple cloning site angefügt. In die beiden genspezifischen Rückwärtsprimer wurde analog zum Design der Vorwärtsprimer je eine *Bam*HI Schnittstelle eingefügt sowie das zu dem Stopcodon TAA revers komplementäre Basentriplett TTA. Dies ist nötig, damit die später ablaufende Transkription im Rahmen der Expression an dieser Stelle terminiert und somit PFLG-1 und PFLG-2 in korrekter Weise synthetisiert werden. Bei den ersten drei Basen der Primer handelt es sich um optional angehängte Basen, die eine effizientere Restriktionshydrolyse ermöglichen. Hierbei ist es nicht von Bedeutung, welche Nukleotide verwendet werden. Abb. 2.1 zeigt in der Übersicht das Primerdesign der SUMO-PFLG-1-Vorwärts- und Rückwärtsprimer.

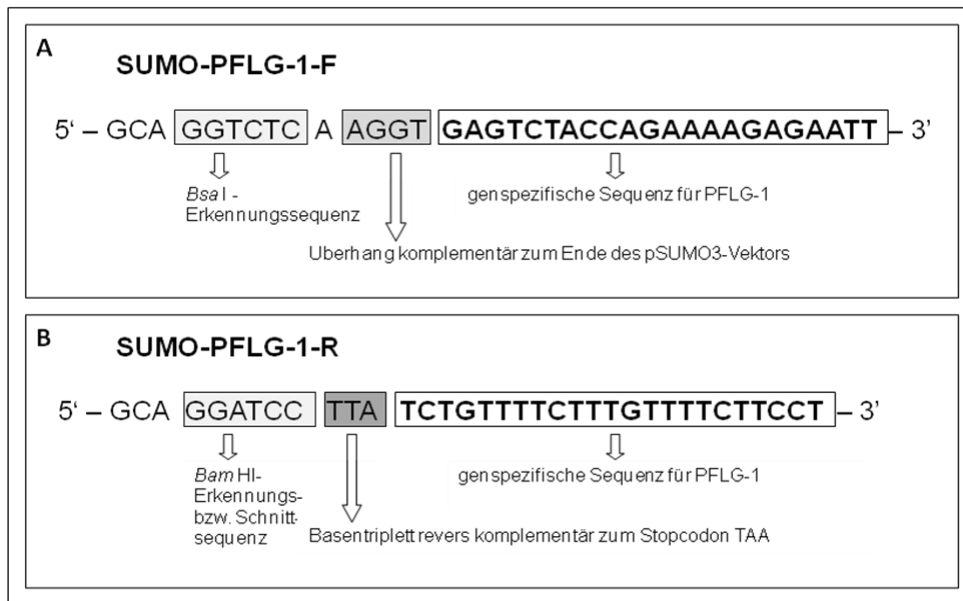


Abb. 2.1: Primerdesign am Beispiel der SUMO-PFLG-1-Primer. A: SUMO3-PFLG-1-F-Vorwärtsprimer, hellgrau hinterlegt ist die *BsaI*-Erkennungssequenz, mittelgrau die Sequenz, die komplementär zum Überhang des pSUMO3-Vektors ist. B: SUMO3-PFLG-1-R-Rückwärtsprimer, hellgrau hinterlegt ist die *BamHI*-Erkennungs- bzw. Schnittsequenz, dunkelgrau die Sequenz, die revers komplementär zum Stopcodon TAA ist.

2.11.1.3 „Colony-check-PCR“ zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung

Um den Erfolg der Transformation zu bestätigen, also um zu überprüfen, ob die Bakterien einen Vektor mit dem inserierten PCR-Produkt aufgenommen haben, wurden im Anschluss an die Transformation jeweils sechs Kolonien ausgewählt und mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze direkt vom Nähragar entnommen und in Reaktionsgefäße mit 20 µl PCR-Mix überführt. Als Primer wurden für den pGEM-T-Vektor die M13-Forward- und M13-Reverse-Primer und für den pSUMO3-Vektor die SUMO-PFLG-1-F- bzw. SUMO-PFLG-2-F- und T7-Term-short-Primer verwendet (2.3). Ohne „Insert“ würde ein kürzeres Fragment amplifiziert, während mit aufgenommenem „Insert“ ein um dessen Länge größeres Fragment amplifiziert wurde.

Für die PCR für den pGEM-T-Vektor wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 2,0 µl Puffer (10x)
- 0,4 µl dNTPs (10 mM)
- 0,5 µl M13-F-Primer (10 µM)
- 0,5 µl M13-R-Primer (10 µM)
- 0,6 µl MgCl₂ (50 mM)
- 14,0 µl H₂O
- 0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) in 1,8 µl H₂O

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C - 10 min	} 30 Zyklen	ausreichend lange, um die Bakterien zu zerstören und die DNA zu denaturieren
95 °C - 45 s		
50 °C - 30 s		
72 °C - 50 s		
72 °C - 5 min		
4 °C - ∞		

Für die PCR für den pSUMO3-Vektor wurde ein Reaktionsansatz verwendet, der dem für den pGEM-T-Vektor entsprach, mit Ausnahme der hier verwendeten SUMO-PFLG-1-F bzw. SUMO-PFLG-2-F- und T7-Term-short-Primer.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C - 10 min	} 30 Zyklen	ausreichend lange, um die Bakterien zu zerstören und die DNA zu denaturieren
95 °C - 1 min		
55 °C - 30 s		
72 °C - 2 min		
72 °C - 3 min		
4 °C - ∞		

2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe. Durch Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffs (Ethidiumbromid), der in doppelsträngiger DNA interkaliert, lassen sich dann unter UV-Durchleuchtung die verschiedenen DNA-Fragmente detektieren.

Verwendet wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur präparativen Gewinnung von mittels PCR erzeugten DNA-Fragmenten und zur Analyse von PCR-Produkten, Gel-Extrakten, Plasmidpräparationen und Restriktionshydrolysen in 0,8-1,5 %igen horizontalen Agarose-Gelen.

Zur Herstellung der Gele wurden 0,8 bis 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben und die Lösung dann in eine horizontale Laufkammer (Horizon 11-14; Life

Technologies, Karlsruhe) mit Probenkamm gefüllt. Nach Aushärten des Gels, Entfernung des Probenkamms und Auffüllen der Laufkammer mit 1x TAE-Puffer wurden die Taschen mit den PCR-Produkten, die zuvor mit dem 6x Ladepuffer LVI versetzt wurden, befüllt. Als Größenstandard für die spätere Zuordnung der detektierten Banden dienten je nach erwarteten Fragmentgrößen entweder der 100 bp-DNA-Größenstandard, der 1 kb DNA-Größenstandard oder der Smart-DNA-Größenstandard. Nach Auftrennung der Proben wurden die Banden durch Fluoreszenz mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei 266 nm sichtbar gemacht, photographisch dokumentiert und gegebenenfalls mit einem sterilen Einmalskalpell ausgeschnitten.

2.11.3 Gel-Extraktion

Für sich anschließende Ligationen oder eine weitere PCR („Nested-PCR“) erfolgte eine Aufreinigung von aus PCR oder Restriktionshydrolysen gewonnenen DNA-Fragmenten mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese. Nach elektrophoretischer Auftrennung, Detektierung und Ausschneiden der Banden unter UV-Licht erfolgte die Elution der DNA aus den Gelstücken mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers. Lediglich die Elution erfolgte mit 20 µl H₂O anstelle des laut Hersteller empfohlenen 5-10 mM Tris.

Zur Kontrolle und zur Abschätzung des DNA-Gehalts durch Vergleich der Bandenintensitäten von DNA-Fragmenten mit Banden des 1 kb-DNA-Größenstandards wurde mit 2 µl der gewonnenen Proben eine weitere Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.11.4 Ligation

Die Ligation dient dazu, amplifizierte DNA-Sequenzen in Vektoren einzuschleusen, damit diese dann geschlossenen Vektoren anschließend in Bakterienstämme transformiert werden können.

Als Vektoren wurden der Klonierungsvektor pGEM-T und der Expressionsvektor pSUMO3 verwendet. Das zu ligierende DNA-Fragment wurde im achtfachen molekularen Überschuss eingesetzt. Folgende 10 µl-Ligationsansätze wurden verwendet:

Ligationsansatz für den pGEM-T-Vektor:

- 5,0 µl 2x Ligation Buffer
- 0,5 µl pGEM-T-Vektor (50 ng/µl)
- 0,7 µl T4 DNA Ligase (1 U/ µl)
- 3,8 µl PCR-Produkt

Ligationsansatz für den pSUMO3-Vektor:

- 2 µl 5x T4 DNA Ligase Puffer
- 1,0 µl pSUMO3-Vektor (25 ng/ µl)
- 0,7 µl T4 DNA Ligase (1 U/ µl)
- 6,3 µl PCR-Produkt

Die Ligation erfolgte jeweils für 8 Stunden bei 16 °C.

Da die Banden bei der vorangegangenen Gel-Extraktion auf sehr geringe „Insertmengen“ hindeuteten, wurde jeweils die maximal mögliche Menge an PCR-Produkt verwendet.

2.11.5 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Für die Transformation erforderliche CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen wurden freundlicherweise aus vorhandenen Laborbeständen zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll im „T-Cloning Kit Manual“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). 50 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.11.6 Transformation

Zur Übertragung von rekombinanter DNA in Bakterienzellen wurde die CaCl₂-Transformation, modifiziert nach Tang und Mitarbeitern (Tang et al., 1994), eingesetzt: 15 µl Ligationsansatz (1:10) oder 2 µl Plasmid-DNA wurden mit 50 µl kompetenten *E. coli* (TOP10F' bzw. BL21(DE3)pLysS) durch vorsichtiges Umrühren vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, woran sich eine Hitzeschockbehandlung bei exakt 42 °C für 30 Sekunden anschloss. Wieder auf Eis gelagert, wurde dem Ansatz 250 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugefügt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C und 700 Upm. Daraufhin wurde der Transformationsansatz auf vorgewärmten Agarplatten (Tab. 2.2), die zuvor mit den für die jeweiligen Bakterienstämme und Vektoren selektiven Antibiotika (Tab. 2.1, Tab. 2.2) und für den Fall einer Blau-Weiß-Selektion (bei

Verwendung des pGEM-T-Vektors) zusätzlich mit 200 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) und 130 µl TSB plus 20 µl X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) versetzt wurden, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Erfolgreiches Ligieren eines „Inserts“ in den pGEM-T-Vektor unterbricht die kodierende Sequenz der β-Galactosidase, wodurch das Enzym nicht mehr exprimiert wird und somit keine Spaltung des zuvor zugegebenen X-Gals (s.o.) in Galactose und 5-Brom-4-chlorindoxyl erfolgt, so dass in diesem Fall kein blauer Farbstoff entsteht und die Kolonie weiß erscheint. Mittels „Colony-check-PCR“ (2.11.1.3) wurden ausgewählte Klone (bei Anwendung der Blau-Weiß-Selektion also weiße Klone) auf das ligierte „Insert“ hin überprüft und die Plasmide mit Hilfe des „NucleoSpin® Plasmid Quick Pure“-Kits isoliert (2.11.7).

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

<i>E. coli</i> -Stamm	Antibiotika-Resistenz	Endkonzentration (µg/ ml)
TOP 10 F'	-	-
BL21(DE3)pLysS	Chloramphenicol	34 µg/ml

Tab. 2.2: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten Vektoren und eingesetzte Agarplatten

Vektor	Antibiotika-Resistenz (µg/ml)	Verwendete Agarplatten
pGEM-T	Ampicillin (100 µg/ml)	TSB-Agarplatten
pSUMO3	Kanamycin (50 µg/ml)	LB-Agarplatten

2.11.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA zur weiteren Verwendung für Sequenzierungen (2.11.8), Restriktionshydrolysen (2.11.9) und weitere Transformationen (2.11.6) aus den Bakterien zu isolieren, wurde das „NucleoSpin® Plasmid QuickPure“-Kit verwendet. Das Prinzip basiert auf einer Kombination aus alkalischer Lyse von Bakterienzellen, Bindung von DNA mittels Anionenaustausch-Chromatographie an eine Silica-Membran und nachfolgender Elution. Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Plasmid DNA Purification, User manual NucleoSpin® Plasmid QuickPure, March 2005/Rev. 02) und das erhaltene Eluat wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.10.2) überprüft.

2.11.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA (2.11.7) wurde von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen) mittels „HotShot“-Sequenzierung, einem Verfahren, das sich der Fluoreszenz-Farbstoff-basierten Sequenzierung bedient, durchgeführt, wobei je 5 µl Plasmid und 2 µl T7-Term-short-Primer (bereits gemischt) eingeschickt wurden.

2.11.9 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau wurde verwendet, um die ligierten PCR-Fragmente aus dem pGEM-T-Klonierungsvektor herauszuschneiden und für eine nachfolgende Ligation in den pSUMO3-Expressionsvektor benutzen zu können. Da die SUMO3-PFLG-1- und -PFLG-2-Primer mit einer *Bsal*- und einer *Bam*HI-Schnittstelle ausgestattet wurden, konnten die jeweiligen „Inserts“ spezifisch mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bsal* und *Bam*HI aus dem Vektor geschnitten werden.

Folgendes Versuchsprotokoll wurde für einen 50 µl Ansatz verwendet:

-5,0 µl 10x NE Puffer 2
-7,0 µl pGEM-T-Vektor mit „Insert“
-38,0 µl H₂O

+ 2,5 µl *Bsal* (10 U/µl)
- 3 Stunden bei 50 °C inkubieren

+ 1,5 µl *Bam*HI (40 U/µl)
- 4 Stunden bei 37 °C inkubieren

Nach erfolgter Restriktionshydrolyse wurden die Proben über eine Agarose-Gelelektrophorese (2.11.2) aufgetrennt, die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktion (2.11.3) in 20 µl H₂O eluiert, um dann in den pSUMO3-Expressionsvektor ligiert (2.11.4) zu werden.

2.12 Rekombinante Expression von PFLG-1 und PFLG-2 in *E. coli*

2.12.1 Struktur des Expressionsvektors

Für die Expression von PFLG-1 und PFLG-2 in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen wurde der pSUMO3-Vektor verwendet. Dieser 5610 bp große Vektor ermöglicht es, ein rekombinantes Fusionsprotein zu exprimieren, welches N-terminal eine Hexa-His-Tag-Sequenz enthält, die für die Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Nickel-Affinitätsäule (2.13.2) genutzt werden kann. Der N-terminale Histidin-/Human SUMO3-Fusionsabschnitt des aufgereinigten Proteins kann dann mit Hilfe der SUMO Protease 2 abgespalten werden, so dass das jeweilige Zielprotein (PFLG-1 bzw. PFLG-2) freigesetzt wird. Die Gensequenzen für die SUMO3-Fusionsproteine stehen unter Kontrolle des T7-Promotors, was die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase, deren Expression durch IPTG induzierbar ist, ermöglicht. Für die Erzeugung der in den Expressionsvektor zu klonierenden Fragmente wurden die SUMO3-PFLG-1- bzw. SUMO3-PFLG-2-Primer (2.3) verwendet, die den für das Protein kodierenden Genabschnitt amplifizieren und zusätzlich eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme *Bsa*I und *Bam*HI sowie die zum Überhang des Vektors am 5'-Ende (TCCA) komplementäre Sequenz (AGGT) besitzen, die nötig ist, um das jeweilige Fragment in den Vektor zu ligieren. Zur Selektion bei der Kultivierung der Bakterien enthält der pSUMO3-Vektor ein Gen für eine Kanamycin-Resistenz.

2.12.2 Durchführung der Expression

Die Expression von PFLG-1 und PFLG-2 erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)pLysS, einem Zellstamm, der unter Kontrolle des lacUV5-Promotors das Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzt, die nach Induktion mit IPTG die klonierten Gene, welche im pSUMO3-Vektor unter Kontrolle des T7-Promotors stehen, transkribiert.

2.12.2.1 Übernachtskulturen

Es wurden 3 ml Kanamycin- (50 µg/ml) und Chloramphenicol- (34 µg/ml) haltiges LB-Medium mit einer aus der Transformation (2.11.6) erhaltenen Einzelkolonie angeimpft und über Nacht schüttelnd (250 Upm) bei 37 °C inkubiert.

2.12.2.2 Bestimmung der Bakteriendichte

Um die Bakteriendichte in den angeimpften Nährmedien zu bestimmen, wurde die optische Dichte (OD) mit einem Photometer bei 600 nm (OD_{600}) gemessen, wobei das für die Anzucht verwendete LB-Kulturmedium als Referenz diente. Für die Messung der OD_{600} wurden jeweils 100 µl Kultur mit 900 µl Medium verdünnt.

2.12.2.3 Induktion und Zellkultivierung

Es wurden je 250 ml Kanamycin-, Chloramphenicol- und Glucose-haltiges LB-Medium in 1000 ml Erlenmeyerkolben durch Animpfen mit der Übernachtskultur auf eine Ziel- OD_{600} von 0,02 inokuliert und schüttelnd (250 Upm) bei 37 °C unter regelmäßiger Bestimmung der OD_{600} inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,6 wurden zunächst zur Herstellung von Dauerkulturen 500 µl der Kultur mit 180 µl Glycerin (87 %) gemischt und bei -80 °C gelagert. Daraufhin wurde die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von 250 µl 1M IPTG induziert und für weitere drei Stunden inkubiert.

Unmittelbar vor und 3 h nach Induktion wurde je eine Probe der Bakterienkultur entnommen (90/ gemessene OD_{600} ergab die erforderliche Probenmenge in µl). Die Proben wurden zentrifugiert (10000 x g, 5 min) und die Pellets bei -20 °C bis zur Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.14.3) aufbewahrt.

Die Expressionskulturen wurden nach erfolgter Inkubation zentrifugiert (5000 x g, 5 min, 4 °C), die abzentrifugierten Bakterienzellen nach Zugabe von 2,5 ml 1x LEW-Puffer durch Vortexen resuspendiert und dann bis zur Aufreinigung von PFLG-1/ PFLG-2 (2.13.1) bei -80 °C gelagert.

2.12.3 Proteolyse der exprimierten Fusionsproteine

Da die exprimierten Proteine im pSUMO3-System als Fusionsprotein mit angehängtem Histidin-SUMO-Teil vorlagen, musste der Fusionsteil jeweils mit SUMO Protease 2, die den Fusionsteil mittels Tertiärstruktur erkennt, abgespalten werden. Für die Proteolyse wurden mittels C8-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigte und anschließend lyophilisierte Proteine verwendet.

Für die Proteolyse wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 100 µg Fusionsprotein
- 500 µl 1x PBS
- 2,5 µl 1M DTT
- 10 U SUMO Protease 2

Um eine möglichst vollständige Hydrolyse zu erzielen, wurden die Ansätze für sieben Tage bei 27 °C und 300 Upm inkubiert und mit Aluminiumfolie abgedeckt.

2.13 Chromatographische Aufreinigung von Proteinen

2.13.1 Aufreinigung von rekombinantem PFLG-1 und PFLG-2

Um die aus der Expression (2.12.2) gewonnenen Bakterienzellen zu lysieren, erfolgten drei Zyklen („Freeze-Thaw-Cycles“), bestehend aus je 10 min Gefrieren bei -80 °C und 10 min Inkubation im Wasserbad bei ca. 37 °C, und eine Ultraschallbehandlung aus sieben Zyklen (je 30 s Ultraschall und 15 s Pause) auf Eis. Daraufhin wurde das Zelllysate zentrifugiert (45 min, 4 °C, 12000 x g), der das Fusionsprotein enthaltende Überstand sterilfiltriert (Filtropur, Porengröße: 0,45 µm; Sarstedt, Nümbrecht) und auf eine Nickel-Affinitätssäule (2.13.2) aufgetragen. Das von der Säule eluierte Material wurde durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 eingestellt und für eine weitere Aufreinigung über eine C8-Umkehrphasen-HPLC (2.13.3) verwendet. Die mittels C8-Umkehrphasen-HPLC fraktionierten Proben wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie (2.14.2) auf Vorhandensein der rekombinanten Fusionsproteine untersucht und positive Fraktionen anschließend lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden in 500 µl 1x PBS aufgenommen und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.14.1) durch weitere Zugabe von 1x PBS auf eine Konzentration von ca. 1 µg/µl eingestellt. Nachfolgend wurden die Fusionsproteine durch Proteolyse (2.12.3) in die jeweiligen rekombinant exprimierten

Proteine PFLG-1 bzw. PFLG-2 und den „Fusionstag“ (Human SUMO3 Fusion Tag) gespalten und danach zur weiteren Aufreinigung über C4-Umkehrphasen-HPLC (2.13.4) mit TFA auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 eingestellt. Die von der C4-Säule eluierten Fraktionen wurden durch erneute massenspektrometrische Analyse (2.14.2) auf die rekombinanten Proteine PFLG-1 und PFLG-2 hin überprüft und nach erfolgtem Lyophilisieren und Resuspendieren in H₂O einem letzten Reinigungsschritt mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC (2.13.5) unterzogen, der auch gleichzeitig zur Bestimmung der Proteinmenge diente. Eine abschließende massenspektrometrische Untersuchung und ein sich anschließendes Eintrocknen der gereinigten Proteine im Lyophilisator dienten als Vorbereitung der Proben für die folgende Untersuchung auf ihre antimikrobielle Aktivität (2.15).

2.13.2 Nickel-Affinitätssäule

Die Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine mittels einer Nickel-Affinitätssäule erfolgte mit „Protino[®] Ni-TED packed columns“ nach dem Protokoll des Herstellers (Macherey-Nagel, User Manual Protino[®] Ni-TED packed columns, April 2006/ Rev. 03). Über die im Fusionsprotein vorhandene Polyhistidin-Sequenz erfolgte eine Interaktion mit den an die Säulenmatrix gebundenen Metallionen, wohingegen sich die übrigen *E. coli*-Proteine aufgrund fehlender Interaktion im Durchfluss befanden. Abschließend wurden die rekombinanten Fusionsproteine mit 4 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Als Vorbereitung für die weitere Aufreinigung mittels C8-Umkehrphasen-HPLC (2.13.3) wurden die eluierten Proteine durch Zugabe konzentrierter bzw. 5 %iger TFA auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 eingestellt, zentrifugiert (5000 x g, 5 min) und sterilfiltriert.

2.13.3 C8-Umkehrphasen-HPLC

Das von der Nickel-Affinitätssäule (2.13.2) eluierte Material wurde mit Hilfe einer Nucleosil 300-7 C8-HPLC-Säule (Macherey-Nagel) weiter aufgereinigt. Bei einer Durchflussrate von 3 ml/min wurde für die Elution ein Gradient von einem polaren Puffer A (0,1 % TFA in H₂O) zu einem unpolaren Puffer B (0,1 % TFA in Acetonitril) verwendet. Nach Äquilibrieren der Säule mit 10 % Puffer B begann die Aufreinigung mit 10 % Puffer B für 5 min, gefolgt von einem linearen 25 min Gradienten bis zu 60 % Puffer B und einem linearen 5 min Gradienten

bis zu 100 % Puffer B. Abschließend wurde für weitere 5 min mit 100 % Puffer B gespült. Die manuelle Fraktionierung der eluierten Proteine erfolgte unter Detektion der UV-Absorption bei 215 nm.

2.13.4 C4-Umkehrphasen-HPLC

Um die rekombinant exprimierten Proteine PFLG-1 und PFLG-2 nach deren proteolytischer Abspaltung vom „Fusionstag“ weiter aufzureinigen, wurde eine Bakerbond Jupiter 5U C4 300A- Säule (250 x 4,6 mm; Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Die Elution erfolgte bei einer Durchflussrate von 0,5 ml/min mittels eines Gradienten unter Verwendung der Puffer A und B (siehe C8-Umkehrphasen-HPLC, 2.13.3). Nachdem die Säule zunächst für 10 min bei 10 % Puffer B äquilibriert wurde, folgten ein linearer 10 min Gradient bis 40 % Puffer B, ein linearer 20 min Gradient bis 70 % Puffer B und abschließend ein linearer 10 min Gradient bis 100 % Puffer B, mit dem für weitere 5 min gespült wurde. Die Fraktionierung der Proben erfolgte wiederum per Hand unter Detektion der UV-Absorption bei 215 nm.

2.13.5 C2/C18-Umkehrphasen-HPLC

Um einerseits eine letzte Reinigung der rekombinanten Proteine zu erzielen und andererseits verlässlich die Proteinmenge für den weiteren Einsatz der Proben in antimikrobiellen Tests (2.15) bestimmen zu können, erfolgte eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC mit einer „SMART™System“ -Anlage (Pharmacia, Freiburg), wobei eine μ RPC C2/C18 SC 2.1/ 10-Trennsäule verwendet wurde. Für die Elution wurde ein Gradient von Puffer A (0,1 % TFA in H₂O) zu Puffer B (0,1 % TFA in 80 % Acetonitril) bei einer Durchflussrate von 100 μ l/min eingesetzt. Nach Äquilibrieren der Säule mit 100 % Puffer A folgten ein linearer Gradient bis 25 % Puffer B innerhalb von 10 min, ein linearer Gradient bis 70 % Puffer B für 30 min und abschließend ein 10 min Gradient bis zu 100 % Puffer B. Die Fraktionierung der eluierten Proteine erfolgte manuell durch Registrierung der UV-Absorption bei 215 nm. Durch Ermitteln der Fläche (Area [min * mAU]) der einzelnen Peaks konnte mittels Dreisatz-Rechnung die Proteinmenge errechnet werden (550 min * mAU \cong 10 μ g Protein).

2.14 Proteinanalytik

2.14.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um einerseits zu gewährleisten, dass die HPLC-Säulen nicht mit zu viel Protein beladen würden, um deren Bindungskapazität nicht zu überschreiten, und andererseits die nötige Proteinmenge für die sich an die C8-Umkehrphasen-HPLC anschließende Proteolyse zu ermitteln, wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung mit einem Einstrahlphotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Absorption der Proteinlösung wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}) in UV-Einmal-Kunststoffküvetten (UVette[®], Eppendorf, Hamburg) mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet ($E = c \times d \times \epsilon$; E = gemessene Extinktion, c = molare Konzentration [M], d = Schichtdicke der Küvette [cm], ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]). Bei Proteinen ist der molare Extinktionskoeffizient unter anderem abhängig von der Anzahl der vorhandenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie der Ausbildung von Disulfid-Brücken. Da sowohl die Sequenzen der rekombinant exprimierten PFLG-Proteinfragmente als auch der Fusionsproteine des SUMO-Systems bekannt waren, wurden mit Hilfe des Analyseprogramms "ProtParam" auf der Internetseite des „ExpPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Servers" (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) die jeweiligen Extinktionskoeffizienten berechnet.

Aufgrund der Tatsache, dass sich in den PFLG-1- und PFLG-2-Fusionsproteinen nur wenige aromatische Aminosäuren, in PFLG-1 gar keine und in PFLG-2 nur ein Tyrosin befanden, konnte mit der beschriebenen Vorgehensweise lediglich eine grobe Abschätzung der Proteinkonzentration vorgenommen werden, z. B. für die C8-Umkehrphasen-HPLC (2.13.3). Eine genauere Bestimmung war für den Einsatz einer definierten Menge PFLG-1 bzw. PFLG-2 bei den antimikrobiellen Tests (2.15) notwendig. Aus diesem Grund wurde hier die Konzentrationsberechnung mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC (2.13.5) vorgenommen.

2.14.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Standardverfahren zur exakten Massenbestimmung von Proteinen und beruht auf der Bestimmung freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der die Proteine ionisiert werden,

einem Massenanalysator, in welchem die Ionen nach ihrem Masse/Ladung-Verhältnis getrennt werden, und einem Detektor, der die Signale zur Übersetzung in das gesuchte Massenspektrum liefert.

Die Massenbestimmung der pSUMO3-PFLG-1- und pSUMO3-PFLG-2-Fusionsproteine, des pSUMO3-„Fusionstags“ und der rekombinanten PFLG-1- bzw. PFLG-2-Proteine erfolgte mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierungs- (ESI) Massenspektrometrie an einem Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid-Massenspektrometer (QTOF II) im Positiv-Ionen-Modus. Rohdaten kombinierter Spektren wurden Hintergrund-korrigiert und Durchschnittsproteinmassen durch Maximum Entropy 1 („MaxEnt1“) Dekonvolution mit der „MassLynx-Software“ (Micromass) generiert und mit den mit Hilfe des „ProtParam tool“, das über die Homepage des „ExpASY Proteomic Server“ (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) zugänglich ist, ermittelten Massendaten verglichen.

2.14.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Induktionskontrolle während der Expression (2.12.2.3) sowie der Kontrolle der Reinheit und Größe der rekombinant exprimierten Proteine im Anschluss der mittels HPLC (2.13.3, 2.13.4, 2.13.5) erfolgten Aufreinigung.

Es wurde das „XCell sure lock Mini-Cell“-Gelsystem verwendet und der Versuch nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1fachen MES-SDS-Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer durchgeführt. Als molekularer Größenstandard diente der SeeBluePlus 2-Größenstandard. Die Proteinbanden wurden durch eine zweistündige Inkubation des Gels in Coomassie-Färbelösung und anschließender vollständiger Entfärbung des Hintergrundes sichtbar gemacht.

2.15 Antimikrobielle Testverfahren

Die rekombinant exprimierten Proteine PFLG-1 und PFLG-2 wurden hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität gegen den grampositiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die gramnegativen *Escherichia coli* ATCC 11303 und *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 10145 sowie gegen die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433 mittels radialem Plattendiffusionstest (2.15.1) getestet.

Dieser Test wurde freundlicherweise im Institut für Infektionsmedizin am UK-SH, Campus Kiel durchgeführt.

2.15.1 Radialer Plattendiffusionstest

Bei diesem antimikrobiellen Test wurden die verschiedenen Mikroorganismen (Tabelle 2.3) in 8 ml TSB eingepflegt und über Nacht bei 37 °C mit 120 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden stammabhängig verschiedene Volumina (Tabelle 2.3) in 8 ml TSB gegeben und abhängig vom jeweiligen Mikroorganismus unterschiedlich kultiviert. Nach erfolgter Inkubation wurden 10 ml Underlay-Agarose (1 % Agarose, 0,02 % Tween20, 1 % TSB-Medium, 10 mM Natriumphosphatpuffer) mit stammabhängigem Volumen (Tabelle 2.3) der Mikroorganismensuspension gemischt. Nach erfolgter Aushärtung in Petrischalen wurden mit einer Hautstanze (Ø 3 mm) Löcher in die Underlay-Agarose gestanzt und in die Stanzlöcher je 5 µl der in 0,01 % Essigsäure gelösten PFLG-1- und PFLG-2-Testlösung in unterschiedlichen Verdünnungen (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) gegeben. Dann wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente humanes Lysozym (100 ng/µl), als Negativkontrolle 0,01 % Essigsäure. Nach erfolgter Kultivierung wurde mit 10 ml Overlay-Agarose (1 % Agarose, 3,4 % Caseinpepton, 0,6 % Sojamehlpepton, 0,5 % D+-Glukose-Monohydrat, 1 % NaCl, 0,5 % Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,2-7,4) überschichtet und für weitere 3-4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die Hemmhöfe ausgemessen.

Tab. 2.3: Kultivierung der verschiedenen Mikroorganismen im radialen Plattendiffusionstest

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

Wenn die Proteine bei mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen antimikrobielle Aktivität zeigen, lässt sich diese als minimale effektive Konzentration (MEK) berechnen

(nach Steinberg und Lehrer, 1997). Sind die Proteine nur in der 1:1 Verdünnung (1 µg/µl) antimikrobiell wirksam, so wird in der Auswertung jeweils die Größe des Hemmhofes angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Expression von PFLG-1 und PFLG-2 im pSUMO3-System

Profilaggrin ist das dominierende „S100-Fused-Type-Protein“ der Haut. Da für andere „S100-Fused-Type-Proteine“ wie z. B. Hornerin und Ifapsoriasis in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, dass Fragmente dieser Proteine antimikrobielle Aktivität aufweisen, und aufgrund der Tatsache, dass bei HPLC-Analysen von antimikrobiell aktiven Fraktionen aus *Stratum corneum*-Extrakten Polypeptide entdeckt wurden, die der N-terminalen Region von Profilaggrin zugeordnet werden konnten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die beiden N-terminal lokalisierten Profilaggrin-Fragmente FLG₈₇₋₁₂₂ (PFLG-1) und FLG₁₂₃₋₂₀₀ (PFLG-2) rekombinant exprimiert, aufgereinigt und hinsichtlich möglicher antimikrobieller Eigenschaften untersucht werden.

3.1.1 Amplifizierung der PFLG-1- und PFLG-2-Gensequenzen mittels PCR

Zur Herstellung der PFLG-1- und PFLG-2-Gensequenzen wurde zunächst mit den genspezifischen Primern PFLG-157-bp-F und 714-bp-R ein DNA-Fragment amplifiziert, das im weiteren Verlauf in einer „Nested-PCR“ als Matritze für die Generierung der PFLG-1 und PFLG-2-Sequenzen eingesetzt wurde. Das in dieser ersten PCR-Analyse generierte ca. 550-570 bp große Produkt entsprach der Länge des zu erwartenden Fragmentes (558 bp). Mit einer „Annealing-Temperatur“ von 61 °C und unter Verwendung von 0,5 µl cDNA aus differenzierten kultivierten humanen primären neonatalen Keratinozyten ließ sich nach elektrophoretischer Auftrennung im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel die intensivste Bande erzielen. Höhere „Annealing-Temperaturen“ (66 °C) bzw. Einsatz größerer oder geringerer Mengen an cDNA (1,5 µl; 0,05 µl) erbrachten keine sichtbaren Amplifikate. Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese ist in Abb. 3.1 dargestellt.

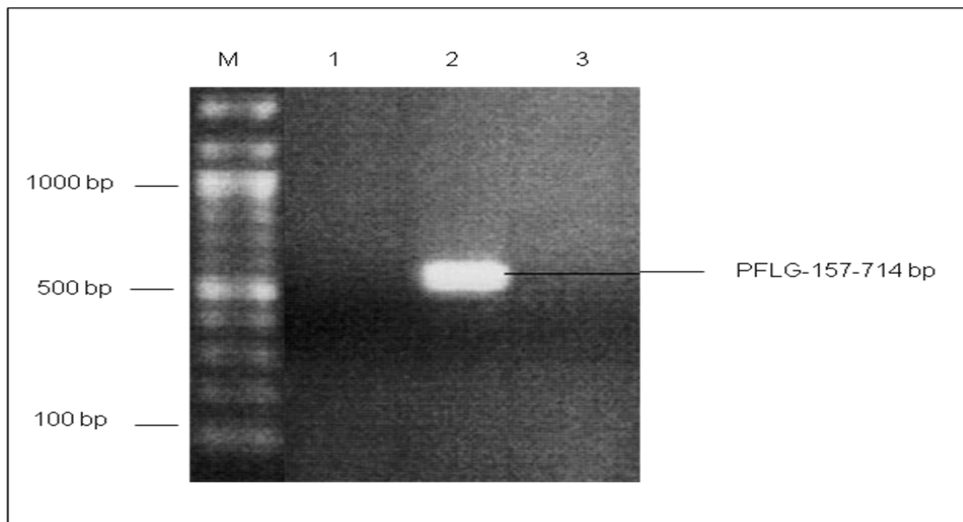


Abb. 3.1: Ethidiumbromid-gefärbte Agarose-Gelelektrophorese der mittels PCR amplifizierten PFLG-157-714-bp-cDNA-Fragmente. M: 100 bp -DNA-Größenstandard; 1: 0,5 µl cDNA (1:10); 2: 0,5 µl cDNA, intensive Bande für PFLG-157-714-bp (558 bp); 3: Negativkontrolle mit Einsatz von H₂O statt cDNA.

Nach einer präparativen Gel-Extraktion des in der ersten PCR erzeugten, als Matrize dienenden DNA-Fragmentes wurde zur Generierung der PFLG-1- und PFLG-2-Sequenzen eine „Nested-PCR“ mit den sequenzspezifischen PFLG-1- und PFLG-2-Primern durchgeführt. Die in dieser PCR generierten 134 bp (PFLG-1) und 260 bp (PFLG-2) großen Produkte entsprachen der Länge der zu erwartenden Fragmente. Mit einer „Annealing-Temperatur“ von 53 °C ließen sich die intensivsten Banden erzielen. In einem abschließenden Schritt wurde mit *Taq*-Polymerase inkubiert, um 3'-A-Überhänge, die zur Ligation in den pGEM-T-Vektor nötig sind, zu generieren. Die gelelektrophoretische Auftrennung der erzeugten PCR-Produkte ist in Abb. 3.2 gezeigt.

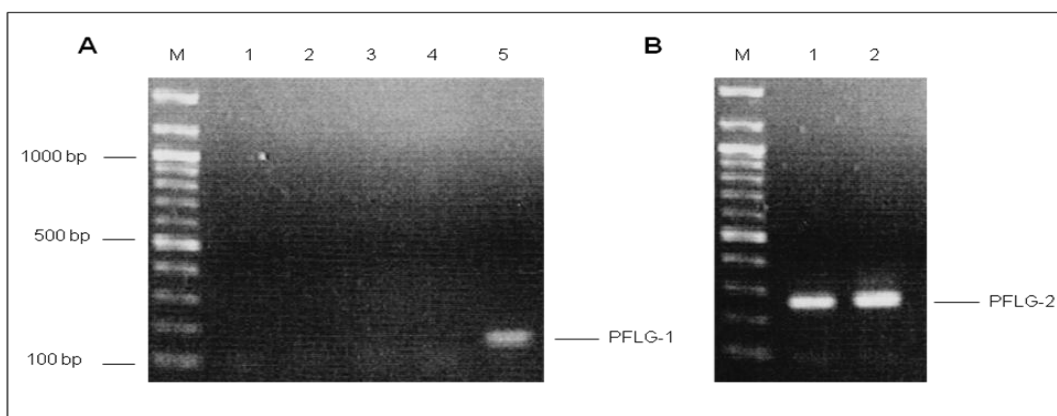


Abb. 3.2: Ethidiumbromid-gefärbte Agarose-Gelelektrophorese der mittels „Nested-PCR“ amplifizierten PFLG-1- und PFLG-2-Fragmente. M: 100 bp-DNA-Größenstandard; A: Amplifikate

des PFLG-1-Fragments. Es wurden verschiedene Volumina des Gelextraktes der vorangegangenen PCR sowie unterschiedliche "Annealing"-Temperaturen getestet. 1: 1 µl DNA (58 °C), 2: 5 µl DNA (58 °C), 3: Negativkontrolle mit Einsatz von H₂O statt DNA, 4: 1 µl DNA (53 °C), 5: 5 µl DNA (53 °C), intensive Bande für PFLG-1 (134 bp); B: Amplifikate des PFLG-2-Fragments. 1: 1 µl DNA (53 °C), intensive Bande für PFLG-2 (260 bp), 2: 5 µl DNA (53 °C), intensive Bande für PFLG-2 (260 bp).

3.1.2 Klonierung im pGEM-T-Vektorsystem

Die PFLG-1- und PFLG-2-Sequenzen wurden vor der eigentlichen Expression im pSUMO3-Vektorsystem zunächst zur weiteren Amplifikation in den pGEM-T-Vektor ligiert (2.11.4) und in *E. coli* TOP 10 F[']- Zellen transformiert (2.11.6). Nach Übernachtskultivierung auf mit Carbenicillin (100 µg/ml), für das der Vektor die entsprechende Resistenz trägt, versetzten TSB-Agarplatten bei 37 °C und nach Zugabe von IPTG und X-Gal für eine Blau-Weiß-Selektion (2.11.6) wurden jeweils sechs weiße Kolonien mittels „Colony-check-PCR“ (2.11.1.3) auf die einklonierten „Inserts“ hin überprüft. Unter Verwendung der M-13-F- und M-13-R-Primer ließ sich mit ligiertem „Insert“ für PFLG-1 eine Fragmentlänge von 394 bp und für PFLG-2 eine Fragmentlänge von 500 bp errechnen. In der im Anschluss an die PCR durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die Bakterien Vektoren mit dem richtigen „Insert“ aufgenommen hatten (Abb. 3.3).

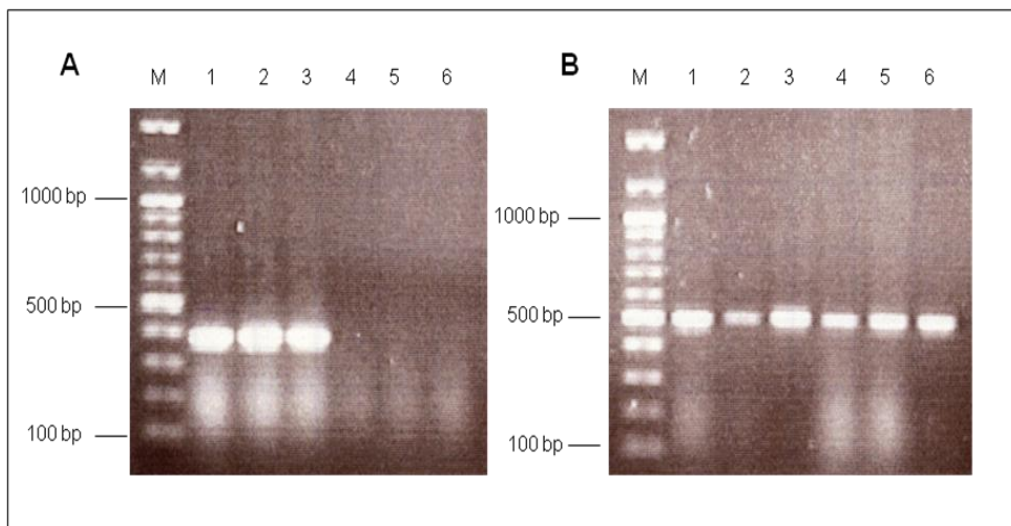


Abb. 3.3: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel einer „Colony-check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation des pGEM-T-Vektors mit inserierten PFLG-1- bzw. PFLG-2- „Inserts“ in *E. coli* TOP 10 F[']-Zellen unter Verwendung der M-13-F- und M-13-R-Primer. Es wurden jeweils sechs Kolonien analysiert. M: 100 bp -DNA-Größenstandard; A: Die Proben 1-3 sind positiv und

zeigen Banden im Bereich von ca. 390 bp; B: Die Proben 1-6 sind positiv und zeigen Banden im Bereich von 500 bp.

Mit jeweils drei positiven Klonen wurden je 3 ml Carbenicillin (100 µg/ ml) haltiges LB-Flüssigmedium angeimpft und bei 37 °C schüttelnd über Nacht kultiviert. Anschließend erfolgten eine Plasmidisolierung (2.11.7; Abb. 3.4) und eine Restriktionshydrolyse (2.11.9) mit den Restriktionsenzymen *Bsal* und *Bam*HI, um die jeweiligen „Inserts“ für die Ligation in den pSUMO3 Expressionsvektor zu erhalten. Durch elektrophoretische Auftrennung ließen sich die PFLG-1- und PFLG-2-Fragmente von den deutlich größeren DNA-Fragmenten des geschnittenen Vektors (ca. 1300 bp) trennen, so dass sie aus dem Gel ausgeschnitten werden konnten. Es zeigten sich Banden für PFLG-1 im Bereich von 120 bp und für PFLG-2 im Bereich von 240-250 bp, was den errechneten Fragmentgrößen entsprach.

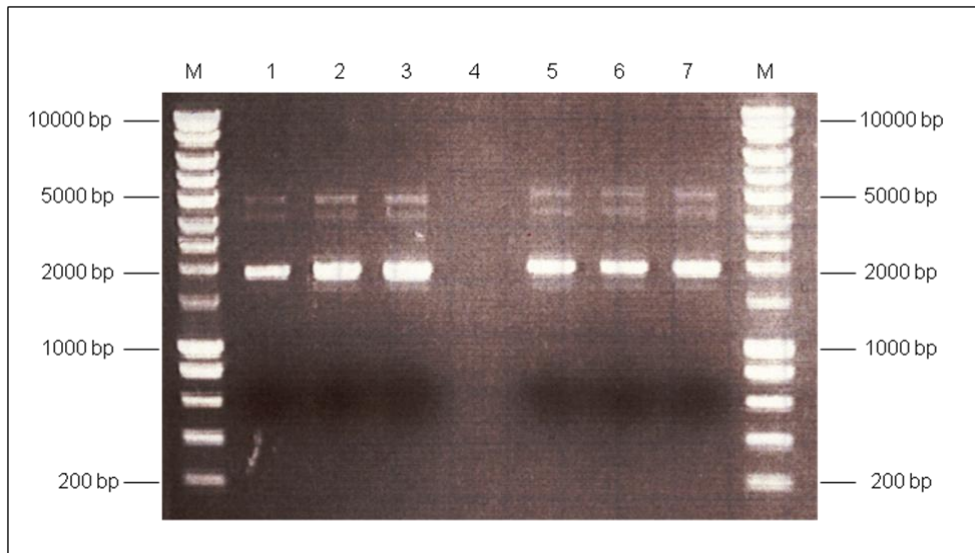


Abb. 3.4: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel zur Überprüfung einer Plasmidisolierung der pGEM-T-Vektoren mit PFLG-1- bzw. PFLG-2-„Insert“. M: Smart-DNA-Größenstandard. 1-3: pGEM-T-Vektoren mit PFLG-1-„Insert“. Die verschiedenen Banden repräsentieren die Plasmide in unterschiedlichen Konformationen. 4: leere Spur. 5-7: pGEM-T-Vektoren mit PFLG-2-„Insert“.

3.1.3 Klonierung im pSUMO3-Vektorsystem

Für die Expression der PFLG-1 und PFLG-2 Proteine wurden die mit Hilfe der oben beschriebenen Klonierung im pGEM-T-Vektor-System amplifizierten PFLG-1 und PFLG-2 DNA-Fragmente zur Generierung passender Überhänge mit entsprechenden

Restriktionsenzymen geschnitten, anschließend in den pSUMO3-Vektor ligiert (2.11.4) und in *E. coli* TOP 10 F[']- Zellen transformiert. Nach Übernacht-Kultivierung auf mit Kanamycin (50 µg/ml), für das der Vektor die entsprechende Resistenz trägt, versetzten LB-Agarplatten bei 37 °C wurden jeweils sechs Kolonien mittels „Colony-check-PCR“ (2.11.1.3) überprüft. Unter Verwendung der PFLG-1-F- bzw. PFLG-2-F- und T7-Term-short-Primer ließ sich mit ligiertem „Insert“ für PFLG-1 eine Fragmentlänge von ca. 260 bp und für PFLG-2 eine Fragmentlänge von ca. 400 bp errechnen. In der im Anschluss an die PCR durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die Bakterien Vektoren mit dem richtigen „Insert“ aufgenommen hatten (Abb. 3.5).

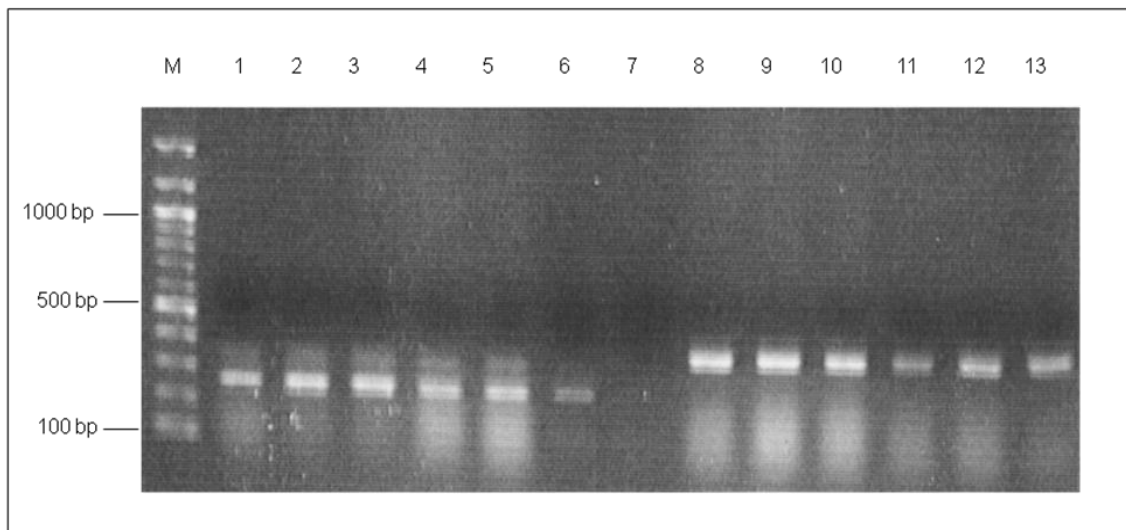


Abb. 3.5: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel einer „Colony-check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit inserierten PFLG-1- bzw. PFLG-2-„Inserts“ in *E. coli* TOP 10 F[']-Zellen unter Verwendung der PFLG-1-F- bzw. PFLG-2-F und T7-Term-short-Primer. Es wurden jeweils sechs Kolonien getestet. M: 100 bp-DNA-Größenstandard; 1-6: Die Proben sind positiv und zeigen Banden im Bereich von ca. 260 bp (PFLG-1); 7: leere Spur; 8-13: Die Proben sind positiv und zeigen Banden im Bereich von ca. 400 bp (PFLG-2).

Mit jeweils sechs positiven Klonen wurden je 3 ml Kanamycin (50 µg/ml) haltiges LB-Flüssigmedium angeimpft und bei 37 °C schüttelnd über Nacht kultiviert. Anschließend erfolgte eine Plasmidisolierung (2.11.7). Im daraufhin durchgeführten Kontrollgel waren verschiedene Konformationsformen der Plasmide sichtbar, so dass sich jeweils Banden bei ca. 4000 bp, 6000 bp und 10000 bp ergaben (Abb. 3.6).

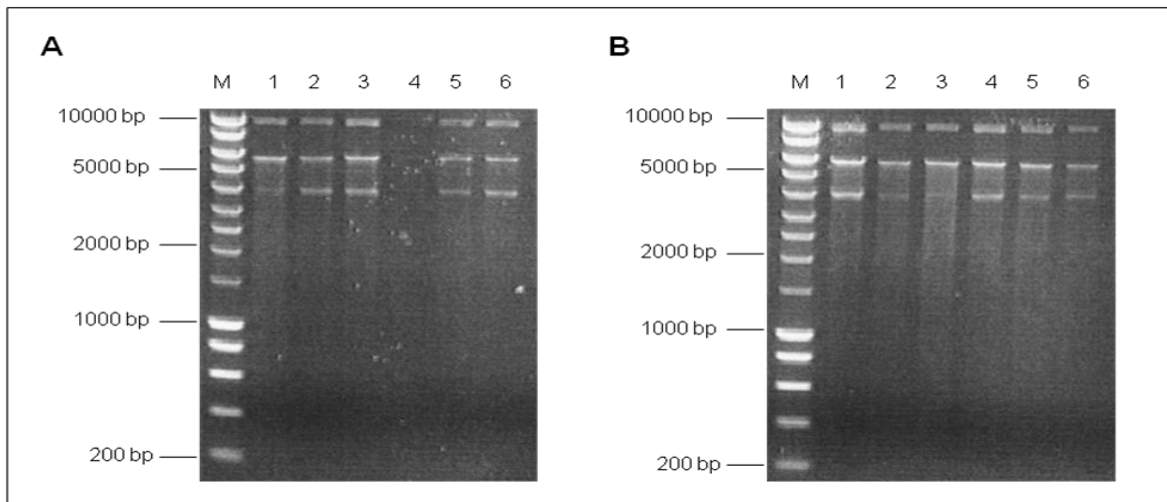


Abb. 3.6: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel zur Überprüfung einer Plasmidisolierung der pSUMO3-Vektoren mit PFLG-1- bzw. PFLG-2- „Insert“ . M: Smart-DNA-Größenstandard. A: pSUMO3-Vektoren mit PFLG-1-„Insert“. Die verschiedenen Banden repräsentieren die Plasmide in unterschiedlichen Konformationen. B: pSUMO3-Vektoren mit PFLG-2-„Insert“.

Zum Überprüfen der Plasmide auf die korrekte Sequenz der „Inserts“ wurden je zwei Plasmide ausgewählt und zum Sequenzieren an die Firma SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen) geschickt, wo eine „HotShot“-Sequenzierung durchgeführt wurde.

Die beiden auf korrekte Basensequenz getesteten Plasmide wurden zur Expression der rekombinanten Proteine PFLG-1 und PFLG-2 in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS, der eine Chloramphenicol-Resistenz enthält, transformiert und bei 37 °C über Nacht schüttelnd inkubiert. Das Transformationsergebnis wurde mit einer „Colony-check-PCR“ bestätigt (Abb. 3.7). Mit jeweils zwei positiven Klonen wurden je 3 ml Kanamycin- (50 µg/ml) und Chloramphenicol- (34 µg/ml) haltiges LB-Flüssigmedium angeimpft und bei 37 °C schüttelnd über Nacht kultiviert. Nach photometrischer Bestimmung der OD₆₀₀ wurden je 250 ml frisches LB-Medium mit Hilfe der Übernacht-Kulturen auf eine Ziel-OD₆₀₀ von 0,02 angeimpft.

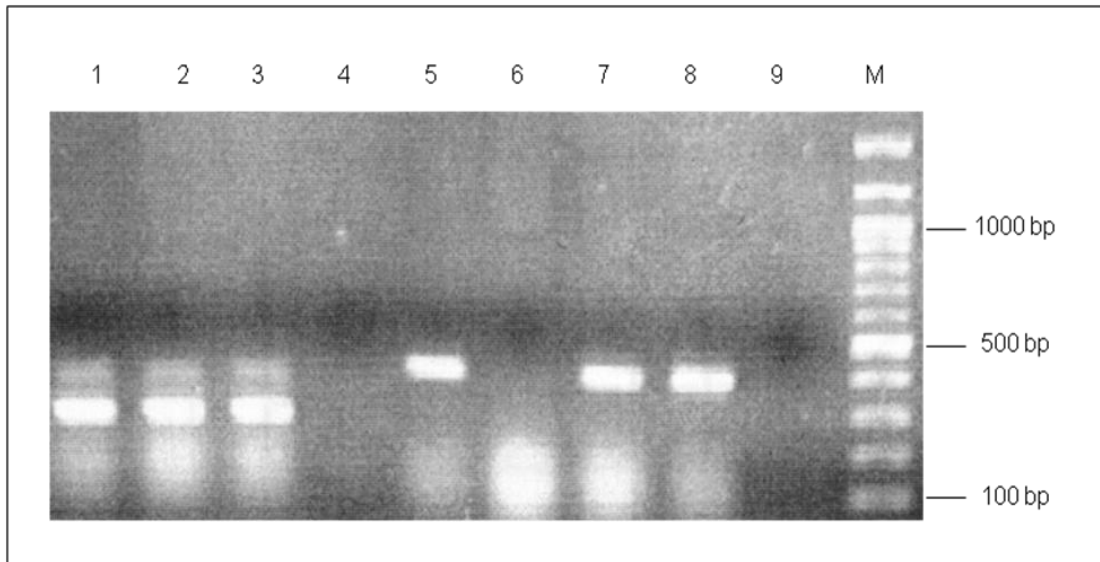


Abb. 3.7: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel einer „Colony-check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit inserierten PFLG-1- bzw. PFLG-2-„Inserts“ in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen unter Verwendung der PFLG-1-F- bzw. PFLG-2-F und T7-Term-short-Primer. M: 100 bp -DNA-Größenstandard. 1-3: Die Proben sind positiv und zeigen Banden im Bereich von ca. 260 bp (PFLG-1). 4: Negativkontrolle unter Verwendung von H₂O. 5, 7, 8: Die Proben sind positiv und zeigen Banden im Bereich von ca. 400 bp (PFLG-2). 6: Die Probe ist negativ. 9: Negativkontrolle unter Verwendung von H₂O.

3.1.4 Expression der PFLG-1- und PFLG-2-Fusionsproteine

Bei einer photometrisch bestimmten OD_{600} von 0,5-0,6 der angeimpften Flüssigkulturen erfolgte die Induktion mit IPTG (1 mM Endkonzentration) zur Proteinexpression der rekombinanten Fusionsproteine in den *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen (2.12). Zur Kontrolle der Induktion, also um zu überprüfen, ob das jeweilige Fusionsprotein exprimiert wurde, wurden unmittelbar vor und 3 Stunden nach der Induktion mit IPTG Proben für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.14.3) entnommen. Die Expressionskulturen wurden nach erfolgter Inkubation zentrifugiert (5000 x g, 5 min, 4 °C), die abzentrifugierten Bakterienzellen in 1x LEW-Puffer resuspendiert und bis zur Aufreinigung der PFLG-1- und PFLG-2-Fusionsproteine bei -80 °C gelagert.

In Abb. 3.8 ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der o.g. Proben der Fusionsproteine vor und nach erfolgter Induktion mit IPTG gezeigt. Die nach der Induktion entnommenen Proben zeigten intensive Banden für die beiden PFLG-1-Fusionsproteine im Bereich von ca. 16000 Da und für die PFLG-2-Fusionsproteine im Bereich von ca. 20.000 Da, die mit den errechneten Massen (15911,5 Da und 20686,8 Da) übereinstimmten.

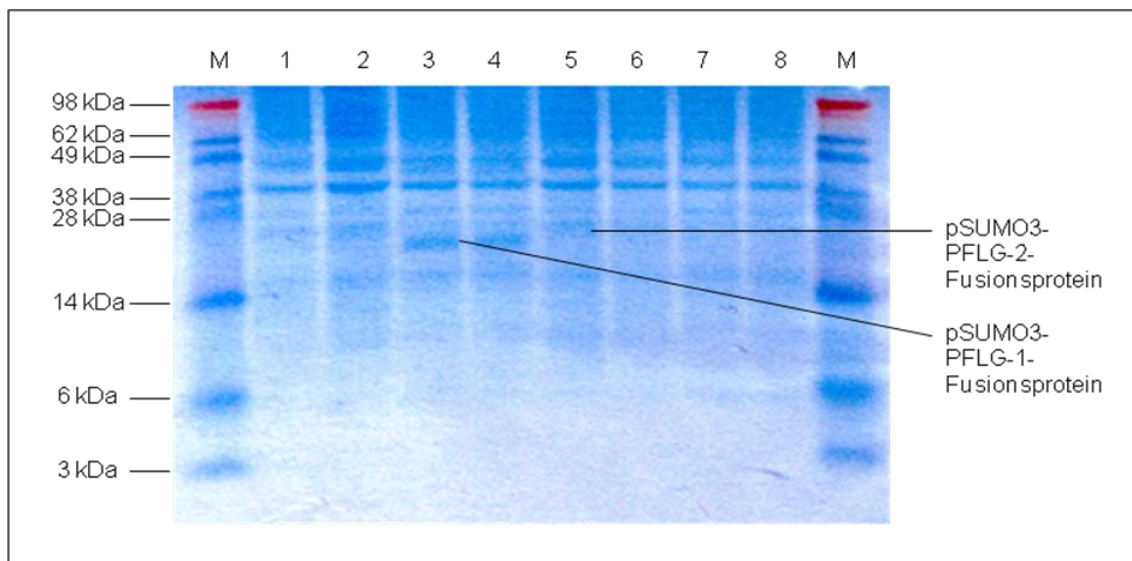


Abb. 3.8: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von Proben der Expressionskulturen von pSUMO3-PFLG-1 und pSUMO3-PFLG-2 in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen unmittelbar vor und 3 h nach Induktion mit IPTG. Es wurde aus zwei verschiedenen Klonen jeweils eine Kultur hergestellt. Im Gel sind die verschiedenen Proben aus den Kulturen jeweils hintereinander aufgetragen. M: SeeBlue® Plus2-Größenstandard. 1,2: gesamte Bakterienzellproteine der pSUMO3-PFLG-1-Expressionskulturen unmittelbar vor Induktion mit IPTG. 3,4: gesamte Bakterienzellproteine der pSUMO3-PFLG-1-Expressionskulturen 3 h nach Induktion mit IPTG. Es zeigen sich intensive Banden im Bereich von ca. 16000 Da. 5,6: gesamte Bakterienzellproteine der pSUMO3-PFLG-2-Expressionskulturen 3 h nach Induktion mit IPTG. Es zeigen sich schwache Banden im Bereich von ca. 20000 Da. 7,8: gesamte Bakterienzellproteine der pSUMO3-PFLG-2-Expressionskulturen unmittelbar vor Induktion mit IPTG.

3.1.5 Aufreinigung der rekombinant exprimierten PFLG-1- und PFLG-2-Fusionsproteine

Die aus der Expression gewonnenen Fusionsproteinproben wurden zunächst einem ersten Aufreinigungsschritt mittels Nickel-Affinitätssäule unterzogen (2.13.2). Die von der Säule eluierten Proben wurden photometrisch auf die Konzentration der jeweiligen Fusionsproteine hin untersucht, was von Bedeutung ist, um die Bindungskapazität der für die nachfolgende C8-Umkehrphasen-HPLC verwendeten Säule nicht zu überschreiten. Für eine Aufreinigung wurde maximal 1 mg Protein pro HPLC-Lauf verwendet.

Mittels C8-Umkehrphasen-HPLC (2.13.3) wurden die Proben weiter aufgereinigt, um ein möglichst sauberes Fusionsprotein zu gewinnen. In Abb. 3.9 ist am Beispiel des PFLG-1-Fusionsproteins ein typisches Chromatogramm einer C8-Umkehrphasen-HPLC dargestellt.

Nach ca. 4-8 min zeigte sich ein Einspritzpeak, der durch die hohe Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie zustande kommt. Nach einer Retentionszeit von ca. 24-25 min wurde das PFLG-1- bzw. PFLG-2-Fusionsprotein eluiert.

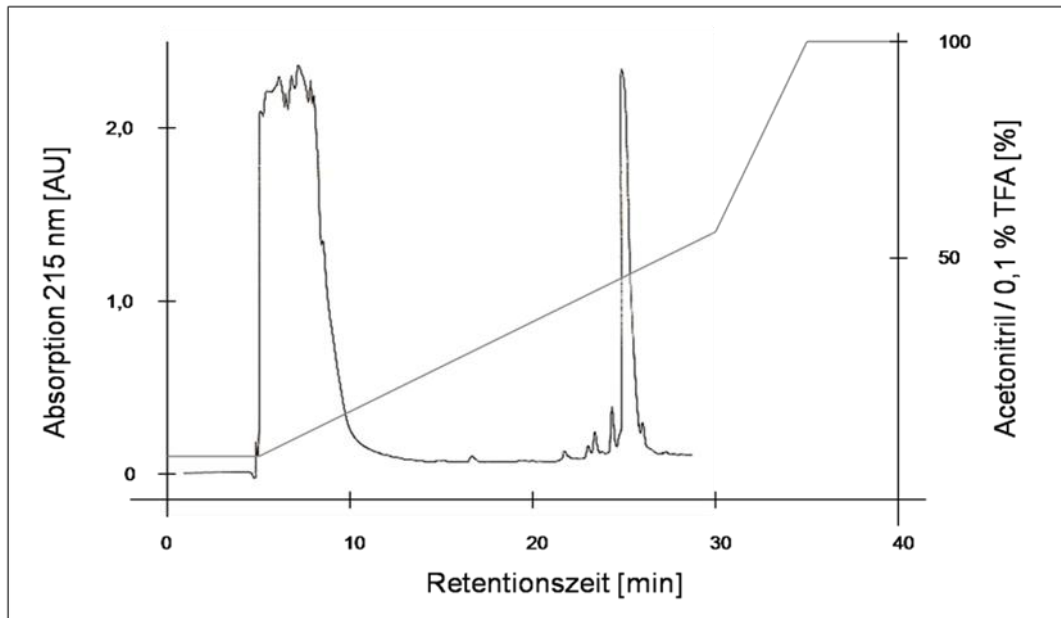


Abb. 3.9: Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten SUMO-PFLG-1-Fusionsproteines mittels C8-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die zuvor über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie aufgereinigte Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min auf die C8 Säule aufgetragen und mit einem H₂O/ 0,1 % TFA-Acetonitril/ 0,1 % TFA-Gradienten eluiert.

Die sich an die C8-Umkehrphasen-HPLC anschließende massenspektrometrische Analyse (2.14.2) der Fusionsproteine ergab für das PFLG-1-Fusionsprotein eine Masse von 15912,6 Da und für das PFLG-2-Fusionsprotein eine Masse von 20687,7 Da, was mit den theoretisch errechneten Massen (15911,5 Da und 20686,8 Da) übereinstimmte. Ein repräsentatives Spektrum für eine dekonvolutierte massenspektrometrische Analyse einer mittels C8-Umkehrphasen-HPLC gewonnenen Probe eines PFLG-1-Fusionsproteins ist in Abb. 3.10 gezeigt.

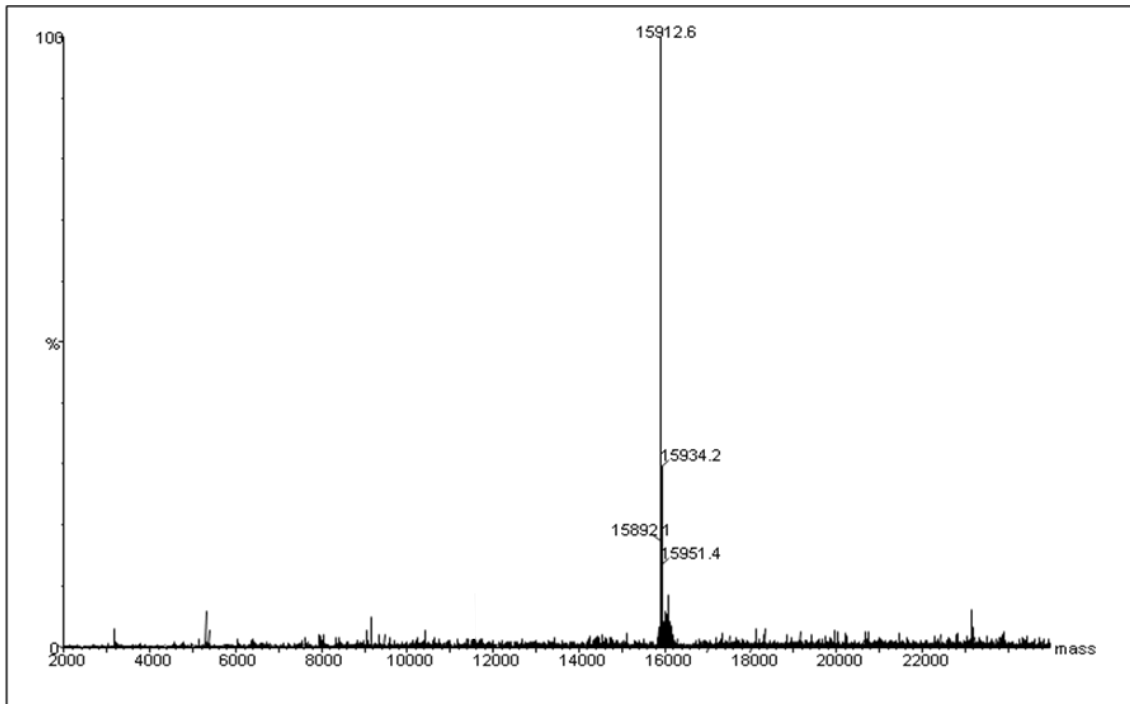


Abb. 3.10: Massenbestimmung eines SUMO-PFLG-1-Fusionsproteins mittels QTOF-Massenspektrometrie. Gezeigt ist die Max-Ent1-Auswertung einer Messung von mittels C8-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigtem SUMO-PFLG-1-Fusionsprotein. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks ist hier gegen die berechnete Masse (mass) in Dalton aufgetragen. Es wurde eine Masse von 15912,6 Da ermittelt.

3.1.6 Aufreinigung von rekombinant exprimiertem PFLG-1 und PFLG-2

Um die PFLG-1- und PFLG-2-Proteine in isolierter Form zu gewinnen, mussten die mittels C8-Umkehrphasen-HPLC gewonnenen Fusionsproteine mit Hilfe der SUMO Protease 2 proteolytisch in das jeweilige Proteinfragment und den SUMO-„Fusionstag“ gespalten werden (2.12.3).

Im Anschluss an die Hydrolyse wurde eine C4-Umkehrphasen-HPLC (2.13.4) durchgeführt, um das PFLG-1- bzw. PFLG-2-Protein aus der jeweiligen Probe zu isolieren. In Abb. 3.11 ist ein typisches Chromatogramm einer C4-Umkehrphasen-HPLC am Beispiel von PFLG-1 gezeigt. Nach ca. 10-12 min Retentionszeit ergaben sich aufgrund des bei der Hydrolyse eingesetzten DTT je ein Peak in reduzierter und oxidiert Form. Das jeweilige Fusionsprotein wurde nach einer Retentionszeit von ca. 19 min (PFLG-1) bzw. 20 min (PFLG-2) eluiert und der „Fusionstag“ nach ca. 24 min.

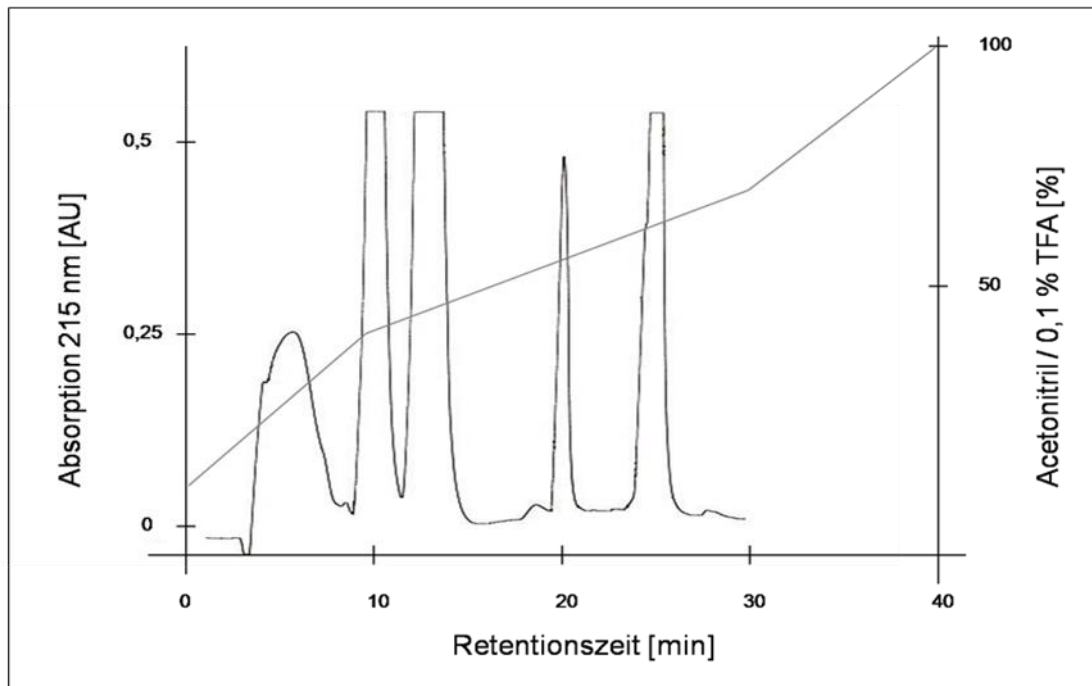


Abb. 3.11: Chromatogramm der Aufreinigung einer SUMO Protease 2-behandelten Probe eines SUMO-PFLG-1-Fusionsproteines mittels C4-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen und mit einem H₂O/0,1 % TFA-100 % Acetonitril/ 0,1 % TFA-Gradienten eluiert.

Die sich an die C4-Umkehrphasen-HPLC anschließende massenspektrometrische Analyse der aufgefangenen Proteinfractionen ergab für PFLG-1 eine Masse von 4410,9 Da und für PFLG-2 eine Masse von 9186,9 Da, was mit den theoretisch errechneten Massen (4410,7 Da und 9186,0 Da) übereinstimmte. In Abb. 3.12 ist ein repräsentatives Spektrum für eine dekonvolutierte massenspektrometrische Analyse einer mittels C4-Umkehrphasen-HPLC gewonnenen Probe von PFLG-1 gezeigt.

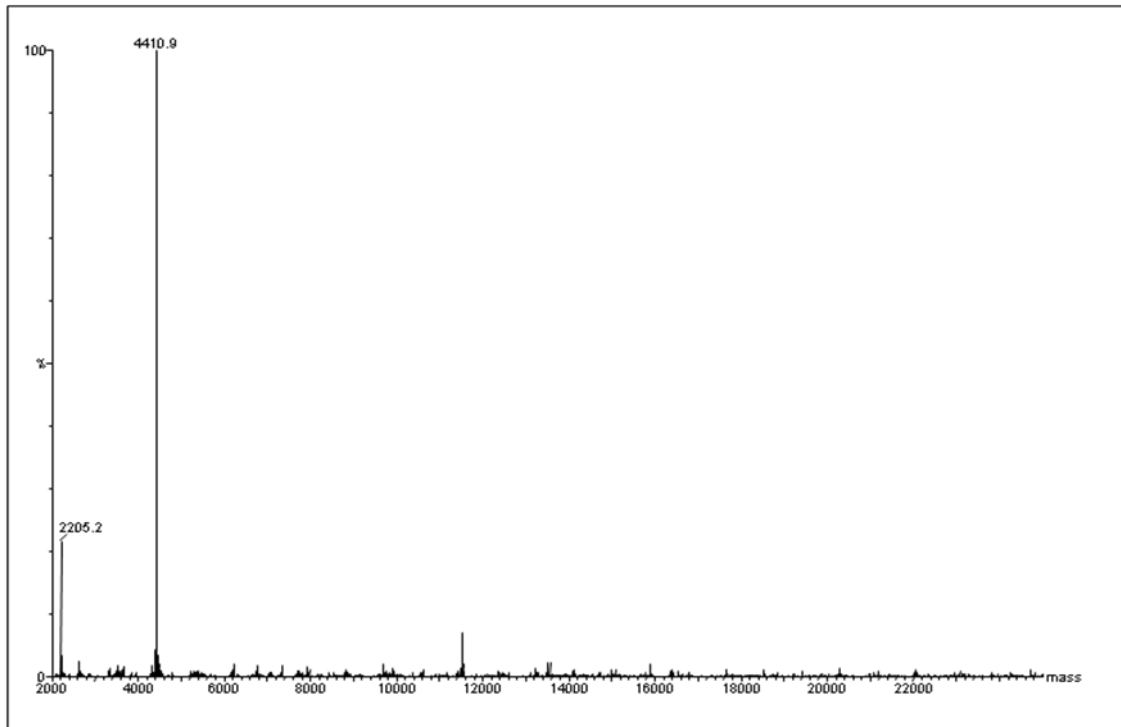


Abb. 3.12: Massenbestimmung von PFLG-1 mittels QTOF-Massenspektrometrie. Gezeigt ist die Max-Ent1-Auswertung einer Messung von mittels C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigtem PFLG-1 nach proteolytischer Abspaltung des „Fusionstags“ mittels SUMO Protease 2. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks ist hier gegen die berechnete Masse (mass) in Dalton aufgetragen. Es wurde eine Masse von 4410,9 Da ermittelt.

Der letzte Aufreinigungsschritt von PFLG-1 und PFLG-2 erfolgte mit Hilfe der C2/C18-Umkehrphasen-HPLC (2.13.5). Ein typisches Chromatogramm einer C2/C18-HPLC-Umkehrphasen-HPLC am Beispiel von PFLG-1 ist in Abb. 3.13 gezeigt. Sowohl PFLG-1 als auch PFLG-2 wurden nach einer Retentionszeit von 12 min eluiert. Die aufgereinigten Proteine wurden im weiteren Verlauf mittels radialer Plattendiffusion auf ihre antimikrobielle Aktivität getestet.

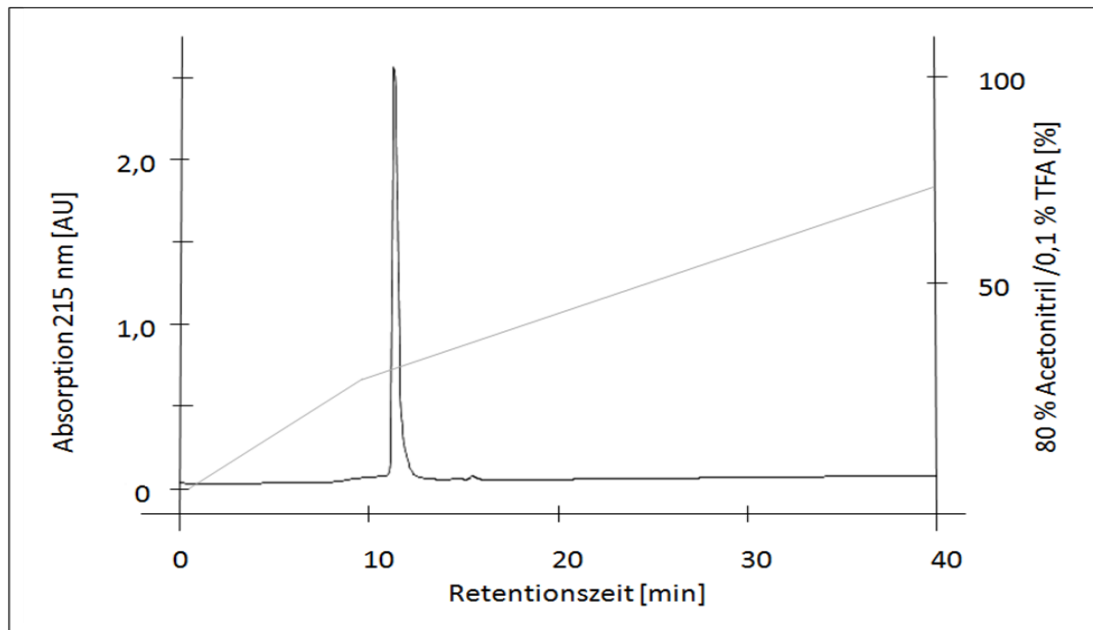


Abb. 3.13: Chromatogramm der Aufreinigung einer durch C4-Umkehrphasen-HPLC gewonnenen Probe eines PFLG-1- Proteins mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf die C2/C18-Säule aufgetragen und mit einem $\text{H}_2\text{O}/0,1 \text{ \% TFA}-80 \text{ \% Acetonitril}/0,1 \text{ \% TFA}$ -Gradienten eluiert.

3.2 Antimikrobielle Aktivität von PFLG-1 und PFLG-2

Nach erfolgreicher Isolierung und Aufreinigung der rekombinant exprimierten PFLG-1- und PFLG-2-Proteine wurden die Proteine mittels radialem Plattendiffusionstest (2.15.1) auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht. Es wurden Agaroseplatten verwendet, die den jeweiligen für die Testung ausgewählten Mikroorganismus bereits enthielten. In den Agar wurden Löcher gestanzt, in die die Proteinlösungen in den verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) gegeben wurden, um die individuelle Wirkschwelle bestimmen zu können. Dabei entsprach eine Verdünnung von 1:1 einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Um das Wirkspektrum von PFLG-1 und PFLG-2 zu analysieren, wurden verschiedene Mikroorganismen eingesetzt: der grampositive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die gramnegativen *Escherichia coli* ATCC 11303 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433. Die Versuche wurden unabhängig voneinander dreimalig durchgeführt. Als Positivkontrolle diente humanes Lysozym (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$).

3.2.1 Antimikrobielle Aktivität von PFLG-1 im radialen Plattendiffusionstest

PFLG-1 zeigte im radialen Plattendiffusionstest gegen keinen der ausgewählten Testorganismen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 und *Candida albicans* ATCC 24433 antimikrobielle Aktivität. So konnte bei keinem der ausgewählten Mikroorganismen ein Hemmhof gemessen werden. Dies gilt für alle verwendeten Verdünnungen (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) von PFLG-1. Die 1:1-Verdünnung entsprach dabei einer Konzentration von 1 µg/µl. Lediglich für die Positivkontrolle aus humanem Lysozym (100 ng/µl) ergaben sich bei allen zu testenden Mikroorganismen intensive Hemmhöfe. Tab. 3.1 stellt die beschriebenen Ergebnisse der radialen Plattendiffusion für PFLG-1 im Überblick dar.

Tab. 3.1: Antimikrobielle Aktivität von PFLG-1 im radialen Plattendiffusionstest

Verdünnung- PFLG-1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>E. coli</i> ATCC 11303		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145		<i>C. albicans</i> ATCC 24433	
	H	B	H	B	H	B	H	B
1:1	kH		kH		kH		kH	
1:3	kH		kH		kH		kH	
1:10	kH		kH		kH		kH	
1:30	kH		kH		kH		kH	
1:100	kH		kH		kH		kH	
Pos. K.	6		7		5		7	

H: Hemmhof, Durchmesser des Hemmhofs in mm; kH: kein Hemmhof vorhanden; B: Bewertung bei nicht vorhandenen Hemmhöfen nicht möglich; Pos. K.: Positivkontrolle: humanes Lysozym 100 ng/µl. Bei keinem der Testorganismen zeigte sich antimikrobielle Aktivität von PFLG-1. Die 1:1-Verdünnung entspricht dabei einer Konzentration von 1 µg/µl. Alle Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2 Antimikrobielle Aktivität von PFLG-2 im radialen Plattendiffusionstest

PFLG-2 zeigte im radialen Plattendiffusionstest antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 11303 und *C. albicans* ATCC 24433. Für *S. aureus* ergab sich ein Hemmhof mit guter Abgrenzbarkeit mit einem Durchmesser von 4 mm Durchmesser (Positivkontrolle 6 mm). Für *E. coli* wurde ebenfalls ein deutlich abzugrenzender Hemmhof mit einem Durchmesser von 5,5 mm (Positivkontrolle 7 mm) nachgewiesen. Bei der Testung gegen *C. albicans* zeigte sich auch ein Hemmhof mit scharfer Abgrenzung bei einem Durchmesser von 5,5 mm (Positivkontrolle 7 mm). Da jeweils nur für die höchste eingesetzte Konzentration ein Hemmhof vorhanden war, konnte die MEK („Minimale Effektive Konzentration“) nach Steinberg und Lehrer nicht berechnet werden. Gegen *P. aeruginosa* ATCC 10145 konnte keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Einen Überblick über die antimikrobielle Aktivität von PFLG-2 im radialen Plattendiffusionstest gibt Tab. 3.2.

Tab. 3.2: Antimikrobielle Aktivität von PFLG-2 im radialen Plattendiffusionstest

Verdünnung- PFLG-2	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>E. coli</i> ATCC 11303		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145		<i>C. albicans</i> ATCC 24433	
	H	B	H	B	H	B	H	B
1:1	4	HHHH	5,5	HHHH	kH		5,5	HHHH
1:3	kH		kH		kH		kH	
1:10	kH		kH		kH		kH	
1:30	kH		kH		kH		kH	
1:100	kH		kH		kH		kH	
Pos. K.	6		7		5		7	

H: Hemmhof, Durchmesser des Hemmhofs in mm; kH: kein Hemmhof vorhanden; B: Bewertung bei vorhandenen Hemmhöfen. HHHH: abgrenzbarer Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof; Pos. K.: Positivkontrolle: humanes Lysozym 100 ng/μl. PFLG-2 zeigte jeweils bei einer 1:1-Verdünnung (entspricht einer Konzentration von 1 μg/μl) antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus*, *E. coli* und

C.albicans. Bei höherer Verdünnung zeigte sich gegen keinen der zu testenden Organismen antimikrobielle Aktivität. Gegen *P. aeruginosa* ist PFLG-2 in keiner der untersuchten Verdünnungen wirksam. Alle Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

4. Diskussion

Als äußere Begrenzung des Körpers und Kontaktfläche zur Umwelt ist die menschliche Haut einer Reihe schädlicher Einflüsse ausgesetzt, zu denen auch eine Vielzahl potenziell pathogener Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilze zählen. Trotz einer permanenten Besiedelung der Haut mit ca. 10^2 - 10^7 Mikroorganismen/cm² kommt es beim gesunden Menschen nur selten zu Hautinfektionen (Fitzpatrick et al., 1993).

In zahlreichen Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass die Haut neben einer intakten physikalischen Barriere und einem hocheffektiven System zur Infektionsabwehr aus humoralen und zellulären Bestandteilen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zusätzlich über eine „chemische Barriere“ aus antimikrobiellen Proteinen und Peptiden verfügt (Harder et al., 1997; Ganz und Lehrer, 1998; Harder und Schröder, 2002; Sahly et al., 2003; Gläser et al., 2005; Rudolph et al., 2006). Die antimikrobiellen Proteine kontrollieren das Wachstum von Mikroorganismen auf der Hautoberfläche. Vorwiegend handelt es sich bei diesen der angeborenen Immunität zugehörigen Molekülen, welche u. a. von den Keratinozyten der Epidermis produziert werden, um kleinere (3-5 kDa), kationische Peptide, die sich in die vier Hauptgruppen der Defensine, Cathelicidine, Ribonukleasen und S100-Proteine einteilen lassen.

In antimikrobiell aktiven HPLC-Fractionen von Proteinextrakten des *Stratum corneum* gesunder Menschen konnten neben den drei dominierenden antimikrobiellen Peptiden RNase 7, Psoriasin und Lysozym noch weitere Proteine und Peptide identifiziert werden. Dazu gehörten auch N-terminale Fragmente des Profilaggrins. Zudem wurden in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe antimikrobielle Eigenschaften für Fragmente der „S100-Fused-Type-Proteine“ Hornerin und Ifapsoriasin/Filaggrin-2 nachgewiesen. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass auch N-terminale Fragmente des Profilaggrin als Mitglied der „S100-Fused-Type“-Proteine antimikrobielle Aktivität aufweisen könnten.

Da Profilaggrin zum einen das dominierende „S100-Fused-Type“-Protein der Haut ist und zum anderen bei HPLC-Analysen von antimikrobiell aktiven Fraktionen aus *Stratum-corneum*-Extrakten Peptide entdeckt wurden, die der N-terminalen Region von Profilaggrin zugeordnet werden konnten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die beiden N-terminal lokalisierten Profilaggrin-Fragmente FLG₈₇₋₁₂₂ (PFLG-1) und FLG₁₂₃₋₂₀₀ (PFLG-2) rekombinant exprimiert, aufgereinigt und hinsichtlich möglicher antimikrobieller Eigenschaften untersucht werden. Somit könnten diese Ergebnisse eine Aussage darüber liefern, ob definierte, in der

Haut nachweisbare Profilaggrin-Fragmente einen direkten Beitrag zur angeborenen Hautabwehr leisten.

4.1 PFLG-1 und PFLG-2 lassen sich in *E. coli* rekombinant exprimieren

Für eine Testung auf mögliche antimikrobielle Aktivität sollten die Profilaggrin-Teilproteine PFLG-1 und PFLG-2 produziert werden. Das Verfahren der rekombinanten Expression von Proteinen in prokaryotischen Zellen bietet den Vorteil einer schnellen, relativ kostengünstigen und effektiven Proteinsynthese. Für die Expression wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS verwendet, da dieser problemlos zu kultivieren ist und zudem mit einer Verdopplungszeit von nur ca. 20 min eine sehr hohe Wachstumsrate aufweist (Sambrook et al., 1989). Aufgrund einer möglichen antimikrobiellen Aktivität der zu exprimierenden Proteine, die toxisch für das Bakterium sein könnte und damit die Expression möglicherweise beeinflussen würde, wurde der pSUMO3-Expressionsvektor der Firma LifeSensors für die rekombinante Expression verwendet. Im pSUMO3-System wird das zu exprimierende Protein als Fusionsprotein, welches vermutlich keine antimikrobielle Aktivität aufweist, hergestellt. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die hohe Aktivität vieler antimikrobieller Peptide gegen *E. coli* ein Grund dafür sein könnte, dass der Versuch der rekombinanten Expression zahlreicher antimikrobieller Proteine in diesem Bakterium bisher erfolglos blieb (Valore und Ganz, 1997).

Zusätzlich bietet das pSUMO3-System die Vorteile einer erhöhten Proteinsyntheserate und einer einfach durchzuführenden Aufreinigung (Butt et al., 2005). Eine im Fusionsteil des Proteins lokalisierte Polyhistidin-Sequenz ermöglicht z. B. die Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Nickel-Affinitätssäule. Unter Verwendung dieses Systems ließen sich PFLG-1 und PFLG-2 in *E. coli* rekombinant exprimieren.

Im Verlauf der Aufreinigung traten jedoch einige Besonderheiten auf, die insgesamt zu Proteinverlusten führten und im Folgenden diskutiert werden sollen.

Im Anschluss an die Aufreinigung der Fusionsproteine mittels C8-Umkehrphasen-HPLC erfolgte die proteolytische Abspaltung des „Fusionstags“ mit Hilfe der SUMO Protease 2, die im Ergebnis regelmäßig unvollständig war. Trotz ausgiebiger Veränderungen der Reaktionsbedingungen wie Verlängerung der Inkubationszeit, Einsatz größerer Mengen an SUMO Protease 2, Veränderungen im Bereich der Temperatur, der Lagerung (schüttelnd, statisch) sowie des Volumens an eingesetztem PBS im Verhältnis zur Menge des

Fusionsproteins, konnte kein vollständiger Verdau erzielt werden. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer bis auf sieben Tage, eine Erniedrigung der vom Hersteller angegebenen optimalen Reaktionstemperatur von 30 °C auf 25 °C sowie das Abdecken des Ansatzes mit Aluminiumfolie erbrachten zumindest eine verbesserte, aber dennoch unvollständige Spaltung. Im Gegensatz zu vielen anderen Proteasen, die die „Fusionstags“ bzw. die Schnittstelle an ihrer Aminosäuresequenz erkennen (Malakhov et al., 2004), erkennt die SUMO Protease 2 den „Fusionstag“ anhand der Tertiärstruktur. Es ist zu vermuten, dass die sterische Anordnung der PFLG-1- und PFLG-2-Fusionsproteine die Schnittstelle im Bereich des „Fusionstags“ verdeckt und somit die Erkennung durch die SUMO Protease 2 erschwert, was in der unvollständigen Spaltung der Fusionsproteine resultierte.

Wie oben erwähnt führte ein Abdecken der Ansätze mit Aluminiumfolie zu einer verbesserten Hydrolyse. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das dem Reaktionsansatz zugegebene DTT unter dem Schutz vor der Lichtenergie länger in seiner in diesem Rahmen aktiven reduzierten Form vorlag. DTT wird in der Proteinbiochemie als Reduktionsmittel hauptsächlich zum Schutz freier SH-Gruppen vor einer Oxidation eingesetzt, um die Bildung von Disulfidbrücken zu vermindern (Cleland, 1964). Dies ist Voraussetzung dafür, dass die SUMO Protease 2 effektiv arbeiten kann. PFLG-1 und PFLG-2 besitzen in ihrer Proteinsequenz selbst keine Cystein-Reste, die für eine Disulfidbrücken-Bindung verantwortlich gemacht werden können, allerdings der verwendete „Fusionstag“. Dieser enthält einen Cystein-Rest, so dass es zur Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Fusionsproteinen kommen kann, wodurch in der Folge aufgrund der veränderten Anordnung der Moleküle die Arbeit der SUMO Protease 2 erschwert oder gänzlich blockiert werden könnte. Um zu verhindern, dass das DTT im Rahmen einer relativ langen Reaktionszeit vollständig in die oxidierte und somit in diesem Zusammenhang inaktive Form übergeht, kann es für weitere Versuche sinnvoll sein, das DTT portioniert über die gesamte Zeitdauer der Spaltung zuzugeben.

Des Weiteren fiel bei der Aufreinigung von PFLG-1 und PFLG-2 auf, dass es von entscheidender Bedeutung war, die mittels Umkehrphasen-HPLC isolierten Proteinfractionen jeweils in Glasröhrchen statt in Kunststoffröhrchen aufzufangen und entsprechend zu lagern. Zunächst wurden im Rahmen der Aufreinigung die Proteinproben routinemäßig in Kunststoffröhrchen aufgefangen, was zu unerklärlichen Proteinverlusten führte. Nachdem die Proteine während der C8- bzw. C4-Umkehrphasen-HPLC fraktioniert wurden, wurde mit Hilfe der C2/C18-Umkehrphasen-HPLC die Proteinmenge bestimmt. Diese fiel jeweils deutlich geringer aus, als durch den Einsatz einer definierten Proteinmenge während der C8- bzw. C4-Umkehrphasen-HPLC und daraus resultierenden Peakflächen zu erwarten war. Unter Verwendung von Glasröhrchen zum Fraktionieren und Lagern der Proteinproben traten keine derartig großen Proteinverluste auf. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte

sein, dass es zu Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Oberfläche der Kunststoffröhrchen kam, so dass die Proteine vermehrt an der Kunststoffoberfläche adhärten und somit in den Röhrchen verblieben. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters adsorbieren viele Proteine an den meisten Grenzflächen zwischen flüssig und fest (Macritchie, 1978). Um die durch Adhäsion an den Oberflächen von Probengefäßen hervorgerufenen Proteinverluste zu minimieren, gibt es eine Reihe von Techniken wie z. B. Modifikation der Proteinlösung durch Zugabe von Additiven oder Beschichtung der Plastik- bzw. Glasoberflächen (Suelter und de Luca, 1983). Einige Proteine scheinen nur an einer bestimmten Art von Oberflächen zu adhären (Suelter und de Luca, 1983). Untersuchungen am Beispiel von Luciferase zeigten, dass die Zugabe von Triton X-100 und Glycerol am effektivsten in der Minimierung von Proteinverlusten durch Adhäsion war (Suelter und de Luca, 1983). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sich die Zugabe von Additiven im Vergleich zur Modifikation der Gefäßoberfläche als deutlich effektiver erwies (Suelter und de Luca, 1983). Proteine unterscheiden sich zwar in Hinblick auf ihre Moleküleigenschaften und weisen somit unterschiedliche adsorptive Eigenschaften auf, aber dennoch stellt die Zugabe eines nichtionischen Lösungsmittels die beste Möglichkeit dar, Proteinverluste aufgrund von Adsorption an Gefäßoberflächen zu minimieren (Suelter und de Luca, 1983). Für eine Proteinaufreinigung im Mikrogramm-Bereich wird empfohlen die Proteinlösung mit Glycerol oder Triton X-100 zu versetzen (Suelter und de Luca, 1983). Neben der Minimierung der Adhäsion sind weitere Vorteile dieser nichtionischen Lösungsmittel, dass sie weder mit elektrophoretischen noch mit den meisten chromatographischen Verfahren interferieren und zusätzlich die Proteine stabilisieren (Gekko und Timasheff, 1981).

Welche Methode letztlich am besten geeignet ist, die postulierten Wechselwirkungen von PFLG-2 mit der Kunststoffoberfläche zu minimieren, müsste in weiteren Studien geklärt werden. Als problematisch anzusehen ist, dass nicht mit Sicherheit auszuschließen wäre, dass die in späteren Tests untersuchten antimikrobiellen Eigenschaften der Proteine in irgendeiner Weise durch das zugegebene Additiv oder dessen Interaktion mit den Proteinen beeinflusst würde.

4.2 PFLG-2 besitzt antimikrobielle Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das N-terminal im Profilaggrin lokalisierte, mittels rekombinanter Expression erzeugte PFLG-2 (FLG₁₂₃₋₂₀₀) antimikrobielle Aktivität gegen das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus*, das gramnegative

Bakterium *Escherichia coli* und die Hefe *Candida albicans* aufweist. Gegen das gramnegative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Das ebenfalls im N-Terminus gelegene PFLG-1 zeigte im Rahmen des in dieser Arbeit angewendeten radialen Plattendiffusionstest hingegen keine antimikrobiellen Eigenschaften gegen die genannten Mikroorganismen.

Die 32 kDa große N-terminale Domäne von Profilaggrin umfasst 293 Aminosäuren und lässt sich in eine 81 Aminosäuren große A- und eine 212 Aminosäuren große kationische B-Domäne unterteilen (Pearson et al, 2002; Presland et al., 1992). In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Profilaggrin-Domäne durch Spaltung mittels der Endoproteinase PEP1 und der beiden Proprotein-Konvertasen Furin und PACE4 vom übrigen Profilaggrin-Protein abgespalten werden kann (Presland et al., 1997; Barr, 1991). Im weiteren Verlauf wird die N-terminale Domäne vermutlich weiter in die A- und die B-Domäne prozessiert, da in Untersuchungen mit gegen die A- oder die B-Domäne gerichteten Antikörpern Fragmente nachgewiesen werden konnten, die jeweils nur mit einem der Antikörper gegen die A-Domäne oder die B-Domäne reagierten (Presland et al., 1997).

Die im Rahmen dieser Dissertation exprimierten Profilaggrin-Teilproteine PFLG-1 und PFLG-2 sind innerhalb der N-terminalen B-Domäne lokalisiert. Das 36 Aminosäuren große PFLG-1 beinhaltet die Aminosäuren 87-122 des Profilaggrin-Proteins. In Bezug auf die N-terminale B-Domäne erstreckt es sich über die Aminosäuren 6-41. Das 78 Aminosäuren große PFLG-2 folgt direkt auf PFLG-1 und umfasst die Aminosäuren 123-200 bzw. die Aminosäuren 42-119 der B-Domäne (Abb. 4.1).

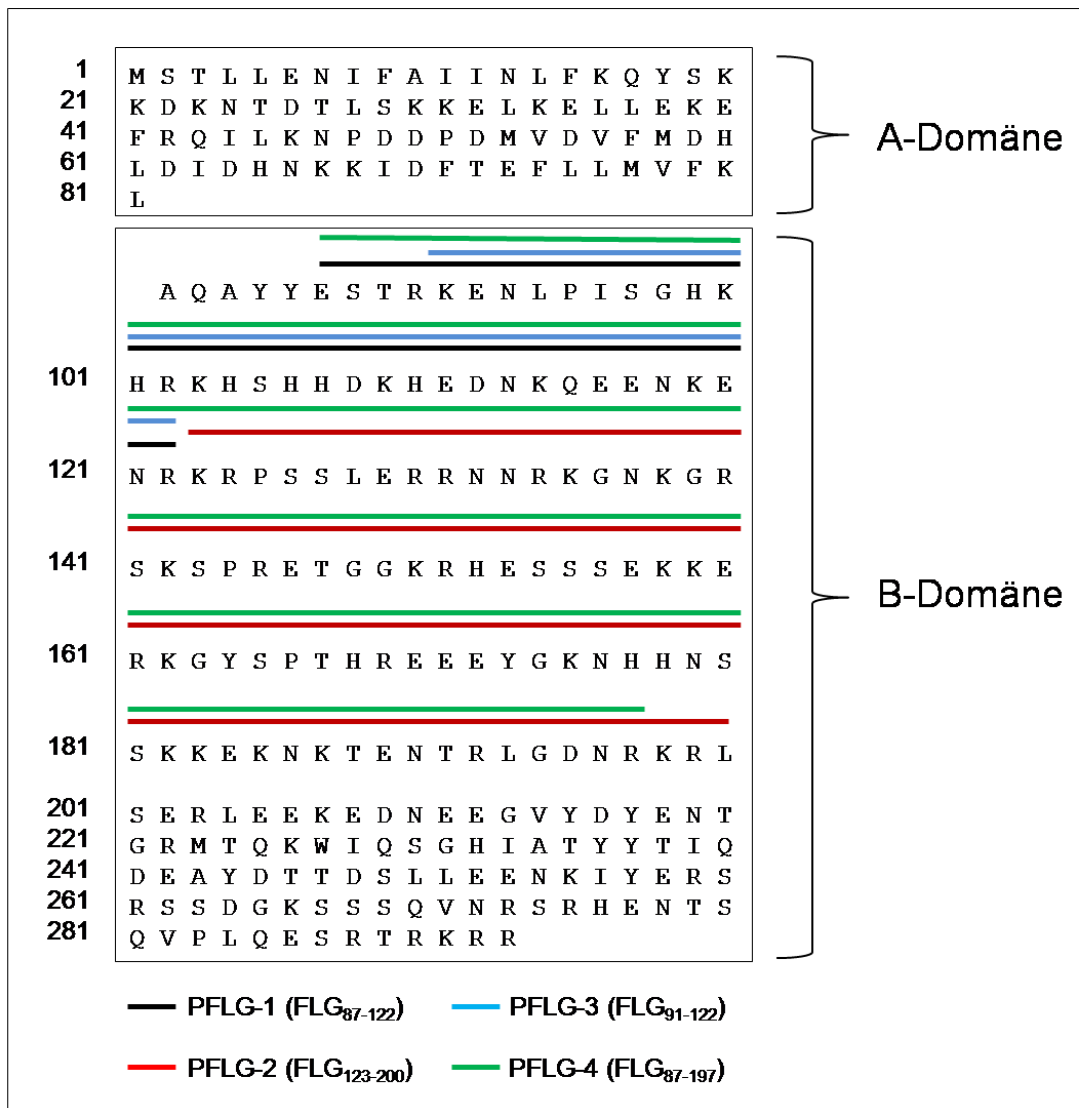


Abb. 4.1: Aminosäuresequenz aus dem N-Terminus von Profilaggrin. Der 293 Aminosäuren große N-Terminus von Profilaggrin gliedert sich in eine 87 Aminosäuren große A- und eine 212 Aminosäuren große B-Domäne. Farblich markiert sind die Sequenzen der im Rahmen dieser Dissertation exprimierten Profilaggrin-Teilproteine PFLG-1 und PFLG-2 sowie die Sequenzen von PFLG-3 und PFLG-4, die im Rahmen der geplanten Dissertation von Dennis Karsch exprimiert wurden und in die Diskussion dieser Arbeit einbezogen werden.

Die B-Domäne trägt eine Signalsequenz (FLG₁₂₂₋₁₃₈), die die Translokation der N-terminalen Profilaggrin-Domäne in den Zellkern während der terminalen Differenzierung ermöglicht (Ishida-Yamamoto et al., 1998; Pearton et al., 2002; Zhang et al., 2002). Neben dieser bisher bekannten Funktion konnte nun im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch Bereiche der B-Domäne antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. In unserer Arbeitsgruppe wurden im Rahmen der geplanten Dissertation von Dennis Karsch zusätzliche Profilaggrin-Teilproteine aus dem Bereich der B-Domäne rekombinant exprimiert, um aus dem Vergleich

der Ergebnisse genauere Aussagen über die Lokalisation und Effizienz der antimikrobiellen Eigenschaften machen zu können. So wurden in dieser weiteren Arbeit die Fragmente FLG₉₁₋₁₂₂ (PFLG-3) und FLG₈₇₋₁₉₇ (PFLG-4) exprimiert (Abb. 4.1). Für PFLG-3, welches sich nur durch das Fehlen der ersten vier Aminosäuren von PFLG-1 unterscheidet, konnte ebenso wie für PFLG-1 keine antimikrobielle Aktivität im radialen Plattendiffusionstest nachgewiesen werden. PFLG-4 setzt sich aus PFLG-1 und PFLG-2 zusammen, wobei die letzten drei Aminosäuren des PFLG-2-Fragments fehlen (Abb. 4.1). Für PFLG-4 wurde antimikrobielle Aktivität gegen die oben genannten Keime sowie zusätzlich gegen das gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen. Hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Potenz liefern PFLG-2 und PFLG-4 im Test gegen *S. aureus*, *E. coli* und *C. albicans* vergleichbare Ergebnisse. Sie unterscheiden sich also hauptsächlich dadurch, dass PFLG-4 im Gegensatz zu PFLG-2 zusätzlich antimikrobielle Aktivität gegenüber *P. aeruginosa* aufweist. Da antimikrobielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* weder in PFLG-1 noch in PFLG-2 gefunden wurde, sondern nur in einem „Fusionsprotein“ aus diesen beiden abzüglich der letzten drei Aminosäuren von PFLG-2, ist zu vermuten, dass sich die Aktivität gegen diesen Keim aus dem Zusammenwirken physikalischer oder chemischer Eigenschaften der beiden Teilsequenzen ergibt.

Aufgrund der Tatsache, dass die meisten antimikrobiellen Peptide kationisch sind (Hancock und Diamond, 2000), wurden die pI-Werte (isoelektrischer Punkt) von PFLG-2 und PFLG-4 verglichen, um zu eruieren, ob die in Hinblick auf *P. aeruginosa* fehlende Aktivität von PFLG-2 gegenüber PFLG-4 auf eine verminderte Kationizität zurückzuführen sein könnte. Aus diesem Vergleich ergab sich jedoch, dass PFLG-2 mit einem pI-Wert von 10,71 sogar über dem pI-Wert von PFLG-4 von 10,19 liegt und somit eine leicht erhöhte Kationizität aufweist. Dies scheint also nicht der Grund für die fehlende Aktivität von PFLG-2 gegen *P. aeruginosa* sein. Die pI-Werte von PFLG-1 und PFLG-3, für welche im radialen Plattendiffusionstest keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden konnte, sind mit 8,46 und 8,38 deutlich geringer als diejenigen von PFLG-2 und PFLG-4.

Die aufgedeckten Unterschiede bezüglich der antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber *P. aeruginosa* könnten auch darin begründet sein, dass PFLG-4 in dem durchgeführten Plattendiffusionstest möglicherweise aufgrund seiner Moleküleigenschaften besser diffundiert als PFLG-2 oder auch PFLG-1. Zwar ist dies eher unwahrscheinlich, da sowohl PFLG-1 als auch PFLG-2 deutlich kleiner sind als PFLG-4. Aber dennoch lässt sich aus dieser Überlegung ableiten, dass der Einsatz der getesteten Profilaggrin-Fragmente in einem weiteren Testsystem, z. B. dem Mikrodilutionstest, der ein flüssiges Testsystem darstellt, sinnvoll wäre.

In Hinblick auf die Unterschiede in ihrer Wirksamkeit gegenüber *P. aeruginosa* wäre es außerdem interessant, die Tertiärstrukturen von PFLG-2, PFLG-4 sowie PFLG-1 zu

analysieren. So wäre es denkbar, dass Unterschiede in der räumlichen Anordnung einzelner für die antimikrobiellen Eigenschaften gegen *P. aeruginosa* verantwortlicher Abschnitte, die jeweils in PFLG-4 und PFLG-2 oder eben in PFLG-4 und PFLG-1 vorkommen, dazu führen, dass *P. aeruginosa* wie beschrieben nur von PFLG-4 abgetötet wird. Mittels Datenbankanalysen ließen sich die Proteinsequenzen mit Sequenzen, deren Tertiärstrukturen bereits bekannt sind, vergleichen, um aufgrund von möglicherweise vorhandenen Sequenzhomologien Aussagen über die räumliche Anordnung der Proteine und somit über strukturelle Unterschiede als mögliche Ursache für die unterschiedliche Wirksamkeit machen zu können.

Schließlich ist zu erwähnen, dass es sich bei den durchgeführten Versuchen um *in vitro*-Untersuchungen handeln. Die *in vivo* ablaufenden Reaktionen, die durch zahlreiche weitere Faktoren beeinflusst werden (4.6), wurden mit Hilfe dieser Untersuchungen nicht erfasst.

4.3 Wirkmechanismen von antimikrobiellen Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das aus der B-Domäne des N-terminalen Abschnitts von Profilaggrin stammende rekombinant exprimierte PFLG-2 *in vitro* antimikrobiell aktiv ist und somit möglicherweise auch *in vivo* einen Beitrag zur kutanen Abwehr von Mikroorganismen leisten könnte. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach dem möglichen Wirkmechanismus von PFLG-2.

Mit einem isoelektrischen Punkt (pI-Wert) von 10,71 ist PFLG-2 sehr kationisch. In früheren Studien wurde gezeigt, dass es sich bei den meisten antimikrobiellen Peptiden um kationische Proteine handelt (Hancock und Diamond, 2000). Des Weiteren ergaben Analysen von 486 antimikrobiell aktiven Proteinen hinsichtlich ihrer Aminosäuren, dass die beiden basischen Aminosäuren Lysin und Arginin sowie die neutralen Aminosäuren Glycin und Leucin besonders häufig vorkommen (Lata et al., 2007). Die Untersuchung der Aminosäuresequenz von PFLG-2 ergab, dass diese vier Aminosäuren mit zusammen 36 von insgesamt 78 Aminosäuren einen Anteil von 46,15 % ausmachen. Das im radialen Plattendiffusionstest antimikrobiell nicht aktive PFLG-1 weist hingegen zum einen mit einem pI-Wert von 8,46 eine deutlich geringere Kationizität auf und hat zum anderen mit 30,56 % (elf von insgesamt 36 Aminosäuren) einen geringeren Anteil an den überdurchschnittlich häufig bei antimikrobiellen Peptiden vorkommenden vier Aminosäuren Arginin, Glycin, Leucin und Lysin. Es könnte also vermutet werden, dass die intensive positive Ladung einen Einfluss auf die Wirkungsweise von PFLG-2 hat. Allgemein wird vermutet, dass Proteine aufgrund ihres amphiphilen Charakters in der Lage sind, in die Bakterienmembran

einzufragen und dort durch Oligomerisierung Poren auszubilden (Lehrer, 2004). So ermöglichen die hydrophilen Domänen, die aus polaren und positiv geladenen Aminosäureresten bestehen, die initiale Bindung an die negativ geladenen äußeren Oberflächen (durch LPS in gramnegativen und Teichonsäuren in grampositiven Bakterien) von Bakterien (Hale und Hancock, 2007). Durch Aggregation in der Zellmembran beeinflussen sie im weiteren Verlauf die Integrität derselben. Dieser Mechanismus wäre für PFLG-2 auch vorstellbar. Auf welche Weise antimikrobielle Peptide *Candida albicans* und weitere Pilze inhibieren oder abtöten, ist noch nicht hinreichend geklärt (Zaiou, 2007). Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass Mechanismen existieren, die analog zur Abtötung von Bakterien zur Zerstörung der Zellmembran von Pilzen führen (Zaiou, 2007).

Neben dieser auf der Zerstörung der Membranen beruhenden antimikrobiellen Aktivität gibt es allerdings weitere Wirkmechanismen. So wurde z. B. für ein Pleurocidin-Analogon nachgewiesen, dass es unter Einsatz der minimalen Hemmkonzentration die RNA- und Protein-Synthese in *E. coli* hemmt ohne dabei schädigend auf die Integrität der Zellmembran zu wirken (Patrzykat et al., 2002). Unter Verwendung höherer Konzentrationen des Pleurocidin-Analogons wurde die Zellmembran zerstört (Patrzykat et al., 2002). Diese Befunde legten die Vermutung nahe, dass durch die oftmals bei antimikrobiellen Tests eingesetzten hohen Konzentrationen der antimikrobiellen Peptide die Effekte auf die Strukturen im Zellinnern und die Interaktionen mit diesen maskiert wurden (Patrzykat et al., 2002). In weiteren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass antimikrobielle Peptide in ihrer Wirkung nicht auf eine Zielstruktur beschränkt sind, sondern in der Lage sind, mit verschiedenen intrazellulären Strukturen zu interagieren, und auf diese Weise z. B. die DNA- und RNA-Synthese hemmen sowie Einfluss auf Enzyme nehmen (Powers und Hancock, 2004). Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus wird für Psoriasin vermutet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von durch Psoriasin abgetötete *E. coli* zeigten keine Zeichen von Membran- oder Zellwandschäden (Gläser et al., 2005). Da außerdem auffiel, dass Psoriasin in seiner Aktivität durch Inkubation mit Zink-Ionen gehemmt wurde (Gläser et al., 2005), wurde vermutet, dass in diesem Fall möglicherweise der Entzug von essentiellen Zink-Ionen für das Absterben von *E. coli* verantwortlich ist.

Welcher Mechanismus letztendlich dem in dieser Arbeit hergestellten PFLG-2 zugrunde liegt, muss in weiteren Studien untersucht werden. So könnte man beispielsweise mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von durch PFLG-2 abgetöteten Bakterien die Frage klären, ob es bei den Bakterien zu Membranschäden kommt. Ein weiteres Verfahren zur Untersuchung der Membranintegrität ist der „SYTOX Green assay“. Der bei diesem Test verwendete fluoreszierende Farbstoff wird nur von toten Zellen mit geschädigter Membran aufgenommen und bindet in der Zelle an Nukleinsäuren (Roth et al., 1997).

4.4 Antimikrobielle Proteine als Therapeutika

In den letzten 60 Jahren und auch heute noch spielen Antibiotika eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von durch Bakterien und andere Mikroorganismen verursachten Infektionskrankheiten. So lieferten sie u. a. einen entscheidenden Beitrag zum deutlichen Anstieg der Lebenserwartung im 20. Jahrhundert (Todar, 2008). Jedoch wird die zunehmende weltweite Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen zu einer immer größer werdenden Bedrohung (Boucher et al., 2009). Wundinfektionen, Gonorrhoe, Tuberkulose, Pneumonien, Septikämien und Ohrentzündungen bei Kindern sind nur einige Beispiele für z. T. bereits schwierig zu therapierende Erkrankungen (Todar, 2008). Das Phänomen der sich ausbreitenden Resistenzen wird in Zusammenhang gebracht mit dem zunehmenden unkritischen Gebrauch von Antibiotika und der steigenden Anzahl an immunkompromittierten Patienten, die u. a. Veränderungen in der zellulären und humoralen Immunität aufweisen (Zaiou, 2007). Von besonderer Bedeutung ist die Resistenz gramnegativer Bakterien gegen Antibiotika, da es bereits einen Mangel an neuen Antibiotika gegen diese Mikroorganismen, deren Prävalenz weltweit zunimmt, gibt (Bartolini et al., 2004; Nicasio et al., 2008; Hawser et al., 2007). Die verminderte Effektivität der derzeitigen antibiotischen Therapie und die weltweit zunehmende Verbreitung von Resistenzen machen die Entwicklung neuer alternativer antimikrobiell wirksamer Substanzen nötig (Zaiou, 2007). Dabei sind in den letzten Jahren v. a. die der angeborenen Immunität zugehörigen antimikrobiellen Peptide in den Fokus des Interesses gelangt. So wurden während der vergangenen 20 Jahre ca. 1500 antimikrobielle Proteine entdeckt (Wang et al., 2009).

Antimikrobielle Peptide bieten eine Reihe von Vorteilen. Sie sind natürlichen Ursprungs, stellen eine konservierte Komponente der angeborenen phylogenetisch alten Immunität dar und sind bereits seit mindestens 10^8 Jahren effektiv an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt, was besonders deutlich wird, wenn man die wirbellosen Organismen betrachtet, die nur über diese angeborene Abwehr verfügen. Pflanzen z. B. produzieren antimikrobielle Peptide, welche eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen aufweisen und somit für einen wirkungsvollen Schutz der Pflanzen vor Infektionen sorgen (Broekaert et al., 1997). Zusätzlich zu einem breiten antibakteriellen Wirkspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien zeigte sich in zahlreichen Untersuchungen, dass viele antimikrobielle Peptide ebenfalls gegen Pilze, Parasiten sowie umhüllte Viren aktiv sind (Oyston et al., 2009). Für einige antimikrobielle Peptide konnte sogar nachgewiesen werden, dass sie toxische Wirkung auf Tumorzellen ausüben und diese abtöten können. Als Beispiel ist in diesem Zusammenhang Magainin II zu nennen, dass zytotoxische Wirkung auf eine Reihe von Tumor-Zelllinien wie z. B. Melanom-Zellen,

Mamma-, Bronchial- und Urothel-Karzinome sowie Lymphom- und Leukämie-Zellen ausübt (Baker et al., 1993; Soballe et al., 1995; Lehmann et al., 2006). Bemerkenswert ist v. a. in Hinblick auf einen Einsatz als Alternative zu den konventionellen Antibiotika, dass einige antimikrobielle Peptide in der Lage sind, multiresistente Bakterien abzutöten. (Giuliani et al., 2007). Eine mögliche Begründung hierfür ist die Tatsache, dass antimikrobielle Peptide in ihrer Wirkung nicht auf eine Zielstruktur beschränkt sind, sondern mit verschiedenen intrazellulären Strukturen zu interagieren vermögen (Powers und Hancock, 2004). Somit wird die Entwicklung von Resistenzen deutlich erschwert.

Einige antimikrobielle Peptide wurden bereits in klinischen Studien getestet. Pexiganan, ein Magainin II-Analogon, war das erste antimikrobielle Peptid, das im Rahmen einer klinischen Studie als antibiotische Creme bei diabetischem Fußulkus getestet wurde. Aufgrund des ungenügenden Nachweises der Effektivität erhielt es jedoch keine Zulassung von der amerikanischen Arzneimittel-Zulassungsbehörde FDA. Auch für Isegran, ein Protegrin I-Analogon, konnte in Studien nicht die postulierte Effektivität in der Prävention oder zumindest Minderung der oralen Mukositis bei Patienten, die wegen Tumoren im Kopf- und Halsbereich eine Radiotherapie erhielten, nachgewiesen werden (Trotti et al., 2004). Am erfolgversprechendsten schien Omiganan, ein Indolicidin-Analogon, das als Gel zur topischen Anwendung in der Prävention vor Katheterinfektionen eingesetzt werden sollte. Jedoch wurde auch dieses antimikrobielle Peptid nicht zugelassen. Obwohl bisher noch kein antimikrobielles Peptid die Zulassung erhalten hat, besteht dennoch Zuversicht, diese Substanzen als eine neue Generation von Medikamenten auf den Markt zu bringen (Zaiou et al., 2007).

Diskutiert wird auch der mögliche gemeinsame Einsatz von Antibiotika und antimikrobiellen Peptiden aus Gründen eines wünschenswerten synergistischen Effekts (Marr et al., 2006).

4.5 Rolle von Profilaggrin im Rahmen von Erkrankungen

Bei verschiedenen Hauterkrankungen ist die Barrierefunktion der Haut eingeschränkt. Häufig findet sich eine Störung in der Ausdifferenzierung der Keratinozyten, verbunden mit einer stark vom physiologischen Muster abweichenden Zeitspanne des normalen Zellumsatzes in der Epidermis. Die Haut ist oft trocken, schuppig und entzündet. Einige chronisch entzündliche Hauterkrankungen wie Psoriasis, Atopische Dermatitis und Ichthyosis vulgaris werden mit Mutationen im Bereich des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ auf Chromosom 1q21.3 in Verbindung gebracht (Segre, 2006; Hoffjan und Stemmler, 2007; de Guzman Strong et al., 2010). Für das *FLG*-Gen, welches für Profilaggrin kodiert und

ebenfalls im Bereich des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ lokalisiert ist, konnten Mutationen nachgewiesen werden, die die häufige autosomal dominante Form der Verhornungsstörung Ichthyosis vulgaris verursachen (Smith et al., 2006). Ebenso wurden Mutationen im *FLG*-Gen entdeckt, die Europäer für eine früh einsetzende, schwere und persistierende Form der Atopischen Dermatitis sowie für die Form des Asthma bronchiale, die mit Atopischer Dermatitis assoziiert ist, prädisponieren (Überblick in Sandilands et al., 2007). Bisher wurden 15 „loss-of-function“-Mutationen im Bereich der Filaggrin-Repeats nachgewiesen (Sandilands et al., 2007). Patienten mit Mutationen im *FLG*-Gen exprimieren ein trunkiertes Profilaggrin-Protein, das zwar in der Lage ist, ein *Stratum granulosum* der Epidermis, welches deutlich dünner ist als in gesunder Haut, mitzuformen, aber dieses mutierte Profilaggrin-Protein kann nicht in die Filaggrin-Untereinheiten prozessiert werden (Sandilands et al., 2007).

Patienten mit Ichthyosis vulgaris leiden unter trockener, schuppender Haut und weisen ebenso wie Patienten mit Atopischer Dermatitis gehäuft Hautinfektionen durch *S. aureus* auf (Baker, 2006). Diese gesteigerte Infektionsanfälligkeit lässt sich mit der eingeschränkten Hautbarriere erklären (Proksch et al., 2006). Es wäre allerdings auch denkbar, dass im Zuge der gestörten Prozessierung aufgrund der Mutationen im *FLG*-Gen die Freisetzung von PFLG-2 behindert oder vermindert ist, so dass die antimikrobielle Wirkung von PFLG-2 auf *S. aureus*, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, fehlt oder verringert ist und sich die vermehrte Infektionsanfälligkeit der Haut auch hierdurch mitbegründen ließe. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten in weiteren Untersuchungen z. B. Antikörper gegen PFLG-2 und weitere N-terminale Abschnitte generiert werden und die Verteilung bzw. das Vorhandensein von PFLG-2 in der Haut gesunder Probanden mit derjenigen von Patienten mit Ichthyosis vulgaris und Atopischer Dermatitis verglichen werden. Hieraus ließen sich dann in der Folge Rückschlüsse über die Prozessierung und die mögliche Bedeutung von PFLG-2 in Zusammenhang mit dem Auftreten von durch *S. aureus* und weitere Mikroorganismen verursachte Hautinfektionen bei gestörter Barrierefunktion der Haut ziehen.

Um die Rolle von PFLG-2 im Rahmen der genannten Erkrankungen weiter zu untersuchen, wäre zusätzlich der Einsatz eines Mausmodells von Interesse. Da die B-Domäne des N-terminalen Profilaggrin jedoch nicht in dem Maße konserviert ist innerhalb verschiedener Spezies wie die A-Domäne (Presland et al., 1992; Pearton et al., 2002), müsste zunächst das PFLG-2-Teilprotein, das von der Lokalisation innerhalb der B-Domäne her dem menschlichen entspricht, mittels rekombinanter Expression aus Maus-DNA erzeugt werden und in antimikrobiellen Testverfahren hinsichtlich der antimikrobiellen Eigenschaften untersucht werden. Wären diese Eigenschaften mit denjenigen des aus menschlicher cDNA exprimierten PFLG-2 vergleichbar, wäre von einem funktionellen Ortholog auszugehen, so

dass der Einsatz von „knock-out“-Mäusen, bei denen dieser Abschnitt ausgeschaltet würde, sinnvoll wäre. Zeigte sich bei diesen „knock-out“-Mäusen eine vermehrte Anfälligkeit für Hautinfektionen, ließen sich Aussagen über die Bedeutung von PFLG-2 im Rahmen der Abwehr von Mikroorganismen im gesunden und kranken Gewebe machen. Allerdings müsste man nachweisen, dass der Rest des Proteins in Expression und Funktion unbeeinträchtigt wäre, um fundierte Aussagen über den N-Terminus machen zu können.

4.6 Ausblick

Da für PFLG-2 antimikrobielle Aktivität gegenüber dem grampositiven *S. aureus* und gramnegativen *E. coli* sowie der Hefe *C. albicans* nachgewiesen werden konnte, ist es prinzipiell denkbar, dass sich PFLG-2 therapeutisch einsetzen ließe.

Um PFLG-2 auf seine Eignung als Therapeutikum zu untersuchen, wäre eine Reihe von weiteren Versuchen nötig. Zunächst müssten die Prozesse der rekombinanten Expression dahingehend optimiert werden, dass eine große Ausbeute an Protein für die Vielzahl an weiteren Tests erzielt werden kann. So wurde in dieser Arbeit auf die Besonderheiten während der Expression von PFLG-2 eingegangen, die zu Proteinverlusten führten, und es wurden bereits Überlegungen zur Optimierung angestellt und z. T. auch schon umgesetzt. Für weitere Studien wäre es sinnvoll, die Expression von PFLG-2 in Hefen zu etablieren. Bei diesem Verfahren wird das Protein direkt in den Kulturüberstand sezerniert und eine Spaltung mittels Proteasen, die sich im Rahmen dieser Arbeit als schwierig erwies, ist nicht mehr nötig (Böer et al., 2006). Des Weiteren tritt hierbei das Problem einer inkorrekten Proteinfaltung, die bei Expression in Bakterienstämmen vorkommen kann, nicht auf (Böer et al., 2006).

Des Weiteren ist PFLG-2 bisher nur in einem Testsystem (radialer Plattendiffusionstest) gegen eine begrenzte Anzahl an Mikroorganismen (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *C. albicans*) unter unphysiologischen Bedingungen (neutraler pH-Wert, geringe Salzkonzentration) getestet worden. Zur besseren Charakterisierung des antimikrobiellen Wirkspektrums sollte gegen weitere Mikroorganismen, insbesondere gegen diejenigen, die Resistenzen gegen konventionelle Antibiotika entwickelt haben, getestet werden und es sollten weitere Testverfahren wie z. B. der Mikrodilutionstest eingesetzt werden, um die Eigenschaften in einem Flüssigkeitstestsystem zu untersuchen. Dies ist v. a. von Interesse, da in einem solchen Testsystem kein Einfluss auf die Diffusionsfähigkeit eines Moleküls zu erwarten ist. So ließen sich unter Verwendung des Mikrodilutionstests mittels Berechnung der LD₉₀ genauere Aussagen über die antimikrobielle Potenz von PFLG-2 machen. Im

radialen Plattendiffusionstest konnte für PFLG-2 bisher nur antimikrobielle Aktivität in einer Konzentration von 1 µg/µl nachgewiesen werden, so dass die MEK, für deren Ermittlung mindestens zwei Messwerte bei unterschiedlichen Konzentrationen nötig sind, nicht berechnet werden konnte und daher keine Rückschlüsse auf die eigentliche antimikrobielle Potenz von PFLG-2 gezogen werden konnten.

Zusätzlich wären Untersuchungen erforderlich, die die Frage klären, ob PFLG-2 durch vermehrte Anwendung zu einer Resistenzentwicklung bei Mikroorganismen führt.

In Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz von PFLG-2 wäre es weiterhin wichtig zu untersuchen, ob PFLG-2 toxisch auf eukaryotische Zellen wirkt und z. B. zur Lyse von Erythrozyten führt. Weiterhin wäre es sinnvoll, den Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen auf die antimikrobielle Wirkung von PFLG-2 zu prüfen, um die biologische Relevanz von PFLG-2 unter physiologischen Bedingungen zu ermitteln. Dies ist von besonderem Interesse bei dem ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe von Dennis Karsch hergestellten PFLG-4, welches antimikrobielle Aktivität neben *E. coli*, *S. aureus* und *C. albicans* zusätzlich gegen *P. aeruginosa* aufweist und damit als mögliches Therapeutikum z. B. gegen durch *P. aeruginosa* verursachte Lungeninfektionen bei Patienten mit Cystischer Fibrose interessant wäre. Mehr als 90 % der Lungeninfektionen werden bei diesen Patienten durch *P. aeruginosa* verursacht und aufgrund der schwierigen Therapierbarkeit stirbt die Mehrzahl der Patienten in der Folge an den an der Lunge verursachten Schäden (Zhang et al., 2005). In einem Alter von 18 Jahren sind bereits 80 % der Patienten mit Cystischer Fibrose chronisch mit *P. aeruginosa* infiziert (Rajan und Saiman, 2002). Bei diesen Patienten finden sich gehäuft Resistenzen gegen diverse Antibiotika wie z. B. Ciprofloxacin, Ofloxacin und Aminoglykoside (Lester und Andreasen, 1988; Ford et al., 1993). In der Lunge werden zwar einige antimikrobielle Peptide wie β -Defensine oder LL-37 exprimiert, die aber in zu geringen Konzentrationen vorkommen (Goldman et al., 1997; Bals et al., 1998). In *in vitro*-Experimenten wurde weiterhin nachgewiesen, dass diese antimikrobiellen Peptide sensibel auf Salz reagieren und somit vermutlich ineffektiv in der Abtötung von *P. aeruginosa* bei Patienten mit Cystischer Fibrose sind, die u.a. auf der apikalen Seite der Lungenepithelien eine hohe Salzkonzentration aufweisen (Goldman et al., 1997; Bals et al., 1998; Zhang et al., 2005). Zudem bilden sich in dem zähen Bronchialsekret der Patienten häufig auch bakterielle Biofilme aus, die mit einer hohen Antibiotikaresistenz einhergehen (Singh et al., 2000; Deligianni et al., 2010). Ein vielversprechender Ansatz wäre die exogene Applikation antimikrobieller Peptide, die sowohl resistent gegen die hohe Salzkonzentration als auch aktiv gegen *P. aeruginosa* sind, in Form eines Dosier-Aerosols (Hancock et al., 2002).

Des Weiteren müsste auch untersucht werden, inwieweit sich die antimikrobielle Aktivität von PFLG-2 unter einem in der Haut herrschenden physiologischen pH-Wert (5,4-5,9; Braun-Falco und Korting, 1986) entfaltet.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Abschnitte der N-terminalen B-Domäne des Profilaggrin-Proteins antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Um die Funktion bezüglich der Rolle in der kutanen Abwehr von Mikroorganismen detaillierter zu beschreiben, und in Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz sollten sich weitere Untersuchungen anschließen.

5. Zusammenfassung

Als äußere Begrenzung des Körpers steht die Haut des Menschen ständig in Kontakt mit der Umwelt und ist einer Reihe schädlicher Einflüsse ausgesetzt, zu denen auch eine Vielzahl potenziell pathogener Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilze zählen. Trotz einer permanenten Besiedelung der Haut mit ca. 10^2 - 10^7 Mikroorganismen/cm² kommt es beim gesunden Menschen nur selten zu Hautinfektionen.

Die Haut verfügt neben einer intakten physikalischen Barriere und einem hocheffektiven System zur Infektionsabwehr aus humoralen und zellulären Bestandteilen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zusätzlich über eine „chemische Barriere“ aus antimikrobiellen Proteinen und Peptiden. Die antimikrobiellen Proteine kontrollieren das Wachstum von Mikroorganismen auf der Hautoberfläche.

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurden in antimikrobiell aktiven HPLC-Fractionen von Proteinextrakten des *Stratum corneums* gesunder Menschen neben den drei dominierenden antimikrobiellen Peptiden RNase 7, Psoriasin und Lysozym u. a. auch N-terminale Fragmente von Profilaggrin identifiziert.

Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass definierte, in der Haut nachweisbare Profilaggrin-Fragmente möglicherweise einen direkten Beitrag zur angeborenen Hautabwehr leisten, wurden im Rahmen dieser Arbeit die beiden N-terminal lokalisierten Profilaggrin-Fragmente FLG₈₇₋₁₂₂ (PFLG-1) und FLG₁₂₃₋₂₀₀ (PFLG-2) rekombinant exprimiert, aufgereinigt und hinsichtlich möglicher antimikrobieller Eigenschaften untersucht. Für PFLG-2 konnte im radialen Plattendiffusionstest antimikrobielle Aktivität gegen das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus*, das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* sowie die Hefe *Candida albicans* nachgewiesen werden. Gegen das gramnegative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* konnte für PFLG-2 keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Das Teilfragment PFLG-1 zeigte in diesem Testverfahren gegen keinen der genannten Mikroorganismen antimikrobielle Aktivität.

Neben den bekannten Funktionen des Profilaggrin-Proteins konnte mit dieser Arbeit nun erstmalig gezeigt werden, dass definierte in der Haut nachweisbare N-terminale Abschnitte des Profilaggrin auch antimikrobielle Eigenschaften aufweisen und somit möglicherweise einen direkten Beitrag zur kutanen Abwehr von Mikroorganismen leisten könnten.

6. Anhang

6.1 Vektorkarte des pSUMO3-Expressionsvektors

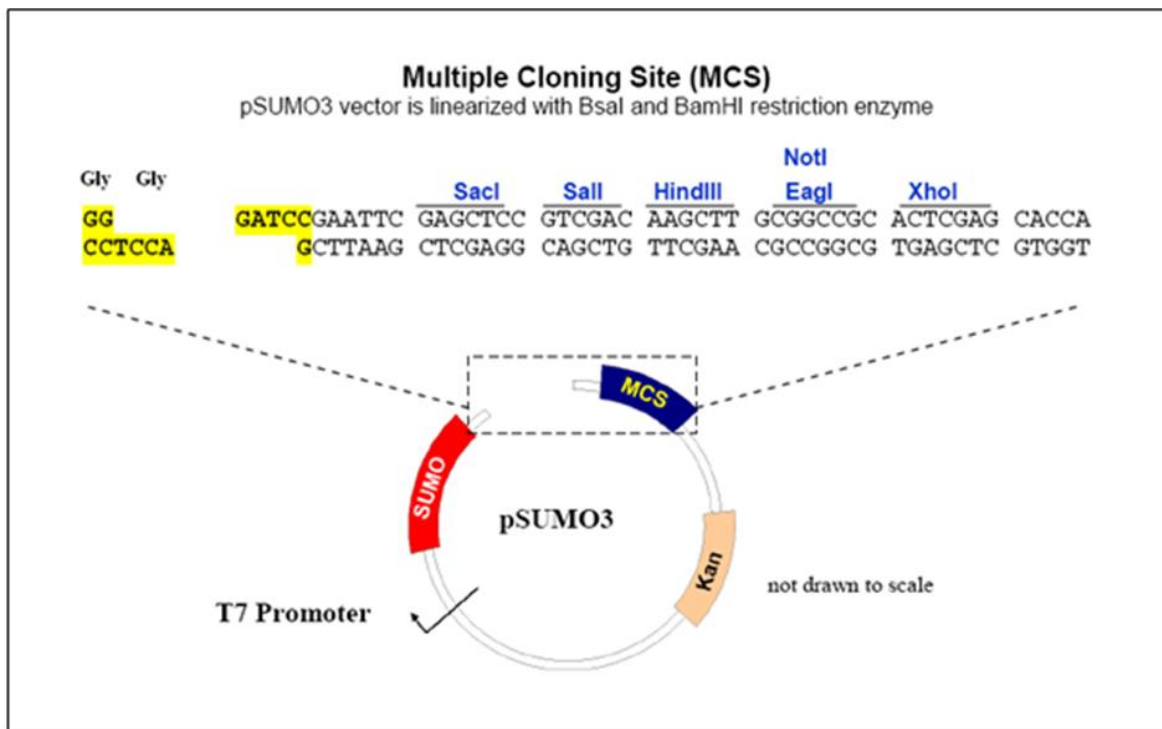


Abb. 6.1: Schematische Darstellung des pSUMO3-Expressionsvektors. Eingezeichnet sind Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme und als Kästen wichtige Sequenzabschnitte des Vektors. Kan: Gen für Kanamycin-Resistenz; MCS: "Multiple Cloning Site"; SUMO: SUMO-Gensequenz. (Aus: Polylinker map (pSUMO3 vector, T7 Kan), LifeSensors.)

6.2 Sequenzen

6.2.1 cDNA und Proteinsequenz des humanen Profilaggrin

Die cDNA-Sequenz umfasst 12747 bp, die Protein-Sequenz 4061 Aminosäuren. Sowohl die cDNA- als auch die Protein-Sequenz des humanen Profilaggrins sind über die NCBI-Zugangsnummer NM_00201 auf der NCBI-Seite unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> verfügbar.

6.2.2 Übersicht der rekombinanten Proteinflragmente von Profilaggrin

6.2.2.1 PFLG-1

Nukleotidsequenz (bp 259-366)

```
gagtctaccagaaaagagaatttaccgatatcaggacacaagcacagaaagcacagtcatca
tgataaacatgaagataataaacaggaagaaaacaaagaaaacaga
```

Proteinsequenz (Aminosäuren 87-122)

```
ESTRKENLPISGHKHKRKHSHHDKHEDNKQEENKENR
```

6.2.2.2 PFLG-2

Nukleotidsequenz (bp 367-600)

```
aaaagaccctcaagtctggaaagaagaacaatagaaaaggggaataaggggaagatccaagag
cccaagagaaacaggggggaaaagggcatgaatctagtctgaaaaaaaaagaagaaaaggat
attcacctactcatagagaagaagaatatggaaaaaacatcataactcaagtaaaaaagag
aaaaacaagactgaaaatactagattaggagacaataggaagaggcta
```

Proteinsequenz (Aminosäuren 123-200)

```
KRPSSLERRNNRKGNGKGRSKSPRETGGKRHESSEKKERKGYSPTHREEEYGKNHHNSSKKE
KNKTENTRLGDNRKRL
```

6.3 Abkürzungen der Aminosäuren und Nucleinsäuren

Tab. 6.1: Abkürzungen der Aminosäuren

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

Tab. 6.2: Abkürzungen der Nucleinsäuren

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

7. Literatur

- Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 2007;261(6):511-28.
- Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100 Suppl 1:11830-5.
- Baker BS. The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 2006;144(1):1-9.
- Baker TA. Protein-DNA assemblies controlling lytic development of bacteriophage Mu. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(5):708-12.
- Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998;102(5):874-80.
- Barr PJ. Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* 1991;66(1):1-3.
- Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Dell'Amico E, Roselli M, Strohmeyer M, et al. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. *J Infect Dis* 2004;189(7):1291-4.
- Böer E, Steinborn G, Kunze G, Gellisen G. Yeast expression platforms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;77:513-23.
- Boman HG. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 2000;173:5-16.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48(1):1-12.

- Braun-Falco O, Korting HC. Der normale pH-Wert der menschlichen Haut. *Der Hautarzt* 1986;37:126-29.
- Broekaert W, Cammue B, de Bolle MF, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 1997;16(3):297 - 323.
- Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif* 2005;43(1):1-9.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(4):328-40.
- Chen VL, France DS, Martinelli GP. De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 1986;87(5):585-7.
- Cleland WW. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry* 1964;3:480-2.
- Contzler R, Favre B, Huber M, Hohl D. Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 2005;124(5):990-7.
- Dale BA, Presland RB, Lewis SP, Underwood RA, Fleckman P. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J Invest Dermatol* 1997;108(2):179-87.
- Dale BA, Scofield JA, Hennings H, Stanley JR, Yuspa SH. Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium. *J Invest Dermatol* 1983;81(1 Suppl):90s-5s.
- de Guzman Strong C, Conlan S, Deming CB, Cheng J, Sears KE, Segre JA. A milieu of regulatory elements in the epidermal differentiation complex syntenic block: implications for atopic dermatitis and psoriasis. *Hum Mol Genet* 2010;19(8):1453-60.

- Deligianni E, Pattison S, Berrar D, Ternan NG, Haylock RW, Moore JE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. *BMC Microbiol* 2010;10:38.
- Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol* 2008;180(3):451-8.
- Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. The initiating proteases of the complement system: controlling the cleavage. *Biochimie* 2008;90(2):387-95.
- Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E. Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1998;111(3):517-23.
- Elias PM. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 2005;125(2):183-200.
- Elias PM. Skin barrier function. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008;8(4):299-305.
- Fitzpatrick TB. *Dermatology in general medicine*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1993.
- Fluhr JW, Dickel H, Kuss O, Weyher I, Diepgen TL, Berardesca E. Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *Br J Dermatol* 2002;146(5):770-6.
- Ford AS, Baltch AL, Smith RP, Ritz W. In-vitro susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas* spp. to the new fluoroquinolones clinafloxacin and PD 131628 and nine other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 1993;31(4):523-32.
- Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 1990;29(40):9432-40.
- Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 1998;10(1):41-4.

- Gekko K, Timasheff SN. Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 1981;20:4667-76.
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology* 2007;2.
- Glaser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. *Nat Immunol* 2005;6(1):57-64.
- Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997;88(4):553-60.
- Hale JD, Hancock RE. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5(6):951-9.
- Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000;8(9):402-10.
- Hancock RE, Patrzykat A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002;2(1):79-83.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387(6636):861.
- Harder J, Glaser R, Schroder JM. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J Endotoxin Res* 2007;13(6):317-38.
- Harder J, Schroder JM. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 2002;277(48):46779-84.
- Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* 2004;17 Suppl 1:6-15.
- Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, Scott IR. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci* 2000;22(1):21-52.

- Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(8):3280-4.
- Hoffjan S, Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol* 2007;157(3):441-9.
- Huber M, Siegenthaler G, Mirancea N, Marenholz I, Nizetic D, Breitzkreutz D, et al. Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *J Invest Dermatol* 2005;124(5):998-1007.
- Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'Guin WM, Dale BA, Iizuka H. Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation. *Br J Dermatol* 1997;137(1):9-16.
- Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Presland RB, Dale BA, Iizuka H. Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest* 1998;78(10):1245-53.
- Jackson B, Tilli CM, Hardman MJ, Avilion AA, MacLeod MC, Ashcroft GS, et al. Late cornified envelope family in differentiating epithelia--response to calcium and ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 2005;124(5):1062-70.
- Krieg P, Schuppler M, Koesters R, Mincheva A, Lichter P, Marks F. Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* 1997;43(3):339-48.
- Kunkel TA. DNA replication fidelity. *J Biol Chem* 1992;267(26):18251-4.
- Lata S, Sharma BK, Raghava GP. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics* 2007;8:263.
- Lee SC, Kim IG, Marekov LN, O'Keefe EJ, Parry DA, Steinert PM. The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J Biol Chem* 1993;268(16):12164-76.

- Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, Suttman H, Sell M, Paulsen F, et al. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *Eur Urol* 2006;50(1):141-7.
- Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(9):727-38.
- Lester A, Andreasen JJ. In vitro susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from bacteremic and fibrocystic patients to four quinolones and five other antipseudomonal antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1988;20(5):525-9.
- List K, Szabo R, Wertz PW, Segre J, Haudenschild CC, Kim SY, et al. Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J Cell Biol* 2003;163(4):901-10.
- Lüllmann-Rauch R. *Histologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003.
- Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh NH. Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J Biol Chem* 2001;276(50):47445-52.
- Macritchie F. Proteins at interfaces. *Adv Protein Chem* 1978;32:283-325.
- Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, Gan SQ, Idler WW, Steinert PM. Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Mol Cell Biol* 1993;13(1):613-25.
- Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6(5):468-72.
- McKinley-Grant LJ, Idler WW, Bernstein IA, Parry DA, Cannizzaro L, Croce CM, et al. Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(13):4848-52.
- Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 1996;106(5):989-92.

- Moseley WS, Seldin MF. Definition of mouse chromosome 1 and 3 gene linkage groups that are conserved on human chromosome 1: evidence that a conserved linkage group spans the centromere of human chromosome 1. *Genomics* 1989;5(4):899-905.
- 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 1:263-73.
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Science, 2008.
- Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 1999;31(1):5-19.
- Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy* 2008;28(2):235-49.
- Oyston PC, Fox MA, Richards SJ, Clark GC. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 8):977-87.
- Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, Mendoza V, Hancock RE. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):605-14.
- Pazdzierny G. Antimikrobielle Peptide: Antibiotika der Zukunft? *Junior Rubin* 2003.
- Pearson DJ, Dale BA, Presland RB. Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J Invest Dermatol* 2002;119(3):661-9.
- Pearson DJ, Nirunsuksiri W, Rehemtulla A, Lewis SP, Presland RB, Dale BA. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp Dermatol* 2001;10(3):193-203.
- Presland RB, Bassuk JA, Kimball JR, Dale BA. Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J Invest Dermatol* 1995;104(2):218-23.

- Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunsuksiri W, Dale BA. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem* 1992;267(33):23772-81.
- Presland RB, Kimball JR, Kautsky MB, Lewis SP, Lo CY, Dale BA. Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 1997;108(2):170-8.
- Proksch E, Folster-Holst R, Jensen JM. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci* 2006;43(3):159-69.
- Rajan S, Saiman L. Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect* 2002;17(1):47-56.
- Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 1994;103(5):731-41.
- Resing KA, Thulin C, Whiting K, al-Alawi N, Mostad S. Characterization of profilaggrin endoproteinase 1. A regulated cytoplasmic endoproteinase of epidermis. *J Biol Chem* 1995;270(47):28193-8.
- Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(6):2421-31.
- Rudolph B, Podschun R, Sahly H, Schubert S, Schroder JM, Harder J. Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(9):3194-6.
- Sadler TW, Langman J. *Langman's medical embryology*. 9th ed. / T.W. Sadler ; original illustrations by Jill Leland ; computer illustrations by Susan L. Sadler-Redmond ; scanning electron micrographs by Kathleen K. Sulik and Jennifer Burgoon ; ultrasound images by Nancy Chescheir and Hytham Imseis. ed. Philadelphia ; London: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

- Sahly H, Schubert S, Harder J, Rautenberg P, Ullmann U, Schroder J, et al. Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(5):1739-41.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sandilands A, Smith FJ, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007;127(6):1282-4.
- Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 9):1285-94.
- Segre JA. Epidermal differentiation complex yields a secret: mutations in the cornification protein filaggrin underlie ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol* 2006;126(6):1202-4.
- Serre G, Mils V, Haftek M, Vincent C, Croute F, Reano A, et al. Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol* 1991;97(6):1061-72.
- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000;407(6805):762-4.
- Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 2006;38(3):337-42.
- Soballe PW, Maloy WL, Myrnga ML, Jacob LS, Herlyn M. Experimental local therapy of human melanoma with lytic magainin peptides. *Int J Cancer* 1995;60(2):280-4.
- Steinberg DA, Lehrer RI. Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. *Methods Mol Biol* 1997;78:169-86.
- Suelter CH, DeLuca M. How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. *Anal Biochem* 1983;135(1):112-9.

- Tang X, Nakata Y, Li HO, Zhang M, Gao H, Fujita A, et al. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 1994;22(14):2857-8.
- Todar K. Online Textbook of Bacteriology, 2009.
- Trotti A, Garden A, Warde P, Symonds P, Langer C, Redman R, et al. A multinational, randomized phase III trial of iseganan HCl oral solution for reducing the severity of oral mucositis in patients receiving radiotherapy for head-and-neck malignancy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58(3):674-81.
- Valore EV, Ganz T. Laboratory production of antimicrobial peptides in native conformation. *Methods Mol Biol* 1997;78:115-31.
- Volz A, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM, Mischke D. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics* 1993;18(1):92-9.
- Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Database issue):D933-7.
- Weinberg AN, Swartz MN. Bacterial diseases with cutaneous involvement. In: Fitzpatrick TB, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. *Dermatology in general medicine*. 4th ed. McGraw-Hill, New York, 1993.
- Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248(3):904-9.
- Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Glaser R, Schroder JM. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PLoS One* 2009;4(4):e5227.
- Xu Z, Wang MR, Xu X, Cai Y, Han YL, Wu KM, et al. Novel human esophagus-specific gene c1orf10: cDNA cloning, gene structure, and frequent loss of expression in esophageal cancer. *Genomics* 2000;69(3):322-30.

Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med* 2007;85(4):317-29.

Zhang D, Karunaratne S, Kessler M, Mahony D, Rothnagel JA. Characterization of mouse profilaggrin: evidence for nuclear engulfment and translocation of the profilaggrin B-domain during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 2002;119(4):905-12.

Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock RE, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):2921-7.

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder, für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die hervorragende Betreuung sowie die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für den Spaß bei der Laborarbeit, die entspannte Atmosphäre und die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen möchte ich mich ganz herzlich bei Anke, Bente, Britta, Claudia M., Claudia N., Doris, Elvira, Eske, Felix, Graziella, Heilwig, Joachim, Jutta, Kerstin, Manfred, Marlis, Regine, Uli und Zhihong bedanken. Außerdem danke ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik.

Für die Unterstützung bei der Durchführung von HPLC-Läufen danke ich Jutta, Anke, Claudia M. und Britta.

Mein besonderer Dank gilt Britta Hansmann, die mich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt hat. Sie hat sehr dazu beigetragen, dass ich mich vom ersten Tag meiner Arbeit im Labor an wohl gefühlt habe. Ihre zahlreichen Ratschläge, Hilfestellungen und aufmunternden Worte, wenn es mal nicht auf Anhieb klappte, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Liebe Britta, ich danke Dir dafür, dass Du Dir immer Zeit für mich genommen hast, sowohl, um mich bei den Experimenten im Labor zu unterstützen, als auch während der Phase des Zusammenschreibens. Vor allem danke ich Dir für die ständige Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Ratschläge und die gewissenhaften Korrekturen. Ich freue mich schon auf das HSV-Spiel, auch wenn es für Deinen geliebten Verein ja gerade leider nicht so rosig aussieht.

Ich danke meinem Kommilitonen und guten Freund Dennis Karsch. Wir haben gemeinsam mit der Laborarbeit begonnen und haben den Weg der Doktorarbeit zusammen beschritten. Dennis, ich danke Dir für den Spaß während der Laborarbeit, die Unterstützung bei den Experimenten und die Mittags- und Kaffeepausen im „IKEA“-Häuschen. Ich weiß, Du schimpfst immer noch auf die Currywurst und das „Schuhsohlen“-Steak. Ich danke Dir vor allem dafür, dass ich mich immer auf Dich verlassen konnte.

Außerdem danke ich Sarah und Jonathan für die netten gemeinsamen Stunden im Labor und den guten Informationsaustausch während der Phase des Zusammenschreibens.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ich danke meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, mir das Studium ermöglicht haben und mir das beste Zuhause, das man sich wünschen kann, geben. Liebe Mama, ich danke Dir für die tolle Reise durch Australien nach Abschluss meines Studiums und für alles, was Du für mich getan hast. Lieber Papa, ich danke Dir für die Durchsicht dieser Arbeit auf Fehler und ebenfalls für alles, was Du für mich getan hast.

Meinem Bruder Tobias danke ich für das ein oder andere „Care“-Paket aus seiner neuen Heimat, die Unterstützung bei der Formatierung dieser Arbeit und die zahlreichen Telefonate bzw. das „Chatten“. Du hast immer an meinen Erfolg geglaubt.

Meiner Schwester Mia danke ich ebenfalls für die vielen Telefonate, zwei tolle Reisen nach Australien und ein unvergessliches Wochenende in Wien im Regen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christian Felix Schulz
Geburtsdatum: 28.01.1983
Geburtsort: Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Andreas Schulz, Gymnasiallehrer
Elsbeth Schulz, geb. Lorenzen, MTA
Geschwister: eine Schwester, ein Bruder

Schulbildung:

1989 – 1993 Grund- und Hauptschule Suchsdorf
1993 – 2002 Humboldt-Schule Kiel
Juni 2002: Abitur

Auslandserfahrungen:

2002 – 2003 „Work and Travel“ in Australien über Council on International Educational Exchange e. V.

Studium:

2003 – 2009 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2006 Beginn der Promotion an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel unter Betreuung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder
November 2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10. Erklärung

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

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

Kiel, den 26.05.2010

Christian Felix Schulz