

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

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES PROFILAGGRIN-PROTEINS
FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ IN DER ANTIMIKROBIELLEN HAUTABWEHR**



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

vorgelegt von
SARAH BABIAN
aus Dannenberg
Kiel 2010

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Schröder
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Grötzing
Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2011
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.02.2011
gez. Herr Prof. Dr. Dr. Cascorbi

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Haut.....	1
1.1.1 Aufbau und Differenzierung der menschlichen Haut.....	1
1.1.2 Schutzmechanismen der menschlichen Haut	3
1.2 Antimikrobielle Peptide	4
1.2.1 Filaggrin	6
1.3 Zielsetzung der Arbeit	8
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Chemikalien	10
2.2 Oligonukleotide	10
2.3 Plasmide.....	11
2.4 Mikroorganismen	12
2.5 Molekularbiologische Methoden	12
2.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	12
2.5.1.1 Standard-PCR.....	12
2.5.1.2 „Nested-PCR“	14
2.5.1.3 Kolonie-PCR	15
2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese	17
2.5.3 Gelextraktion und -aufreinigung	17
2.5.4 Ligation.....	18
2.5.5 Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen.....	18
2.5.6 Transformation	18
2.5.7 Isolierung von Plasmid-DNA	19
2.5.8 Restriktionshydrolyse	19
2.5.9 DNA-Sequenzierung	20
2.6 Rekombinante Expression des Fusionsproteins in <i>E. coli</i> ..	20
2.6.1 Struktur des Expressionsvektors.....	20
2.6.2 Durchführung der Expression des Fusionsproteins.....	21
2.7 Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins	22
2.7.1 Aufschluss der Expressionsbakterien	22
2.7.2 Nickel-Affinitätschromatographie.....	23
2.7.3 C8-Umkehrphasen-HPLC	23

2.7.4	Spaltung des Fusionsproteins	24
2.7.5	C4-Umkehrphasen-HPLC	25
2.7.6	C2/C18-Umkehrphasen-HPLC.....	25
2.8	Proteinanalytik	26
2.8.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	26
2.8.2	Massenspektrometrie.....	26
2.8.2.1	Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie	26
2.8.2.2	AspN-Verdau für die MS-MS-Sequenzierung	27
2.8.2.3	Nanoelektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie	27
2.8.2.4	„Collision-induced dissociation“	27
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.9	Antimikrobielle Testung	28
2.9.1	Radialer Plattendiffusionstest.....	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Amplifikation der Profilaggrin-Sequenz	30
3.2	Klonierung im pGEM-T-Vektorsystem	31
3.2.1	Ligation und Transformation in <i>E. coli</i> TOP10 Zellen	32
3.3	Klonierung im pSUMO3-Vektorsystem.....	33
3.3.1	Ligation und Transformation in <i>E. coli</i> TOP10 Zellen	33
3.3.2	Transformation in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS Zellen	34
3.4	Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins	35
3.4.1	Expression des Fusionsproteins	35
3.4.2	Aufreinigung des Fusionsproteins	35
3.5	Aufreinigung des rekombinanten Profilaggrin-Proteins	37
3.5.1	Proteolytische Abspaltung des Fusionstags.....	37
3.5.2	Trennung des rekombinanten Profilaggrin-Proteins	38
3.6	AspN-Verdau und MS-MS-Sequenzierung	42
3.7	Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität.....	42
3.7.1	Radialer Plattendiffusionstest.....	42
4	Diskussion	44
5	Zusammenfassung	54
6	Anhang	56
6.1	Vektorkarten	56
6.1.1	pGEM-T-Vektor	56

6.1.2	pSUMO3-Vektor.....	56
6.2	Proteinsequenzen und -daten.....	57
6.2.1	Fusionsprotein des Profilaggrin-Fragmentes.....	57
6.2.2	Profilaggrin-Protein FLG ₃₆₀₅₋₃₈₉₇	57
6.2.3	Nukleotidsequenz.....	57
7	Literaturverzeichnis.....	58
8	Danksagung.....	64
9	Lebenslauf	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
cDNA	„mRNA complementary DNA“ (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HPLC	„High performance liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
kb	Kilo Basenpaare
LB-Medium	„lysogenic broth“-Medium
LEW-Puffer	„Lysis Equilibration Wash“-Puffer
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	„messenger RNA“
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
nm	Nanometer
PBS	„Phosphat buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TSB	“Tryptic soy broth”
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
μl	Mikroliter
∞	unendlich

Symbole des Einbuchstabencodes für Aminosäuren:

A	Alanin	G	Glycin	M	Methionin	S	Serin
C	Cystein	H	Histidin	N	Asparagin	T	Threonin
D	Asparaginsäure I		Isoleucin	P	Prolin	V	Valin
E	Glutaminsäure	K	Lysin	Q	Glutamin	W	Tryptophan
F	Phenylalanin	L	Leucin	R	Arginin	Y	Tyrosin

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenin	C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin	T	Desoxythymidin

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

1.1	Schematischer Aufbau der menschlichen Epidermis	2
1.2	Schematische Struktur des humanen Profilaggrins	7
3.1	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit Produkten der Standard-PCR	31
3.2	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel des Produktes der „Nested“-PCR	31
3.3	Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pGEM-T-Vektors mit FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉ -Insert in <i>E. coli</i> TOP10–Zellen	32
3.4	Kontrollgel der Plasmidisolierung des pGEM-T-Vektors mit Insert aus Flüssigmedium	33
3.5	Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉ -Insert in <i>E. coli</i> TOP10 Zellen	34
3.6	Kontrollgel der Plasmidpräparation des FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉ -Inserts im pSUMO3-Vektor aus Flüssigkultur	34
3.7	Kontrollgel der Kolonie-PCR nach Transformation des pSUMO3-Vektors mit FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉ -Insert in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	35
3.8	Repräsentatives Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten SUMO-Fusionsproteins mittels C8-Umkehrphasen-HPLC	36
3.9	Repräsentative massenspektrometrische Daten des rekombinant exprimierten SUMO-Fusionsproteins	37
3.10:	Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung einer SUMO-Protease 2-behandelten Probe des SUMO-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC	38
3.11	Repräsentative massenspektrometrische Daten des Profilaggrin-Proteins FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉	39
3.12	Silber-gefärbtes SDS-PAGE-Übersichtsgel des rekombinant hergestellten FLG-Proteins	40
3.13	Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung des Profilaggrin-Proteins FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉ mittels C2/C18- Umkehrphasen-HPLC	41
3.14	Repräsentative massenspektrometrische Daten des Profilaggrin-Proteins FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉	41
4.1	Prozessierung des humanen Profilaggrin in der epidermalen Differenzierung	52
6.1	Schematische Darstellung des pGEM-T-Klonierungsvektors	56
6.2	Schematische Darstellung des pSUMO3-Expressionsvektors	56

Tabellen

2.1	Verwendete Oligonukleotide	11
2.2	Parameter der C8-Umkehrphasen-HPLC	24
2.3	Parameter der C4-Umkehrphasen-HPLC	25
3.1	Radialer Plattendiffusionstest zur Testung antimikrobieller Aktivität des Profilaggrin-Proteins FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉	43

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut ist mit ihrer Gesamfläche von ca. 2 m² (Lüllmann-Rauch, 2003) eines der größten Organe des Menschen und stellt den Kontakt des Körpers zur äußeren Umwelt her. Sie ist permanent den verschiedensten Umwelteinflüssen ausgesetzt und hat viele wichtige Funktionen zum Schutz des Körpers vor Krankheiten und Dehydrierung inne. Gleichzeitig ist sie an Prozessen wie der Regulation der Körpertemperatur beteiligt und ermöglicht mit Hilfe ihrer Sensoren das Tasten und Fühlen zur Wahrnehmung der Umwelt. Obwohl neben der natürlichen Hautflora unzählige weitere Keime und Erreger, je nach Lokalisation zwischen 10² und 10⁷ Mikroorganismen/cm², die menschliche Haut besiedeln (Harder und Schröder, 2005) kann sie sich in den meisten Fällen sehr erfolgreich gegen Infektionen wehren und es kommt nur selten zu Schädigungen oder Erkrankungen in Folge des Eindringens von Mikroorganismen. Dazu trägt die Struktur der Haut in ihrem Aufbau und ihren Zellen ganz wesentlich bei.

1.1.1 Aufbau und Differenzierung der menschlichen Haut

Die Haut des Menschen gliedert sich in mehrere Schichten. Die äußerste Schicht bildet die Haut (Cutis), darunter liegt die Unterhaut (Subcutis). Die Cutis wird weiter unterteilt in Oberhaut (Epidermis) und Lederhaut (Dermis). Die Epidermis besteht aus mehrschichtigem verhornten Plattenepithel. Sie setzt sich aus vier Schichten zusammen (siehe Abb. 1.1). In der basal gelegenen Zellschicht, dem *Stratum basale*, befinden sich die in kleinen Gruppen liegenden Stammzellen, in denen die Mitosen stattfinden (Lüllmann-Rauch, 2003). So werden kontinuierlich neue Hautzellen der Epidermis, die Keratinozyten, gebildet, aus denen sich die gesamte Epidermis immer wieder neu regeneriert. Daneben liegen junge Keratinozyten, die vom *Stratum basale* aus die Stadien ihrer Differenzierung in den nachfolgenden Schichten durchlaufen. Im darüber liegenden *Stratum spinosum* verbinden sich die Keratinozyten verstärkt durch die Ausbildung von Desmosomen und der Aufbau des "Cornified Cell Envelope" beginnt mit der vermehrten Synthese struktureller Proteine und Lipide. Im folgenden *Stratum granulosum* bilden sich im Inneren der Zellen vermehrt Keratohyalin-Granula bei einem gleichzeitig beginnenden Verlust erster

Zellorganellen und der Umstrukturierung des Zytoskeletts. In der abschließenden Hautschicht, dem *Stratum corneum*, findet die terminale Differenzierung statt im Zuge derer die Keratinozyten absterben und als tote, verhornte Korneozyten ohne Zellkern und Organellen die äußerste Zellschicht der Epidermis bilden.

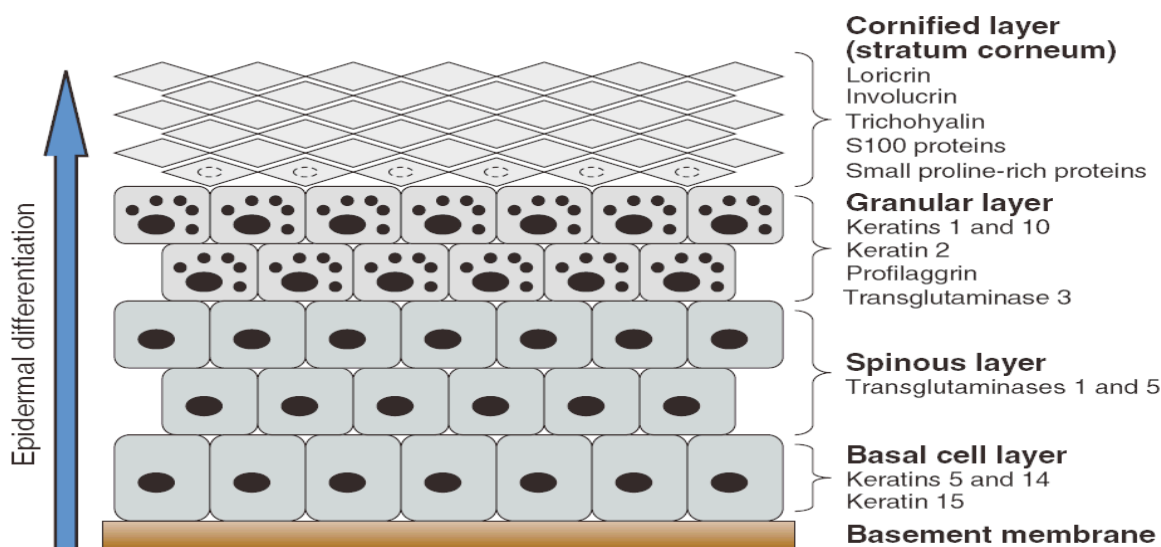


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der menschlichen Epidermis. Die Keratinozyten proliferieren im *Stratum basale* und durchwandern im Zuge ihrer Differenzierung die nachfolgenden Zellschichten, das *Stratum spinosum* und das *Stratum granulosum* (Keratohyalin-Granula als schwarze Punkte dargestellt) bis sie im abschließenden *Stratum corneum* als abgestorbene Korneozyten vorliegen (aus Sandilands *et al.*, 2009).

Der Zelltod im *Stratum corneum* unterscheidet sich von der Apoptose und wird als epidermaler programmierter Zelltod beschrieben (Polakowska und Haake, 1994; Lippens *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass Caspase 14, die ausschließlich in der Epidermis exprimiert wird, an diesem Vorgang beteiligt ist (Houben *et al.*, 2007). Die nun als Korneozyten bezeichneten verhornten Zellen besitzen keinen Zellkern oder Zellorganellen mehr und ihre Plasmamembran wurde vollständig durch den „Cornified Cell Envelope“ und extrazellulär angelagerte Lipide ersetzt. Dieser als widerstandsfähige Zellohülle verstandene "Cornified Cell Envelope" entsteht durch die kovalente Verknüpfung von Strukturproteinen wie Loricrin, das in so genannten L-Keratohyalin-Granula in der Zelle vorkommt, Involucrin und Filaggrin mit Hilfe von Transglutaminasen an der zytosolischen Seite der Plasmamembran (Nemes und Steinert, 1999; Presland und Dale, 2000; Kalinin *et al.*, 2001) sowie der Bindung extrazellulärer Lipide (Swartzendruber *et al.*, 1987). Die Lipide werden in die Lamellarkörper synthetisiert und gelangen anschließend durch Fusion dieser Lamellarkörper mit der Plasmamembran in den extrazellulären Raum. Sie werden

auch als „Lipid Envelope“ bezeichnet, der die epidermale Barriere weiter verfestigt (Madison, 2003). Im *Stratum corneum* schließlich ist die Plasmamembran der Zelle vollständig ersetzt durch vernetzte Proteine auf der zytosolischen Seite und durch die Lipidmatrix auf der extrazellulären Seite. Im Zuge der abschließenden Desquamation werden die Korneozyten an der Oberfläche der Epidermis von den vitalen Zellen abgeschuppt (Candi *et al.*, 2005).

1.1.2 Schutzmechanismen der menschlichen Haut

Die Haut des Menschen schützt sich auf ganz unterschiedliche Art und Weise um ihre vielfältigen Funktionen aufrechterhalten zu können.

Die Lipidbarriere sorgt dafür, dass möglichst wenig Flüssigkeit über die Hautoberfläche verloren geht und die Haut dadurch austrocknet. Diese Lipidschicht besteht aus langkettigen Fettsäuren, Cholesterin und ω -Ceramiden, in die die Korneozyten des *Stratum corneums* eingebettet sind (Weerheim und Ponc, 2001). Die Lipide werden von den Keratinozyten des *Stratum granulosum* sezerniert und extrazellulär an Proteine des „Cornified Cell Envelope“ sowie an Desmosomen gebunden. Einen zusätzlichen Schutz vor Austrocknung gewährleisten die Abbauprodukte des Strukturproteins Filaggrin. Sie tragen zum Aufbau des „Säureschutzmantels“ bei und bewirken als Feuchtigkeitsspender, dass mehr Wasser in der Epidermis zurückbleibt (Harding *et al.*, 2000; Kezic *et al.*, 2008). Die Wassermoleküle werden vor allem für enzymatische Prozesse wie die der Proteasen benötigt. Besteht hier ein Wassermangel, führt dies zu Störungen in der Differenzierung und Abschuppung der Epidermiszellen. Zusammen mit den Korneozyten bildet die Lipidschicht gleichzeitig eine mechanische Barriere gegen Eindringlinge. Das permanente Aufsteigen vitaler Keratinozyten bis zu ihrer Ausdifferenzierung und Abschuppung als Korneozyten des *Stratum corneums* dauert in der Regel etwa vier Wochen und führt zur ständigen Erneuerung der Epidermis (Houben *et al.*, 2007). Dadurch wird die übermäßige Kolonisierung durch adhärierende Mikroorganismen zusätzlich erschwert.

Neben dieser „physikalischen Barriere“ existiert der so genannte „Säureschutzmantel“ der Haut, der in Folge des relativ niedrigen pH-Wertes von 4,5 bis 5,0 dafür sorgt, dass sich Erreger nicht in allzu großer Anzahl auf der Haut ansiedeln oder in sie eindringen können (Boman, 2000).

Seit einigen Jahren wird zunehmend die Bedeutung einer „chemischen Barriere“ der Haut diskutiert, die ebenfalls zur Erhaltung der natürlichen Integrität der Haut beiträgt. Diese „chemische Barriere“ wird vor allem durch antimikrobielle Peptide repräsentiert (Harder *et al.*, 1997; Harder und Schröder, 2002; Gläser *et al.*, 2005), doch auch antimikrobiell wirksame Lipide konnten identifiziert werden (Drake *et al.*, 2008).

Darüber hinaus besitzt der Mensch neben den genannten Barrieren ein effizientes Abwehrsystem zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionen. Dabei werden zwei Systeme unterschieden, die eng zusammen arbeiten und sich gegenseitig ergänzen. Das angeborene Immunsystem wehrt Pathogene unspezifisch und unmittelbar mit dem ersten Kontakt ab. Es setzt sich aus neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen sowie verschiedenen Effektormolekülen des Komplementsystems zusammen. Das adaptive Immunsystem (spezifische Immunsystem) wird vor allem durch die B- und T-Lymphozyten repräsentiert. Die B-Lymphozyten sind in der Lage, spezifische Strukturen (Antigene) der Krankheitserreger zu erkennen und gezielt Antikörper zu bilden. Zu den T-Lymphozyten gehören die T-Helfer-Zellen, die verschiedene Zytokine zur Stimulierung der Immunantwort sezernieren, sowie zytotoxische T-Zellen, die in der Lage sind den Zelltod (Apoptose) der fremden Zelle zu induzieren, wenn sie an deren Oberfläche eine fremdartige Antigenstruktur erkannt haben. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten können zu Gedächtniszellen differenzieren, die bei erneutem Kontakt mit dem Erreger seine Antigenstruktur erkennen und innerhalb weniger Stunden eine angemessene Abwehrreaktion starten können (immunologisches Gedächtnis).

1.2 Antimikrobielle Peptide

Nachdem 1987 der amerikanische Forscher M. Zasloff zwei antimikrobiell wirkende Proteine (Magainine) aus der Haut von Fröschen isolierte (Zasloff, 1987), gelang es Mitte der 90er Jahre erstmals ein antimikrobielles Peptid, das humane Beta-Defensin-1 (hBD-1), im Blutplasma des Menschen zu identifizieren (Bensch *et al.*, 1995). Die Isolierung des humanen Beta-Defensin-2 (hBD-2) aus läsionalen Hautschuppen von Psoriasis-Patienten (Harder *et al.*, 2007) und die Entdeckung des humanen Beta-Defensin-3 (hBD-3) in humanen Keratinozyten (Harder *et al.*, 2001)

zeigten, dass auch die menschliche Haut antimikrobiell wirksame Peptide exprimiert und somit ein chemisches Abwehrsystem zur Eliminierung von Mikroorganismen besitzt. Doch auch bei der Untersuchung von gesunder Haut konnte ein Protein mit antimikrobieller Aktivität nachgewiesen werden, die Ribonuklease 7 (RNase 7) (Harder und Schröder, 2002). Diese Erkenntnis belegt, dass es in der menschlichen Haut Mechanismen gibt, die ihre Integrität wahren und sie fortwährend vor Infektionen zu schützen vermögen.

Die Eigenschaft das Wachstum von Mikroorganismen zu hemmen ist allen antimikrobiellen Peptiden gemein. Bisher lassen sie sich nach ihrer Struktur in die folgenden Hauptgruppen einteilen: Defensine, Cathelicidine, Ribonukleasen und S100-Proteine. Diese Proteine stellen phylogenetisch alte Effektormoleküle dar und gehören der angeborenen Immunabwehr an. Sie sind in Wirbellosen wie in Wirbeltieren (Lehrer *et al.*, 1993; Schröder, 1999; Zasloff, 2002) zu finden. Es handelt sich dabei um niedermolekulare Oligo- bis Polypeptide, die in der Lage sind über verschiedene Mechanismen für ein breites Spektrum mikrobieller Zellen bakteriostatisch oder bakterizid zu wirken. Die meisten antimikrobiellen Peptide liegen bei physiologischem pH-Wert kationisch vor. Diese Eigenschaft ermöglicht ihnen mit der negativen Ladung auf der Oberfläche von Mikroorganismen zu interagieren. Die Wechselwirkungen mit der Membran führen zur Ausbildung von Poren und dem Zusammenbruch des Membranpotentials, was in der Lyse des Bakteriums endet (Lehrer, 2004). Ein anderer Wirkmechanismus konnte bei Psoriasin beobachtet werden. Die antimikrobielle Wirkung auf *E. coli*-Bakterien zeigte sich *in vitro* abhängig von Zink und lässt vermuten, dass die Zink-bindende Domäne des Psoriasin die Funktion zur Abwehr von oxygenem Stress Zink-abhängiger Enzyme der *E. coli*-Bakterien stört (Harder und Schröder, 2005). Darüber hinaus können einige antimikrobielle Peptide als Entzündungsmediatoren zur Zytokinfreisetzung, als Induktoren von Angiogenese und Wundheilung sowie als chemotaktische Faktoren fungieren (Liu *et al.*, 2002; Cole und Lehrer, 2003). Dabei werden einige kontinuierlich sezerniert und sind somit auch auf gesunder menschlicher Haut nachzuweisen (z. B. RNase 7), während andere erst durch Kontakt mit Mikroorganismen oder im Rahmen von Entzündungen oder Infektionen vermehrt in den Epithelzellen gebildet werden. Zu diesen induzierbaren antimikrobiellen Proteinen gehören unter anderem die humanen Beta-Defensine hBD-2 und hBD-3. In den letzten Jahren konnten neue Erkenntnisse zu den

Proteinen der „S100 Fused Type“-Familie gewonnen werden. Im Jahre 2008 zeigte die Expression von rekombinanten humanen Hornerin-Fragmenten, dass das Hornerin-Protein in mehrere antimikrobiell wirksame Peptide prozessiert wird (Wu, 2005). Damit gab es neue Hinweise, dass Hornerin, welches im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* gesunder Haut exprimiert wird (Wu *et al.*, 2009), mit Hilfe eines noch nicht ausreichend geklärten Mechanismus zur Abwehr der Haut beiträgt. Im vergangenen Jahr ließ sich für C-terminale Sequenzen von Filaggrin-2 (Ifapsoriasin) ebenfalls antimikrobielle Aktivität nachweisen (Hansmann, 2008).

1.2.1 Filaggrin

Filaggrin wurde 1981 erstmals aus dem *Stratum corneum* isoliert und aufgrund der Beobachtung, dass es mit Keratinfilamenten in den Hautzellen interagiert, beschreibend „Filament-aggregating protein“ oder kurz „Filaggrin“ genannt (Steinert *et al.*, 1981). Es gehört zur Familie der humanen "S100 Fused Type"-Proteinen, die sich durch die Ca^{2+} -bindenden S100- und EF-Hand-Domänen sowie ihre vielen sich wiederholenden Einheiten („Repeats“) auszeichnen. Weitere Proteine dieser Familie sind Trichohyalin-like 1, Trichohyalin, Repetin, Hornerin, Filaggrin-2 (Ifapsoriasin) und Cornulin. Das *Filaggrin*-Gen befindet sich in der Region 1q21.3 des humanen Chromosom 1 im so genannten „Epidermalen Differenzierungskomplex“. Dieser enthält über 40 Gene von Schlüsselproteinen, die in den epidermalen Differenzierungsvorgang involviert sind, wie beispielsweise auch die Strukturproteine Loricrin und Involucrin (Volz *et al.*, 1993; Mischke *et al.*, 1996).

Die genomische Sequenz von Filaggrin weist die für diese Familie typische Struktur auf und setzt sich aus drei Exon- und zwei Intronbereichen zusammen (Gan *et al.*, 1990; Presland *et al.*, 1992). Das erste Exon besitzt eine Größe von 51 bp und beinhaltet den nicht kodierenden Bereich der 5'-untranslatierten Region.

Das mit 150 bp größere zweite Exon enthält das Startkodon und kodiert für die S100-Domäne. Das große dritte Exon enthält die kodierende Sequenz für die EF-Hand-Domäne, die Tandemsequenzwiederholungen und die 3'-untranslatierte Region (siehe Abb. 1.2 A).

Das aus 4061 Aminosäuren bestehende histidinreiche Vorläuferpeptid Profilaggrin (GenBank accession number NM_002016) umfasst zehn bis zwölf Filaggrin-Repeats flankiert von trunkierten Filaggrin-Sequenzen sowie zwei Ca^{2+} -Bindungsdomänen am N-Terminus, eine S100- und eine EF-Hand-Domäne, und die abschließende

C-terminale Domäne (siehe Abb. 1.2 B).

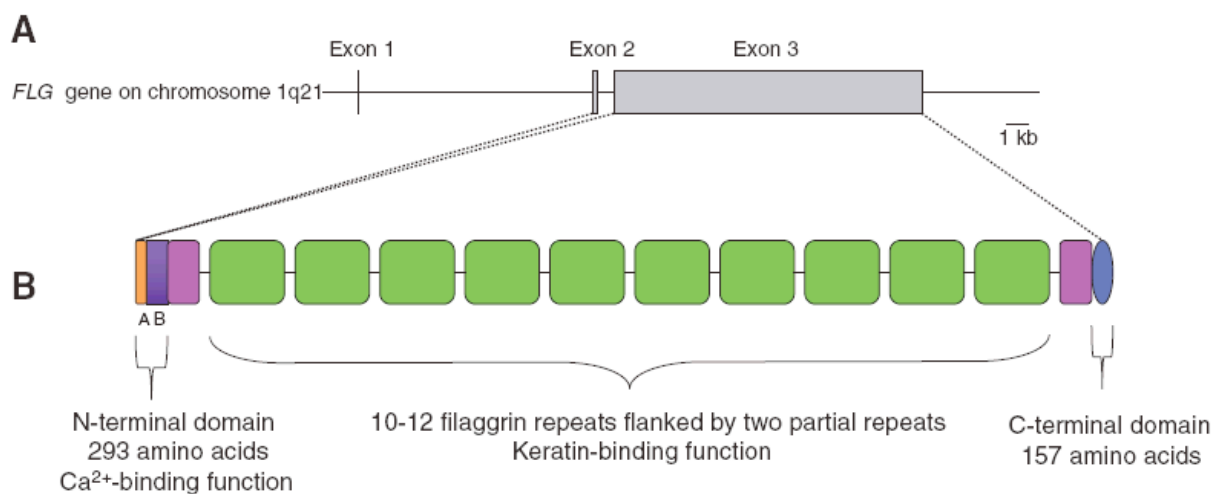


Abb. 1.2: Schematische Struktur des humanen Profilaggrins. **A:** Das Profilaggrin-Gen *FLG* liegt im „Epidermalen Differenzierungskomplex“ auf Chromosom 1q21 und setzt sich aus drei Exon- und zwei Intronbereichen zusammen, wobei der Großteil der für Profilaggrin kodierenden Sequenzen im Exon 3 enthalten sind. **B:** Am N-Terminus besitzt Profilaggrin zwei Ca²⁺-Bindungsdomänen (A-Domäne, orange) und eine B-Domäne (dunkellila). Darauf folgen 8-12 Keratin-bindende Filaggrin-Repeats (grün), umrahmt von jeweils einer trunkierten Filaggrin-Sequenz (helllila). Jede Filaggrin-Einheit umfasst 324 Aminosäuren und wird von den benachbarten Repeat-Einheiten durch kurze Linkersequenzen getrennt. Am C-Terminus befindet sich eine 157 Aminosäuren lange Domäne (aus Sandilands *et al.*, 2009).

Filaggrin wird im *Stratum granulosum* in den Keratinozyten als unlösliches Propeptid Profilaggrin synthetisiert (Resing *et al.*, 1995a) und in F-Keratohyalin-Granula gespeichert (Steven *et al.*, 1990). Während des Differenzierungsprozesses der Keratinozyten wird Profilaggrin in aktive Filaggrin-Einheiten gespalten. Diese sind an der Ausbildung des „Cornified Cell Envelope“ beteiligt. Die durch weitere Prozessierung entstehenden Abbauprodukte des Filaggrins dienen als „Natural Moisturizing Factors“ als wichtige Feuchtigkeitsspender der Haut (Kezic *et al.*, 2008).

Untersuchungen von Mäusen zeigten, dass Filaggrin vor allem in der murinen Epidermis, aber auch im Ösophagus, im Vormagen und in der Zunge exprimiert wird (Makino *et al.*, 2003).

Das in dieser Arbeit untersuchte Fragment des Profilaggrins beinhaltet die Aminosäuren 3605 bis 3879 und schließt einen Teil des letzten Filaggrin-Repeats sowie einen Teil des trunkierten Filaggrins am C-Terminus mit ein. Das 274 Aminosäuren umfassende Protein besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 28731 Da. Der pI-Wert beträgt 7,49 und der Extinktionskoeffizient 4470 l/(mol x cm). Da ein C-terminales Peptidfragment des Filaggrin-2, welches wie

Profilaggrin der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie angehört, antimikrobielle Aktivität zeigte (Hansmann, 2008), ist es möglich, dass auch homologe Profilaggrin-Fragmente antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Zudem gaben Untersuchungen von Patienten mit Atopischer Dermatitis und Ichthyosis vulgaris Anlass, weitere Analysen zur Funktion von Filaggrin zu veranlassen. Es ist bereits bekannt, dass bei der Mehrheit der Patienten dieser chronisch entzündlichen Hauterkrankungen die Expression bzw. die Prozessierung von Profilaggrin zu funktionellen Filaggrin-Einheiten gestört ist und die geschädigte Hautbarriere zu dem Erscheinungsbild dieser Krankheiten führt (Palmer *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). Die Ursache konnte auf Genebene aufgedeckt werden, da viele Patienten Mutationen im *Filaggrin*-Gen aufweisen (Sandilands *et al.*, 2007).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits für eine Reihe von Proteinen der Epidermis eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden, unter anderem für Proteinfragmente des „S100-Fused-Type-Protein“ Hornerin und Fragmente des Filaggrin-2 (Ifapsorin). Ein weiteres Mitglied dieser Proteinfamilie ist Profilaggrin. Da es sich hierbei mit einer Größe von über 400 kDa um ein sehr großes Protein handelt, ist die Vervielfältigung schwierig und eine Sequenzierung des gesamten Proteins nicht möglich (Sandilands *et al.*, 2007). Daher sollten Untersuchungen einzelner, strukturell klar definierter Profilaggrin-Fragmente durchgeführt werden. Im Rahmen der Dissertationen von Dennis Karsch und Christian Schulz wurde bereits für verschiedene N-terminale Peptidfragmente antimikrobielle Aktivität gegen unterschiedliche Mikroorganismen gezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Teilsequenz des C-Terminus von Profilaggrin ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften besitzt. Ziel war es, das Filaggrin-Fragment FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ (siehe 6.2.2) rekombinant herzustellen und anschließend hinsichtlich antimikrobieller Aktivität gegenüber verschiedenen Mikroorganismen zu analysieren. Zu diesem Zweck musste die Teilsequenz des Profilaggrins zunächst mittels PCR amplifiziert und in ein Vektorsystem integriert werden. Im Anschluss wurde dieser Vektor in Bakterienzellen kultiviert, die das rekombinante Protein exprimieren konnten. Die anschließenden Untersuchungen im Radialen Plattendiffusionstest sollten eine Aussage liefern, ob das C-terminal

lokalierte Filaggrin-Fragment FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ einen direkten Beitrag zur angeborenen Hautabwehr leistet.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNA Ladder	Fermentas, Wilna, Litauen
100 bp TriDye Ladder	New England Biolabs, Ipswich, USA
Acetonitril	Promochem GmbH, Wesel
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
EDTA	Gibco, Eggenstein
Glycerin	USB, Cleveland, USA
H ₂ O (für HPLC)	Promochem GmbH, Wesel
Smart-DNA-Ladder	Eurogentec, Seraing, Belgien
TFA (Trifluoressigsäure)	Promochem GmbH, Wesel

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Chemie (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die sowohl bei den unten aufgeführten PCRs als auch bei der Sequenzierung als Primer dienten, wurden von der Firma Sigma-Genosys (Deisenhofen) bezogen. Die Primer der Sumo-PCR haben eine Länge von 33 Nukleotiden, wobei sich jeweils eine Sequenz von 20 Nukleotiden spezifisch an das Fragment anlagert (siehe Tab. 2.1). Die zusätzlichen Nukleotide bilden einen Überhang, der beim 5'-Primer (Sumo3-flg-2F) eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bsal* und beim 3'-Primer (Sumo3-flg-2R) für das Enzym *NotI* enthält (fettgedruckt). Die Arbeitslösungen aller Primer hatten eine Konzentration von 10 μ M.

Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Schmelztemperatur T_m
Flg-c2F1	CATCACGAAGACAGAGCCGGTCAC	72,9°C
Flg-c2F2	AATCAGGCACTCATCATGCAGAGAA	69,8°C
Flg-c2F3	TCCAGACAATCAGGCACTCATCAT	68,8°C
Flg-c2R2	GGCTGTATCGCGGTGAGAGGAT	70,4°C
Sumo3-flg-2F	AAGGTCTCAAGGTT CCTCTGGTGGACAGGCTGC	80,7°C
Sumo3-flg-2R	AAGCGGCCGCTT ATCGCCTCTCAGAGTCCTCTG	82,5°C
Sumo-F	TCAATGAGGCAGATCAGATT	56,0°C
T7 term short	CTAGTTATTGCTCAGCGG	56,0°C
M13-F	TGTA AACGACGGCCAGT	61,7°C
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	55,5°C

Die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme *Bsal* (Sumo3-flg-2F) und *NotI* (Sumo3-flg-2R) sind fettgedruckt.

2.3 Plasmide

Zur Vervielfältigung des PCR-Produktes wurde der Klonierungsvektor pGEM-T (2,9 kb, Promega) gewählt, der Schnittstellen für die Enzyme *Bsal* und *NotI* (10 U/μl; NEB) aufweist (siehe 6.1.1). Diese Klonierungsstrategie bietet neben der effizienten Vervielfältigung des PCR-Produktes weitere Vorteile. Der Prozess wird durch die Bakterien selbst zusätzlich kontrolliert und sie können gleichzeitig als Speicherform dienen. Darüber hinaus kann nach dem Herausschneiden des Inserts aus dem Vektor mittels Gelelektrophorese überprüft werden, ob dieser Schritt erfolgreich war, da das Insert mit einer Größe von 822 bp von dem Vektor (2900 bp) bzw. halbverdaulichem Material deutlich getrennt wird. Ein genereller Vorteil von Vektorsystemen ist die Möglichkeit der Bearbeitung mit verschiedenen Restriktionsenzymen.

Für die Expression des rekombinanten Proteins wurde in den Expressionsvektor pSUMO3 („Small ubiquitin-like modifier“; 5,6 kb, LifeSensors) ligiert. Der pSUMO3-Vektor (siehe 6.1.2) weist von den Enzymen *Bsal* und *BamHI* (10 U/μl; NEB) generierte Nukleotid-Überhänge auf. Da das einzufügende Insert ebenfalls Schnittstellen für *BamHI* besitzt, konnte dieses Enzym nicht verwendet werden, da sonst auch das Insert geschnitten würde. Aus diesem Grund wurde der Vektor mit dem Enzym *NotI* verdaut, sodass die sich im Vektor befindliche *NotI* Schnittstelle freigelegt wurde und die Schnittstellen kompatibel zu den Enden des Inserts waren.

2.4 Mikroorganismen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen handelt es sich um die Gram-negativen, stäbchenförmigen *Escherichia coli* aus der Familie der Enterobakterien.

Zum Anzüchten einer großen Anzahl von Kolonien, deren Mikroorganismen das Insert enthalten, wurde der Vektor mit dem Insert zunächst in *E. coli* TOP10 Zellen (Invitrogen) transformiert. Da diese Bakterien das Fusionsprotein jedoch nicht exprimieren, wurde die Proteinexpression von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen (Chloramphenicol-Resistenz, Novagen) ausgeführt.

Für die antimikrobielle Testung wurden der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die Gram-negativen Stämme *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433 ausgewählt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; Mullis *et al.*, 1986) ist es möglich, genau definierte DNA-Fragmente *in vitro* spezifisch zu amplifizieren. Dazu werden neben der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz Oligonukleotide (Primer), eine DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine Pufferlösung, die dem Enzym ein geeignetes Arbeitsmilieu schafft, benötigt. Die PCR läuft in unterschiedlichen Phasen ab, die sich in Zyklen wiederholen. Nach der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 94-95°C wird die Temperatur Primer-spezifisch, d. h. abhängig von ihrer Schmelztemperatur, herabgesetzt, damit sich diese an die Einzelstränge anlagern können („Annealing“). An diese Phase schließt sich die Elongation an, in der die DNA-Polymerase die Einzelstränge mit den komplementären Nukleotiden verbindet und so semi-konservativ neue DNA-Doppelstränge synthetisiert. Diese Doppelstränge bilden im nächsten Zyklus die Ausgangsmatrizen für eine erneute Amplifikation.

2.5.1.1 Standard-PCR

In der Standard-PCR wurde mit Hilfe spezifischer Primer zunächst ein größeres Fragment der humanen Keratinozyten-cDNA amplifiziert. Dieses diente bei der

weiteren Vervielfältigung als Matrize für kürzere Fragmente (Prinzip der „Nested-PCR“, siehe 2.5.1.2). In der ersten Standard-PCR wurde die *Pfu* Ultra Hotstart DNA-Polymerase zur Generierung des Fragments gewählt, da sie eine „Proof-Reading“-Funktion besitzt. Das bedeutet, dass sie aufgrund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität fehlerhaft eingebaute Nukleotide während der Strangsynthese erkennt und diese entfernt. Die *Pfu*-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus*. Da die erste Standard-PCR keine Produkte entstehen ließ, wurde in der folgenden PCR die Advantage 2 DNA-Polymerase eingesetzt. Der Vorteil hierbei liegt darin, dass es sich um einen Enzymmix aus einer *Taq*-Polymerase und 10% *Pfu*-Polymerase handelt und somit größere Fragmente (hier 940 bp) sicherer amplifiziert werden können. *Taq*-Polymerasen werden aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Die Elongationszeit wurde abhängig von dem eingesetzten Enzym berechnet (Richtwert für die *Pfu*-Polymerase 500 bp/min; *Taq*-Polymerase 1000 bp/min).

Ein Standard-PCR-Ansatz (30 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

3,0 µl Puffer (10 x Cloned *Pfu*-Buffer, Stratagen); Puffer (10x, Clontech)
 0,6 µl dNTPs (10 mM)
 2,0 µl cDNA ; 3 µl 1:10 verdünnte PCR1-Produkte mit cDNA 28/ 35
 0,6 µl Flg-c2F1- /Flg-c2F2- /Flg-c2F3-Primer (10 µM)
 0,6 µl Flg-cR- /Flg-c2-R2-Primer (10 µM)
 0,6 µl *Pfu* Ultra Hotstart DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Stratagen)
 Advantage 2 DNA-Polymerase (15-25 U/µl, Clontech)
 H₂O ad 30 µl

Die erste Standard-PCR wurde unter folgenden Bedingungen im Thermocycler (PTC-200, MJ Research, USA) durchgeführt:

95°C	7 min	
95°C	30 sec	} 33 Zyklen
61°C	30 sec	
72°C	90 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Die zweite Standard-PCR wurde als „Touch-down-PCR“ durchgeführt. Hierbei erfolgt zyklusweise eine Annäherung der Annealing-Temperatur an die zu erwartende Schmelztemperatur der Primer um die Spezifität der Primerbindungen zu erhöhen.

Parameter der „Touch-down-PCR“:

95°C	2 min		
94°C	30 sec	}	5 Zyklen
70°C	90 sec		
94°C	30 sec	}	5 Zyklen
68°C	90 sec		
94°C	20 sec	}	30 Zyklen
66°C	30 sec		
72°C	90 sec		
72°C	10 min		
4°C	∞		

2.5.1.2 „Nested-PCR“

Zur Amplifikation der humanen Keratinozyten-cDNA wurde das Verfahren der „Nested-PCR“ gewählt, welches auf der Hintereinanderschaltung zweier PCR-Reaktionen („Nested-PCR“ = verschachtelte PCR) basiert. Zunächst wird mit Hilfe eines ersten Primer-Paares ein größeres Fragment amplifiziert (siehe Standard-PCR, 2.5.1.1). Die Produkte dieser PCR dienen als Matrize für die darauf folgende PCR, bei der ein weiter innen liegendes Primer-Paar ein kürzeres Fragment entstehen lässt. Die Wahl dieser Methode erfolgte aus dem Grund, dass die verwendeten Primer nicht-genspezifische Ankersequenzen für Restriktionsschnittstellen besitzen und dadurch leicht unspezifische Produkte gebildet werden.

Im Ablauf der PCR wurden zunächst zehn Zyklen ähnlich denen der Standard-PCR durchgeführt, da zu Beginn der Amplifikation die Primer nur mit der genspezifischen Teilsequenz komplementär zur Matrize sind. Nach einigen Zyklen werden jedoch auch die künstlich angefügten Nukleotidüberhänge für die Restriktionsschnittstellen mitverlängert, sodass sich die spezifische Schmelztemperatur erhöht und die Annealing- und Elongationstemperatur in den folgenden 25 Zyklen zusammengelegt werden können. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des Fragments und betrug als Richtwert etwa 1 min pro 500 bp.

Die Zusammensetzung des Ansatzes (50 μ l) war wie folgt:

5 μ l	Puffer (10x, Stratagen)
1 μ l	dNTPs (10mM)
1 μ l	Sumo3-flg2-F (10 μ M)
1 μ l	Sumo3-flg2-R (10 μ M)
5 μ l	1:50 verdünnte cDNA aus Standard-PCR
1 μ l	<i>Pfu</i> Ultra Hotstart DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l, Stratagen)
H ₂ O ad 50 μ l	

Für die PCR wurden nachfolgende Bedingungen gewählt:

95°C	60 sec	} 10 Zyklen
94°C	30 sec	
54°C	30 sec	
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	} 25 Zyklen
72°C	60 sec	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Nach Ablauf der gesamten PCR wurde dem Ansatz 1 μ l *Taq*-Polymerase (5 U/ μ l, Invitrogen) hinzugefügt und die Probe verblieb für weitere 20 min bei 72°C im Thermocycler. Das Enzym generiert 3'-Desoxyadenosinphosphat-Überhänge, die komplementär zu den 3'-Desoxythymidinphosphat-Überhängen der verwendeten Vektoren sind. Somit ist die Voraussetzung für die Ligation der PCR-Produkte als Insert in die jeweiligen Vektoren geschaffen.

2.5.1.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Überprüfung, ob die Bakterien im Zuge der Transformation den Vektor mit dem Insert aufgenommen haben. Infolge der zehnmütigen Erhitzung im Thermocycler bei 95°C werden die Bakterien lysiert und die DNA wird als Template für die Amplifikation zugänglich gemacht. Durch die Wahl der Primer lässt sich zum einen nachvollziehen, ob sich das Fragment im Vektor befindet, zum anderen, ob sich dieser geschlossen hat und die Orientierung des Inserts im zirkulären Vektor korrekt ist. Daher wird entweder der eine Primer spezifisch für das Insert gewählt, während der andere Primer außerhalb dieser Sequenz bindet (angewandt beim pSUMO3-Vektor) oder beide Primer binden außerhalb der Sequenz (angewandt beim pGEM-T-Vektor). Für die Kolonien, deren Bakterien den pGEM-T-Vektor aufgenommen hatten, wurden die Primer M13-F

sowie M13-R und als Enzym die *Taq*-Polymerase (5 U/ μ l, Invitrogen) verwendet. Bakterienkolonien, in die der pSUMO3-Vektor transformiert wurde, wurden mit Hilfe des Sumo3-flg-2F- und des T7 term short-Primers sowie der AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/ μ l, Roche) kontrolliert. Zur Gewinnung des Bakterienmaterials wurden mit einer sterilen Pipettenspitze zehn Einzelkolonien von der Agarplatte aufgenommen und jeweils in einem 20 μ l PCR-Ansatz resuspendiert.

Der PCR-Ansatz der Kolonie-PCR des pGEM-T-Vektors enthielt:

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

Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt:

<u>95°C</u>	10 min	} 35 Zyklen
94°C	30 sec	
50°C	30 sec	
<u>72°C</u>	90 sec	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Der PCR-Ansatz der Kolonie-PCR des pSUMO-Vektors enthielt:

2,0 μ l Puffer (10 x, Roche)
 1,2 μ l MgCl₂ (25 mM, Roche)
 0,4 μ l dNTPs (10 mM)
 0,4 μ l Sumo-flg-2F-Primer (10 μ M)
 0,4 μ l T7 term short-Primer (10 μ M)
 0,1 μ l AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/ μ l, Roche)
 H₂O ad 20 μ l

Es wurden nachstehende Bedingungen gewählt:

<u>95°C</u>	10 min	} 30 Zyklen
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
<u>72°C</u>	90 sec	
72°C	7 min	
4°C	∞	

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Dieses Verfahren ermöglicht die Auftrennung von PCR-Produkten und Plasmiden sowie die Bestimmung ihrer Größe mit Hilfe von Größen- und Massenstandards, deren Banden jeweils eine definierte Länge haben. Es wird ein elektrisches Feld aufgebaut, sodass die negativ geladenen DNA-Fragmente durch das Agarosegel in Richtung positiv-geladener Anode wandern und sich dabei auftrennen, da kleine Moleküle schneller wandern als größere.

Ein 1%-iges Gel wurde hergestellt aus 1 g Agarosepulver, welches in 100 ml 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgeköcht wurde und sich darin vollständig löste. Nach Abkühlen auf circa 50°C folgte die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zur späteren Detektion der Banden unter der UV-Lampe (High Performance Transilluminator, Ultraviolet Produkts, USA). Das noch flüssige Agarosegel wurde in die horizontale Elektrophoresekammer (Horizon, Life Technologies) gegossen und härtete bei RT aus. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Ladepuffer LVI (6 x, 0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) versetzt und neben dem DNA-Marker (je nach Größe der DNA-Fragmente 100 bp- oder 1 kb- DNA-Leiter) aufgetragen. Daraufhin wurde an die Kammer eine Spannung angelegt und die Proben liefen solange im Gel bis sich die Banden des Markers aufgetrennt hatten.

2.5.3 Gelextraktion und -aufreinigung

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das DNA-Material im Gel durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht. Mit Hilfe der DNA-Leiter als Größenstandard konnte die Größe der Fragmente bestimmt werden. Jene Banden, die für die Weiterarbeit bestimmt waren, wurden mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Um das DNA-Material aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde es nach dem „Qiaex II Agarose Gel Extraction Protocol“ (Qiagen, Hilden) gereinigt und mit 30 µl Tris HCl-Puffer (10 mM, pH 8,5) eluiert. Zur Kontrolle der Aufreinigungsprozedur und Bestimmung der Konzentration wurde mit 2-4 µl der Proben eine erneute Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.5.4 Ligation

Ziel der Ligation ist es die Schnittstellen der DNA-Sequenz und des Vektors durch eine Ligase miteinander zu verbinden, damit der geschlossene Vektor im weiteren Klonierungsprozess in Bakterien transformiert werden kann. Die DNA-Sequenz wurde zuvor mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bsal* und *NotI* geschnitten und das jeweilige Plasmid (pGEM-T- bzw. pSUMO3-Vektor) ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut, sodass das Plasmid nun wie die DNA-Sequenz linear vorlag und ihre Enden kompatibel waren. Zudem hat die *Taq*-Polymerase so genannte „sticky ends“ entstehen lassen (siehe 2.5.1.2). Die Ligationsansätze enthielten 30 ng PCR-Produkt, 25 bzw. 30 ng Vektor (pGEM T- bzw. pSUMO3-Vektor), 0,7 µl T4 Ligase (3 U/µl, Promega) und wurden in Ligationspuffer (Promega) auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Das Verhältnis von Vektor zu Insert wurde so eingestellt, dass das Insert mindestens im 5-fachen molaren Überschuss vorlag. Die Ligationsansätze sowie eine Probe mit linearem Vektormaterial zur Kontrolle, ob dieser mit sich selbst religiert, wurden für zehn Stunden bei 16°C inkubiert.

2.5.5 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Mikroorganismen werden als kompetent bezeichnet, wenn sie für die Aufnahme von in Lösung befindlicher DNA geeignet sind. Um diese Voraussetzung für die Transformation zu schaffen, wurden die Bakterien mit Calciumchlorid behandelt und anschließend einem Hitzeschock ausgesetzt. Diese chemische Vorbehandlung wurde nach dem Protokoll im T-Cloning Kit Manual (Fermentas, Kanada) durchgeführt.

2.5.6 Transformation

Dieser Vorgang beschreibt die Aufnahme des geschlossenen Vektors in kompetente Bakterienzellen und wurde nach dem modifizierten Protokoll von Tang und Mitarbeitern (Tang *et al.*, 1994) durchgeführt. Das Ligationsvolumen wurde zunächst 1:5 bzw. 1:10 mit H₂O verdünnt, um ein größeres Volumen zu erhalten, welches sich leichter pipettieren und mit den Bakterien mischen ließ. Von diesem verdünnten Volumen wurden 10 µl für die Transformation in 50 µl kompetente *E. coli* TOP10-Zellen eingesetzt. Nach Inkubation für 25 min auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sec durchgeführt. Darauf folgten weitere 3 min auf Eis und die Zugabe

von 300 µl vorgewärmter (37°C) SOC-Nährlösung (0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Pepton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM D-Glucose) pro Ansatz. Im Anschluss an eine einstündige Inkubation bei 37°C und 700 rpm wurden die Bakterien auf vorgewärmten (37°C) LB-Agarplatten (Stammlösung: 10 g NaCl, 10 g Soja-Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, H₂O ad 1l, pH 7,4) ausplattiert und über Nacht weiter bei 37°C inkubiert. Die Agarplatten enthielten bereits die Antibiotika (50 µg/ml Carbenicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol oder 50 µg/ml Kanamycin), für die die Mikroorganismen eine Resistenz auf ihrem Vektor trugen. So war nur ein Wachstum derjenigen Bakterien möglich, die den Vektor aufgenommen hatten. Jeweils zehn Einzelkolonien pro Platte wurden daraufhin mittels Kolonie-PCR (siehe 2.5.1.3) auf das Insert überprüft. Bei erfolgreicher Transformation wurde von der jeweiligen Kolonie eine Flüssigkultur mit LB-Medium über Nacht angesetzt und das Plasmid am Folgetag aufgereinigt.

2.5.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung des Plasmids aus den Bakterien der LB-Flüssigkulturen erfolgte nach dem „NucleoSpin® Plasmid QuickPure“-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den genauen Angaben des Herstellers. Das Eluat (isoliertes Plasmid in 30 µl AE-Puffer) wurde mittels einer Gelelektrophorese (0,8%-iges Agarosegel) überprüft und die Konzentration mittels Vergleich der Intensität der Banden bestimmt.

2.5.8 Restriktionshydrolyse

Zunächst war das Insert in den Klonierungsvektor pGEM-T kloniert worden. Ziel war es eine ausreichende Menge an DNA-Material zu gewinnen. Anschließend musste das Insert in einem Restriktionsverdau von den Restriktionsendonukleasen *Bsa*I und *Not*I (10 U/µl; NEB) aus dem Klonierungsvektor wieder herausgeschnitten werden, damit es in den Expressionsvektor pSUMO3 ligiert werden konnte. In diesem Vektorsystem wurde das Fusionsprotein von den Bakterien *E. coli* BL21 (DE3) pLysS letztlich exprimiert.

Protokoll des Restriktionsverdau (52 μ l):

5,0 μ l Puffer (NE Buffer 3, 10 x)
0,5 μ l BSA (Bovines Serumalbumin; 100 x, NEB)
2,0 μ l *NotI* (10 U/ μ l)
10 μ l pGEM-T-Vektor (100 ng/ μ l)
H₂O ad 50 μ l
Inkubation bei 37°C für drei Stunden
+ 2 μ l *BsaI*
Inkubation bei 50°C für drei Stunden
65°C für 20 min
4°C ∞

Nach dem Restriktionsverdau wurde der Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Weiterarbeit wurde die Bande des Inserts herausgeschnitten und mit Hilfe der Gelextraktion in 25 μ l Tris HCl eluiert.

2.5.9 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden Plasmide ausgewählt, die sich in der Kolonie-PCR und nach der Plasmidpräparation positiv im Agarosegel zeigten. Es wurden je 5 μ l Plasmid mit 2 μ l Forward-Primer Sumo-F (10 μ M) bzw. 2 μ l Reverse-Primer T7 term short (10 μ M) zusammenpipettiert. Der Entschluss, Proben jeweils mit einem 3'- und einem 5'-Primers einzusenden, erfolgte, um für die zu untersuchende Sequenz, die mit einer Länge von über 800 Basenpaaren recht lang ist, eine zusätzliche Kontrolle zu erreichen. Das Sequenzierungsverfahren mittels „HotShot“-Sequenzierung, einer Fluoreszenz-Farbstoff-basierten Sequenzierung, wurde von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen) durchgeführt. Nur mit den Plasmiden, die die exakte Sequenz des Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ aufwiesen, wurde weitergearbeitet.

2.6 Rekombinante Expression des Fusionsproteins in *E. coli*

2.6.1 Struktur des Expressionsvektors

Für die Expression des Fusionsproteins in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS wurde der pSUMO3-Vektor verwendet. Dieser Vektor besitzt eine „Multiple Cloning Site“ mit verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, die das Einfügen von

DNA-Sequenzen ermöglichen. Der Vektor weist einen 5'-ACCT-Überhang am Ende der SUMO3-Kodierungssequenz auf, der es ermöglicht eine Gensequenz an den SUMO-Tag einzuklonieren. Die Gensequenz muss zuvor mittels PCR amplifiziert werden und im anschließenden Restriktionsverdau Überhänge erhalten, die kompatibel zu den Überhängen des Vektors sind. Dabei ist auf die Wahl der spezifischen Primer zu achten. Der 5'-Primer wurde so gewählt, dass er eine *BsaI*-Erkennungssequenz (GGTCTC) für dieses Restriktionsenzym sowie einen komplementären Überhang (AGGT) zum ACCT-Ende des pSUMO3-Vektors besitzt. Da der linear vorliegende Vektor an seinen Enden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *BsaI* und *BamHI* aufweist und das Insert eine *BamHI*-Schnittstelle besitzt, muss dieses Ende des Vektors mit einem anderen Enzym geschnitten werden. Daher wurde der pSUMO3-Vektor mit *NotI* verdaut (siehe 2.5.8; 1 μ l pSUMO3-Vektor (250 ng/ μ l) eingesetzt) und der 3'-Primer besitzt entsprechend eine Erkennungssequenz für *NotI* (GCGGCCGC). Mit Hilfe der SUMO-Protease 2 (1 U/ μ l, LifeSensors) kann nach der Aufreinigung des Fusionsproteins der SUMO-Tag abgespalten werden, so dass das Profilaggrin-Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ als isoliertes Zielprotein vorliegt. Der pSUMO3-Vektor besitzt zudem einen T7-Promotor und den His-Tag des Fusionstags. Letzterer besteht aus sechs aufeinander folgenden CAT-Basensequenzen nahe des N-Terminus, die für Histidin kodieren und die Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Nickel-Affinitätssäule ermöglichen (siehe 2.7.2). Zur Selektion bei der Kultivierung der Bakterien enthält der pSUMO3-Vektor eine Kanamycin-Resistenz.

2.6.2 Durchführung der Expression des Fusionsproteins

Die Expression des Fusionsproteins erfolgte in dem Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, der unter Kontrolle des lacUV5-Promotors das Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzt. Dieses Enzym transkribiert nach Induktion mit IPTG (1 mM) die klonierten Gensequenzen, die im pSUMO3-Vektor unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Für die Expression des Fusionsproteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ wurde nach der Transformation und erfolgreicher Überprüfung mittels Kolonie-PCR Bakterienmaterial einer Einzelkolonie der über Nacht inkubierten Agarplatten aufgenommen und in Flüssigmedium kultiviert. Es wurde in 3 ml LB-Medium, welches die Antibiotika Chloramphenicol (34 μ g/ml) und Kanamycin (50 μ g/ml)

enthielt, ebenfalls über Nacht bei 37°C und 700 rpm inkubiert. Zur Bestimmung der Bakteriendichte in dem angeimpften LB-Medium wurde die optische Dichte (OD) mit dem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bei 600 nm gemessen. Dafür wurde die Flüssigkultur 1:10 mit LB-Medium verdünnt. Die OD gibt die ungefähre Menge der Bakterien an; im Bereich von 0,1 bis 1 liegt lineares Wachstum vor, d. h. in gleichen Zeitabständen vermehren sich die Bakterien konstant. Für die Expressionskultur wurden 200 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (34 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) durch Zugabe von 8 ml Flüssigkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,02 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Es wurde regelmäßig die OD₆₀₀ bestimmt. Als sie einen Wert zwischen 0,4 und 0,6 erreicht hatte, erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 200 µl IPTG (Endkonzentration 1 mM) und die weitere Inkubation für drei Stunden unter oben genannten Bedingungen. Im Anschluss wurde die Kultur 5 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet in 2 ml LEW-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0; 1 ml Puffer pro 100 ml Kultur) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurde eine SDS-PAGE-Analyse durchgeführt (siehe 2.8.3). Zu diesem Zweck wurden direkt vor der Induktion mit IPTG als auch drei Stunden danach Proben aus der Kultur abgenommen. Die erforderliche Menge (in µl) wurde nach der Formel (90:OD₆₀₀) bestimmt und das Volumen nach Entnahme 5 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde bis zur Anfertigung des Gels bei -20°C gelagert.

2.7 Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins

2.7.1 Aufschluss der Expressionsbakterien

Für die Weiterarbeit mit dem rekombinanten Fusionsprotein, das von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS exprimiert wurde, muss das Fusionsprotein aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt werden. Mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Bandelin, Berlin) wurden die Bakterien aufgeschlossen. Hierzu wurde die Probe in sechs Zyklen (12 sec Ultraschall, 30 sec Pause) behandelt. Anschließend wurde die Probe 45 min bei 12500 x g und 4°C zentrifugiert, sodass sich die Bakterien im Pellet

und das Fusionsprotein im Überstand befanden. Letzterer wurde im nachfolgenden Schritt auf die Nickel-Affinitätssäule aufgetragen.

2.7.2 Nickel-Affinitätschromatographie

Die Nickel-Affinitätschromatographie stellt ein Trennverfahren für Proteine dar. Da das Fusionsprotein eine Polyhistidin-Sequenz enthält, können diese His-Gruppen an Ni-Ionen der Trennsäule als Liganden binden. Somit tritt das Fusionsprotein mit der Säule in Wechselwirkung, während andere Proteine der *E. coli*-Bakterien, die diese Eigenschaft nicht besitzen, nicht in der Säule gehalten werden und sich im Durchfluss befinden. Das Trennverfahren wurde mit dem „Protino® Ni-TED packed columns“ (Macherey-Nagel, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es wurden 2 ml auf die Trennsäule aufgetragen. Abschließend wurde das Fusionsprotein mit 4,5 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0) von der Säule gelöst und die Konzentration im Photometer bestimmt. Für den nächsten Aufreinigungsprozess mittels C8-Umkehrphasen-HPLC wurde dem Eluat TFA hinzugefügt bis ein pH-Wert von 2-3 vorlag. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 5000 x g wurde die Probe sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm).

2.7.3 C8-Umkehrphasen-HPLC

Die C8-Umkehrphasen-HPLC ist ein weiteres chromatographisches Trennverfahren. Das von der Nickelsäule eluierte Fusionsprotein wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min mit einem Laufmittel (Puffer A = 0,1% TFA in H₂O) als mobile Phase auf die C8-Säule (Nucleosil 300-7 C8-HPLC-Säule, Macherey-Nagel) aufgetragen, die die stationäre Phase (Puffer B = 100% Isopropanol und 0,1% TFA) enthält (siehe Tab. 2.2). Je nach dem wie stark die Bestandteile der zu trennenden Probe mit der stationären Phase wechselwirken, verbleiben sie unterschiedlich lange in der Säule. Das Chromatogramm zeigt die Retentionszeit bei einer Aufzeichnung von 0,5 cm/min, die angibt, wann die jeweiligen Probenkomponenten am Ende der Trennsäule detektiert wurden. Dabei wird die Lichtabsorption gemessen und der Detektor erfasst die Änderungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase. Proteine lassen sich bei einer Wellenlänge im Bereich von 215 nm detektieren.

Tab. 2.2: Parameter der C8-Umkehrphasen-HPLC

Zeit t [min]	Konzentration Puffer B = Isopropanol und 0,1% TFA [%]	Durchflussrate (Flow) [ml/min]
0,01	10	3
5	10	
30	60	
35	100	
45	100	

Die aus der C8-Umkehrphasen-HPLC resultierenden Fraktionen wurden über Massenspektrometrie-Analyse (siehe 2.8.2.1) sowie SDS-PAGE-Analyse (siehe 2.8.3) auf das Vorhandensein des rekombinanten Fusionsproteins überprüft. Positive Fraktionen wurden anschließend durch Lyophilisierung im Vakuum (Gefriertrocknungsanlage, Christ) getrocknet um zu erreichen, dass das Isopropanol, die TFA und das Wasser der Probe im Vakuum verdampfen und das Fusionsprotein in pulverisierter Form zurückbleibt.

2.7.4 Spaltung des Fusionsproteins

Zur Spaltung des im pSUMO3-Vektorsystem exprimierten Fusionsproteins wurde die gefriergetrocknete Proteinprobe zunächst in 300 µl PBS (1 x, 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,115% Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,02% KH₂PO₄, pH 6,8; PAA Laboratories GmbH) gelöst und die Proteinkonzentration gemessen. Für den Proteolyseansatz wurde 100 µg Fusionsprotein in 500 µl PBS (1 x) gelöst und 2,5 µl DTT (5 mM) hinzugefügt. Die SUMO-Protease 2 (1 U/µl, LifeSensors) soll in diesem Verdau den SUMO3-Fusionstag von dem rekombinant hergestellten Profilaggrin-Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ trennen. Das Enzym erkennt hierbei den Fusionstag an der Tertiärstruktur und spaltet ihn ab. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Enzyms (1 U, 2 U, 5 U und 10 U pro 100µg Fusionsprotein) eingesetzt, um die optimale Konzentration für die Spaltung zu finden. Die Ansätze wurden bei 30°C und 300 rpm für vier Tage inkubiert. Nach der weiteren Aufreinigung mit Hilfe der C4-Umkehrphasen-HPLC wurden die Fraktionen, die das Protein enthielten, vereint, da keine Unterschiede im Resultat bezüglich der eingesetzten Konzentrationen der SUMO-Protease 2 zu erkennen waren.

2.7.5 C4-Umkehrphasen-HPLC

Um das Profilaggrin-Protein nach der proteolytischen Abspaltung vom SUMO3-Fusionstag und der Protease zu trennen, wurde eine Bakerbond Jupiter 5U C4 300A-Säule (250 x 4,6 mm; Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet.

Tab. 2.3: Parameter der C4-Umkehrphasen-HPLC

Zeit t [min]	Konzentration Puffer B (= 80% Isopropanol und 0,1% TFA) [%]	Durchflussrate (Flow) [ml/min]
0,01	10	0,50
5	50	0,50
15	80	0,35
25	100	0,35
30	100	0,35
31	10	0,35
45	10	0,50
60	10	0,50

Die Fraktionierung der Proben erfolgte per Hand unter Detektion der UV-Absorption bei 215 nm. Anschließend wurden die Fraktionen massenspektrometrisch analysiert und die Konzentration bestimmt.

2.7.6 C2/C18-Umkehrphasen-HPLC

Um eine möglichst saubere Aufreinigung des Profilaggrin-Proteins zu erreichen, wurde im Anschluss an die C4-Umkehrphasen-HPLC und die Messung im Massenspektrometer eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht eine Trennung mittels an die Säulenmatrix gebundene C2- und C18-Ketten. Die C2/C18-Umkehrphasen-HPLC erfolgte mit einer μ RPC C2/C18 SC 2.1/10-Säule (GE Healthcare) an einer „SMART™System“ -Anlage (Pharmacia, Freiburg). 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 zehnminütiger 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 die Proteinmenge errechnet werden (550 min * mAU entsprach hierbei etwa 10 μ g Protein).

2.8 Proteinanalytik

2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Absorptionsmessung in einem Einstrahlphotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}) vorgenommen. Die Absorption der Proteinlösung wurde in UV-Einmal-Kunststoffküvetten (UVette, Eppendorf, Hamburg) mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. So konnte die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E = c \times d \times \epsilon$; E = gemessene Extinktion, c = molare Konzentration [M], d = Schichtdicke der Küvette [cm], ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$l / \text{mol} \times \text{cm}$]) berechnet werden. Nach diesem Gesetz verhält sich die Lichtextinktion bei einer bestimmten Wellenlänge proportional zur Konzentration der Lösung, wenn die Schichtdicke konstant bleibt. Der molare Extinktionskoeffizient ist spezifisch für eine Substanz und bei Proteinen abhängig vom Gehalt der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie der Anzahl an Disulfidbrücken. Da das Lambert-Beer'sche Gesetz nur für einen definierten linearen Bereich gültig ist, wurden Konzentrationen nur bei gemessenen Absorptionen zwischen 0,04 und 0,8 berechnet, ggf. mussten die Proteinlösungen aufkonzentriert oder verdünnt werden.

2.8.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Verfahren zur Bestimmung der Masse eines Proteins und wurde jeweils zur Überprüfung der Proteinmasse nach der C8-, C4- und C2/C18-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der die Proteine ionisiert werden, einem Analysator, in dem die Ionen nach ihrem Masse-Ladung-Verhältnis getrennt werden und einem Detektor, der die Signale der Ionenströme empfängt, verstärkt und aufzeichnet.

2.8.2.1 Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie

Die Massenbestimmung des Fusionsproteins, des SUMO3-Fusionstags und des rekombinanten Profilaggrin-Proteins erfolgte mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie an einem Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF 2, Micromass, Manchester, UK) im Positiv-Ionen-Modus in

einem Bereich von 80-2000 m/z. Rohdaten kombinierter Spektren wurden am Computer mit der „MassLynx 4-Software“ (Micromass) ausgewertet. Die Spektren der einzelnen Scans wurden gemittelt und Hintergrund-korrigiert. Die Durchschnittsproteinmassen (in Dalton) wurden durch „Maximum Entropy 1“ Dekonvolution mit der „MassLynx-Software“ berechnet.

2.8.2.2 AspN-Verdau für die MS-MS-Sequenzierung

Die AspN-Endoprotease, isoliert aus dem *Flavobacterium meningosepticum*, schneidet selektiv Proteinbindungen N-terminal von Asparaginsäureresten. Für den Verdau wurde 25 µg der lyophilisierten Proteinprobe aus der C2/C18-Umkehrphasen-HPLC in 50 µl NaH₂PO₄-Puffer (50 mM) resuspendiert. Nach Zugabe von 460 ng AspN (Roche) wurde der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Verdau von 10 µg Cytochrom C in 50 µl NaH₂PO₄-H₂O-Puffer mit 100 ng AspN-Enzym über Nacht bei 37°C verdaut. Die Spaltprodukte des AspN-Verdaus wurden im Anschluss mittels Nanoelektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie untersucht.

2.8.2.3 Nanoelektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die Nanoelektrospray wurde für MS-MS-Peptidsequenzierungen nach dem AspN-Verdau eingesetzt. Die Nanoelektrospray-Quelle besteht aus einer Glaskapillare von nur wenigen Mikrometern Durchmesser, über die kontinuierlich die Analytlösung in das elektrische Feld injiziert wird. Ein anliegender Gasdruck fördert diese Probe kontinuierlich mit einer geringen Flussrate von wenigen nl/min in das elektrische Feld. Diese Variante der Massenspektrometrie ermöglicht eine sehr genaue Messung von geringen Probenvolumina.

2.8.2.4 „Collision-induced dissociation“

„Collision-induced dissociation“ bedeutet stoßinduzierte Fragmentierung. Bei diesem Verfahren werden die Molekülionen der Proteine durch Gasteilchen gezielt zur Fragmentierung angeregt. Anschließend werden die dabei entstehenden Ionen massenspektrometrisch analysiert. Dieses Verfahren wurde verwendet, um die Fragmente des AspN-Verdaus sequenzieren zu können. Die Identität der Probe

wurde über eine Datenbanksuche mit den Größen der Peptidfragmente analysiert. Hierfür wurde die Datenbank „Mascot“ (Matrix Science) durchsucht.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem Auftrennungsverfahren von Proteinen dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis als Trennmedium. Verwendet wurde ein 10% BisTris Mini Gel (NuPAGE Novex, Invitrogen), welches in eine vertikale Kammer (Invitrogen) eingeklemmt und mit MES-Puffer (1 x, 0,05 M MES, 0,05 M Trisbase, 3,5 mM SDS, 1,025 mM EDTA) umspült wurde. Die 14 µl-Proben wurden mit 4 µl DTT-haltigem Ladepuffer (4 x, 4% (w/v) SDS, 60% (v/v) Glycerin, 0,3 M Tris, 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) versetzt und 10 min bei 95°C im Thermocycler inkubiert. Als Größenstandard wurde SeeBlue Plus 2, Prestained Standard (Invitrogen) verwendet. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer an eine Spannung von 100 V angeschlossen. Die Anfärbung der Proteine erfolgte nach dem modifizierten Protokoll der Silberfärbung von Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven und Dernick, 1988) mit Hilfe reduzierter Silberionen, die an bestimmte Aminosäuren der Proteine binden. Zur Entwicklung wurden 2,5% (w/v) Na₂CO₃ mit 0,04% (v/v) Formaldehyd verwendet. Nach dem Sichtbarwerden der Banden wurde die Entwicklung mit 5% (v/v) Essigsäure gestoppt.

2.9 Antimikrobielle Testung

Das rekombinant hergestellte Profilaggrin-Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ wurde auf eine mögliche antimikrobielle Aktivität mit Hilfe des radialen Plattendiffusionstests untersucht. Als Testmikroorganismen wurden der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die Gram-negativen Stämme *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433 ausgewählt. Durchgeführt wurde die antimikrobielle Testung im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel.

2.9.1 Radialer Plattendiffusionstest

Der radiale Plattendiffusionstest wurde in Anlehnung an Steinberg und Lehrer, 1997, durchgeführt und ausgewertet. In diesem Testsystem werden Agarplatten verwendet,

die den jeweiligen Testorganismus gleichmäßig suspendiert enthalten. In eingestanzte Löcher wird die Proteinlösung in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen in 0,01% Essigsäure (unverdünnt 1000 µg/ml; verdünnt 1:3, 1:10, 1:30 und 1:100) eingefüllt und diffundiert radial in den Agar. Dabei verhält sich die Diffusion proportional zum Konzentrationsquadranten. Als Positivkontrolle diente Lysozym (100 ng/µl), ein Protein, das bekanntermaßen antimikrobielle Aktivität gegen die verwendeten Mikroorganismen besitzt. Als Negativkontrolle wurde 0,01% Essigsäure verwendet. Nach Inkubation der Agarplatten bei 37°C für 18-24 h wurden die Platten mit einer weiteren Agarschicht übergossen. Dadurch erhielten die Bakterien neue Nährstoffe. Bei Vorliegen einer antimikrobiellen Wirkung des Proteins nimmt das Bakterienwachstum weiter zu und es lässt sich ein Hemmhof um die aufgetragene Lösung feststellen, innerhalb dessen der Testorganismus nicht wachsen konnte. Die antimikrobielle Aktivität wird für diesen Test als MEK (minimale effektive Konzentration, berechnet aus den Hemmhöfen bei verschiedenen Verdünnungen) angegeben.

3 Ergebnisse

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe bereits für Fragmente von epidermalen Proteinen der „S100 Fused Type“-Familie wie Filaggrin-2 und Hornerin eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden konnte, sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob Filaggrin, welches zur gleichen Proteinfamilie gehört, ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften besitzt. Ziel dieser Arbeit war die Generierung des rekombinanten Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ und die anschließende Untersuchung dieses Proteins hinsichtlich möglicher antimikrobieller Aktivität.

3.1 Amplifikation der Profilaggrin-Sequenz

Zur Generierung des Profilaggrin-Proteins wurde zunächst ein DNA-Fragment der Sequenz von Aminosäure 3605 bis 3879 mittels Standard- und „Nested“-PCR amplifiziert. Als DNA-Material wurden zwei cDNAs gewählt, die aus ausdifferenzierten humanen Keratinozyten neonataler Vorhautepidermis stammten. Gleichzeitig wurden Oligonukleotide bestellt, die an der Nukleotidsequenz dieser cDNA spezifisch binden (siehe 2.2). Mittels Standard-PCR wurde vorerst ein größeres Fragment amplifiziert (siehe 2.5.1.1), welches anschließend als Vorlage bei der „Nested-PCR“ eingesetzt wurde (siehe 2.5.1.2). Die Verwendung des Primerpaares Flg-c2F1 und Flg-cR sowie der *Pfu* UltraHotstart DNA-Polymerase im ersten Reaktionsansatz (siehe 2.5.1.1) zeigte im zur Kontrolle angefertigten 2%-igen Agarosegel keine Banden. Daraufhin wurde die Primerkonstellation geändert (Flg-c2F2 bzw. Flg-c2F3 und Flg-c2R2) und eine andere DNA-Polymerase verwendet. Der Vorteil der Advantage 2 DNA-Polymerase liegt darin, dass es sich um einen Enzymmix aus einer *Taq*-Polymerase und 10% *Pfu*-Polymerase handelt. Dies ermöglicht bei der Amplifikation größerer Fragmente (hier 940 bp) eine geringere Fehlerquote. Im 1,7%-igen Agarosegel wurde die Bande im Bereich zwischen 900 und 1000 bp detektiert (siehe Abb. 3.1), was mit der Größe des Fragments von 940 bp übereinstimmt. Diese Banden wurden für die Weiterarbeit aus dem Gel herausgeschnitten, aufgereinigt und in 30 µl Tris-Cl (10 mM) eluiert.

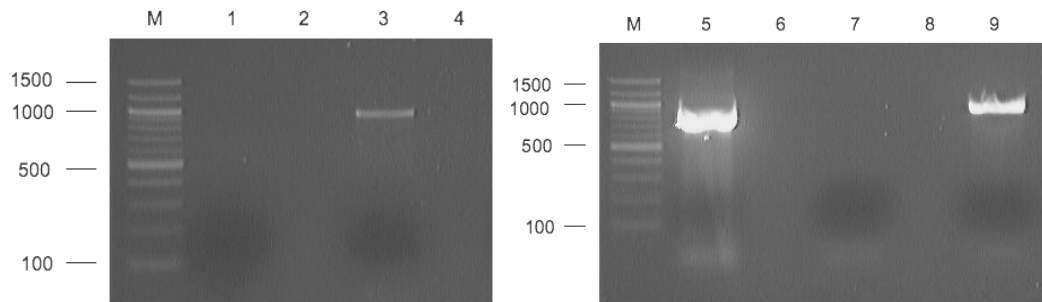


Abb. 3.1: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit Produkten der Standard-PCR. Die Amplifikation des Fragments erfolgte aus verschiedenen humanen Keratinozyten-cDNA-Proben (stimuliert mit 1,0 mM CaCl_2 über 4 Tage (Spur 2 und 6), 6 Tage (Spur 3, 4, 7 und 8) sowie 8 Tage (Spur 1 und 5) mit den Primerpaaren Flg-c2F3 und Flg-c2R2 (Spur 1-4) bzw. Flg-c2F2 und Flg-c2R2 (Spur 5-9). Sichtbar sind DNA-Banden im Bereich von ca. 950 bp. M: 100 bp-DNA-Ladder.

Die Produkte der Standard-PCR dienten als Ausgangsmaterial für die PCR mit den Sumo3-flg-2F- und Sumo3-flg-2R-Primern („Nested“-PCR). Die erste „Nested“-PCR ließ keine Banden im Kontrollgel entstehen. Daher wurde eine zweite, im Ablauf identische „Nested“-PCR mit den Produkten der vorausgegangenen PCR als Templates durchgeführt. Im 1%-igen Agarosegel ist daraufhin eine starke Bande im Bereich von etwa 850 bp sichtbar, welche dem gewünschten Fragment mit einer Länge von 848 bp entspricht (siehe Abb. 3.2).

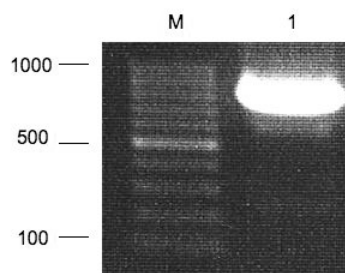


Abb. 3.2: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel des Produktes der „Nested“-PCR. Die Amplifikation des Fragments erfolgte mit einem Produkt der Standard-PCR (siehe Abb. 3.1, Spur 5) mit den Primern Sumo3-flg-2F und Sumo3-flg-2R und zeigte eine Bande im Bereich von etwa 850 bp passend zur Fragmentgröße von 848 bp (Spur 1). M: 100 bp-DNA-Ladder.

Nachdem diese Bande herausgeschnitten und aufgereinigt wurde, zeigte das 1%-ige Kontrollgel eine scharfe Bande im Bereich des Zielfragments.

3.2 Klonierung im pGEM-T-Vektorsystem

Mit Hilfe des pGEM-T-Vektorsystems sollte das Fragment zunächst weiter vervielfältigt werden. Zu diesem Zweck wurde in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert.

3.2.1 Ligation und Transformation in *E. coli* TOP10 Zellen

Die Produkte der „Nested“-PCR wurden mit Hilfe der T4-Ligase (3 U/ μ l, Promega) in den pGEM-T-Vektor ligiert (siehe 2.5.4). Das Ligationsvolumen wurde 1:10 mit H₂O verdünnt und für die Transformation in die *E. coli* TOP10 Zellen eingesetzt (siehe 2.5.6). Im Anschluss an die einstündige Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien zum Anzüchten auf LB-Nährboden ausplattiert, der das Antibiotikum Carbenicillin (50 μ g/ml) enthielt. Am darauf folgenden Tag wurde mit dem Bakterienmaterial zehn zufällig ausgewählter Einzelkolonien eine Kolonie-PCR durchgeführt. Ein 1%-iges Kontrollgel bestätigte, dass drei der ausgewählten Einzelkolonien, den Vektor mitsamt des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Inserts enthielten (siehe Abb. 3.3, Spur 1, 3 und 6). Das amplifizierte Fragment hatte eine Länge von etwa 1090 bp und die dazugehörigen Banden lagen damit übereinstimmend im Bereich über 1000 bp.

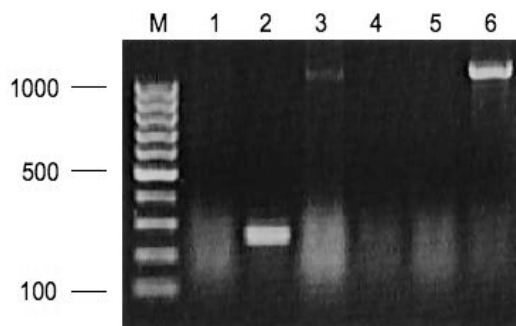


Abb. 3.3: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pGEM-T-Vektors mit FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Insert in *E. coli* TOP10-Zellen. Verwendet wurden die Primer M13-F sowie M13-R. Die Spuren 1-6 entsprechen den jeweils analysierten Klonen. Klon 1 (sehr schwache Bande), 3 und 6 zeigten eine Bande im erwarteten Bereich von etwa 1000 bp. M: 100 bp-DNA-Ladder.

Von den kontrollierten Einzelkolonien der Transformation in *E. coli* TOP10 Zellen wurde jeweils eine Flüssigkultur aus 3 ml LB-Medium mit Carbenicillin (50 μ g/ml) sowie einer Pipettenspitze mit dem Bakterienmaterial hergestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Plasmid aus den Bakterien der kontrollierten Einzelkolonien präpariert, sodass das Profilaggrin-Fragment im pGEM-T-Vektor für die Weiterarbeit isoliert vorlag. Das Kontrollgel der Plasmidisolation zeigt Abb. 3.4.

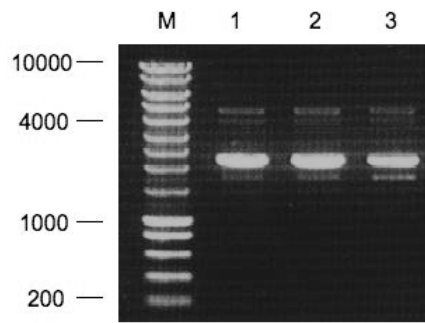


Abb. 3.4: Kontrollgel der Plasmidisolierung des pGEM-T-Vektors mit FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Insert aus Flüssigmedium. In den Spuren 1-3 wurden jeweils 10% des Elutionsvolumens der isolierten Plasmide der Klone 1, 3 und 6 aufgetragen. Die verschiedenen Banden repräsentieren unterschiedliche Konformationen der Plasmide. M: SmartLadder.

Im nächsten Schritt wurde das Insert mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BsaI* und *NofI* aus dem pGEM-T-Vektor herausgeschnitten um es später in den pSUMO3-Expressionsvektor zu ligieren. Nach dem Restriktionsverdau ließ sich das Fragment in 1%-igem Agarosegel isolieren, da es sich während der Elektrophorese sowohl vom geschnittenen linearen Vektor als auch vom ungeschnittenen zirkulären Vektor trennte. Die Banden des Fragments wurden aus dem Gel herausgeschnitten. Nach der anschließenden Aufreinigung zeigte sich im 1%-igen Kontrollgel die Bande im Bereich der Fragmentgröße von 848 bp.

3.3 Klonierung im pSUMO3-Vektorsystem

Für die Expression des rekombinanten Profilaggrin-Proteins wurde das Fragment in den Expressionsvektor pSUMO3 kloniert.

3.3.1 Ligation und Transformation in *E. coli* TOP10 Zellen

Mit Hilfe der T4-Ligase (3 U/μl, Promega) wurden das Profilaggrin-Fragment und der pSUMO3-Vektor wie im Ligationsansatz beschrieben miteinander verbunden (siehe 2.5.4). Der geschlossene Vektor konnte daraufhin in die *E. coli* TOP10 Zellen transformiert werden. Diese Transformation wurde erfolgreich durchgeführt, wie sich in der zur Kontrolle durchgeführten Kolonie-PCR mit zufällig ausgewählten Einzelkolonien zeigen ließ (siehe Abb. 3.5). Die Kolonien, deren Bakterien das Vektorsystem aufgenommen hatten, wurden auf Nährböden mit dem Antibiotikum Kanamycin (50 μg/ml) gezüchtet, da der pSUMO3-Vektor diese Antibiotikaresistenz zur Selektion positiver Klone (d. h. Klone, die das FLG-Insert enthalten) besitzt.

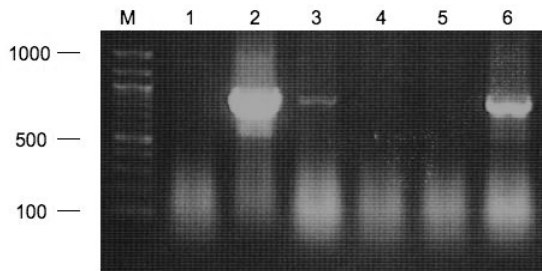


Abb. 3.5: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Insert in *E. coli* TOP10 Zellen. Verwendet wurden die Primer Sumo3-flg-2F und T7 term short. Die Spuren 1-6 entsprechen den jeweils analysierten Klonen. Klon 2, 3, 5 (sehr schwache Bande) und 6 zeigten eine Bande im erwarteten Bereich von etwa 850 bp (Fragmentgröße 848 bp). M: 100 bp TriDye Ladder.

Auch von diesen getesteten Einzelkolonien wurden Flüssigkulturen mit 3 ml LB-Medium und dem zugehörigen Antibiotikum Kanamycin (50 µg/ml) hergestellt. Nachdem die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert wurden, wurde das Plasmid im nächsten Schritt aus den Bakterien isoliert. Im anschließenden 1%-igen Kontrollgel waren unterschiedliche energetische Formen der Plasmide sichtbar, je nach Grad ihrer Verdrillung (siehe Abb. 3.6). Die am höchsten konzentrierten Plasmide wurden für die Sequenzierung ausgewählt.

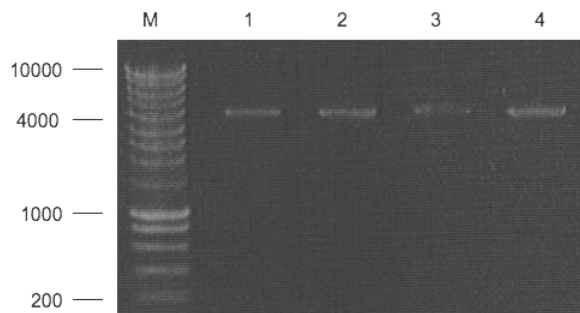


Abb. 3.6: Kontrollgel der Plasmidpräparation des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Inserts im pSUMO3-Vektors aus Flüssigkultur. In den Spuren 1-4 wurden jeweils 10% des Elutionsvolumens der isolierten Plasmide der Klone 2, 3, 5 und 6 aufgetragen. Die verschiedenen Banden repräsentieren unterschiedliche Konformationen der Plasmide. M: SmartLadder.

3.3.2 Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen

Für die Expression des rekombinanten Proteins wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS gewählt, der eine Chloramphenicolresistenz besitzt. Die Plasmidprobe wurde 1:10 mit H₂O verdünnt und davon 1 µl auf 50 µl chemisch kompetenter Bakterien eingesetzt. Die LB-Agarplatten enthielten die Antibiotika Kanamycin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) entsprechend den

Resistenzen des pSUMO3-Vektors bzw. der Bakterien. Es wurde 150 μ l Transformationsansatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonie-PCR zur Überprüfung, ob der Vektor tatsächlich aufgenommen wurde, bestätigte bei drei von sechs zufällig ausgewählten Einzelkolonien die erfolgreiche Transformation (siehe Abb. 3.7). Von diesen drei Kolonien wurden Flüssigkulturen (20 ml LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol) hergestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

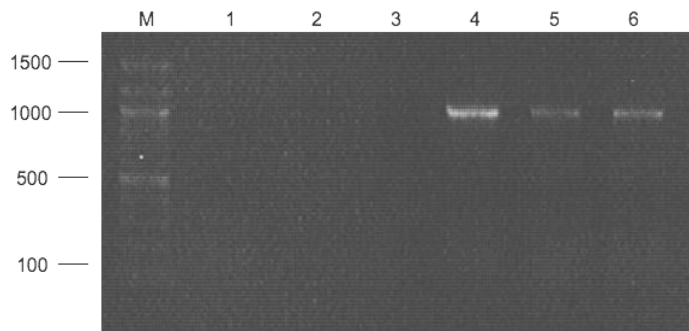


Abb: 3.7: Kontrollgel der Kolonie-PCR nach Transformation des pSUMO3-Vektors mit FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Insert in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Die Banden der positiven Kolonien (Spur 4, 5 und 6) liegen bei etwa 1000 bp. M: 100 bp TriDye Ladder (NEB).

3.4 Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins

3.4.1 Expression des Fusionsproteins

Nach der Induktion mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) erfolgte die Proteinexpression des rekombinanten Fusionsproteins in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Bakterien (siehe 2.6.2). Im Anschluss wurde die Lyse der Bakterien mittels Ultraschall durchgeführt. Um die Bakterien danach vom Fusionsprotein zu trennen, wurde die Probe 45 min lang zentrifugiert, sodass sich ein Bakterienpellet bildete und sich das Protein im Überstand befand.

3.4.2 Aufreinigung des Fusionsproteins

Die Proteinprobe wurde zu diesem Zweck zunächst auf die Nickel-Affinitätssäule aufgetragen. Im Eluat wurde anschließend die Konzentration des Fusionsproteins gemessen. Diese muss bekannt sein, um die Bindungskapazität der Säule der nachfolgenden C8-Umkehrphasen-HPLC nicht zu überschreiten. Zur sauberen Auftrennung sollten nicht mehr als 1 mg Protein pro Durchlauf auf die HPLC-Säule geladen werden, um deutliche und gut zu trennende Peaks zu erhalten.

Mithilfe der C8-Umkehrphasen-HPLC-Analyse wurde die Probe weiter aufgereinigt. Ein typisches Chromatogramm einer C8-Umkehrphasen-HPLC ist in Abb. 3.8 gezeigt. Nach etwa 8 min war ein Einspritzpeak zu sehen, der dadurch zustande kam, dass das Imidazol der Probe als erstes detektiert wurde. Das Fusionsprotein wurde nach etwa 22 min Retentionszeit eluiert (siehe Abb. 3.8, Pfeil).

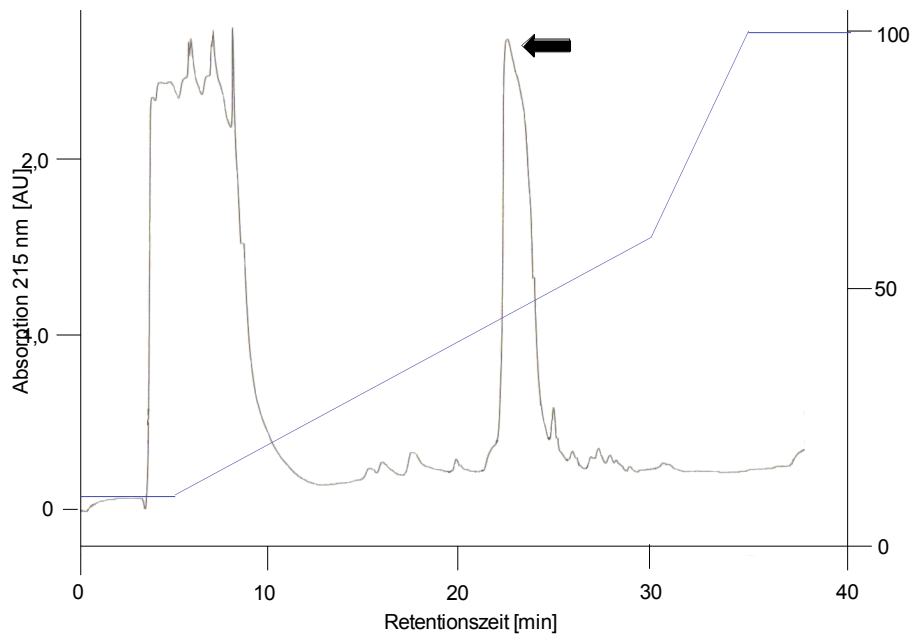


Abb. 3.8: Repräsentatives Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten SUMO-Fusionsproteins mittels C8-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (graue Linie) im Gradientenverlauf (blaue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die zuvor über eine Nickel-Affinitätssäule aufgereinigte Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min auf die C8-Säule aufgetragen und mit einem (H₂O/0,1% TFA – 100% Isopropanol/0,1% TFA)-Gradienten wie beschrieben eluiert (siehe 2.7.3). Der Peak des Fusionsproteins ist mit einem Pfeil markiert.

Die nachfolgende Analyse im Massenspektrometer (siehe Abb. 3.9) zeigte, dass das Fusionsprotein eine Masse von 40238,3 Da besitzt. Die theoretisch berechnete Proteinmasse beträgt 40231,9 Da. Die Differenz dieser beiden Massen von 6,4 Da könnte auf die Kalibrierung des Massenspektrometers zurückzuführen sein. Zudem wurde ein Protein mit einer Masse von 39926,6 Da detektiert, welches im Chromatogramm der C8-Umkehrphasen-HPLC-Analyse nicht vom Fusionsprotein zu unterscheiden war. Dieses Protein wurde wie das Fusionsprotein dem Verdau mit der SUMO-Protease 2 unterzogen.

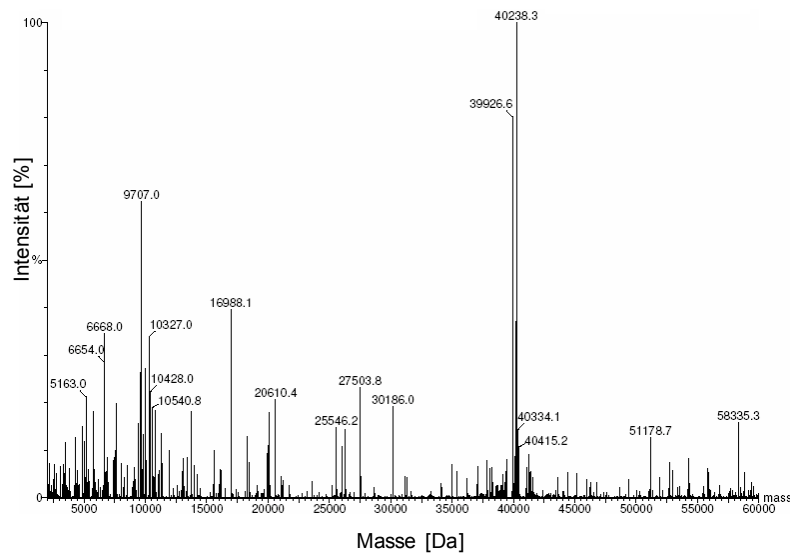


Abb. 3.9: Repräsentative massenspektrometrische Daten des rekombinant exprimierten SUMO-Fusionsproteins. Kumuliertes Spektrum der gesamten Messung. Die Masse in Dalton ist gegen die Intensität in Prozent des höchsten Peaks aufgetragen. Die theoretisch berechnete Masse des Fusionsproteins beträgt 40231,9 Da.

3.5 Aufreinigung des rekombinanten Profilaggrin-Proteins

Um das isolierte rekombinante Profilaggrin-Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ zu erhalten, musste der SUMO-Tag vom Fusionsprotein abgespalten werden. Die Hydrolyse erfolgte mit der SUMO-Protease 2 (1 U/μl, LifeSensors). Zuvor musste das Protein aus dem Gemisch von Isopropanol, TFA und Wasser der letzten Aufreinigungs- und Analyseschritte isoliert werden. Durch das Gefriertrocknen im Vakuum (Lyophilisierung) verdampfen die genannten Flüssigkeiten und das Fusionsprotein bleibt in pulverisierter Form zurück. Danach wurde das Protein in PBS (1 x) wieder aufgelöst und lag für die nachfolgende Hydrolyse vor.

3.5.1 Proteolytische Abspaltung des Fusionstags

Mit Hilfe des Enzyms SUMO-Protease 2 wurde der SUMO3-Fusionstag vom Profilaggrin-Protein abgespalten. Die getesteten unterschiedlichen Protease-Konzentrationen von 1 U, 2 U, 5 U und 10 U pro 100 μg Fusionsprotein zeigten keine Unterschiede im Resultat des Verdaus. Die Inkubationszeit des Verdauungsansatzes betrug vier Tage. Im Anschluss folgten weitere Aufreinigungsschritte über die C4- sowie C2/C18-Umkehrphasen-HPLC und die Überprüfung der Proteinmasse im Massenspektrometer.

3.5.2 Trennung des rekombinanten Profilaggrin-Proteins

Mit Hilfe der C4-Umkehrphasen-HPLC wurde das Profilaggrin-Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ vom Fusionstag sowie von unverdaulichem Protein getrennt. Ein repräsentatives Chromatogramm für eine C4-Umkehrphasen-HPLC ist in Abb. 3.10 dargestellt. Nach etwa 11 min ist ein Salz-Peak und nach etwa 18 min jeweils ein Einspritzpeak von DTT in reduzierter und oxidiert Form sichtbar. Das FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Protein (siehe Abb. 3.10, blauer Pfeil) eluierte nach etwa 21 min Retentionszeit. Der Peak bei einer Retentionszeit von etwa 24 min beinhaltete das nicht hydrolysierte Fusionsprotein (schwarzer Pfeil), der Peak bei etwa 25 min entstand durch den Fusionstag (weißer Pfeil).

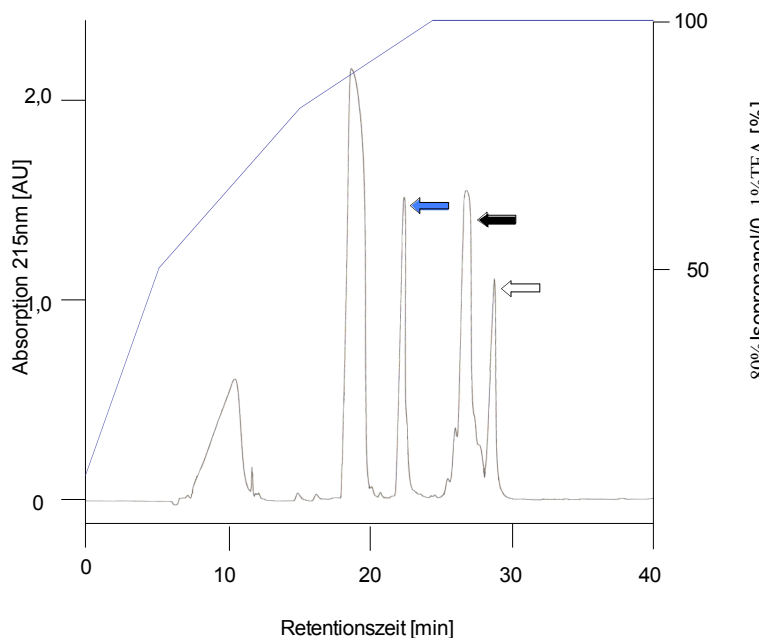


Abb. 3.10: Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung einer SUMO-Protease 2-behandelten Proteinprobe mittels C4-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (graue Linie) im Gradientenverlauf (blaue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 bzw. 0,35 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen und mit einem (H₂O/0,1%TFA-80%Isopropanol/0,1%TFA)- Gradienten wie in 2.7.5 beschrieben eluiert. Das FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Protein ist mit einem blauen Pfeil, das nicht hydrolysierte Fusionsprotein mit einem schwarzen Pfeil sowie der Fusionstag mit einem weißen Pfeil markiert.

Die massenspektrometrische Analyse der C4-Umkehrphasen-HPLC-Fractionen zeigte die Masse des Profilaggrin-Fragments von 28732,1 Da (siehe Abb. 3.11), die sich von der berechneten Masse des rekombinanten Proteins (28731,1 Da) in einem Dalton unterscheidet. Auch in dieser Analyse war ein etwa 300 Da kleineres Protein, welches im Chromatogramm der C4-Umkehrphasen-HPLC nicht vom Profilaggrin-Protein zu unterscheiden war, detektiert worden.

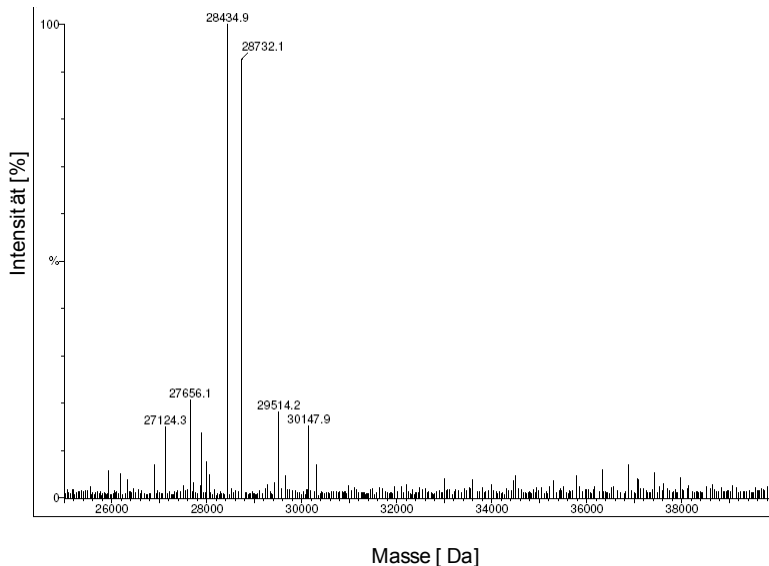


Abb. 3.11: Repräsentative massenspektrometrische Daten des Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ Gezeigt ist ein kumuliertes Spektrum der gesamten Messung. Die Masse in Dalton ist gegen die Intensität in Prozent des höchsten Peaks dargestellt. Die theoretisch berechnete Masse des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins beträgt 28731,1 Da.

Als zusätzliche Kontrolle sowie zur Übersicht der verschiedenen Schritte der Proteinexpression und der Aufreinigung wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines 10%-igen BisTris Mini Gels durchgeführt. Durch die Anfärbung mittels Silberfärbung konnten die bakteriellen Proteine vor und nach Induktion der Expression des Fusionsproteins dargestellt werden (siehe Abb. 3.12, Spur 1 und 2). Nach der Induktion ist eine intensivere Bande bei etwa 60 kDa im Vergleich zur uninduzierten Probe zu erkennen, die dem Fusionsprotein (theoretische Masse 40,2 kDa) entspricht. Daneben ist das Fusionsprotein im Eluat der Nickel-Affinitätschromatographie sowie in der C8-Umkehrphasen-HPLC-Fraktion zu sehen. Darauf folgt der Verdau des Fusionsproteins, in dem das Profilaggrin-Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ (theoretische Masse 28,7 kDa) im Bereich von 40 kDa, der SUMO-Fusionstag (11,5 kDa) im Bereich von 20 kDa sowie unverdautes Fusionsprotein zu erkennen ist. Die letzte Bande repräsentiert das Profilaggrin-Protein nach der Aufreinigung über die C4-Umkehrphasen-HPLC. Nach Angaben des Manuals des SUMO-Expressionssystems (LifeSensors) läuft der 11,5 kDa große SUMO-Fusionstag im SDS-PAGE-Gel bei 20 kDa. Somit liegt die Bande des Fusionsproteins (40 kDa) ebenfalls etwas höher (bei 60 kDa). Doch auch die Bande des Profilaggrin-Proteins liegt in einer höheren Größenordnung als erwartet. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei rekombinanten Filaggrin-2-Fragmenten beobachtet (Hansmann, 2008). Die massenspektrometrischen Messdaten bestätigen jedoch,

dass die Masse des rekombinanten Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ mit der theoretisch errechneten Masse übereinstimmt. Gleichzeitig zeigt das SDS-PAGE-Übersichtsgel, dass die Proteinproben keine anfärbaren Verunreinigungen enthalten.

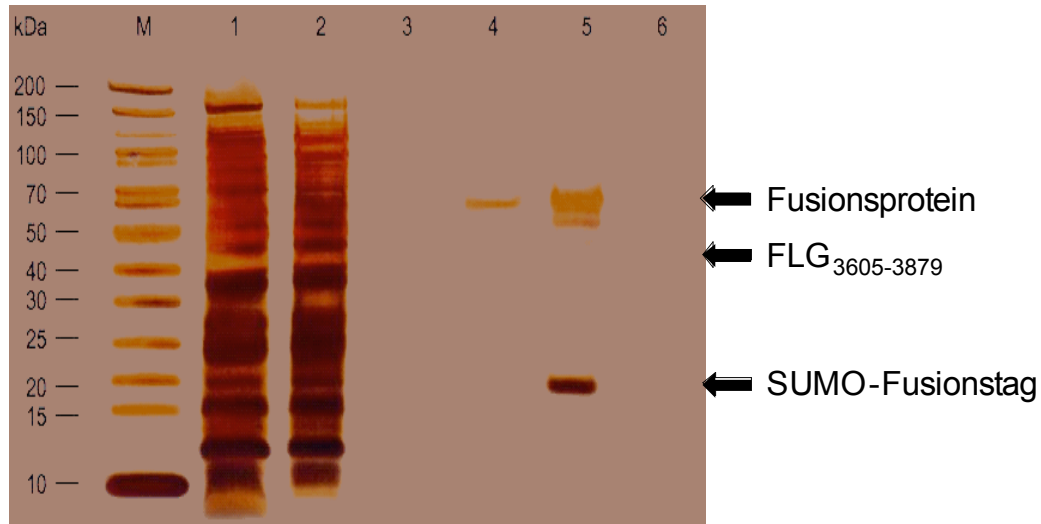


Abb. 3.12: Silber-gefärbtes SDS-PAGE-Übersichtsgel des rekombinant hergestellten FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins. Es wurden je Spur 100-150 ng Protein der Expressionskultur bzw. des Proteins im jeweiligen Aufreinigungsschritt aufgetragen. Gezeigt sind in Spur 1 die Proteine der *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen vor der Induktion mit IPTG (1 mM) und in Spur 2 die Bakterienproteine 3 h nach Induktion mit IPTG (1 mM). In Spur 2 ist das Fusionsprotein zu erkennen, dessen Bande etwa im Bereich von 60 kDa liegt. Spur 3 zeigt das Eluat der Nickel-Affinitätschromatographie, welches ebenfalls eine Bande in dieser Größenordnung zeigt. In Spur 4 ist das Fusionsprotein nach der C8-Umkehrphasen-HPLC dargestellt. Die Proteine in der Spur 5 resultieren aus der Spaltung des Fusionsproteins mit der SUMO-Protease 2 und zeigen das FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Protein (etwa bei 40 kDa), den SUMO-Fusionstag (etwas bei 20 kDa) sowie unverdautes Fusionsprotein. In Spur 6 liegt das Protein nach der C4-Umkehrphasen-HPLC weiter aufgereinigt und isoliert vor. M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas).

Durch die C2/C18-Umkehrphasen-HPLC wurde das Protein von weiteren Verunreinigungen befreit und im Anschluss die Protein-Konzentration anhand der Fläche der bei 280 nm absorbierenden Peaks berechnet. Dieses Verfahren ermöglicht eine Trennung mittels an die Säulenmatrix gebundene C2- und C18-Kohlenstoffketten. Die Abbildung 3.13 zeigt, dass der Peak des Proteins bei einer Retentionszeit von etwa 12 min liegt. Der Pfeil markiert den Peak, dessen massenspektrometrische Daten in der nachfolgenden Abbildung dargestellt werden (siehe Abb. 3.14). Trotz Veränderung des Gradienten konnte das 312,3 Da kleinere Protein nicht vom Profilaggrin-Fragment getrennt werden. Es könnte vermutet werden, dass es sich hierbei um eine verkürzte Version des Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ handelt, dem die zwei C-terminalen Aminosäuren Arginin (Masse von Arginin in einer Peptidbindung je 156,2 Da) fehlen. Daher wurde ein Teil der

Proteinprobe im Anschluss an die C2/C18-Umkehrphasen-HPLC einem AspN-Verdau unterzogen. Die Spaltprodukte des Verdaus wurden weiter massenspektrometrisch analysiert.

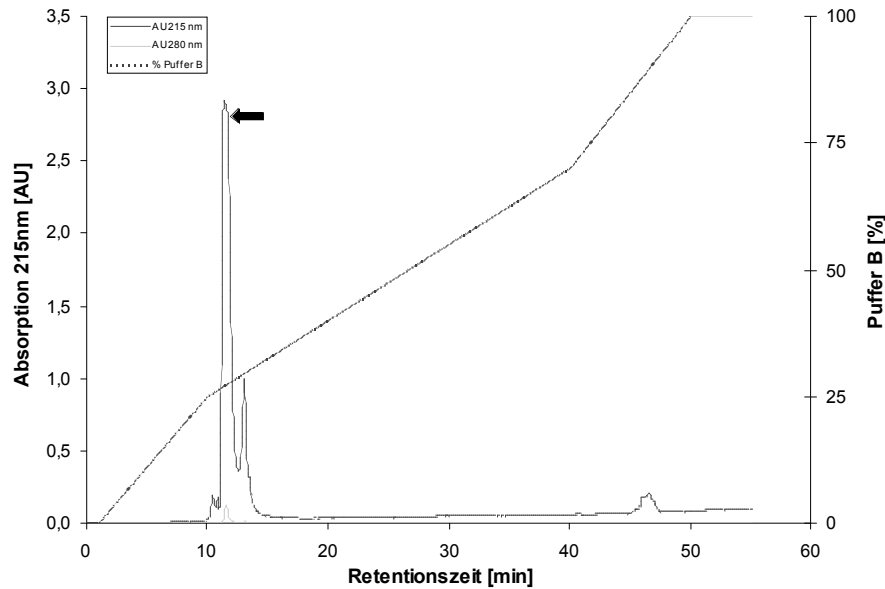


Abb. 3.13: Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung des Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ mittels C2/C18- Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) sowie bei 280 nm (graue Linie) im Gradientenverlauf (unterbrochene Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min auf die C2/C18-Säule aufgetragen und mit einem Puffer B (80% Acetonitril / 0,1% TFA)-Gradienten wie in 2.7.5 beschrieben eluiert. Der Pfeil weist auf den Peak, dessen massenspektrometrische Daten in Abb. 3.14 dargestellt sind.

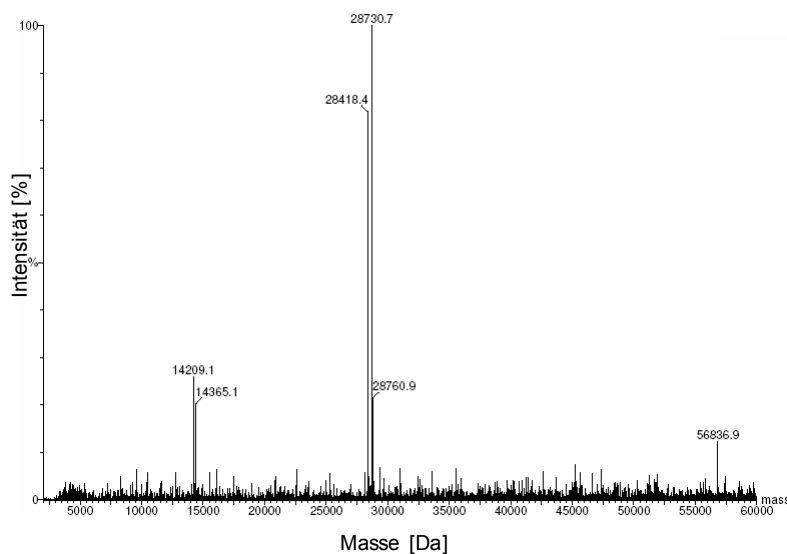


Abb. 3.14: Repräsentative massenspektrometrische Daten des Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ Kumuliertes Spektrum der gesamten Messung. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks ist gegen die Masse in Dalton aufgetragen. Die theoretisch berechnete Masse des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins beträgt 28731,1 Da.

3.6 AspN-Verdau und MS-MS-Sequenzierung

Proteinproben aus der C2/C18-Umkehrphasen-HPLC wurden mit Hilfe der AspN-Endoprotease verdaut und die Spaltprodukte im Anschluss mittels MS-MS-Peptidsequenzierung weiter analysiert um die rekombinanten Proteine näher charakterisieren zu können. Aus den in der Nanoelektrospray-Ionisierung gemessenen Proteinpeaks wurden Proteinfraktionen ausgewählt, die in der „Collision-Induced Dissociation, CID“ gezielt fragmentiert wurden. Diese zwei- bis dreifach geladenen Fragmente wurden massenspektrometrisch gemessen und sequenziert. Anhand der Massen der Fragmente konnten die Sequenzen in der „Mascot“-Datenbank verglichen werden. Als Ergebnis dieser Proteinanalyse konnte konstatiert werden, dass die Proteinsequenzen der gemessenen Fragmente ausschließlich mit den Sequenzen des Profilaggrins übereinstimmen. Das bedeutet, dass es keine Hinweise auf andere Proteine in der Proteinprobe gibt.

Gleichzeitig ließ sich anhand von Sequenzanalysen mit der Sequenzdatenbank für Proteine ExpASY (Expert Protein Analysis System) belegen, dass die Masse des rekombinant hergestellten Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ abzüglich der zwei endständigen Arginine theoretisch 28418,7 Da betragen würde. Diese Masse unterscheidet sich lediglich in 0,3 Da vom gemessenen verkürzten Protein. Damit scheint es sehr wahrscheinlich, dass dem 312,3 Da kürzeren Protein zwei Arginin-Moleküle fehlen.

3.7 Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität

Nach erfolgreicher Generierung des rekombinanten Proteins konnten die Untersuchungen zur möglichen antimikrobiellen Aktivität durchgeführt werden. Es wurden verschiedene Testorganismen verwendet um ein möglichst breites Wirkspektrum analysieren zu können: der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die Gram-negativen Stämme *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433.

3.7.1 Radialer Plattendiffusionstest

Dieses Testsystem verwendet Agarplatten, die den jeweiligen Testorganismus bereits enthalten. In ausgestanzte Löcher wurde die Proteinlösung gegeben. Um eine Wirkschwelle feststellen zu können, wurden unterschiedliche

Proteinkonzentrationen getestet: unverdünntes Protein mit einer Konzentration von 1000 µg/ml (34,8 µM), verdünnte Probe mit Konzentrationen von 333 µg/ml, 100 µg/ml, 33 µg/ml bzw. 10 µg/ml. In der ersten Durchführung konnte auch bei der unverdünnten Proteinprobe mit einer Konzentration von 1000 µg/ml bei keinem der ausgewählten Mikroorganismen ein Hemmhof gemessen werden. Lediglich die Positivkontrolle, bei der das antimikrobiell wirksame Lysozym (100 ng/µl) verwendet wurde, zeigte abgrenzbare Hemmhöfe (je nach Erreger zwischen 5 und 7 mm große Hemmhöfe). Zwei weitere Testungen bestätigten, dass das Profilaggrin-Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ keine antibakterielle Wirkung gegen die ausgewählten Bakterienstämme besitzt. Eine Übersicht ist in Tab. 3.1 gezeigt.

Tab. 3.1: Radialer Plattendiffusionstest zur Testung antimikrobieller Aktivität des Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉. kH = keinHemmhof.

Testorganismus \ Konzentration	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>Candida albicans</i> ATCC 24433
1000 µg/ml (1:1)	kH	kH	kH	kH
333 µg/ml (1:3)	kH	kH	kH	kH
100 µg/ml (1:10)	kH	kH	kH	kH
33 µg/ml (1:30)	kH	kH	kH	kH
10 µg/ml (1:100)	kH	kH	kH	kH
Lysozym 500 ng/ µl	6 mm	7 mm	5 mm	7 mm

4 Diskussion

Die Haut des Menschen ist permanent der Umwelt und ihren Einflüssen ausgesetzt. Dabei ist es für sie besonders wichtig, den Verlust von Wasser zu minimieren und gleichzeitig das Eindringen von Pathogenen zu verhindern. Auf der epithelialen Oberfläche lebt eine Vielzahl von Mikroorganismen. Einige gehören der natürlichen Hautflora an, während andere in zu großer Anzahl schädigend wirken. Dennoch zeigt die gesunde Haut keine Zeichen von Läsionen und kann ihre Barrierefunktionen zum Schutz vor übermäßiger Besiedelung durch Bakterien sowie vor Austrocknung aufrechterhalten (Harder und Schröder, 2005). Dieses eindrucksvolle Phänomen lässt sich unter anderem durch die Existenz antimikrobieller Peptide erklären, die zum Teil auch in der gesunden Epidermis von den Keratinozyten exprimiert werden und so die Kolonisierung der Bakterien kontrollieren und eindämmen können (Schröder, 1999). Bei Kontakt mit pathogenen Erregern kann die Synthese weiterer Effektormoleküle verstärkt werden und so eine flächige Besiedelung und ein Eindringen in die oberen Hautschichten verhindert werden.

In dieser Arbeit wurde eines jener Proteine näher auf antimikrobielle Aktivität untersucht, das in humanen Keratinozyten exprimiert wird und zusammen mit den Keratinen 80 - 90% der Proteinmasse der Epidermis ausmacht (Candi *et al.*, 2005): Filaggrin. In unserer Arbeitsgruppe konnte für N-terminale Fragmente des Profilaggrins antimikrobielle Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* nachgewiesen werden (Ch. Schulz, D. Karsch, unveröffentlicht). Weitere Untersuchungen sollten auf diesen Erkenntnissen aufbauen und prüfen, ob sich Sequenzen des Profilaggrin-C-Terminus ähnlich verhalten. Dabei wurde für diese Arbeit eine Peptid-Sequenz gewählt, die am Ende des letzten Filaggrin-Repeats beginnt und bis in das sich anschließende trunkierte Filaggrin reicht (siehe Abb. 1.2). Die Bedeutung der C-terminalen Sequenzen des Profilaggrins ist bisher nicht ausreichend geklärt. Für die 157 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne ist bekannt, dass sie eine Rolle bei der Prozessierung der Profilaggrin-Proteine in Filaggrin-Monomere spielt (Presland *et al.*, 1992). Denn bei Menschen, die aufgrund einer Mutation in der kodierenden Sequenz der C-terminalen Domäne diese nicht vollständig exprimieren, ist dieser Prozessierungsschritt gestört (Sandilands *et al.*, 2009).

Bei Patienten mit Atopischer Dermatitis konnte gezeigt werden, dass in den erkrankten Hautarealen die Barrierefunktion der Epidermis gestört ist (Gläser *et al.*, 2005). Bei dieser weit verbreiteten Hauterkrankung, die auch als "atopisches Ekzem" oder „Neurodermitis“ bezeichnet wird, handelt es sich um eine chronische Erkrankung, die durch gerötete, schuppige Hautläsionen begleitet von Juckreiz gekennzeichnet ist und typischerweise in Schüben auftritt. Zudem ist bekannt, dass die Atopische Dermatitis mit Hautinfektionen in den betroffenen Arealen assoziiert ist, die beispielsweise durch *Staphylococcus aureus* ausgelöst werden können (Ong *et al.*, 2002). Interessanterweise wurde beschrieben, dass viele Patienten „loss-of-function“-Mutationen im Filaggrin-Gen tragen (Sandilands *et al.*, 2009). Um Filaggrin weiter charakterisieren zu können, wurde das ausgewählte Profilaggrin-Fragment FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ zunächst rekombinant hergestellt. Die Technik der rekombinanten Expression von Proteinen in Bakterien erlaubt die schnelle und effiziente Produktion von Proteinen in großen Mengen. Als Organismus für die rekombinante Expression wurde *E. coli* gewählt, da dieses Bakterium aufgrund seiner einfachen Kultivierbarkeit im Labor und seiner schnellen Verdopplungszeit gut für dieses Vorhaben geeignet ist (Sambrook *et al.*, 1989). Nach der erfolgreichen Generierung folgte die Analyse des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins. Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob der C-Terminus von Profilaggrin, wie es bereits für N-terminale Sequenzabschnitte nachgewiesen werden konnte, antimikrobielle Effekte auf potentiell pathogene Mikroorganismen zeigt. Um ein möglichst repräsentatives Erregerspektrum zur Beurteilung heranziehen zu können, wurden unterschiedliche Klassen von Mikroorganismen getestet (siehe 2.9). Die im radialen Plattendiffusionstest eingesetzte maximale Proteinkonzentration von 1000 µg/ml (34,8 µM) erzielte jedoch keine nachweisbare Wirkung gegen die Testorganismen.

Interessanterweise zeigte die massenspektrometrische Analyse, die sich an den Aufreinigungsschritt der C8-Umkehrphasen-HPLC anschloss, neben der Masse des Fusionsproteins ein weiteres, im Vergleich zum rekombinant hergestelltem Fusionsprotein 311,7 Da kleineres Protein, welches im Chromatogramm der C8-Umkehrphasen-HPLC-Analyse nicht vom Fusionsprotein getrennt werden konnte und daher erst in diesem Analyseschritt erkannt wurde. Auch in den Fraktionen der C4- und C2/C18-Umkehrphasen-HPLC wurde ein kürzeres Produkt (312,3 Da Massendifferenz) detektiert. Da sich die Proteine mittels Standardgradienten nicht separieren ließen, wurde durch Veränderung des Gradienten versucht, die beiden

Produkte in unterschiedliche Fraktionen aufzutrennen. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Methoden gelang dies jedoch nicht.

Es stellt sich nun die Frage, um was für ein Produkt es sich bei dem kleineren Protein handelt und wie es entstehen konnte. Möglicherweise könnte es sich hierbei um ein verkürztes Protein des Profilaggrin-Fragments FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ handeln. Beide Fusionsproteine wurden von der SUMO-Protease 2 geschnitten. Dieses Enzym ist eine Protease, die spezifisch an der Tertiärstruktur des rekombinanten Proteins den SUMO3-Fusionstag erkennt und diese Sequenz abspaltet. Die Spaltung eines fremden Proteins ohne diese Erkennungsstruktur, beispielsweise ein von den verwendeten *E. coli*-Bakterien BL21 (DE3) pLysS hergestelltes und anschließend weiter mitaufgereinigtes Protein, ist daher wenig wahrscheinlich.

Die Differenz der Massen von 311,7 Da bzw. 312,3 Da würde mit der theoretischen Masse zweier Arginin-Moleküle übereinstimmen, die in einer Peptidbindung jeweils 156,2 Da verzeichnen. Diese Aminosäuren befinden sich am C-Terminus des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins (siehe 6.2.2) und könnten daher abgespalten worden sein. Anhand von Sequenzanalysen mit der Sequenzdatenbank für Proteine ExPASy (Expert Protein Analysis System) ließ sich belegen, dass die Masse des rekombinant hergestellten Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ abzüglich der zwei endständigen Arginine theoretisch 28418,7 Da betragen würde. Diese Masse unterscheidet sich lediglich in 0,3 Da von der gemessenen Masse des verkürzten Proteins.

Dass bereits eine Mutation in einem der Primer im Zuge der Amplifikationsschritte des Fragments eine verkürzte Sequenz verursacht haben könnte, lässt sich nahezu ausschließen. Die Sequenzierung, welche vor der Transformation des pSUMO3-Vektorsystems samt Filaggrin-Insert in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen durchgeführt wurde, zeigte keine Mutationen in der Basenfolge auf. Ein verkürztes Fragment könnte entstehen, wenn der Austausch einer Base eine Punktmutation mit der Funktion eines Stoppkodons zur Folge hätte. Neben 61 Aminosäure-kodierenden Basentriplets sind nur drei Basenkombinationen für ein Stoppkodon bekannt: UAG, UAA sowie UGA (Bickel, 1994). Für die Aminosäure Arginin kodieren folgende Basentriplets: CGG, CGA, CGC, CGU sowie AGG und AGA. Nur CGA und AGA könnten im Falle einer Punktmutation durch Basenaustausch in UGA umgewandelt werden. Desweiteren könnten zweifache Mutationen zu Abbrüchen führen. Die Wahrscheinlichkeit, dass es so zum Abbruch der Proteinbiosynthese gekommen ist, wäre aber als gering einzuschätzen. Aufgrund der Länge der Sequenz des

FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins von über 800 bp wurde die Sequenzierung von beiden Seiten, das heißt mit einem 3'- und einem 5'-Primer, durchgeführt, um ein sicheres Ergebnis zu erreichen (siehe 2.5.9). Es wurde ausschließlich mit Proben weitergearbeitet, deren Basenfolgen vollständig mit der vorgegebenen Sequenz übereinstimmten. Die Ursache der Entstehung eines verkürzten Profilaggrin-Proteins liegt somit höchstwahrscheinlich in den Expressions- oder Aufreinigungsschritten.

Denkbar ist, dass der ausgewählte *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS über Enzyme verfügt, die in der Lage sind, das exprimierte Profilaggrin-Protein an seinem C-Terminus zu schneiden und dabei die beiden Arginine von der benachbarten Glutaminsäure abzuspalten. Unklar ist jedoch, welches Enzym so spezifisch an dieser Position schneidet. Tryptische Enzyme, die C-terminal von Arginin und Lysin spalten, können nahezu ausgeschlossen werden. Da das rekombinant hergestellte Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ über 30 Arginine in seiner Proteinsequenz enthält, wären zahlreiche weitere Spaltprodukte zu erwarten.

In Bakterien der Gattung *Staphylococcus aureus* wurde bereits die Glutamylpeptidase I-Familie identifiziert, welche spezifisch zwischen Glutaminsäure und Arginin schneidet (Schilling und Overall, 2008). Daher wäre es möglich, dass auch der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS eigene Enzyme besitzt, die an dieser Stelle im Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ schneiden. Für *E. coli*-Bakterien sind bereits verschiedene Glutamylpeptidasen bekannt (Gonzales und RobertBaudouy, 1996; Suzuki *et al.*, 2001). Ein Enzym, das zu dieser Enzymklasse gehört, ist die Metallopeptidase Aminopeptidase A (Jankiewicz und Bielawski, 2003). Vermutlich spielt sie eine Rolle in regulatorischen Prozessen der *E. coli*-Bakterien, denn sie besitzt die Fähigkeit an DNA zu binden (Charlier *et al.*, 2000; Minh *et al.*, 2009). Als Substrate der Aminopeptidase A wurden bisher jedoch nur die Aminosäuren Cystein und Glycin identifiziert (Suzuki *et al.*, 2001). Prinzipiell wäre es aber denkbar, dass eine bisher nicht identifizierte Glutamylpeptidase das FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Protein schneiden könnte. Auf der Suche nach einer Peptidase, die spezifisch Glutaminsäure von Arginin abspaltet, wurde die Peptidase-Datenbank „MEROPS“ herangezogen. Dort konnte jedoch kein Enzym mit diesen Eigenschaften ausfindig gemacht werden.

Neben der Verwendung von Proteaseinhibitoren bestände eine weitere Möglichkeit, die Aktivität möglicher bakterieller Enzyme zu senken, darin, die Temperatur des Reaktionsansatzes etwa auf 4°C herabzusetzen, denn die meisten Enzyme brauchen eine weitaus höhere optimale Arbeitstemperatur. Bei 0°C finden

Reaktionen in der Regel nur sehr langsam statt. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt bis 37°C an, darüber verändert sich bei vielen Enzymen die für die Funktion wichtige Tertiärstruktur, die Reaktionsgeschwindigkeit wird dadurch vermindert. Daher liegt das Optimum der Wirkung bei den meisten Enzymen zwischen 30 und 45°C. Eine bekannte Ausnahme stellt die *Taq*-Polymerase aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus* dar, die selbst bei Temperaturen über 95°C noch aktiv ist (Bickel, 1994).

Gleichzeitig stellt sich die Frage, warum nicht alle Proteine der Expression von den Bakterien gespalten wurden, wenn tatsächlich bakterieneigene Enzyme zur Prozessierung des Proteins geführt haben. Ein Erklärungsansatz wäre, dass die Aktivität eines putativen bakteriellen Enzyms nicht ausreichend hoch ist. Bei dem Proteinfragment FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ handelt es sich vermutlich nicht um ein spezifisches Substrat prokaryotischer Zellen. Da solche bakteriellen Enzyme für bakterielle Prozesse optimiert sind, ist vorstellbar, dass sie das Profilaggrin-Fragment eventuell nicht effizient spalten können. Desweiteren könnten quantitativ nicht ausreichend viele Enzyme im Bakterium vorhanden sein, um die FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Fragmente vollständig zu prozessieren. Denn durch die Induktion der Expression des Profilaggrin-Proteins mittels IPTG sollte hauptsächlich das Profilaggrin-Fusionsprotein synthetisiert werden, während kaum noch Proteine des bakteriellen Stoffwechsels produziert werden.

Möglicherweise handelt es sich bei dieser Position der beiden Arginine aber auch um eine "Sollbruchstelle". Das würde bedeuten, dass diese Stelle unter Umständen besonders empfindlich oder anfällig für enzymatische Abspaltungen ist und dazu dienen könnte, den C-Terminus des Proteins abzutrennen. Auch ein spontaner Zerfall des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins ist nicht auszuschließen. Studien unserer Arbeitsgruppe konnten für das verwandte „S100 Fused Type“-Protein Hornerin zeigen, dass dieses Protein sehr fragil ist und unter bestimmten Bedingungen leicht in kleinere Einheiten zerfällt (Wu *et al.*, 2009). Dieser autoproteolytische Prozess wurde bei unterschiedlich vorherrschenden pH-Werten beobachtet und scheint daher von dieser Kondition beeinflusst zu sein. Darüber hinaus führt diese Art des Proteinabbaus zu einer Komplexbildung der Hornerinfragmente (Wu *et al.*, 2009). Doch zu welchem Zweck sollten so kurze Fragmente entstehen? In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, warum trunke Filaggrin-Sequenzen im Profilaggrin-Protein existieren. Diese Sequenzen befinden sich im *Filaggrin*-Gen direkt N- und C-terminal der zehn bis zwölf Filaggrin-Repeats. Bekanntermaßen

kodieren diese Genabschnitte nicht für funktionsfähige Strukturproteine (Presland *et al.*, 1992). Daher kann vermutet werden, dass diese verkürzten Einheiten eine andere Funktion innehaben. Für einzelne und modifizierte Aminosäuren der biologisch aktiven Filaggrin-Monomere ist bereits bekannt, dass sie zum Feuchtigkeitshaushalt der Epidermis entscheidend beitragen, indem sie als „Natural Moisturizing Factor“ bewirken, dass vermehrt Wassermoleküle in den oberen Hautschichten verbleiben (Kezic *et al.*, 2008). Möglicherweise wirkt die trunkierte Filaggrin-Einheit ebenfalls an diesem Mechanismus zum Schutz der Haut vor Austrocknung mit. Eine weitere mögliche Funktion könnte in der Unterstützung der kutanen Abwehr liegen. Besitzt dieses C-terminale Fragment unter Umständen antimikrobielle Aktivität gegen pathogene Bakterien? In der Dissertation von Zhihong Wu wurden für Hornerin-Fragmente antimikrobielle Effekte beschrieben. Hornerin ist ein epidermales Protein, das wie Profilaggrin zu der "S100 Fused Type"-Familie zählt. Es konnte nachgewiesen werden, dass tryptisch verdaute Hornerin-Fragmente im Gegensatz zu ungespaltenen Hornerin-Proteinfragmenten antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Mikroorganismen besitzen (Wu, 2005).

Für die Abklärung der Herkunft des vermutlich um zwei Arginin-Reste verkürzten FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins wurde eine weitere analytische Strategie gewählt. Mit Hilfe eines Enzyms sollten die rekombinant hergestellten Proteine verdaut werden und die Spaltprodukte im Anschluss näher untersucht werden. Ein Enzym, das häufig zur Spaltung von zu sequenzierenden Proteinen verwendet wird, ist die Serinprotease Trypsin, die an C-terminalen Positionen der Aminosäuren Arginin und Lysin schneidet. Doch im rekombinant hergestellten Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ befinden sich zu viele potentielle Trypsinschnittstellen, wodurch in einem Verdauungsansatz sehr viele kleine Fragmente entstehen würden. Diese wären aufgrund ihrer Größe schwer zu identifizieren, denn je kleiner die Fragmente sind, desto schwieriger ist es, sie im Massenspektrometer zu ionisieren. Daher wurde die Endoproteinase AspN verwendet, welche spezifisch N-terminal an Asparaginsäure- und Cystein-Resten spaltet. Die Produkte des Verdauens wurden im „Collision-Induced Dissociation“-Modus sequenziert. Mit dieser Methode sollte gezeigt werden, ob die Fragmente ausnahmslos aus dem Profilaggrin-Protein stammen, oder ob zusätzlich Fragmente identifiziert werden, die diesem Protein nicht zugeordnet werden können. Letztere können in einer Sequenz-Datenbank mit bekannten Sequenzen verglichen werden. In diesem Fall sollte geklärt werden, ob es sich um Proteinfragmente eines

bakteriellen Proteins des *E. coli*-Stamms BL21 (DE3) pLysS handeln könnte. Doch alle signifikanten Sequenzen stimmten mit Sequenzen des Profilaggrins überein. Somit gab es keine Hinweise auf ein anderes Protein oder eine Kontamination durch bakterielle Proteine der Probe. Zu beachten ist jedoch, dass nur zwei- bis dreifach geladene Fragmente sequenziert wurden. Einfach geladene sowie schlecht ionisierbare Fragmente ließen sich nicht analysieren. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass doch Proteinfragmente, die nicht aus einem Profilaggrin-Protein stammen, in der Probe enthalten waren. Weiterführende Experimente zur näheren Charakterisierung der verkürzten Variante des Profilaggrin-Proteins wurden im Umfang dieser Arbeit nicht durchgeführt. Denkbar wäre es, jedes im AspN-Verdau entstandene Fragment zu sequenzieren um so eventuell doch Hinweise auf eine bakterielle Herkunft zu finden. Eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC-Trennung der AspN-verdauten Proteinprobe und anschließender Analyse aller Fraktionen könnte hier detailliertere Information über eventuell vorhandene Kontaminationen geben.

Andererseits stehen eine Reihe verschiedener Auftrennungsverfahren zur Verfügung, um die beiden entstandenen Proteine voneinander zu separieren. Eine davon stellt die "Isoelektrische Fokussierung" dar. In einer Elektrophorese in einem Gel mit pH-Gradienten können die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt werden. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist der pH-Wert, an dem seine Nettoladung neutral ist (Mortimer und Müller, 2007). Die Proteine wandern im Gel an die Stelle, an der dieser pH-Wert vorliegt, und verbleiben dort. Auf diese Weise lassen sich auch Proteine auftrennen, die sich nur in einer Aminosäure unterscheiden (Michov, 1995). Der theoretische pI-Wert des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins liegt bei 7,49. Arginin als stark basische Aminosäure hat einen pI-Wert von 11,76. Die verkürzte Profilaggrin-Version ist in seinen chemischen Eigenschaften ohne zwei Arginine saurer und befindet sich daher mit einem pI-Wert von 6,96 unterhalb des isoelektrischen Punktes des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Fragments.

Eine weitere Methode zur Separation der entstandenen Proteine stellt die Ionenaustauschchromatographie dar, die ionisierte Substanzen anhand ihrer Interaktion mit dem geladenen Säulenmaterial trennt. Da die C-terminalen Arginine des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins polare Seitenketten besitzen, die dem verkürzten Protein fehlen, unterscheiden sich die beiden Proteine in ihrer Polarität. Das stärker geladene Protein wird besser an das entgegengesetzt geladene Säulenmaterial

binden und folglich auch später eluieren. Auch der pH-Wert des Puffers beeinflusst diesen Prozess, da dieser die Nettoladung von Protein und Säulenmaterial bedingt. Liegt der pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins, bindet das Protein nur schwach. Da sich der pI-Wert der beiden Proteine unterscheidet, sollte die Trennung mit Hilfe dieses chromatographischen Verfahrens gelingen.

Eine weitere Fraktionierungsmethode ist die Größenausschlusschromatographie, die sich Unterschiede in der Molekülgröße zur Trennung zu Nutze macht. Die Proteine werden nach der Größe ihres Molekulargewichtes zwischen den Poren der Trennphase (Gel) und der mobilen Phase filtriert. Während kleinere Proteine in die Poren eindringen und dort zurückgehalten werden, werden größere Proteine ausgeschlossen und als erstes eluiert (Gey, 2008). Die Differenz der Massen des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins und des kürzeren Proteins beträgt 312 Da. Die meisten Gelfiltrationssäulen trennen Proteine jedoch erst bei Massenunterschieden im kDa-Bereich auf.

Würde die Auftrennung der beiden Proteine mit Hilfe eines dieser Verfahren gelingen, ließe sich prüfen, ob eines von beiden doch antimikrobielle Effekte besitzt und es womöglich in den für diese Arbeit durchgeführten radialen Plattendiffusionstests aufgrund einer jeweils zu geringen Konzentration der einzelnen Proteine zu dem Resultat einer nicht-nachweisbaren antimikrobiellen Wirkung kam. Gleichzeitig könnte massenspektrometrisch überprüft werden, ob es sich bei dem kleineren Protein tatsächlich um eine verkürzte Version des rekombinanten FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Proteins handelt.

Im Rahmen der hier vorgelegten Studie konnte keine antimikrobielle Aktivität für das C-terminale Profilaggrin-Fragment FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ festgestellt werden. Während der Beitrag des Profilaggrins zur kutanen Abwehr nach wie vor unklar bleibt, wurde die Bedeutung des gesamten Profilaggrin-Proteins in der epidermalen Differenzierung bereits einige Jahre nach Identifizierung dieses Hautproteins ergründet (Dale *et al.*, 1985). Filaggrin wird im *Stratum granulosum* in den Keratinozyten zunächst als unlösliches Propeptid Profilaggrin synthetisiert (Resing *et al.*, 1995a) und in F-Keratohyalin-Granula (Steven *et al.*, 1990) gespeichert (siehe Abb. 4.1). Während des Differenzierungsprozesses der Keratinozyten wird Profilaggrin bei steigendem intrazellulären Ca²⁺-Spiegel exprimiert (zunächst entdeckt in Mäusen; Dale *et al.*, 1983). Durch Dephosphorylierung und Proteolyse wird es in lösliche etwa 37 kDa große aktive Filaggrin-Einheiten gespalten (O'Regan *et al.*, 2008). Als verantwortliche

Enzyme der Prozessierung wurden unter anderem die Profilaggrin Endoprotease 1 (Resing *et al.*, 1995b), die Ca^{2+} -abhängige Protease Calpain (Yamazaki *et al.*, 1997) sowie die Ca^{2+} -abhängigen Serinproteasen Furin und PACE 4 (Pearton *et al.*, 2001) beschrieben. Die entstandenen funktionellen Filaggrin-Einheiten sind an der Ausbildung des „Cornified Cell Envelope“ beteiligt, indem sie die Keratinfilamente der Zellen aggregieren. Die Struktur des Zytoskeletts wird dadurch abgeflacht und ist schließlich in seiner ursprünglichen Form nicht mehr vorhanden (Dale *et al.*, 1997).

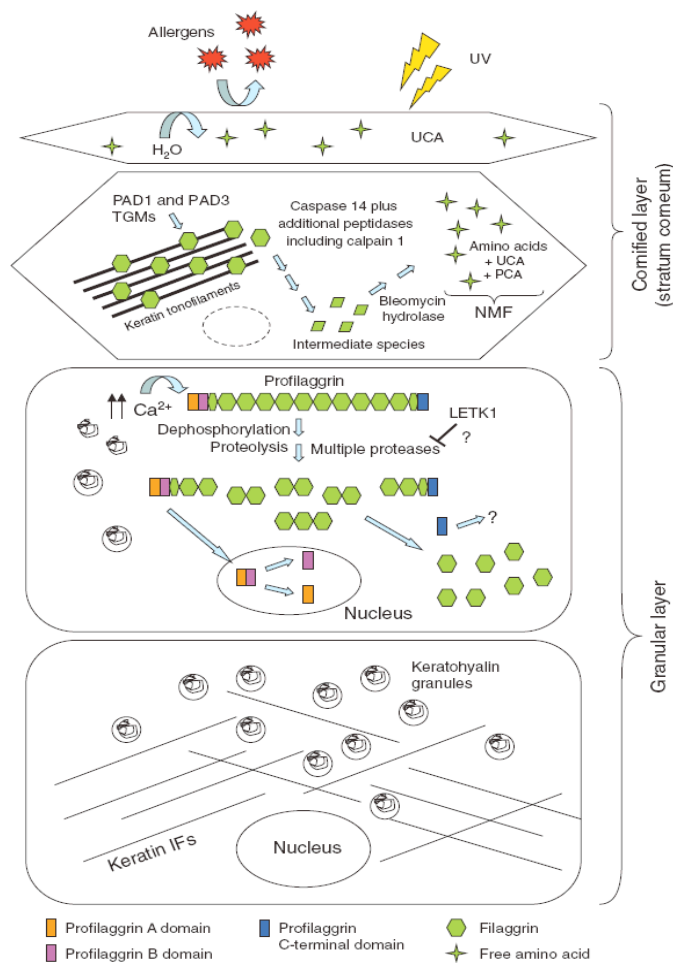


Abb. 4.1 Prozessierung des humanen Profilaggrin in der epidermalen Differenzierung.

Im *Stratum granulosum* wird Profilaggrin als inaktive, unlösliche Form in Keratohyalin-Granula gespeichert. In Folge der ansteigenden Ca^{2+} -Konzentration in den Keratinozyten wird Profilaggrin dephosphoryliert und durch Proteasen gespalten. Der N-Terminus wird in den Zellkern aufgenommen. Die freien Filaggrin-Monomere binden im *Stratum corneum* direkt an Keratin-Filamente. Deren Kollaps führt daraufhin zur Kondensierung des Keratin-Zytoskeletts. Transglutaminasen (TGM) vernetzen die Filamente während Peptidylarginindeiminasen (PAD) sie weiter zur unlöslichen Keratin-Matrix modifizieren. Die Filaggrin-Monomere werden mit Hilfe verschiedener Proteasen, darunter Caspase 14, weiter zerlegt und die freien Aminosäuren und ihre Derivate (UCA = Urocaninsäure; PCA = Pyrrolidoncarbonsäure) wirken als „Natural Moisturizing Factors“ in der Hauthydratation und möglicherweise im UV-Schutz der Haut mit (aus Sandilands *et al.*, 2009).

Damit gehört Filaggrin zu jenen Proteinen, die den Verhornungsprozess der Keratinozyten (Keratinisation) der Zellen einleiten. Die Filaggrin-Monomere werden im *Stratum corneum* mit Hilfe verschiedener Proteasen, darunter Caspase 14 (Denecker *et al.*, 2007), weiter in freie Aminosäuren und ihre Derivate (Urocaninsäure; Pyrrolidoncarbonsäure; Abbauprodukte der Aminosäuren Glutamin,

Glutaminsäure sowie Histidin) gespalten (Lippens *et al.*, 2000). Diese Abbauprodukte dienen als „Natural Moisturizing Factors“ als wichtige Feuchtigkeitsspender, denn sie bewirken, dass mehr Wasser in der Epidermis verbleibt (Harding *et al.*, 2000; Kezic *et al.*, 2008). Folglich steht den Proteasen ausreichend Wasser für ihre Spaltungsprozesse zur Verfügung. Gleichzeitig verleihen diese Feuchtigkeitsspender der Haut zusätzliche Flexibilität. Für den N-Terminus des Profilaggrin-Proteins ist bisher bekannt, dass er in den Zellkern aufgenommen wird und dort regulatorisch wirkt (Pearson *et al.*, 2002).

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen dennoch, dass es nicht auszuschließen ist, dass der C-Terminus eine Rolle in der kutanen Abwehr spielen könnte. Da in weiteren Studien (Ch. Schulz und D. Karsch, unveröffentlicht) antimikrobielle Aktivität in N-terminalen Profilaggrin-Sequenzen nachgewiesen werden konnte, ist eine Verwendung anderer Teilsequenzen dieses Proteins als körpereigenes Antibiotikum in der Zukunft nicht auszuschließen. Das Problem der Resistenzentwicklung von Antibiotika im klinischen Gebrauch und damit einhergehend die Schwierigkeiten der Therapie zur effektiven Bekämpfung bakterieller Infektionen verdeutlichen die Wichtigkeit der Entwicklung alternativer Antibiotika. Denn viele Mikroorganismen sind in der Lage, Enzyme zu produzieren, welche die Wirkung antimikrobieller Substanzen aufheben können und sie damit durch Anwendung dieser Medikamente nicht geschädigt werden können. Insbesondere bei dermatologischen Erkrankungen, die mit Hautbarriere-Defekten einhergehen wie die Atopische Dermatitis, wirft die Bedeutung von Profilaggrin nach wie vor viele Fragen auf und die Erforschung der Eigenschaften dieses epidermalen Proteins ist daher in Zukunft weiterhin von großem Interesse.

5 Zusammenfassung

Antimikrobielle Peptide gehören zur chemischen Barriere der menschlichen Haut und tragen dazu bei, dass diese trotz einer hohen Besiedelung durch Mikroorganismen ausgesprochen selten infiziert wird. In der Unterstützung der natürlichen Resistenz der Haut exprimieren die Keratinozyten konstitutive und induzierbare antimikrobielle Peptide, darunter RNase-7, Psoriasin und Lysozym. Für die epidermalen „S100-Fused-Type“-Proteine Hornerin und Ifapsoriasin konnte ebenfalls antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Ein weiteres Protein dieser Familie ist das über 400 kDa große Profilaggrin. Seine Funktion in der epidermalen Differenzierung ist seit langem bekannt. Als Strukturprotein ist Filaggrin im Zuge der Keratinisation an der Ausbildung des „Cornified Cell Envelope“ beteiligt. Desweiteren dienen seine Abbauprodukte als wichtige Feuchtigkeitsspende der Hydratation der Haut. Bei Patienten mit Atopischer Dermatitis führen Mutationen im *Filaggrin*-Gen zu einer Störung der Barrierefunktion. Es zeigt sich ein Krankheitsbild mit starker Austrocknung der Haut und einer erhöhten Infektanfälligkeit. Daher könnte vermutet werden, dass Peptidfragmente des Profilaggrins antimikrobielle Eigenschaften aufweisen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein C-terminales Fragment des Profilaggrins zur Bakterienabwehr beitragen und so die Integrität der Haut fördern könnte. Ziel war es, das Profilaggrin-Fragment FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉, dessen Sequenz einen Teil des letzten C-terminalen Filaggrin-Repeats sowie des C-terminalen trunkierten Filaggrins einschließt, näher auf mögliche antimikrobiellen Eigenschaften zu untersuchen. Zur Generierung des rekombinanten Proteins wurde das Fragment zunächst mittels Standard- und „Nested“-PCR amplifiziert. Als DNA-Material wurde cDNA aus ausdifferenzierten humanen Keratinozyten neonataler Vorhautepidermis gewählt. Zur Vervielfältigung des PCR-Produktes wurde das Fragment in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert, der in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert wurde. Für die Expression des rekombinanten Profilaggrin-Proteins wurde das Fragment in den Expressionsvektor pSUMO3 kloniert und der geschlossene Vektor in die *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert. Das rekombinant exprimierte Protein FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ wurde chromatographisch aufgereinigt. In der anschließenden massenspektrometrischen Analyse wurde neben dem FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Protein ein

weiteres Protein detektiert. Bei diesem Produkt handelt es sich um ein kleineres Protein, welches aufgrund seiner Masse und in Übereinstimmung mit Sequenzanalysen sehr wahrscheinlich eine trunkierte Version des FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉-Profilaggrin-Proteins darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Proteine nicht voneinander getrennt werden. Für die abschließende antimikrobielle Testung der Proteinprobe wurden der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die Gram-negativen Stämme *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433 ausgewählt. Die vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass das C-terminale Fragment FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ in den eingesetzten Konzentrationen keine antimikrobielle Aktivität gegen die ausgewählten Testorganismen besitzt. Dennoch tragen diese Erkenntnisse zum weiteren Verständnis der antimikrobiellen Peptide der Haut bei. In der Erforschung zukünftiger therapeutischer Ansätze im Einsatz natürlicher Antibiotika sind weitere Untersuchungen des Profilaggrins hinsichtlich seiner möglichen antimikrobiellen Eigenschaften weiterhin von großem Interesse. Insbesondere bei Dermatosen, die mit Hautbarriere-Defekten einhergehen, ist die Bedeutung von Profilaggrin nach wie vor nicht ausreichend geklärt.

6 Anhang

6.1 Vektorkarten

6.1.1 pGEM-T-Vektor

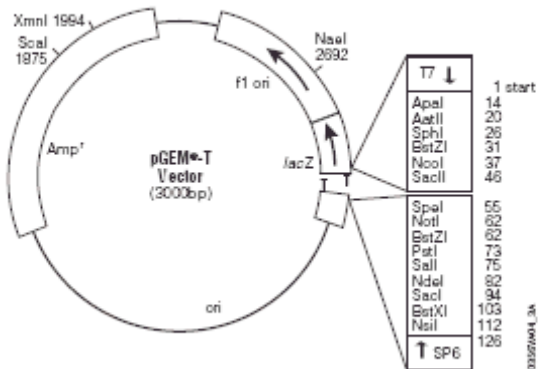


Abb. 6.1: Schematische Darstellung des pGEM-T-Klonierungsvektors. Eingezeichnet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme und als Kästen markiert wichtige Sequenzabschnitte. Ori: Replikationsursprung; lacZ: lacZ-kodierende Sequenz (aus Technical Manual pGEM-T vector systems; Promega).

6.1.2 pSUMO3-Vektor

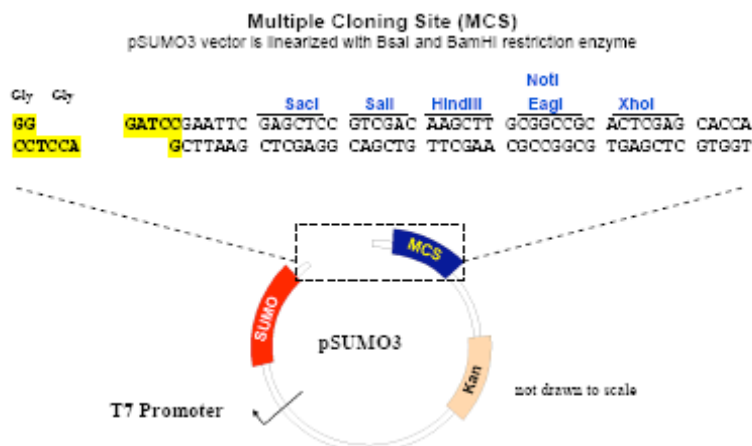


Abb. 6.2: Schematische Darstellung des pSUMO3-Expressionsvektors. Eingezeichnet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme und als Kästen verschiedene Sequenzabschnitte: Kan: Gen für Kanamycin-Resistenz; MCS: „Multiple Cloning Site“; SUMO: SUMO-Gensequenz (aus Polylinker map, pSUMO3 vector, T7 Kan, LifeSensors).

7 Literaturverzeichnis

- Bensch, K. W., Raida, M., Magert, H. J., Schulz-Knappe, P., Forssmann, W. G., 1995. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 368, 331 - 335.
- Bickel, H., 1994. in: *Natura*, 2. Auflage, Klett, Stuttgart.
- Boman, H. G., 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* 173, 5 - 16.
- Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 328 - 340.
- Charlier, D., Kholti, A., Huysveld, N., Gigot, D., Maes, D., Thia-Toong, T. L., Glansdorff, N., 2000. Mutational analysis of *Escherichia coli* PepA, a multifunctional DNA-binding aminopeptidase. *Journal of Molecular Biology* 302, 411 - 426.
- Cole, A. M. und Lehrer, R. I., 2003. Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. *Curr. Pharm. Des* 9, 1463 - 1473.
- Dale, B. A., Presland, R. B., Lewis, S. P., Underwood, R. A., Fleckman, P., 1997. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J. Invest Dermatol.* 108, 179 - 187.
- Dale, B. A., Resing, K. A., Lonsdale-Eccles, J. D., 1985. Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 455, 330 - 342.
- Dale, B. A., Scofield, J. A., Hennings, H., Stanley, J. R., Yuspa, S. H., 1983. Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium. *J. Invest Dermatol.* 81, 90s - 95s.
- Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hochepeid, T., Ovaere, P., Lippens, S., Van den, B. C., Van Damme, P., D'Herde, K., Hachem, J. P., Borgonie, G., Presland, R. B., Schoonjans, L., Libert, C., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., Vandenaabeele, P., Declercq, W., 2007. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat. Cell Biol* 9, 666 - 674.
- Drake, D. R., Brogden, K. A., Dawson, D. V., Wertz, P. W., 2008. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J. Lipid Res.* 49, 4 - 11.
- Gan, S. Q., McBride, O. W., Idler, W. W., Markova, N., Steinert, P. M., 1990. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 29, 9432 - 9440.
- Gey, M., 2008. in: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, 2. Auflage, Springer, Berlin.

- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M., 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* 6, 57 - 64.
- Gonzales, T. und RobertBaudouy, J., 1996. Bacterial aminopeptidases: Properties and functions. *Fems Microbiology Reviews* 18, 319 - 344.
- Hansmann, B., 2008. Proteinexpressionsanalysen und Funktionsuntersuchungen von Ifapsoriasin in der menschlichen Haut. Dissertation
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J. M., 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861 -
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J. M., 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276, 5707 - 5713.
- Harder, J., Gläser, R., Schröder, J. M., 2007. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J. Endotoxin. Res.* 13, 317 - 338.
- Harder, J. und Schröder, J. M., 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* 277, 46779 - 46784.
- Harder, J. und Schröder, J. M., 2005. Antimicrobial peptides in human skin. *Chem. Immunol. Allergy* 86, 22 - 41.
- Harding, C. R., Watkinson, A., Rawlings, A. V., Scott, I. R., 2000. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int. J. Cosmet. Sci.* 22, 21 - 52.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R., 1988. Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in Phastsystem Development Unit .1. Staining of Sodium Dodecyl-Sulfate Gels. *Electrophoresis* 9, 28 - 32.
- Houben, E., De Paepe, K., Rogiers, V., 2007. A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol. Physiol* 20, 122 - 132.
- Jankiewicz, U. und Bielawski, W., 2003. The properties and functions of bacterial aminopeptidases. *Acta Microbiol. Pol.* 52, 217 - 231.
- Kalinin, A., Marekov, L. N., Steinert, P. M., 2001. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J. Cell Sci.* 114, 3069 - 3070.
- Kezic, S., Kemperman, P. M., Koster, E. S., de Jongh, C. M., Thio, H. B., Campbell, L. E., Irvine, A. D., McLean, W. H., Puppels, G. J., Caspers, P. J., 2008. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J. Invest Dermatol.* 128, 2117 - 2119.
- Lehrer, R. I., 2004. Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 727 - 738.

- Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K., Ganz, T., 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 105 - 128.
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death. Differ.* 12 Suppl 2, 1497 - 1508.
- Lippens, S., Kockx, M., Knaapen, M., Mortier, L., Polakowska, R., Verheyen, A., Garmyn, M., Zwijsen, A., Formstecher, P., Huylebroeck, D., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2000. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death. Differ.* 7, 1218 - 1224.
- Liu, A. Y., Destoumieux, D., Wong, A. V., Park, C. H., Valore, E. V., Liu, L., Ganz, T., 2002. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J. Invest Dermatol.* 118, 275 - 281.
- Lüllmann-Rauch, R., 2003. in: *Histologie*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Madison, K. C., 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J. Invest Dermatol.* 121, 231 - 241.
- Makino, T., Takaishi, M., Toyoda, M., Morohashi, M., Huh, N. H., 2003. Expression of hornerin in stratified squamous epithelium in the mouse: a comparative analysis with profilaggrin. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 485 - 492.
- Michov, B., 1995. in: *Elektrophorese. Theorie und Praxis*, 1. Auflage, Gruyter, Berlin.
- Minh, P. N. L., Devroede, N., Massant, J., Maes, D., Charlier, D., 2009. Insights into the architecture and stoichiometry of Escherichia coli PepADNA complexes involved in transcriptional control and site-specific DNA recombination by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research* 37, 1463 - 1476.
- Mischke, D., Korge, B. P., Marenholz, I., Volz, A., Ziegler, A., 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J. Invest Dermatol.* 106, 989 - 992.
- Mortimer, C. und Müller, U., 2007. in: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*, 9. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific Enzymatic Amplification of Dna In Vitro - the Polymerase Chain-Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263 - 273.
- Nemes, Z. und Steinert, P. M., 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* 31, 5 - 19.
- O'Regan, G. M., Sandilands, A., McLean, W. H., Irvine, A. D., 2008. Filaggrin in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*

- Ong, P. Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R. L., Leung, D. Y., 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1151 - 1160.
- Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W. H., 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* 38, 441 - 446.
- Pearton, D. J., Dale, B. A., Presland, R. B., 2002. Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J. Invest Dermatol.* 119, 661 - 669.
- Pearton, D. J., Nirunsuksiri, W., Rehemtulla, A., Lewis, S. P., Presland, R. B., Dale, B. A., 2001. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp. Dermatol.* 10, 193 - 203.
- Polakowska, R. R. und Haake, A. R., 1994. Apoptosis: the skin from a new perspective. *Cell Death. Differ.* 1, 19 - 31.
- Presland, R. B. und Dale, B. A., 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev. Oral Biol Med.* 11, 383 - 408.
- Presland, R. B., Haydock, P. V., Fleckman, P., Nirunsuksiri, W., Dale, B. A., 1992. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J. Biol Chem.* 267, 23772 - 23781.
- Resing, K. A., Johnson, R. S., Walsh, K. A., 1995a. Mass spectrometric analysis of 21 phosphorylation sites in the internal repeat of rat profilaggrin, precursor of an intermediate filament associated protein. *Biochemistry* 34, 9477 - 9487.
- Resing, K. A., Thulin, C., Whiting, K., al Alawi, N., Mostad, S., 1995b. Characterization of profilaggrin endoprotease 1. A regulated cytoplasmic endoprotease of epidermis. *J. Biol Chem.* 270, 28193 - 28198.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T., 1989. in: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandilands, A., Smith, F. J., Irvine, A. D., McLean, W. H., 2007. Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J. Invest Dermatol.* 127, 1282 - 1284.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D., McLean, W. H., 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J. Cell Sci.* 122, 1285 - 1294.

- Schilling, O. und Overall, C. M., 2008. Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. *Nature Biotechnology* 26, 685 - 694.
- Schröder, J. M., 1999. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57, 121 - 134.
- Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O'Regan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, P., McLean, W. H., 2006. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat. Genet.* 38, 337 - 342.
- Steinberg, D. A. und Lehrer, R. I., 1997. Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. *Methods Mol. Biol.* 78, 169 - 186.
- Steinert, P. M., Cantieri, J. S., Teller, D. C., Lonsdale-Eccles, J. D., Dale, B. A., 1981. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 4097 - 4101.
- Steven, A. C., Bisher, M. E., Roop, D. R., Steinert, P. M., 1990. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J. Struct. Biol* 104, 150 - 162.
- Suzuki, H., Kamatani, S., Kim, E. S., Kumagai, H., 2001. Aminopeptidases A, B, and N and dipeptidase D are the four cysteinylglycinases of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 183, 1489 - 1490.
- Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., Madison, K. C., Downing, D. T., 1987. Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J. Invest Dermatol.* 88, 709 - 713.
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H. O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., Yokoyama, K., 1994. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 22, 2857 - 2858.
- Volz, A., Korge, B. P., Compton, J. G., Ziegler, A., Steinert, P. M., Mischke, D., 1993. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics* 18, 92 - 99.
- Weerheim, A. und Ponc, M., 2001. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch. Dermatol. Res.* 293, 191 - 199.
- Wu, Z., 2005. Analysis of two human gene clusters involved in innate immunity. Dissertation
- Wu, Z., Meyer-Hoffert, U., Reithmayer, K., Paus, R., Hansmann, B., He, Y., Bartels, J., Glaser, R., Harder, J., Schroder, J. M., 2009. Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin. *J. Invest Dermatol.* 129, 1446 - 1458.

- Yamazaki, M., Ishidoh, K., Suga, Y., Saido, T. C., Kawashima, S., Suzuki, K., Kominami, E., Ogawa, H., 1997. Cytoplasmic processing of human profilaggrin by active mu-calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 652 - 656.
- Zasloff, M., 1987. Magainins, A Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin - Isolation, Characterization of 2 Active Forms, and Partial Cdna Sequence of A Precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5449 - 5453.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389 - 395.

8 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. J.-M. Schröder möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Mein größter Dank gilt Dr. Britta Hansmann für die außergewöhnliche und herzliche Betreuung. Danke, dass Du mir mit vielen guten Ratschlägen und ermutigenden Worten stets zur Seite gestanden hast. Dein Optimismus und deine unermüdliche tatkräftige Energie haben mich zur Anfertigung dieser Dissertation vorangetrieben.

Für den Spaß bei der Laborarbeit, die entspannte Atmosphäre und die vielen Tipps und Hilfeleistungen möchte ich mich ganz herzlich bei Ties, Zhihong, Uli, Elvira, Jan, Dr. Bartels, Graziella, Eske, Heilwig, Kerstin und Manfred bedanken.

Außerdem möchte ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik für die freundliche Unterstützung danken.

Weiterhin gilt mein Dank Jutta und Claudia für die Hilfe bei der Durchführung der HPLC.

Bei Frau Silvia Voss im Mikrobiologischen Institut bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der antimikrobiellen Testungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern. Ihr habt mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Ihr habt mir mein Studium ermöglicht und mir stets Mut gemacht meinen eigenen Weg zu finden! Danke, dass ich mich auf eure Unterstützung und liebevollen Rückhalt in jeder Lebenslage verlassen kann!

Sophia, Svenja und Tobias, ihr habt immer viel Verständnis gezeigt und an mich geglaubt. Danke!

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sarah Katherina Babian
Geburtsdatum: 31.07.1984
Geburtsort: Dannenberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Derzeitige Anschrift: Theodor-Storm-Str.14, 24116 Kiel

Schulbildung

1991 - 1995 Grundschule Bredstedt
1995 - 2004 Theodor-Storm-Schule, Gymnasium, Husum;
Abschluss: Abitur

Weiterer Bildungsweg

2004 Beginn Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2007 Beginn der Doktorarbeit an der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J.-M. Schröder
2009 Beginn Praktisches Jahr
1. Terial im Hôpital cantonal de Fribourg, Schweiz (Innere Medizin)
2. Terial im UKSH, Kiel (Radiologie)
3. Terial im Städtischen Krankenhaus, Kiel (Chirurgie)
voraussichtlich 2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung