

# **Charakterisierung der Serin-Protease-Inhibitoren SPINK9 und SPINK6**

---

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Maria Sperrhacke

Kiel, 2014

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Karina Reiss

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2014

Zum Druck genehmigt: 19.05.2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan



# INHALTSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis .....   | I  |
| Abkürzungsverzeichnis.....   | IV |
| 1 Einleitung .....   | 1  |
| 1.1 Aufbau und Funktion der Haut.....                                | 1  |
| 1.2 Epidermis .....  | 1  |
| 1.3 Homöostase der Haut.....   | 4  |
| 1.3.1 EGFR.....  | 5  |
| 1.3.2 ADAMs.....   | 6  |
| 1.3.3 Regulation von ADAMs.....                                      | 7  |
| 1.4 Barrierefunktion der Haut.....                                   | 8  |
| 1.4.1 Desquamation.....  | 8  |
| 1.4.2 Antimikrobielle Peptide.....                                   | 9  |
| 1.4.3 angeborene Immunantwort .....                                  | 11 |
| 1.5 Serinproteasen und ihre Inhibitoren .....                        | 12 |
| 1.5.1 Kallikrein-ähnliche Peptidasen.....                            | 13 |
| 1.5.2 LEKTI1 .....   | 14 |
| 1.5.3 SPINK9 und SPINK6 .....  | 17 |
| 2 Zielsetzung .....  | 19 |
| 3 Material und Methoden .....  | 20 |
| 3.1 Material .....   | 20 |
| 3.2 Chemikalien.....   | 20 |
| 3.3 Enzyme.....  | 23 |
| 3.4 Kits .....   | 23 |
| 3.5 Geräte .....   | 23 |
| 3.6 Software.....  | 24 |
| 3.7 Allgemeine Puffer .....  | 24 |
| 3.8 Zellbiologische Methoden.....                                    | 24 |
| 3.8.1 Zelllinien und Zellkultur.....                                 | 24 |
| 3.8.2 Kollagenisieren von Zellkulturplatten .....                    | 27 |
| 3.8.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen .....                  | 27 |
| 3.8.4 Präparation von primären humanen Keratinozyten .....           | 28 |
| 3.8.5 Präparation von primären murinen Keratinozyten.....            | 28 |
| 3.8.6 Leukozyten-Isolation durch Dichtegradientenzentrifugation..... | 29 |
| 3.8.7 Präparation von Eosinophilen.....                              | 30 |
| 3.8.8 Zellzahlbestimmung .....                                       | 30 |
| 3.8.9 Stimulation von Zellen und Einsatz von Inhibitoren .....       | 31 |
| 3.8.10 Wundheilungsversuch.....                                      | 32 |
| 3.8.11 Zellviabilitätsversuch.....                                   | 32 |
| 3.8.12 <i>Chemotaxis Assay</i> (mittels BOYDEN-Kammer) .....         | 32 |
| 3.8.13 Transfektion.....   | 34 |
| 3.8.14 Fluoreszenzfärbung.....                                       | 34 |
| 3.9 Mikrobiologische Methoden.....                                   | 35 |
| 3.9.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....                          | 35 |
| 3.9.2 Kryokonservierung von <i>E. coli</i> .....                     | 35 |
| 3.10 Molekularbiologische Methoden .....                             | 35 |
| 3.10.1 Primer .....  | 35 |
| 3.10.2 PCR .....   | 36 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.10.3  | Konzentrationsbestimmung von DNA und mRNA .....   | 36  |
| 3.10.4  | Restriktionsverdau .....  | 36  |
| 3.10.5  | Ligation .....  | 36  |
| 3.10.6  | Transformation .....  | 36  |
| 3.10.7  | Plasmidpräparation .....  | 37  |
| 3.10.8  | Agarose-Gelelektrophorese .....   | 37  |
| 3.10.9  | Präparation von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen .....   | 37  |
| 3.10.10 | Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....   | 38  |
| 3.10.11 | Sequenzierung .....   | 38  |
| 3.10.12 | Klonierung von Vektoren .....   | 38  |
| 3.10.13 | Isolation von mRNA .....  | 40  |
| 3.10.14 | Reverse Transkription .....   | 40  |
| 3.10.15 | <i>Real-Time</i> PCR .....  | 41  |
| 3.11    | Proteinbiochemische Methoden .....  | 42  |
| 3.11.1  | humanes SPINK9/6 .....  | 42  |
| 3.11.2  | Herstellung von Zelllysaten .....   | 43  |
| 3.11.3  | Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration .....   | 43  |
| 3.11.4  | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....   | 44  |
| 3.11.5  | <i>Western Blot</i> .....   | 45  |
| 3.11.6  | Immunologische Detektion von <i>Western Blots</i> .....   | 45  |
| 3.11.7  | <i>Strippen</i> von <i>Western Blots</i> .....  | 46  |
| 3.11.8  | Co-Immunpräzipitation .....   | 46  |
| 3.11.9  | Immunhistochemie .....  | 47  |
| 3.11.10 | DNA-Assoziationsversuch .....   | 47  |
| 3.12    | Bioinformatik .....   | 48  |
| 3.13    | Statistische Analyse .....  | 48  |
| 4       | Ergebnisse .....  | 49  |
| 4.1     | Organisation der <i>spink</i> -Gene und Strukturvorhersage von SPINK9 und SPINK6 .....              | 49  |
| 4.2     | Expressionsmuster von hSPINK9 und hSPINK6 .....   | 53  |
| 4.3     | Die mRNA-Expression der <i>spink</i> -Gene ist induzierbar .....                                    | 56  |
| 4.4     | hSPINK9 und hSPINK6 sind in der Zelle vesikulär lokalisiert und werden induzierbar sekretiert ..... | 60  |
| 4.5     | hSPINK9 fördert die Migration von Keratinozyten .....   | 63  |
| 4.6     | Detaillierte Untersuchung der Funktion von hSPINK9 .....  | 65  |
| 4.6.1   | Die Aktivierung der Keratinozyten durch rhSPINK9 ist Metallo-protease-abhängig ...                  | 65  |
| 4.6.2   | P2-Rezeptoren vermitteln die rhSPINK9 induzierte Keratinozyten-aktivierung .....                    | 69  |
| 4.6.3   | hSPINK9 beeinflusst die Differenzierung von Keratinozyten nicht .....                               | 73  |
| 4.6.4   | hSPINK9 stimuliert die Expression von KLK5 .....  | 74  |
| 4.7     | Rolle von hSPINK9 im Immunsystem .....  | 75  |
| 4.7.1   | hSPINK9 fördert die Motilität von Immunzellen .....   | 75  |
| 4.7.2   | hSPINK9 in Eosinophilen .....   | 77  |
| 5       | Diskussion .....  | 80  |
| 5.1     | Expression und Regulation von hSPINK9 und hSPINK6 .....   | 80  |
| 5.2     | hSPINK9 fördert Keratinozytenmigration Metallo-protease- und P2-Rezeptoren-abhängig                 | 86  |
| 5.3     | Rolle von hSPINK9 im Immunsystem .....  | 93  |
| 5.4     | Ausblick .....  | 95  |
| 6       | Zusammenfassung .....   | 98  |
| 7       | Summary .....   | 100 |
| 8       | Literatur .....   | 102 |
| 9       | Publikationen .....   | VII |

|      |   |      |
|------|---|------|
| 9.1  | Publikation 3: Charakterisierung von humanen SPINK9 als Stimulus zur Aktivierung des EGF-Rezeptors via P2-Rezeptor- und ADAM-Aktivierung..... | VII  |
| 9.2  | Publikation 2: Erstbeschreibung und Charakterisierung von murinem SPINK6.....   | VII  |
| 9.3  | Publikation 1: Erstbeschreibung und Charakterisierung von murinem SPINK12.....  | VII  |
| 10   | Anhang.....   | VIII |
| 10.1 | Vektorkarte von pcDNA3.1 L2.5.....  | VIII |
| 10.2 | Gensequenz von hSPINK9-eGFP.....  | VIII |
| 10.3 | Aminosäuresequenz von hSPINK9-eGFP .....  | IX   |
| 10.4 | Vektorkarte von pcDNA3.1 L3.5.....  | IX   |
| 10.5 | Gensequenz von hSPINK6-eGFP.....  | X    |
| 10.6 | Aminosäuresequenz von hSPINK6-eGFP .....  | X    |
| 10.7 | Chemokine .....   | XI   |
| 11   | Abbildungsverzeichnis .....   | XII  |
| 12   | Tabellenverzeichnis .....   | XIV  |
| 13   | Danksagung.....   | XV   |
| 14   | Erklärung.....  | XVI  |
| 15   | Lebenslauf.....   | XVII |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                   |   |
|-------------------|---|
| ADAM              | <i>a</i> <i>disintegrin and metalloprotease</i>   |
| AMP               | <i>antimikrobielles Peptid</i>  |
| APS               | <i>ammonium persulfate</i>  |
| <i>Aqua dest.</i> | Destilliertes Wasser ( <i>Aqua destillata</i> )   |
| AREG              | <i>Amphiregulin</i>   |
| BAM               | 1,2- <i>bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid tetra (acetoxymethyl) ester |
| BFA               | <i>Brefeldin A</i>  |
| bp                | <i>Basenpaare</i>   |
| BSA               | <i>bovines Serumalbumin</i>   |
| BTC               | <i>Betacellulin</i>   |
| bzw.              | <i>beziehungsweise</i>  |
| cDNA              | <i>complementary DNA</i>  |
| CE                | <i>cornified envelope</i>   |
| Cetux             | Cetuximab   |
| Ct                | <i>cycle threshold</i>  |
| C-terminal        | Carboxy-terminal  |
| CTF               | <i>C-terminales Fragment</i>  |
| Da                | <i>Dalton</i>   |
| DABCO             | 1,4- <i>Diacabicyclo(2,2,2)octan</i>  |
| DAPI              | 4,6- <i>Diamidin-2-phenylindol</i>  |
| DMEM              | <i>Dulbeccos modified eagle medium</i>  |
| DNA               | <i>deoxyribonucleic acid</i>  |
| dNTP              | <i>Desoxy nukleosidtriphosphat</i>  |
| DTT               | 1,4- <i>Dithiothreitol</i>  |
| <i>E.</i>         | <i>Escherichia</i>  |
| ECL               | <i>enhanced chemiluminescence</i>   |
| ECP               | <i>eosinophil cationic protein</i>  |
| EDN               | <i>eosinophil derived neurotoxin</i>  |
| EDTA              | <i>Ethylendiamintetraacetat</i>   |
| EETs              | <i>eosinophil extracellular traps</i>   |
| EGF               | <i>epidermal growth factor</i>  |
| eGFP              | <i>enhanced green fluorescent protein</i>   |
| EGFR              | <i>epidermal growth factor receptor</i>   |
| EMBP              | <i>eosinophil major basic protein</i>   |
| EPR               | <i>Epiregulin</i>   |
| ERK1/2            | <i>extracellular-Signal regulated kinases 1/2</i>   |
| <i>et al.</i>     | und andere ( <i>et alii</i> )   |
| EtOH              | Ethanol   |
| EZM               | <i>extrazelluläre Matrix</i>  |
| FCS               | <i>fetal calf serum</i>   |
| FL                | <i>full length</i>  |
| fMLP              | <i>N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine</i>  |
| GAPDH             | <i>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>   |
| GPCR              | G-Protein-gekoppelter Rezeptor ( <i>G-Protein Coupled Receptor</i> )                          |
| HA                | <i>Hämagglutinin</i>  |
| <i>hb2m</i>       | <i>humanes <math>\beta</math>2-Mikroglobulin-Gen</i>  |
| hBD               | <i>humanes Beta defensin</i>  |
| HB-EGF            | <i>heparin-binding EGF-like factor</i>  |
| hCAP              | <i>human cationic antimicrobial protein</i>   |
| <i>hhprt</i>      | <i>humanes Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen</i>                                     |
| HRP               | <i>horseradish peroxidase</i>   |

|              |   |
|--------------|---|
| hSPINK       | <u>h</u> umanes <u>S</u> PINK   |
| IFN $\gamma$ | <u>I</u> nter <u>f</u> eron <u><math>\gamma</math></u>  |
| IgG          | <u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>  |
| IL           | <u>I</u> nter <u>l</u> eukin  |
| Inv          | <u>I</u> nvolutrin  |
| Iono         | <u>I</u> onomycin   |
| IP           | <u>I</u> mmunpr <u>ä</u> zipitation   |
| KGM2         | <u>K</u> eratinocyte <u>g</u> rowth <u>m</u> edium <u>2</u>   |
| KLK          | <u>k</u> allikrein related <u>p</u> eptidase  |
| Krt10        | <u>K</u> eratin <u>10</u>   |
| LB-Medium    | <u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth Medium nach Bertani (1951)   |
| LBs          | <u>l</u> amellar <u>b</u> odies   |
| LEKTI        | <u>l</u> ympho <u>e</u> pithelial <u>K</u> azal <u>t</u> ype <u>i</u> nhibitor kodiert durch <i>spink</i> -Gene |
| LPS          | <u>L</u> ipopolysaccharid   |
| LY           | <u>LY</u> 294002  |
| MAPK         | <u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> roteinkinase  |
| MCP1         | <u>m</u> onocyte <u>c</u> hemoattractant <u>p</u> rotein- <u>1</u>  |
| MM           | <u>M</u> arimastat  |
| mRNA         | <u>m</u> essenger <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid  |
| mSPINK       | <u>m</u> urines <u>S</u> PINK   |
| NET          | <u>n</u> eutrophil <u>e</u> xtracellular <u>t</u> rap   |
| NHEK         | Primäre humane Keratinozyten ( <u>n</u> ormal <u>h</u> uman <u>e</u> pidermal <u>k</u> eratinocytes)            |
| nSPINK       | <u>n</u> atürliches aus <i>S. conreum</i> isoliertes <u>S</u> PINK  |
| N-terminal   | Amino-terminal  |
| OD           | <u>o</u> ptische <u>D</u> ichte   |
| Oligo d(T)   | Oligomer bestehend aus 18 aufeinanderfolgenden Thyminen   |
| oxATP        | <u>a</u> denosine 5'- <u>t</u> riphosphate, periodate <u>o</u> xidized <u>s</u> odium salt                      |
| P2           | <u>p</u> urinergic <u>r</u> eceptor <u>t</u> ype <u>2</u>   |
| PAGE         | <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> eleelektrophorese  |
| PBMCs        | <u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells  |
| PBS          | Phosphatpuffer ( <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)   |
| PCR          | Polymerasekettenreaktion ( <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)                                   |
| pEGFR        | <u>p</u> hosphorylierter/aktivierter <u>E</u> GFR   |
| pERK1/2      | <u>p</u> hosphorylierter/aktivierter <u>E</u> RK1/2   |
| PMA          | <u>P</u> horbol-12- <u>m</u> yristat-13- <u>a</u> acetat  |
| PPADS        | <u>p</u> yradoxal <u>p</u> hosphate-6- <u>a</u> zophenyl-2',4',- <u>d</u> isulfonic acid                        |
| PTX          | <u>P</u> ertussis <u>T</u> oxin   |
| PVDF         | <u>P</u> olyvinylidifluorid   |
| Retins.      | Trans-all-Retinsäure  |
| rhSPINK      | <u>r</u> ekombinantes <u>h</u> umanes <u>S</u> PINK   |
| rpm          | Umdrehungen pro Minute ( <u>r</u> ound <u>p</u> er <u>m</u> inute)  |
| RPMI         | <u>R</u> oswell <u>p</u> ark <u>m</u> emorial <u>i</u> nstitute <u>m</u> edium                                  |
| RT           | Raum <u>t</u> emperatur   |
| S.           | <u>S</u> tratum   |
| SDS          | Natrium-Dodecylsulfat ( <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)   |
| SEM          | Standardfehler des Mittelwerts ( <u>s</u> tandard <u>e</u> rror of <u>m</u> ean)                                |
| SOC          | <u>s</u> uper <u>o</u> ptimal <u>B</u> roth with <u>c</u> atabolite <u>r</u> epression                          |
| Sorb         | <u>S</u> orbitol  |
| SPINK        | <u>s</u> erine <u>p</u> rotease <u>i</u> nhibitor <u>K</u> azal <u>t</u> ype                                    |
| SSP          | <u>S</u> taurosporin  |
| Sur          | Suramin   |
| TAE          | <u>T</u> ris- <u>a</u> acetat- <u>E</u> DTA   |
| TBS          | <u>t</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline  |
| TEMED        | <u>t</u> etramethylethylenediamine  |
| TGF $\beta$  | <u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor  |
| TNF $\alpha$ | <u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor <u><math>\alpha</math></u>  |

|       |  |
|-------|--|
| U     | <i>unit</i>  |
| UKSH  | <u>U</u> niversitätsklinikum <u>S</u> chleswig- <u>H</u> olstein |
| üN    | <u>ü</u> ber <u>N</u> acht                                       |
| UTR   | <i><u>u</u>n<u>t</u>ranslated <u>r</u>egion</i>                  |
| UV    | <i><u>u</u>ltraviolette <u>S</u>trahlung</i>                     |
| VitD3 | <u>V</u> itamin <u>D</u> 3                                       |
| xg    | x-fache Erdbeschleunigung  |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT

Die Haut ist die Grenzschicht des Körpers zur Umwelt. Sie stellt mit etwa 1,5 bis 2 m<sup>2</sup> das größte Organ des Menschen dar. Sie ist insbesondere für die Abwehr von pathogenen Erregern zuständig, reguliert die Wärmeaustauschrate zwischen dem Körper und der Umwelt (Thermoregulation) und ist für die Osmoregulation essentiell. Diese verschiedenen Funktionen erfüllt die Haut durch ihren speziellen mehrschichtigen Aufbau (Abbildung 1).

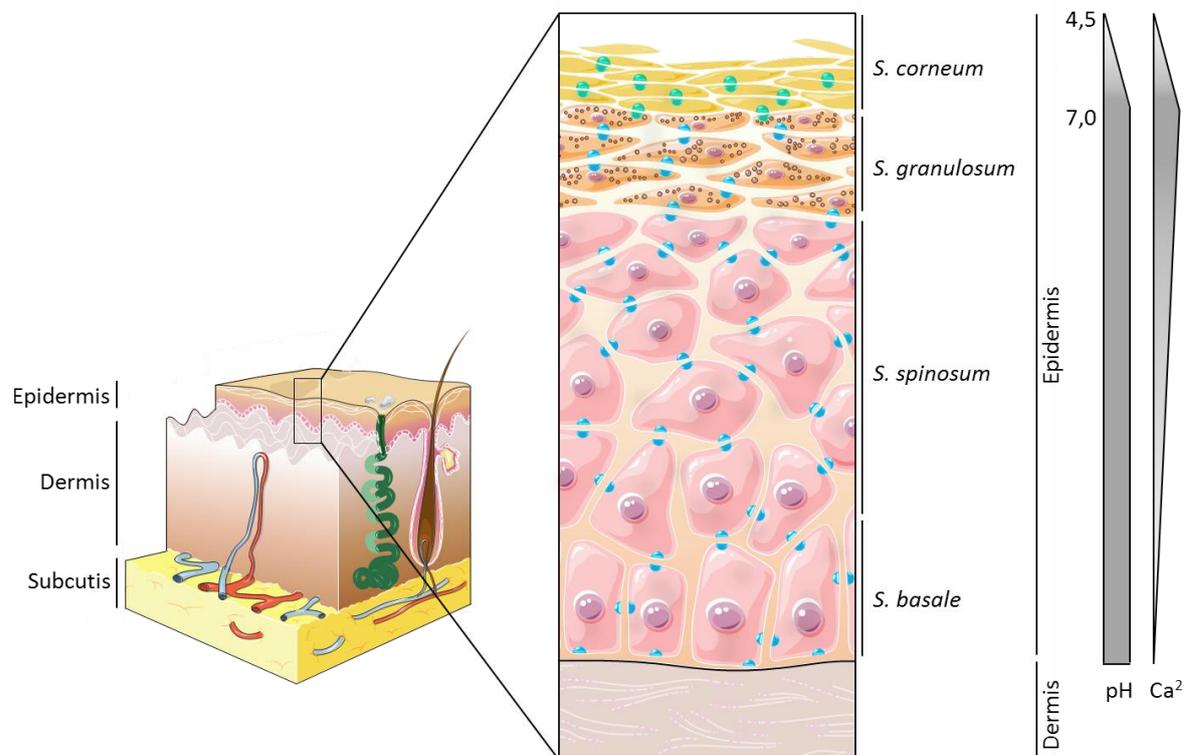
Die unterste Schicht, die Subcutis (Unterhaut), besteht hauptsächlich aus Bindegewebs- und Fettgewebszellen und wird zusätzlich von Nervenzellen und Blutgefäßen durchzogen, die bis in die mittlere Schicht, die Dermis, reichen und die Nährstoffversorgung der Haut sicherstellen. Sie dient als Nährstoffspeicher, Wärmeisolation und als Stoßschutz. Der Übergang von der Subcutis zur darauf befindlichen Dermis (Lederhaut) ist fließend. In der Dermis kommen hauptsächlich Fibroblasten als Zelltyp, aber auch Mastzellen, Blut- und Lymphgefäße, Nervenendungen, epitheliale Anhangsgebilde, wie Haare, Nägel, Schweiß- und Talgdrüsen, als auch Wärme- und Kälterezeptoren und Tastsinnesorgane vor. Das extrazelluläre Fasergeflecht aus Kollagenen, Elastin und Fibrillin verleiht der Haut Elastizität und Festigkeit. Die oberste Schicht der Haut stellt die Epidermis (Oberhaut) dar. Sie ist die eigentliche Grenzschicht des Körpers zur Umwelt und ist demzufolge insbesondere für den Schutz gegenüber äußeren Einflüssen verantwortlich. Die Epidermis ist von der Dermis durch die Basalmembran scharf abgegrenzt.

## 1.2 EPIDERMIS

Die Epidermis besteht aus bis zu 20 Zelllagen. Ihre Dicke variiert je nach Lokalisation und Beanspruchung zwischen ca. 0,1 mm im Gesichtsbereich bis zu 5 mm an Fußsohlen. Dabei übt sie für den Körper essentielle Funktionen aus. Zum einen bildet sie eine Barriere gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen, zum anderen schützt sie beispielsweise vor Austrocknung, UV-Schädigung oder Penetration durch Erreger (Proksch *et al.* 2008). Zu 95 % besteht die Epidermis aus Keratinozyten. Außerdem sind Langerhanszellen, Melanozyten und Merkelzellen präsent.

Als Reaktion auf die stetige Beanspruchung durch die Umwelt unterliegt die Epidermis einer ständigen Regeneration. Dies geschieht durch epidermale Stammzellen, die direkt durch Hemidesmosomen an der Basalmembran verankert sind. Diese undifferenzierten Keratinozyten sind in der Lage zu proliferieren und stellen die unterste einlagige Epidermisschicht, welche *Stratum*

(*S.*) *basale* (Basalschicht) genannt wird, dar. Ihre Tochterzellen durchwandern dann die Epidermis. Dabei differenzieren die Zellen immer weiter aus, bis sie nach etwa einem Monat verhornen, absterben und schließlich abschilfern (Houben *et al.* 2007). Während der Differenzierung kommt es zu einer modifizierten Genexpression, die zu den morphologischen und funktionellen Änderungen führt (Sotiropoulou and Blanpain 2012). Reguliert wird dieser Prozess unter anderem durch den steigenden Kalzium-Gradienten im extrazellulären Raum (Abbildung 1)(Dykes *et al.* 1982; Menon *et al.* 1985). Im *S. basale* befinden sich außerdem die Melanozyten, welche Melanin synthetisieren, diese in Form von Melanosomen an die umgebenden Keratinozyten abgeben und somit vor Schädigung durch UV-Strahlung schützen.



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut.** Auf der Subcutis und der Dermis befindet sich die Epidermis. Ihre basalen Zellen, das *Stratum (S.) basale*, sind in der Lage zu proliferieren. Die in der Epidermis überwiegend vorkommenden Keratinozyten durchlaufen vom *S. basale* zum *S. corneum* einen Differenzierungsprozess. Stabilität verleihen dabei die Desmosomen (blau) und die Korneodesmosomen (grün). Die Zellen des *S. granulosum* bilden *lamellar bodies* (braun), welche für die Entstehung des *cornified envelopes* und die lipidreiche extrazelluläre Matrix verantwortlich sind. Der extrazelluläre pH-Wert der Epidermis ist zunächst neutral, sinkt dann und wird im *S. granulosum* und *S. corneum* saurer. Zudem steigt die  $Ca^{2+}$ -Konzentration korrelierend mit dem Differenzierungsgrad an und fällt dann im *S. corneum* wieder ab (nach Ovaere *et al.* 2009).

Das *S. spinosum* (Stachelschicht) folgt dem *S. basale*. Die Zellen beginnen auszudifferenzieren, es kommt zur horizontalen Umorientierung der Zellachse und die Zellen bilden stachelförmige Ausläufer aus. Die Zellen sind untereinander mit Desmosomen verbunden und bilden dadurch einen Zellverband. Zudem beginnt hier die Bildung der sogenannten *lamellar bodies* (LBs). Dies sind doppelmembranumfasste Vesikel, in denen Lipide, Proteasen, Protease-Inhibitoren, aber auch antimikrobielle Peptide (AMPs) transportiert und dann polar sekretiert werden (Elias *et al.* 1998; Oren *et al.* 2003; Ishida-Yamamoto *et al.* 2004). Es wird davon ausgegangen, dass sie ihren Ursprung im Golgi-Apparat haben (Madison and Howard 1996; Elias *et al.* 1998).

In den Zellen des *S. granulosum* (Körnerschicht) setzt sich die Differenzierung fort. Die Zellen flachen dabei fortwährend ab, der Inhalt der LBs wird sekretiert, die Zellorganellen und der -kern werden abgebaut, bis die Zelle schließlich dehydriert und abstirbt. Besonders an der Sekretion des LB-Inhalts ist, dass die Zelle diese Vesikel entsprechend ihrer Fracht zu verschiedenen Zeitpunkten sekretiert (Ishida-Yamamoto *et al.* 2004). Während der terminalen Phase der Differenzierung bildet sich der *cornified envelope* (CE), eine schwerlösliche Protein-Lipid-Struktur, an der Plasmamembran aus (Nemes and Steinert 1999; Segre 2003). Die Proteine sind über Isopeptidbindungen kovalent miteinander vernetzt. Solche Bindungen werden in der Haut durch die Transglutaminasen TGase 1, TGase 3 und TGase 5 zwischen löslichen Proteinen, wie Involucrin und *small proline-rich proteins*, und auch unlöslichen Proteinen, wie Loricrin, Periplakin und Envoplakin, katalysiert (Eckert *et al.* 2005). Das so entstandene Multiprotein bildet mit zusammen mit Lipiden eine funktionelle Barriere aus.

Die oberste Schicht der Epidermis ist das *S. corneum* (Hornschicht). Hier ist die Differenzierung der Keratinozyten vollständig abgeschlossen. Die toten Zellen sind nun plattenartig abgeflacht, mit Makrofibrillen aus Keratin und Filaggrin gefüllt (Steinert *et al.* 1981; Nemes and Steinert 1999), verhornt und kohärent durch Korneodesmosomen miteinander verbunden. Die Zellen werden nun auch Korneozyten genannt. Das *S. corneum* wird durch einen stark wasserabweisenden Hydrolipidfilm geschützt (Downing *et al.* 1987). Die Lipide stammen sowohl aus den Zellen des *S. granulosum*, als auch aus den Schweiß- und Talgdrüsen, deren Ausführungsgänge an der Hautoberfläche enden. Sie tragen zur Hautbefeuchtung und -einfettung und somit zum Hydrolipidfilm bei. Eine Besonderheit stellt das *S. corneum* der palmaren und plantaren Hautbereiche dar. Hier ist es, aufgrund der starken mechanischen Belastung, aber auch durch den verstärkten Kontakt mit potentiellen Pathogenen und chemischen Substanzen, besonders stark ausgeprägt.

Schlussendlich schilfern die obersten Korneozyten des *S. conreum* durch proteolytische Spaltung ab. Dieser Prozess wird Desquamation genannt.

### 1.3 HOMÖOSTASE DER HAUT

Um die Haut intakt zu halten und somit eine Barriere gegenüber äußerer Umwelteinflüsse zu gewährleisten, müssen sich die Proliferation der Stammzellen im *S. basale* und die Desquamation der obersten Schichten des *S. corneum* die Balance halten. Über die genaue Regulation und den molekularen Mechanismus der Homöostase ist bis jetzt noch relativ wenig bekannt. Mittels gentechnischer Untersuchungen konnten jedoch verschiedene Signalmoleküle, welche für die Homöostase essentiell sind, identifiziert werden. Unter ihnen sind Notch, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *nuclear factor-κB* (NF-κB), p63, Mitglieder der AP2-Familie, *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP), *interferon regulatory factor 6* (IRF6), *grainyhead-like 3* (GRHL3), *Krüppel-like factor 4* (KLF4) (Blanpain and Fuchs 2009).

Der Notch-Signalweg spielt bei der Regulation der Homöostase eine Hauptrolle. Der membranständige Notch-Rezeptor ist dabei mit seinen Liganden der Initiator. Er wird von den Metalloproteasen ADAMs (*a disintegrin and metalloproteases*) geschnitten, nachdem einer der fünf ebenfalls membranständigen Liganden (*Jagged1,-2, Delta-like 1,-3, -4*) einer anderen Zelle gebunden hat. Eine weitere Spaltung des noch membranständigen Notch-Fragmentes durch eine  $\gamma$ -Sekretase setzt intrazellulär die zytoplasmatische Domäne frei, welche dann in den Zellkern transloziert, an den Transkriptionsfaktor *C-promoter binding factor-1* (CBF1) bindet und die Transkription bestimmter Gene initiiert (Nowell and Radtke 2013). Die Bedeutung des Notch-Signalwegs für die Homöostase konnte anhand von Mäusen, bei denen der Notch-Rezeptor deletiert wurde, gezeigt werden. Bei einem konventionellen *knock-out* des *notch*-Genes kommt es zwischen Embryonaltag 9 und 10 zum Absterben des zu kleinen Embryos mit vergrößertem Herzbeutel und Entwicklungsdefiziten der Somiten (Conlon *et al.* 1995). Deswegen wurde für weitere Untersuchungen Notch durch konditionale Deletion in Keratinozyten ausgeschaltet (Rangarajan *et al.* 2001; Nicolas *et al.* 2003). Diese führt zur Hyperproliferation epidermaler *S. basale*-ähnlicher Zellen und einer gesteigerten Expression früher Differenzierungsmarkern in den differenzierten Schichten. Außerdem konnte der Notch-Signalweg unter Beteiligung der AP2 (*activating protein 2*)-Familie mit der Regulation der terminalen Differenzierung in Verbindung gebracht werden (Wang *et al.* 2008). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Notch-Signalweg essentiell für die Regulation von Proliferation und Differenzierung in der Haut ist.

Auch die MAPK-Kaskade ist für das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung essentiell (Sotiropoulou and Blanpain 2012). Sowohl die Deletion von *MAPK/ERK kinases 1/2* (MEK1/2) in Keratinozyten (Scholl *et al.* 2007), als auch das Ausschalten von *extracellular-signal*

*regulated kinases 1/2* (ERK1/2)(Dumesic *et al.* 2009) führten zu einer verringerten Proliferation und einem Defekt der epidermalen Barriere. Neben der Aktivierung der MAPK-Kaskade durch basale Integrine und der negativen Regulation durch Adhäsionsmoleküle, wird die Aktivierung des MAPK-Signalweges hauptsächlich durch den Tyrosinkinase-Rezeptor *epidermal growth factor receptor* (EGFR) vermittelt.

### 1.3.1 EGFR

Für die Homöostase der Haut spielt der *epidermal growth factor receptor* (EGFR oder ErbB-1) als Aktivator der MAPK-Kaskade eine entscheidende Rolle. Aber auch während der Wundheilung werden sowohl Proliferation als auch Migration der Keratinozyten durch den EGFR vermittelt.

Der EGFR ist ein Mitglied der Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie. Dessen Aufbau ist durch eine extrazelluläre Liganden-Bindedomäne, eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Tyrosin-kinase-Domäne charakterisiert (Wells 1999; Bazley and Gullick 2005). Wird der EGFR durch Ligandenbindung aktiviert, so dimerisiert er zunächst (Ogiso *et al.* 2002; Ferguson *et al.* 2003), es kommt zur Autophosphorylierung durch die Tyrosinkinase-Aktivität und anschließend wird das Signal über Signalmoleküle wie Akt, ERK1/2, MEK1/2 oder STAT ins Zellinnere transduziert (Xue and Lucocq 1998; Katzel *et al.* 2009). Eine EGFR-Aktivierung wird mit einer Steigerung von Zellproliferation, Zellmotilität, Angiogenese, Metastasierung und einer Reduktion von Apoptose und Differenzierung in Verbindung gebracht (Yarden and Sliwkowski 2001). Die Bedeutung des EGFR für die Homöostase der Haut konnte insbesondere durch die Deletion des EGFR in der Maus gezeigt werden (Sibilia and Wagner 1995). Die neugeborenen Mäuse weisen unreife Lungen, keine oder nur rudimentäre Barthaare auf, haben offene Augen, begründet in Defekten bei der Hornhautbildung und ihre Barriere der Haut ist aufgrund veränderter Proliferation und Differenzierung stark gestört.

Als Liganden des EGFR wurden bislang EGF (*epidermal growth factor*, Cohen 1965), TGF $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* , Derynck *et al.* 1984), AREG (Amphiregulin, Shoyab *et al.* 1989), HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*, Higashiyama *et al.* 1991), BTC (Betacellulin, Shing *et al.* 1993), Epigen (Strachan *et al.* 2001) und Epiregulin (EPR, Toyoda *et al.* 1995) beschrieben. Insbesondere EGF, TGF- $\alpha$  und HB-EGF spielen bei der Wundheilung eine wichtige Rolle. Die Liganden liegen alle zunächst als membrangebundene Vorläuferproteine vor und werden erst durch *Shedding*, die proteolytische Freisetzung membrangebundener Proteine, zu ihrer löslichen aktiven Form prozessiert (Lee *et al.* 1985). Die dafür verantwortlichen *Sheddases* gehören zu der Familie der ADAMs (Sahin *et al.* 2004). Durch Expression der Liganden und deren

Maturierung mittels der *Shedding*-Aktivität der ADAMs kann die Aktivierung des EGFR reguliert werden (Schulze *et al.* 2001; Schäfer *et al.* 2004).

### 1.3.2 ADAMs

ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) sind transmembrane Zink-abhängige Metalloproteasen und gehören zur Gruppe der Metzinkine (Bode *et al.* 1993; Wolfsberg *et al.* 1995). Im Menschen sind bisher 25 ADAM-Gene bekannt (Edwards *et al.* 2008). Unter ihnen gibt es Mitglieder sowohl mit katalytischer Aktivität wie ADAMDEC-1, ADAM-8, -9, 10, -12, -15, -17, -19, -20, -21, -28, -30 und -33, als auch ohne, wie ADAM-2, -7, -11, -18, -22, -23, -29 und -32 (Edwards *et al.* 2008). Die am besten untersuchten ADAMs sind ADAM10 und ADAM17. Sie werden von einem Großteil der somatischen Zellen exprimiert und sind in der Lage Adhäsionsmoleküle, Moleküle der extrazellulären Matrix oder Rezeptoren zu spalten und fungieren auch als *Sheddases* für Wachstumsfaktoren und Cytokine und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (zusammengefasst in Edwards *et al.* 2008).

ADAM17 (NM\_003183) wurde durch seine Eigenschaft das proinflammatorische TNF $\alpha$  freizusetzen, unter dem Namen TACE (TNF $\alpha$ -*converting enzyme*) bekannt (Black *et al.* 1997; Moss *et al.* 1997). Inzwischen wurden zahlreiche weitere Substrate beschrieben. Darunter sind auch Proformen der EGFR-Liganden HB-EGF (Sahin *et al.* 2004; Schäfer *et al.* 2004), TGF $\alpha$  (Peschon *et al.* 1998), AREG (Gschwind *et al.* 2003; Sahin *et al.* 2004), Epigen (Sahin and Blobel 2007) und EPR (Sahin *et al.* 2004). Auch ADAM10 (NM\_001110) setzt unter anderem EGFR-Liganden, namentlich BTC (Sahin *et al.* 2004) und EGF (Sahin *et al.* 2004), frei. Zudem spaltet es Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin (Maretzky *et al.* 2005) und VE-Cadherin (Schulz *et al.* 2008) und begünstigt damit die Migration von Keratinozyten und Endothelzellen. Der Einfluss von ADAM17 auf die Homöostase der Haut wurde durch die Deletion der Metalloprotease-Domäne im Mausmodell von Peschon *et al.* 1998 gezeigt. Sie resultierte in einer gestörten Reifung des Darms, der Lunge, des Magens, der Schild- und Nebenschilddrüse, des Herzens und der Speicheldrüsen als auch in rudimentären Barthaaren, offenen Augen und Defekten beim Aufbau der verschiedenen Hautschichten und Differenzierung ähnlich des Phänotyps der EGFR-defizienten Maus (Jackson *et al.* 2003). Da die konventionelle Deletion des ADAM17 im gesamten Organismus zu einer nicht überlebenden Maus führte (Tod zwischen E17,5 und Geburt, Peschon *et al.* 1998), generierten Chalaris *et al.* 2010 eine lebensfähige ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Maus, bei der die ADAM17-Expression in allen Geweben drastisch reduziert ist. Auch sie zeigte Entwicklungsstörungen von Augen, Herz, Haaren und Haut. Weiterhin reagiert das Darmepithel deutlich empfindlicher auf *dextran sulfate sodium*-induzierte Colitis, da die epitheliale

Regeneration, aufgrund verminderter EGFR-vermittelter Signale, reduziert ist. 2011 beschrieben Blaydon *et al.* den bislang einzigartigen Fall eines Patienten mit fehlender ADAM17-Aktivität, ausgelöst durch eine Mutation im *adam17*-Gen. Auch hier wurde die Bedeutung von ADAM17 für die Homöostase der Haut deutlich sichtbar. Der Patient hat ähnliche Symptome wie die EGFR- und ADAM17-defizienten Mäuse. Er leidet unter wiederkehrenden Infektionen des Darms, starken Veränderungen bei der Haar- und Nagelbildung, sowie schweren Hautdefekten.

ADAM10 schneidet, genauso wie ADAM17, den Notch-Rezeptor, nach dem einer seiner Liganden gebunden hat. Der Phänotyp einer ADAM10-deletierten Maus gleicht mit Defekten im kardiovaskulären System, zentralen Nervensystem, Somiten und der Letalität im Embryonaltag 9,5 stark dem Phänotyp der Notch-defizienten Maus (Hartmann *et al.* 2002).

### 1.3.3 REGULATION VON ADAMS

Da ADAMs für die Freisetzung von EGFR-Liganden essentiell sind, ist die Regulation ihrer *Shedding*-Aktivität unter anderem für die Wundheilung von großer Bedeutung. Wichtig für die Aktivität scheint die Domänenstruktur der ADAMs zu sein. Sie bestehen im Allgemeinen aus Pro-, Metalloprotease-, Disintegrin-, Cystein-reichen, EGF-ähnlichen, Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen (Seals and Courtneidge 2003). Die Prodomäne hält das Vorläuferprotein durch einen Cystein-*switch* inaktiv und wird im Trans-Golgi-Netzwerk durch Furin oder andere Konvertasen abgespalten (Van Wart and Birkedal-Hansen 1990; Schlöndorff *et al.* 2000). Ist die Prodomäne dann nicht mehr mit dem Molekül assoziiert, ist es proteolytisch aktiv. Bei proteolytisch aktiven ADAMs besitzt die darauffolgende Metalloprotease-Domäne ein Zink-Bindungsmotiv. Sie beinhaltet das aktive Zentrum (Bode *et al.* 1993; Gomis-Rüth 2003). Die Cystein-reiche Domäne scheint ein Angriffspunkt für Protein-Disulfidisomerasen zu sein, welche die Aktivität durch Konformationsänderungen beeinflussen (Willems *et al.* 2010) und die Substraterkennung mit koordinieren (Janes *et al.* 2005; Lorenzen *et al.* 2012). Außerdem zeigten Le Gall *et al.* (2010), dass auch die Transmembrandomäne ausschlaggebend für die Substratspezifität sein kann. Umstritten sind des Weiteren die Rolle der Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domäne in Bezug auf die induzierbare Aktivität (Reddy *et al.* 2000; Doedens *et al.* 2003; Le Gall *et al.* 2010).

Man unterscheidet hinsichtlich der proteolytischen Aktivität der ADAMs zwischen konstitutivem und induzierbarem *Shedding*. Die ADAM-Aktivität ist zum Beispiel durch unphysiologische Stimulantien wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin (Iono), aber auch durch physiologische Wachstumsfaktoren und Cytokine induzierbar (Huovila *et al.* 2005). Welcher Mechanismus genau das stimulierbare *Shedding* reguliert, wird derzeit kontrovers diskutiert und

ist noch nicht genau bekannt. Die Aktivitätssteigerung von ADAM17 durch PMA, welches die Proteinkinase C aktiviert, oder der Einsatz von Ionomycin, welcher einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle bewirkt und somit sowohl ADAM10 als auch ADAM17 aktiviert, geben als Signaltransduktoren Hinweise auf einen ADAM-aktivierenden Signalweg. Aber auch der Einsatz von Inhibitoren wie PP2, ein Src-Kinaseinhibitor (Gutwein *et al.* 2000) und die Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Ohtsu *et al.* 2006) lassen vermuten, dass verschiedene Signalwege zu einer verstärkten Substratfreisetzung führen.

## 1.4 BARRIEREFUNKTION DER HAUT

Neben dem Schutz vor physikalischen Einflüssen, vermittelt insbesondere das *S. corneum* eine chemisch/biochemische Barriere (Scheuplein and Blank 1971; Elias 2005). Somit schützt es vor Wasserverlust (Blank 1953), dem Eindringen und der Infektion von Mikroorganismen und der Penetration durch Fremdstoffen (Proksch *et al.* 2008).

Dabei spielt die Struktur *des S. corneum* nach dem Zwei-Komponenten-Prinzip, welches auch Ziegelstein-Mörtel-Prinzip (*brick and mortar model*) genannt wird, eine zentrale Rolle. Aufgebaut ist es aus den abgeflachten mit Keratinmakrofibrillen-gefüllten Korneozyten mit dem CE, die „Ziegelsteine“, und der lipidreichen extrazellulären Matrix (EZM), der „Mörtel“, welcher die Zwischenräume durch ihre hydrophoben Eigenschaften versiegelt. Neben dem Schutz vor transepidermalem Wasserverlust und dem Eintreten von Fremdstoffen besitzen manche Lipide zusätzlich eine antimikrobielle Funktion. Der pH-Wert der obersten Hautschichten liegt im leicht sauren Bereich bei etwa pH 4,5 bis 5,0 (Ohman and Vahlquist 1998). Man spricht dabei vom Säureschutzmantel. Er wirkt sich positiv auf das Wachstum und die Zusammensetzung der Normalflora aus und reguliert die Aktivität von Enzymen, welche z.B. für die Desquamation essentiell sind. Durch die Desquamation hat die Haut eine gewisse selbstreinigende Eigenschaft.

### 1.4.1 DESQUAMATION

Der terminale Schritt des Differenzierungsprozesses endet in der sogenannten Desquamation, der Abschilferung der obersten Hautschichten. Sie gehört zur ersten Instanz des Körpers zur Abwehr von physikalischen, chemischen und mikrobiellen Angriffen. Für die Desquamation spielt das Auflösen der Zell-Zell-Kontakte zur Freisetzung von Korneozyten in Form von Schuppen eine zentrale Rolle. Im Durchschnitt lösen sich ca.  $5 \times 10^8$  Zellen pro Tag ab (Milstone 2004). Dieser Prozess ist besonders für die Hauthomöostase wichtig, da dafür eine Balance zwischen der Proliferation im *S. basale* und der Desquamation der obersten Hautschichten aufrechterhalten werden muss. Besteht jedoch ein Ungleichgewicht, kommt es zu Krankheiten

wie z.B. Psoriasis (zu hohe Proliferationsrate) oder Ichtyosis (zu geringe Desquamation) (Lundwall and Brattsand 2008).

Da die Zellen der Haut besonders hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, sind die Zell-Zell-Kontakte zum Erhalt des Zellverbundes von großer Bedeutung. Die Keratinozyten sind durch sogenannte Desmosomen verbunden, die die Keratinfilamente zweier Zellen miteinander verbinden und mechanische Kräfte verteilen. Sie bestehen aus den Transmembranproteinen der Cadherinfamilie Desmocollin 1 und Desmoglein 1 (Stokes 2007), welche eine Bindung mit denen der Nachbarzelle eingehen. Ankerproteine wie Desmoplakin bilden intrazellulär einen Plaque, der die Cadherine und die Keratinfilamente miteinander verknüpft. Die differenzierten Korneozyten sind mit einer modifizierten Art der Desmosomen, den Korneodesmosomen, miteinander verbunden. Ihr extrazellulärer Hauptbestandteil ist neben Desmoglein 1 und Desmocollin 1 das Korneodesmosin (Serre *et al.* 1991). Der intrazelluläre Teil ist mit dem CE vernetzt.

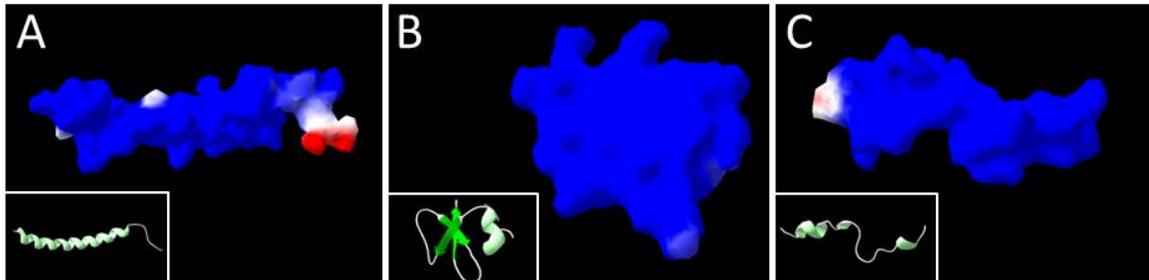
Die Zell-Zell-Kontakte werden während der Desquamation durch die proteolytische Spaltung der Korneodesmosomen aufgelöst (Lundström and Egelrud 1988; Egelrud and Lundström 1990). Dies ist ein streng regulierter Prozess, bei dem verschiedene Proteasen wie die Kallikreine und ihre Inhibitoren eine essentielle Rolle spielen.

## 1.4.2 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE

Ein sehr wichtiger Bestandteil der Barriere der Haut sind die antimikrobiellen Peptide (AMPs). Sie schützen durch ihre antimikrobielle Aktivität als einer der ersten Effektoren vor einer Infektion durch Pathogene wie gram-positive und gram-negative Bakterien, Hefen, Pilze und Viren (Hancock and Diamond 2000; Elias 2007).

AMPs besitzen eine hohe Diversität hinsichtlich ihrer Länge, Sequenz und Struktur (Brogden 2005). Die meisten von ihnen sind kleine kationische Peptide (<10 kDa), welche meist auch eine amphipathische Struktur besitzen und Schwefelbrücken über Cysteine ausbilden. Aufgrund ihrer Struktur klassifiziert man die AMPs in die zwei Hauptfamilien  $\beta$ -Defensine und Cathelicidine (Gallo and Hooper 2012).  $\beta$ -Defensine werden ausgezeichnet durch eine  $\beta$ -Faltblattstruktur und drei intramolekulare Disulfidbrücken. Cathelicidine hingegen haben meist eine  $\alpha$ -Helixstruktur, besitzen eine variable kationische AMP-Domäne und eine konservierte Prodomäne, welche zunächst proteolytisch abgespalten werden muss, damit eine antimikrobielle Aktivität besteht (Abbildung 2) (Zanetti *et al.* 1995; Oren *et al.* 1999). Es wird davon ausgegangen, dass sich die meisten der AMPs aufgrund ihrer Ladung zunächst durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladene bakterielle Membran anlagern, sich dann in die Membran einlagern,

multimerisieren und somit Poren in der Membran bilden, was schließlich zum Tod des Bakteriums führt (Brogden 2005). Außerdem kann ihre antimikrobielle Wirkung z.B. auf der Inhibition der Zellwandsynthese, der Störung der Proteinsynthese und der Synthese von DNA und RNA beruhen (Kragol *et al.* 2001; Brogden 2005; Sass *et al.* 2008, 2010).



**Abbildung 2: AMPs sind kationische Peptide.** Dargestellt sind die Tertiär- (großes Bild) und Sekundärstruktur (kleines Bild unten rechts) der kationischen AMPs LL-37 (A), hBD2 (B) und D-Pro14-Melittin (C). Die elektrostatische Ladung des Moleküls ist durch Farben visualisiert (blau: positiv; weiß: neutral; rot: negativ) (nach Bauer *et al.* 2001; Hewish *et al.* 2002; Wang 2008; visualisiert mit Swiss PDB Viewer).

Für die Barrierefunktion der Haut sind vor allem AMPs wie Psoriasin (auch S100A7, Gläser *et al.* 2005), RNase 7 (Harder and Schroder 2002; Simanski *et al.* 2010), hBD1 (*human beta-defensin 1*; Ali *et al.* 2001), hBD2 (Harder *et al.* 1997; Schröder and Harder 1999), hBD3 (Harder *et al.* 2001), hBD4 und LL-37 (Frohm *et al.* 1997) verantwortlich. Sie werden konstitutiv und/oder induzierbar z.B. über Regulatoren einer Infektion/Entzündungsreaktion exprimiert (Liu *et al.* 2002; Harder *et al.* 2004). Am Beispiel von hBD2 und LL-37 konnte gezeigt werden, dass die Keratinozyten AMPs über die LBs sekretieren (Oren *et al.* 2003; Aberg *et al.* 2007). Zusätzlich zur antimikrobiellen Wirkung können AMPs auch noch andere Funktionen vertreten. So wirken sie auch als Chemokine und locken Immunzellen an, fördern die Produktion von Chemokinen, haben Einfluss auf die Cytokinproduktion, unterstützen die Wundheilung und stimulieren das adaptive Immunsystem. LL-37 beispielsweise ist zusätzlich ein Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Davidson *et al.* 2004), das chemotaktisch für Neutrophile, Monozyten, T-Lymphozyten und Mastzellen wirkt (Agerberth *et al.* 2000; De Yang *et al.* 2000), die Freisetzung von Cytokinen beeinflusst (Brown *et al.* 2011) und die Wundheilung durch die Stimulation der Angiogenese (Koczulla *et al.* 2003) und der Reepithelialisierung (Heilborn *et al.* 2003) unterstützt.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die wundheilungsfördernde Wirkung von LL-37, genauso wie die Wirkung von dem aus dem Bienengift stammenden AMP Melittin, auf die Aktivierung des EGFRs zurückzuführen ist (Tjabringa *et al.* 2003; Sommer *et al.* 2012). Die Aktivierung des EGFR wird durch die Bindung von Liganden hervorgerufen, die wiederum von den ADAM

Metalloproteasen freigesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der ADAMs durch LL-37 oder Melittin *purinergic receptor type2* (P2R)-abhängig ist (Elssner *et al.* 2004; Sommer *et al.* 2012). Diese Rezeptoren werden hauptsächlich durch die Bindung von Nukleosidtriphosphaten stimuliert. Bei der ADAM-Aktivierung durch LL-37 und Melittin kann es sich um *purinergic receptor type2X*-Rezeptoren (P2XR) handeln, welche Liganden-abhängige Ionenkanäle sind und deren Aktivierung zu einer Depolarisation durch den Einstrom kationischer Ionen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  führt (Ralevic and Burnstock 1998). *Purinergic receptor type2Y*-Rezeptoren (P2YR) können ebenfalls eine Rolle spielen, hierbei handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. P2-Rezeptoren spielen in der Haut bei der Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Wundheilung (Burnstock *et al.* 2012) eine Rolle, was sich auch auf ihre ADAM-aktivierende Funktion zurückführen lässt.

### 1.4.3 ANGEBORENE IMMUNANTWORT

Aus funktioneller Sicht wird zwischen der adaptiven oder auch erworbenen Immunantwort und der angeborenen Immunantwort unterschieden. Die adaptive Immunantwort richtet sich gezielt gegen spezielle Antigene mittels spezifischer Antikörper und kann ein immunologisches Gedächtnis für eine schnellere Reaktion auf wiederholte Infektionen ausbilden. Die angeborene Immunantwort hat im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort ein breites Wirkspektrum und kann dadurch, dass sie nicht auf bestimmte Pathogene spezialisiert ist, sehr schnell wirken.

Kommt es zu einer Infektion, werden die Pathogene zunächst durch die angeborene Immunantwort in Schach gehalten und es wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Dies geschieht, indem Makrophagen (differenzierte Monozyten) und Neutrophile durch ihre unspezifischen Rezeptoren Muster der Pathogenoberfläche erkennen, den Pathogenen folglich phagozytieren und lysieren. Durch die Erkennung des Pathogens kommt es zusätzlich zur Freisetzung proinflammatorischer Cytokine, Chemokine und anderer Mediatoren, die die Entzündung weiter fördern indem unter anderem die adaptive Immunantwort eingeleitet wird. So werden weitere Immunzellen wie Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen, Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Neutrophile und Eosinophile angelockt und Mastzellen aktiviert.

### MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN

Monozyten sind Leukozyten und pluripotente Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen. Sie zirkulieren im peripheren Blut (Jia and Pamer 2009; Swirski *et al.* 2009). Durch Mediatoren wie Chemokine (CCL5, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , etc.), werden sie im Falle einer Infektion zum Infektionsherd gelockt (DiPietro *et al.* 1998; Frank *et al.* 2000). Dieser Vorgang

wird als Chemotaxis bezeichnet. Die reifen Makrophagen differenzieren gewebsspezifisch aus und können resident im Gewebe vorliegen (in der Epidermis als Langerhans-Zellen). Sie stellen die ersten wichtigen zellulären Effektoren der angeborenen Immunantwort dar, da sie Pathogene und infizierte Zellen aber auch zerstörte und apoptotische körpereigene Zellen phagozytieren. Zudem setzen sie Signalproteine, wie Chemokine, Cytokine, Wachstumsfaktoren und Angiogenesefaktoren frei (TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , bFGF, PDGF, VEGF etc.), welche andere Immunzellen aktivieren, eine Entzündungsreaktion initiieren und die Wundheilung fördern (Eming *et al.* 2007). Außerdem können sie Antigene präsentieren und stimulieren somit das adaptive Immunsystem. Schließlich leiten sie Angiogenese, Kollagensynthese und Narbenbildung, welche für eine Wundheilung essentiell sind, ein (Mirza *et al.* 2009; Rodero and Khosrotehrani 2010).

## GRANULOZYTEN

Granulozyten sind Leukozyten mit polymorphen Kernen. Aufgrund der histologischen Anfärbbarkeit ihrer Granula wird zwischen Neutrophilen, Basophilen und Eosinophilen unterschieden. Hier soll im Detail nur auf die Eosinophilen eingegangen werden, da nur dieser Subtyp für diese Arbeit relevant war.

Eosinophile infiltrieren, angelockt durch Chemoattraktanten, in entzündetes Gewebe, wie es bei vielen Hautkrankheiten (u.a. Allergien, Autoimmunkrankheiten, Infektionen etc.) gezeigt werden konnte (Simon and Simon 2007; Simon *et al.* 2010). Gekennzeichnet werden sie durch ihre zweilappigen Zellkerne und ihre Granula. Die Granula enthalten verschiedenste Enzyme und toxische Proteine aber auch Chemokine und Cytokine, die durch Degranulation in die Umgebung sezerniert werden können (Logan *et al.* 2003; Rothenberg and Hogan 2006). So sind sie in der Lage, Parasiten zu bekämpfen, die für die Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile zu groß sind (Rothenberg and Hogan 2006). Durch *eosinophil cationic protein* (ECP) und *eosinophil derived neurotoxin* (EDN) haben sie zudem eine antivirale Wirkung (Rosenberg and Domachowske 2001) und es wird eine antimikrobielle Aktivität durch das katapultartige Freisetzen von mitochondrialer DNA vermutet, an der granuläre Proteine assoziiert sind (Yousefi *et al.* 2008; Simon *et al.* 2011). Dies ähnelt den *neutrophil extracellular traps* (NETs, genomische DNA) von den Neutrophilen (Brinkmann *et al.* 2004; Papayannopoulos and Zychlinsky 2009).

## 1.5 SERINPROTEASEN UND IHRE INHIBITOREN

Proteasen werden basierend auf der Art ihres aktiven Zentrums in Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartat-, Metallo- und Glutamatproteasen unterteilt. Insbesondere Serin-Proteasen werden mit der Desquamation in Verbindung gebracht (Suzuki *et al.* 1994). Typischerweise beinhalten

ihre proteolytischen Domänen eine Triade aus Serin, Histidin und Aspartat. Weiterhin vermitteln Serin-Proteasen unter anderem auch apoptotische, entwicklungsbiologische und immunologische Prozesse sowie Blutkoagulation, Fibrinolyse, Komplementsystemaktivierung und Verdauung von Nahrung.

### 1.5.1 KALLIKREIN-ÄHNLICHE PEPTIDASEN

Kallikrein-ähnliche Peptidasen (KLKs), oder auch *tissue kallikreins* genannt, sind eine Familie der Serin-Proteasen. Im Menschen sind bezüglich ihrer kodierenden Gene und Proteinstrukturen 15 hochkonservierte Mitglieder der KLKs bekannt, welche im bislang größten zusammenhängenden bekannten Cluster der Serin-Proteasen auf dem Chromosom 19q13.4 codiert werden (Yousef and Diamandis 2001). Alle KLKs werden als Präproenzyme codiert. Die Expression wird meist über Transkriptionsfaktoren reguliert. Aber auch die KLK-Zymogenaktivierung, nach der Abspaltung der Prädomäne bei der Sekretion in das endoplasmatische Retikulum, spielt bei der Regulation eine wichtige Rolle. Diese Aktivierung geschieht durch komplexe proteolytische Kaskaden. Die Aktivität der KLKs spielt bei verschiedensten Prozessen wie der Samenverflüssigung, angeborenen Immunantwort, Desquamation der Haut, Neurodegeneration, Degeneration und Remodellierung der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle. Es wurde auf mRNA-Ebene nachgewiesen, dass 11 (KLK1, KLK4-11, KLK13, KLK14) der 15 KLKs in der Epidermis exprimiert werden (Komatsu *et al.* 2003, 2005), wobei nur drei, KLK5, KLK7 und KLK14, in ihrer aktiven Form in den obersten Schichten des *S. corneum* nachgewiesen werden konnten (Hansson *et al.* 1994; Brattsand and Egelrud 1999; Stefansson *et al.* 2006).

KLK5, wegen seiner tryptischen Aktivität auch als *stratum corneum tryptic enzyme* (SCTE) bekannt, spielt bei der Aktivierung der KLKs eine Schlüsselrolle. Es ist in der Lage 11 der 15 KLKs zu aktivieren (Yoon *et al.* 2007) und es wird vermutet, dass KLK5 in der Epidermis eine Reaktionskaskade auslöst. KLK5 ist zunächst in der Lage sich zu autoaktivieren. Aber auch proKLK7 und proKLK14 werden aktiviert. Das aktivierte KLK14 ist dann in der Lage proKLK5 zu aktivieren, was einen *feed-back-loop* darstellen könnte. Diese Kaskade ist pH-Wert abhängig und wird als einer der Regulationsmechanismen diskutiert (Caubet *et al.* 2004; Brattsand *et al.* 2005). Das aktive KLK5 ist in der Lage die drei Bestandteile der Korneodesmosomen, Corneodesmosin, Desmocollin 1 und Desmoglein 1, zu spalten und ist somit für die Desquamation verantwortlich (Ekholm *et al.* 2000). Außerdem kann es immunmodulatorisch wirken, indem es das antimikrobielle Cathelicidin LL-37 spaltet und den *protease activated*

*receptor-2* (PAR-2) proteolytisch aktiviert und somit eine Entzündungsreaktion auslöst (Yamasaki *et al.* 2006; Stefansson *et al.* 2008).

Aber auch KLK7, welches aufgrund seiner chymotryptischen Aktivität auch *stratum corneum chymotryptic enzyme* (SCCE) genannt wird, ist in der Lage Desmocollin 1 und Corneodesmosin proteolytisch zu spalten (Caubet *et al.* 2004). Außerdem konnten Borgoño *et al.* 2007 zeigen, dass die KLKs KLK1, KLK6, KLK13 und KLK14 ebenfalls Desmocollin spalten können.

Neben der proteolytischen Maturierung der KLKs, physikalischen Parametern wie dem pH-Wert, dem Wassergehalt und den umgebenden Ionen (Watkinson *et al.* 2001; Caubet *et al.* 2004; Brattsand *et al.* 2005) wird die Aktivität der Serin-Proteasen in der Haut auch durch Inhibitoren wie *lymphoepithelial kazal type inhibitor* (LEKTI), Elafin und *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) reguliert. Alle drei Inhibitoren scheinen bei der Desquamation involviert zu sein, jedoch wird Elafin hauptsächlich im Fall einer Entzündung in der Haut exprimiert und *secretory leukocyte protease inhibitor* hat eine wichtige antimikrobielle Funktion in der Haut (Nonomura *et al.* 1994; Wiedow *et al.* 1998).

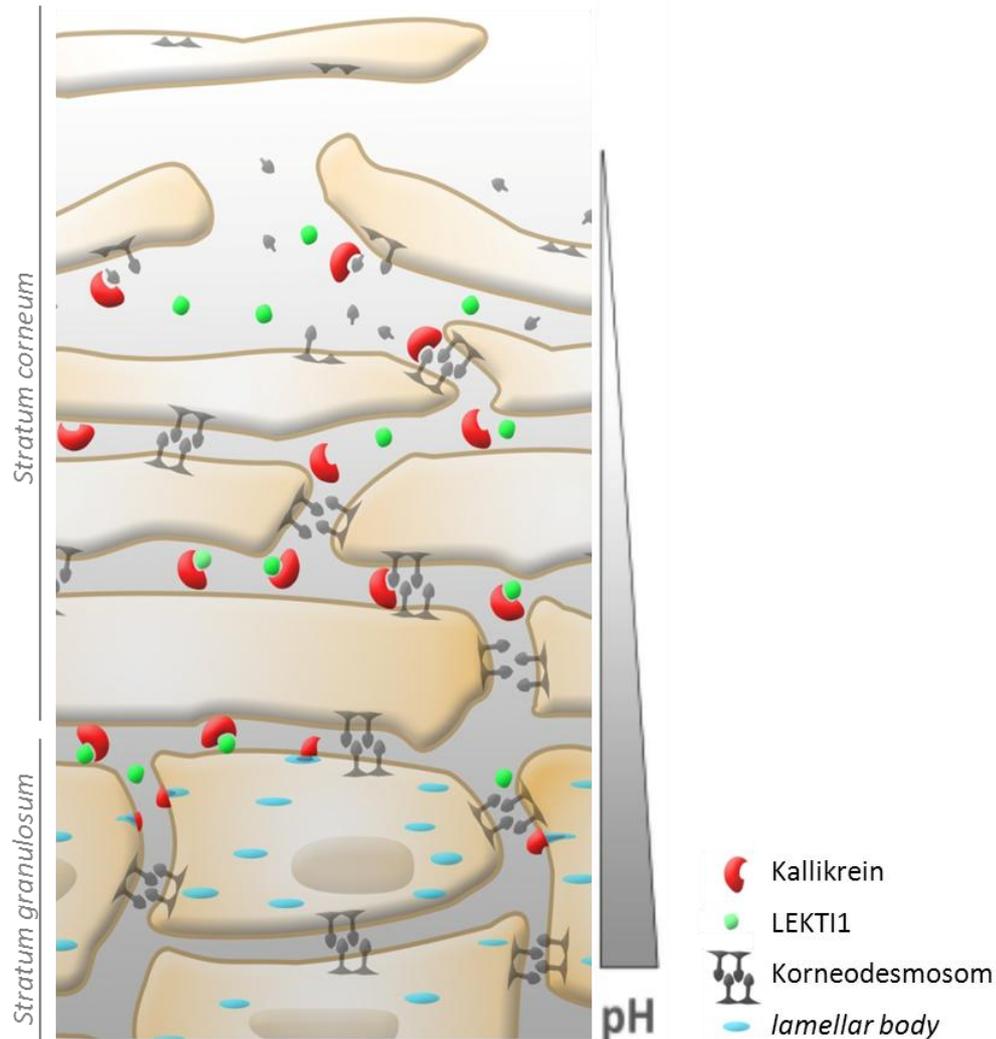
### 1.5.2 LEKTI1

LEKTI1 (*lympho epithelial kazal type inhibitor 1*, auch LEKTI) gehört zu der Gruppe der Kazal-Typ-Inhibitoren. Der Name dieser Gruppe stammt von dem Entdecker des ersten Kazal-Typ-Inhibitors *pancreatic secretory trypsin inhibitor* (PSTI), auch bekannt als *serine protease inhibitor kazal type 1* (SPINK1), welcher sowohl Thrombin als auch Trypsin inhibieren kann (Kazal *et al.* 1948). Typisch für das Kazal-Motiv sind die drei Disulfidbrücken mit dem Muster 1-5/2-4/3-6, die an sechs konservierten Cysteinen ausgebildet werden (Abbildung 3). Zusätzlich befindet sich zwischen dem dritten und vierten Cystein ein konserviertes Tyrosin. LEKTI1 besteht aus 15 Domänen (Mägert *et al.* 1999), wobei zwei Domänen, nämlich D2 und D15, das typische Kazal-Motiv enthalten und die anderen nur ein Kazal-Typ-ähnliches Motiv aufweisen. Ihnen fehlt eine der drei typischen Disulfidbrücken (Lauber *et al.* 2003).

LEKTI1 wird im Thymus, den Tonsillen, der Nebenschilddrüse, der Luftröhre, Haarfollikeln und in nichtverhornenden und verhornenden Epithelien, wie der Haut, exprimiert (Mägert *et al.* 1999; Bitoun *et al.* 2003). Es wird in drei verschiedenen *splicing*-Varianten, der *full-length*-Isoform mit 145 kDa (15 Domänen), *long*-Isoform mit 148 kDa (30 zusätzliche Aminosäuren zwischen D13 und D14) und *short*-Isoform mit 125 kDa (13 Domänen), synthetisiert (Bitoun *et al.* 2003; Tartaglia-Polcini *et al.* 2006). Diese Formen werden dann im endoplasmatischen Retikulum durch Furin in Multidomänenfragmente gespalten (Bitoun *et al.* 2003; Deraison *et al.* 2007), welche nach der Sekretion eventuell auch weiter zu einzelnen Domänen gespalten werden. *In*



LEKTI1 wird durch das Gen *serine protease inhibitor kazal-type 5 (spink5)* kodiert (Mägert *et al.* 1999; Chavanas *et al.* 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen dieses Gens, wie Einzelnukleotid-Polymorphismen mit atopischer Dermatitis, welches auch ein erhöhtes Risiko für Lebensmittelallergien und Asthma bedeutet, assoziiert sind (Walley *et al.* 2001; Kato *et al.* 2003). Besonders deutlich wird die Bedeutung von LEKTI1 auf die Homöostase der Haut bei dem Netherton Syndrom (OMIM 256500) (Netherton 1958; Chavanas *et al.* 2000; Hachem *et al.* 2006). Hierbei liegt eine Mutation im *spink5*-Gen vor, die dazu führt, dass LEKTI1 nicht mehr vollständig synthetisiert wird. Die proteolytische Aktivität von KLK5 und KLK7 in den tieferen Schichten ist erhöht, somit liegt eine unkontrollierte Desquamation vor und die Barrierefunktion der Haut ist gestört (Komatsu *et al.* 2002; Schechter *et al.* 2005; Descargues *et al.* 2006). Das Netherton Syndrom ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Krankheit. Patienten leiden unter Ichtyose, Haarschaft-Defekten (auch „bamboo hair“ genannt) und einer atopischen Manifestation mit hohem IgE-Level. Es besteht dabei eine hohe postnatale Mortalität, wahrscheinlich aufgrund vermehrter Infektionen und hypernaträmischer Dehydration (Fartasch *et al.* 1999). Für die Untersuchung und Entwicklung eventueller Therapeutika für Netherton Syndrom-Patienten wurde eine Maus generiert, bei der das murine Ortholog mSPINK5 deletiert wurde (Yang *et al.* 2004). Die Maus hat, mit einer massiven Abschilferung des *S. corneums* und einer hohen Mortalität innerhalb von wenigen Stunden nach der Geburt aufgrund von Dehydration, ähnliche Symptome wie Netherton-Patienten und kann deshalb gut als Modellorganismus zur Untersuchung von Fragestellungen bezüglich LEKTI1 genutzt werden.



**Abbildung 4: Die Aktivität der KLKs, welche die Desquamation initiieren wird durch LEKTI1 reguliert.** Die Zellen der obersten epidermalen Schichten sind durch Korneodesmosomen miteinander verbunden. Um ein kontrolliertes Abschilfern der obersten Schichten zu gewährleisten, muss die Aktivität der Korneodesmosomen-spaltenden KLKs reguliert werden. Dies geschieht durch den Serinprotease-Inhibitor LEKTI1, welcher ebenfalls wie die KLKs im *S. granulosum* durch *lamellar bodies* sekretiert wird. Die Interaktion von LEKTI1 mit den KLKs wird mit dem sinkenden pH-Wert so schwach, dass LEKTI1 nicht mehr in der Lage ist die KLKs zu inhibieren. Die KLKs liegen nun aktiv vor und spalten Bestandteile der Korneodesmosomen. Somit werden die Zell-Zell-Verbindungen aufgelöst und die obersten Korneozyten schilfern ab. (modifiziert nach Deraison *et al.* 2007)

### 1.5.3 SPINK9 UND SPINK6

2009 beschrieben Brattsand *et al.* und Meyer-Hoffert *et al.* erstmals das *hspink9*-Gen, welches für das Protein hSPINK9 (auch LEKTI2 genannt) kodiert und eine große Homologie zu LEKTI1 aufweist (GeneID: 643394, NM\_001040433, NP\_001035523). Die Expression von hSPINK9 beschränkt sich im Gegensatz zu LEKTI1 hauptsächlich auf palmare und plantare Bereiche, die sich aufgrund der starken Beanspruchung durch ein verdicktes *S. corneum* auszeichnen. Dort ist hSPINK9 aber genauso wie LEKTI1 und auch KLK5 im *S. granulosum* und *S. corneum* zu finden.

Zudem konnte auf mRNA-Ebene auch eine Expression im Thymus, den Tonsillen, der Leber, dem Gehirn, den Hoden und der Plazenta nachgewiesen werden (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert *et al.* 2009). Die Expression im Pancreas ist strittig, da die Untersuchungen von Brattsand *et al.* (2009) ein Signal zeigten, die Studie von (Meyer-Hoffert *et al.* 2009) jedoch nicht. Das *hspink9*-Gen beinhaltet vier Exons und drei Introns. Im Gegensatz zu LEKT11 besitzt hSPINK9 nur eine Kazal-Domäne. Brattsand *et al.* konnten 2009 zeigen, dass hSPINK9 an KLK5 und sehr schwach auch an KLK8 binden kann. Jedoch stellte sich bis jetzt eine inhibitorische Aktivität nur gegenüber KLK5 heraus. Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin, KLK7, KLK8 und KLK14 werden nicht von hSPINK9 gehemmt, sodass von einem KLK5-spezifischen Inhibitor gesprochen werden kann (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert *et al.* 2009). Aufgrund der Tatsache, dass hSPINK9 in der Haut nur in palmaren und plantaren Bereichen vorkommt, wird vermutet, dass es bei der Regulation für die Bildung des verdickten *S. corneums* an diesen Bereichen mit verantwortlich ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Nachweis einer gesteigerten Expression bei Hyperkeratosen (Meyer-Hoffert *et al.* 2009). Zudem kann man vermuten, dass hSPINK9 neben der Inhibition von KLK5 noch andere physiologische Funktionen besitzt, wie Wu *et al.* (2008) mit der antimikrobiellen Aktivität gegenüber von *E. coli* zeigen konnte.

Neben hSPINK9 konnte auch ein weiterer Kazaltyp-Inhibitor isoliert werden, hSPINK6 (Meyer-Hoffert *et al.* 2010). Er wird vom *hspink6*-Gen kodiert (GeneID: 404203, NM\_001195290, NP\_001182219), enthält genauso wie *hspink9* eine Signalpeptid-Sequenz sowie eine Kazal-Domäne und besteht aus vier Exons und drei Introns. Exprimiert wird hSPINK6 wie hSPINK9, besonders an den palmaren und plantaren Bereichen der Haut. Es ist zusätzlich aber auch an weniger verhornten Hautarealen wie dem Gesicht, Armen, Oberkörper und den Beinen zu finden. Dort kommt es auch hauptsächlich in den stärker differenzierten Schichten, nämlich *S. granulosum* und *S. corneum*, vor. Außerdem konnte es in immunhistologischen Präparaten in Schweiß- und Talgdrüsen nachgewiesen werden. Neben der Expression in der Haut, konnte hSPINK6 auf mRNA-Ebene im Gehirn, Thymus und in der Plazenta gezeigt werden. hSPINK6 hat im Vergleich zu hSPINK9 eine breitere inhibitorische Aktivität. So hemmt es selektiv die Kallikreine KLK5, KLK7, KLK12, KLK13 und KLK14, welche wichtig für die Hauthomöostase sind, nicht jedoch KLK8, Trypsin, Cathepsin G, Chymase, Neutrophile Elastase, Plasmin, Matriptase, Prostatin, Chymotrypsin und Trombin (Meyer-Hoffert *et al.* 2010; Kantyka *et al.* 2011). Folglich wird angenommen, dass hSPINK6 die Aktivität der epidermalen KLKs und somit die Hauthomöostase reguliert. Ein Hinweis darauf ist, dass hSPINK6 im Falle einer atopischen Dermatitis, bei der eine gestörte Hautbarriere vorliegt, weniger exprimiert wird. Jedoch werden auch weitere physiologische Funktionen aufgrund des Expressionsmusters vermutet.

## 2 ZIELSETZUNG

In der Haut spielen Kallikreine eine Hauptrolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase. Ihre proteolytische Aktivität ist essentiell für das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Desquamation. Die epidermalen Kallikreine (KLKs) werden unter anderem durch LEKT11, aber auch durch die beiden kürzlich beschriebenen Serin-Protease-Inhibitoren hSPINK9 und hSPINK6 in ihrer Aktivität reguliert. hSPINK9 stellt dabei einen spezifischen Inhibitor für KLK5 dar, der in der Haut nur an palmoplantaren Bereichen vorkommt, wohingegen hSPINK6 mit KLK5, KLK7, KLK12, KLK13 und KLK14 ein breiteres Wirkspektrum besitzt und scheinbar in allen Bereichen der Haut vorzufinden ist. Die Expression der beiden Inhibitoren wurde, außer in der Haut, bisher nur durch mRNA-Analysen untersucht. In dieser Arbeit sollte zunächst das Expressionsmuster von hSPINK9 und hSPINK6 auf der Protein-Ebene in den Organen analysiert werden, um eventuell auf weitere Funktionen rückschließen zu können. Des Weiteren sollte die Regulation der Proteinsynthese auf transkriptioneller Ebene, die Sekretion und die Funktion der Proteine untersucht werden.

Eine weitere Schlüsselrolle bei der Erhaltung der Barrierefunktion der Haut spielen die antimikrobiellen Peptide (AMPs). Für hSPINK9 wurde neben ihrer Funktion als KLK5-Inhibitor eine antimikrobielle Aktivität gegenüber *E. coli* beschrieben. Daher sollte im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob es ähnlich wie andere AMPs neben der bakteriziden Wirkung eine zusätzliche Chemokin- oder Cytokin-ähnliche Funktion besitzt. Hierfür sollte getestet werden, ob hSPINK9 als Chemoattraktant wirkt, sowie die Proliferation und/oder die Migration von Keratinozyten, welche die Wundheilung essentiell sind, fördern kann. In einem weiteren Schritt sollte anschließend geklärt werden, auf welche Art und Weise hSPINK9 auf die Zellen wirkt und eine Reaktion der Zellen auslöst. Im Fokus stand dabei die Frage, welche Rezeptoren eine Rolle spielen könnten und über welchen Weg das Signal in die Zelle gelangt. Hierfür gaben die Wirkungsweisen der AMPs LL-37 und Melittin einen Anhaltspunkt. Über sie ist bekannt, dass sie die Zellmigration durch die Aktivierung des EGFRs fördern. Dies wird ausgelöst durch ein vermehrtes *Shedding* der EGFR-Liganden mittels der ADAMs.

Zudem sollte geklärt werden, ob sich die Maus als Modellorganismus für hSPINK9- und hSPINK6-Untersuchungen eignet. Hierzu sollten auch in Maus-Expressionsstudien hinsichtlich der Regulation der putativen Genorthologe erstellt werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 MATERIAL

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| 96-well-Platten (Flachboden)                               | Sarstedt AG & Co., DE              |
| <i>Amicon® Ultra Centrifugal Filter (cutt off: 10 kDa)</i> | EMD Millipore Cooperation, USA     |
| Deckgläschen   | Menzel-Gläser GmbH, DE             |
| Einfrierbehälter, Nalgene <i>Mr. Frosty</i>                | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Frischhaltebox, luftdicht                                  | EMSA GmbH, DE                      |
| <i>Gene Pulser Cuvette, 0,1 cm</i>                         | Bio-Rad Laboratories, Inc., DE     |
| Gestopfte Spitzen  | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Glaskolben, 1000 ml, 300 ml                                | Schott AG, DE                      |
| Injektionsnadeln, Sterican                                 | B. Braun Melsung AG, DE            |
| Injektionsspritzen, <i>inject</i>                          | B. Braun Melsung AG, DE            |
| MACS LS Columns  | Miltenyi Biotec GmbH, DE           |
| Mikroschraubröhre, 2 ml                                    | Sarstedt AG & Co., DE              |
| <i>Multifly-Set (Butterfly)</i>                            | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Neubauer-Zählkammer  | Brand GmbH & Co KG, DE             |
| Objektträger   | Menzel-Gläser GmbH, DE             |
| <i>Optical Adhesive Film</i>                               | life Technologies Co., USA         |
| <i>PAP-pen</i>   | Dako Deutschland GmbH, DE          |
| Parafilm   | American National Can Company, USA |
| Pasteurpipetten  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE        |
| <i>PCR MicroAmp optical 96 well plate</i>                  | Life Technologies Co., USA         |
| Petrischale, Ø 10 cm                                       | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Präparationsbesteck  | Fine Scientific Tools GmbH, DE     |
| PVDF-Membran, 0,2 µm                                       | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE     |
| Reaktionsgefäß, 2 ml, 1,5 ml, 0,2 ml                       | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Roti®-PVDF-Membran, 0,45 µm                                | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE        |
| Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml                  | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Skalpell   | B. Braun Melsung AG, DE            |
| Spritzenfilter, 0,45 µm Porengröße                         | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Stickstofftank   | AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, DE   |
| Transwell-Filter, 5 µm Porengröße                          | Corning Inc., NE                   |
| Whatmanpapier, 1,5 mm                                      | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE        |
| Zellkulturflaschen, 78 cm <sup>2</sup>                     | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Zellkulturplatten, 12-well                                 | BD Bioscience GmbH (Falcon), DE    |
| Zellkulturplatten, 48-well                                 | BD Bioscience GmbH, DE             |
| Zellkulturplatten, 6-well                                  | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Zellkulturschalen, Ø 10 cm                                 | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Zellschaber, 16 cm, 25 cm                                  | Sarstedt AG & Co., DE              |
| Zellsieb, 40 µm Nylon                                      | BD Bioscience GmbH, DE             |
| Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml                          | Sarstedt AG & Co., DE              |

### 3.2 CHEMIKALIEN

|   |   |
|---|---|
| 1,10-Phenanthrolin                          | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| <i>10x buffer DNaseI + MgCl<sub>2</sub></i> | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| <i>10x FastDigest buffer</i>                | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)           | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| 4-Nitrophenyl-β-D-Glucuronid                | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| <i>5x RT buffer</i>                         | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| Agar Agar                                   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |

|  |  |
|--|--|
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)                                   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Amphiregulin (AREG)  | Immunotools GmbH, DE                                   |
| Ampicillin   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Bapta AM   | Tocris Bioscience, GB                                  |
| Betaisodona®   | Mundipharma GmbH, DE                                   |
| Bisacrylamid   | Bio-Rad Laboratories, Inc., DE                         |
| Brefeldin A (BFA)  | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                             |
| BSA-Standard   | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE    |
| Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )                            | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| <i>Cell dissociation solution, non-enzymatic</i>               | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                             |
| Cetuximab C225   | Merck KGaA, DE   |
| Chloroform   | Merck KGaA, DE   |
| Choleratoxin   | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                             |
| <i>Complete, Protease-Inhibitor-Mix</i>                        | Roche Deutschland Holding GmbH, DE                     |
| Coomassie Plus™, Protein Assay Reagent                         | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE    |
| <i>Desoxynucleotides</i> (dNTPs)                               | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE    |
| <i>Diazabicyclooctane</i> (DABCO)                              | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Diethylether   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Dithiothreitol (DTT)   | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE    |
| DMEM   | Life Technologies Co., USA                             |
| DNA-Ladepuffer, 6x <i>Loading Dye</i>                          | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE    |
| DNA-Marker, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder                         | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE    |
| DNA-Marker, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder                       | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE    |
| ECL Select   | GE Healthcare GmbH, USA                                |
| EDTA, Dinatriumsalz  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| EGF, rekombinant, human  | Immunotools GmbH, DE                                   |
| EGF, rekombinant, murin  | Immunotools GmbH, DE                                   |
| EGTA   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Ethanol, 96 % (EtOH)   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Ethidiumbromid   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Eukitt   | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                             |
| Fetales Kälberserum (FCS)                                      | PAA Laboratories GmbH, AT                              |
| Flagellin aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                    | Dr. U. Gerstel (nach Meyer-Hoffert <i>et al.</i> 2011) |
| fMLP   | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                             |
| Glucose  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Glycerin   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Glycin   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| GÖ6976   | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                             |
| HB-EGF   | PeproTech, USA   |
| Hefeextrakt  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Heparin  | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                             |
| IFN $\gamma$   | PeproTech, USA   |
| Il1 $\beta$  | Immunotools GmbH, DE                                   |
| Ionomycin (Iono)   | Calbiochem part of Merck KGaA, DE                      |
| Isopropanol  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| Kaliumchlorid (KCl)  | Merck KGaA, DE   |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )    | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                            |
| <i>Keratinocyte growth medium 2, ready-to-use</i> (KGM2)       | Promocell GmbH, DE                                     |
| Kollagen aus Rattenschwanz                                     | Roche Deutschland Holding GmbH, DE                     |
| Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>E. coli</i>                     | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                             |
| LSM 1077   | PAA Labortoaries GmbH, DE                              |
| LY294002 (LY)  | Calbiochem part of Merck KGaA, DE                      |
| Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )                          | Merck KGaA, DE   |

|  |   |
|--|---|
| Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )             | Merck KGaA, DE                                      |
| Marimastat (MM)                                  | Tocris Bioscience, UK                               |
| MCP1   | Immunotools GmbH, DE                                |
| Mercaptoethanol                                  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Methanol (MeOH)                                  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Meyer's Hämalaunlösung                           | Merck KGaA, DE                                      |
| Milchpulver                                      | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Mowiol® 4-88                                     | Calbiochem part of Merck KGaA, DE                   |
| Natriumacetat                                    | Merck KGaA, DE                                      |
| Natriumchlorid (NaCl)                            | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Natriumcitrat                                    | Merck KGaA, DE                                      |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                       | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Natriumhydroxid (NaOH)                           | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Oligo d(T)                                       | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| oxATP  | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| Paraformaldehyd (PFA)                            | Merck KGaA, DE                                      |
| Penicillin/Streptomycin, 100x                    | PAA Laboratories GmbH, AT                           |
| peqGOLD TriFast                                  | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE                      |
| Pertussis-Toxin (PTX)                            | Calbiochem part of Merck KGaA, DE                   |
| Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)              | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| Phosphatase-Inhibitor-Mix, PhosStop              | Roche Deutschland Holding GmbH, DE                  |
| PP2  | Calbiochem part of Merck KGaA, DE                   |
| PPADS  | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| Protein G Agarose                                | Pierce part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE    |
| Proteinmarker, <i>PageRuler™ Puls/Spectra LR</i> | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| <i>Random Hexamer Primer</i>                     | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| Retinsäure                                       | Fluka, DE   |
| rhSPINK9   | J. Fischer  |
| RiboLock RNase Inhibitor                         | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| Roti-Immunoblock, 10x                            | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Rotiphorese Gel 30                               | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| RPMI 1640  | PAA Laboratories GmbH, AT                           |
| Saccharose                                       | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Salzsäure, rauchend (HCl)                        | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Saponin  | Merck KGaA, DE                                      |
| Sorbitol   | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| Staurosporin (SSP) aus <i>Streptomyces sp.</i>   | Calbiochem part of Merck KGaA, DE                   |
| Suramin (Sur)                                    | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED)                   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| TGFβ   | Immunotools GmbH, DE                                |
| TNFα   | Peprtech, USA                                       |
| Tranfektionsreagenz, Attractene                  | Quiagen GmbH, DE                                    |
| Transfektionsreagenz, Turbofect                  | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| Tricin   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Tris   | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Triton X100                                      | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Trypanblau                                       | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| Trypsin, 2,5 %                                   | Biochrom part of Merck KGaA, DE                     |
| Trypsin-EDTA, 10x                                | PAA Laboratories GmbH, AT                           |
| Trypton/Pepton aus Casein                        | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Tween20  | Carl Roth GmbH & Co. KG, DE                         |
| Vitamin D3 (VitD3)                               | Sigma-Aldrich Co. LLC., DE                          |
| Xylolersatz, <i>Histo-Clear</i>                  | Biozym Scientific GmbH, DE                          |

### 3.3 ENZYME

|                              |   |
|------------------------------|---|
| DNaseI                       | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE                    |
| Dream Taq™ DNA-Polymerase    | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| <i>FastDigest BamHI</i>      | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| <i>FastDigest XhoI</i>       | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| Maxima RT                    | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| Pfu DNA-Polymerase           | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| <i>SUMO protease 1</i>       | LifeSensors Inc., USA                               |
| <i>SYBR Premix Ex Taq II</i> | Takara Bio Inc., JP                                 |
| T4 DNA-Ligase                | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |

### 3.4 KITS

|  |   |
|--|---|
| <i>Alkaline Phosphatase Standard, Vectastain ABC kit</i>       | Biologo, DE   |
| <i>Alkaline Phosphatase Substrat kit I, Vectastain ABC kit</i> | Biologo, DE   |
| <i>Cell Titer Glo® Luminescent Cell Viability Assay</i>        | Promega Corporation, USA                            |
| <i>Eosinophil Isolation kit, human</i>                         | Miltenyi Biotec GmbH, DE                            |
| <i>Gene Jet Gel Extraction kit</i>                             | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| <i>Gene Jet PCR Purification kit</i>                           | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| <i>Gene Jet plasmid Miniprep kit</i>                           | Fermentas part of Thermo Fisher Scientific Inc., DE |
| <i>Pure Yield™ plasmid Midiprep kit</i>                        | Promega Corporation, USA                            |

### 3.5 GERÄTE

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| -80°C Gefrierschrank, Forma 9000 Series                                  | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| 96-well-Platten-Absorption-Reader EL800                                  | BioTek Instruments GmbH, DE        |
| 96-well-Platten-Fluoreszenz-Reader FLx800                                | BioTek Instruments GmbH, DE        |
| Absaugpumpe, BVC <i>professional</i>                                     | Vacuubrand GmbH & Co. KG, DE       |
| Analysenwaage  | Kern & Sohn GmbH, DE               |
| Analysenwaage  | Denver Instruments GmbH, USA       |
| Biophotometer  | Eppendorf AG, DE                   |
| Brutschrank, HERA cell 150   | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Einkanalpipetten   | Abimed GmbH, DE                    |
| Elektroporator, Micropulser  | Bio-Rad Laboratories, Inc., DE     |
| ESI-QTOF-MS  | Micromass, UK                      |
| Fluoreszenzmikroskop, Axiovert mit Kamera 200M und Filter A350/A488/A595 | Carl Zeiss AG, DE                  |
| Fotodokumentationsanlage, BioDocII                                       | Biometra GmbH, DE                  |
| Fotokamera, EOS 1100D mit Mikroskopaufsatz                               | Canon Deutschland GmbH, DE         |
| Heizblock,   | Eppendorf AG, DE                   |
| Kippschüttler, Unitwist-RT   | Unieup GmbH, DE                    |
| Lichtmikroskop, invers   | Helmut Hund GmbH, DE               |
| MACS MultiStand  | Miltenyi Biotec GmbH, DE           |
| Magnetrührer, CB 162   | Stuart, USA                        |
| MidiMACS Separator   | Miltenyi Biotec GmbH, DE           |
| Mikrowelle   | Samsung GmbH, DE                   |
| MircoPulser  | Bio-Rad Laboratories, Inc.         |
| Multi-Imagingsystem, Fusion FX7  | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE     |
| NanoDrop 1000 Spectrophotometer  | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE     |
| PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S                                      | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE     |
| PerfectBlue™ Gelsystem Mini Twin S                                       | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE     |
| PerfectBlue™ Semi Dry Elektrobloetter                                    | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE     |

|  |  |
|--|--|
| PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE                 |
| pH-Meter pH211                         | HANNA Instruments Deutschland GmbH, DE         |
| Rollentisch Stuart SRT6                | Bibby Scientific Ltd, UK                       |
| Sonifizierer (Ultraschall)             | Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE          |
| Spannungsgeber, PAC 300                | Bio-Rad Laboratories, Inc., DE                 |
| Spannungsgeber, Power Supply EV231     | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE                 |
| StepOnePlus™ Real-Time PCR System      | Life Technologies Co., USA                     |
| Sterilwerkbank                         | Köttermann GmbH & Co. KG, DE                   |
| Thermozykler, peqSTAR 96 universal     | PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE                 |
| Überkopfschüttler, MACS Mix            | Miltenyi Biotec GmbH, DE                       |
| UV-Tisch                               | UVP Ltd., CA                                   |
| Vortexer, Vortex Genie                 | IKA-Werke GmbH & Co. KG, DE                    |
| Wasseraufbereitungsanlage, TKA GenPure | TKA part of Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Wasserbad, GFL1004                     | GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, DE     |
| Zentrifuge, Centrifuge 5417R           | Eppendorf AG, DE                               |
| Zentrifuge, Centrifuge 5424            | Eppendorf AG, DE                               |
| Zentrifuge, Centrifuge 5804R           | Eppendorf AG, DE                               |
| Zentrifuge, Centrifuge 5810R           | Eppendorf AG, DE                               |
| Zentrifuge, Heraeus Multifuge X3R      | Thermo Fisher Scientific Inc., USA             |

### 3.6 SOFTWARE

|   |  |
|---|--|
| Adobe Photoshop CS4 Extended                  | Adobe Systems GmbH, USA                |
| AxioVision 4.8.2                              | Carl Zeiss AG, DE                      |
| Bio 1D v15.02                                 | Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE    |
| Clone Manager 9                               | Scientific & Educational Software, USA |
| Fusion 15.17                                  | Vilber Lourmat Deutschland GmbH, DE    |
| Mendeley Desktop v1.10.3                      | Mendeley Ltd., UK                      |
| Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint 2010 | Microsoft Corp., UK                    |
| GraphPad Prism 5                              | GraphPad Software Inc.,                |
| Chromas Lite v2.1                             | Technelysium Pty Ltd., AU              |
| StepOne Software 2.2.2                        | Life Technologies Co., USA             |
| Swiss PDB Viewer v4.1.0                       | Swiss Institute of Bioinformatic, CH   |
| GeneDoc v2.6.002                              | Nicholas and Nicholas 1997             |
| SigmaStat 3.1 software                        | Erkrath, SYSSTAT, DE                   |

### 3.7 ALLGEMEINE PUFFER

|     |   |     |             |       |                |
|-----|---|-----|-------------|-------|----------------|
| PBS | 137 mM NaCl                             | TBS | 20 mM Tris  | TBS-T | 20 mM Tris     |
|     | 2,7 mM KCl                              |     | 1,17 M NaCl |       | 1,17 M NaCl    |
|     | 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |     | 10 mM EDTA  |       | 10 mM EDTA     |
|     | 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |     |             |       | 0,1 % Tween-20 |
|     | pH 7,2                                  |     |             |       |                |

### 3.8 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

#### 3.8.1 ZELLINIEN UND ZELLKULTUR

Sämtliche Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung in einem Brutschrank kultiviert. Adhärent wachsende Zelllinien, wie COS7-, HeLa-, HEK293T- und HaCaT-Zellen, wurden in Zellkulturschalen mit 10 ml Medium mit Zusätzen oder in Zellkulturplatten mit dem-

entsprechend weniger Medium kultiviert. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80-90 %, wurden sie geteilt. Dies geschah zunächst durch das Entfernen des Mediums und Waschens mit PBS. Anschließend wurde zu den Zellen 1 ml 1x Trypsin-EDTA gegeben und so lange inkubiert bis diese sich von der Schale ablösten. Daraufhin wurde zu der Zellsuspension 5 ml Medium mit Zusätzen gegeben, um mit dem enthaltenen FCS die proteolytische Aktivität des Trypsins abzustoppen. Bei HEK293T-Zellen war ein Ablösen durch Trypsin nicht erforderlich. Hier wurden die Zellen lediglich mit einer serologischen Pipette ab gespült und vereinzelt. Schließlich wurde von der Zellsuspension die gewünschte Menge in eine neue Zellkulturschale mit 10 ml Medium mit Zusätzen überführt.

Suspensionszelllinien, wie THP1, HL-60 und EOL1 wurden in Petrischalen mit 10 ml Medium mit Zusätzen subkultiviert um ein Ausdifferenzieren zu verhindern. Bei einer zu hohen Zelldichte wurde die gewünschte Menge an Zellsuspension in eine neue Schale mit 10 ml Medium mit Zusätzen gegeben.

Primäre Keratinozyten wurden in Zellkulturflaschen oder kollagenisierten Zellkulturplatten kultiviert. Bei einer Konfluenz zwischen 80 und 90 % wurde das Medium abgesaugt, 3 ml 1x Trypsin-EDTA zu den Zellen gegeben und inkubiert bis sie sich vom Untergrund ablösten. Anschließend wurden 10 ml DMEM mit Zusätzen hinzugefügt um die Aktivität des Trypsins abzustoppen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 200  $xg$  für 5 min bei RT sedimentiert. Sie wurden dann in KGM2 mit Zusätzen aufgenommen und schließlich in Zellkulturflaschen mit 12 ml KGM2-Medium mit Zusätzen ausgesät.

|                             |     |       |              |   |      |       |                  |
|-----------------------------|-----|-------|--------------|---|------|-------|------------------|
| Zusätze<br>(für Zelllinien) | 10  | %     | FCS          | Zusätze<br>(für primäre<br>Keratinozyten) | 0,06 | mM    | Ca <sup>2+</sup> |
|                             | 100 | U/ml  | Penicillin   |   | 1    | x     | Supplement mix   |
|                             | 100 | µg/ml | Streptomycin |   | 100  | U/ml  | Penicillin       |
|                             |     |       |              |   | 100  | µg/ml | Streptomycin     |

## COS7

COS7-Zellen (*CV-1 in origin, carrying SV40*, ATCC) stammen aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Sie wurden mit dem Virus SV40 transformiert und somit immortalisiert. Es sind adhärent wachsende Zellen, die in DMEM-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden.

## HELA

Die HeLa-Zelllinie (ATCC) war die erste etablierte menschliche Zelllinie. Es sind epitheliale Zellen eines Zervix-Adenokarzinoms der 31-jährigen Patientin Henrietta Lacks. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in RPMI-Medium mit Zusätzen subkultiviert.

## HEK293T

HEK293T-Zellen (*human embryonic kidney*, ATCC) wurden ursprünglich aus humanen embryonalen Nierenzellen generiert. Sie wurden mit dem Virus SV40 transformiert. Es handelt sich um adhärent wachsende Zellen, die im DMEM-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden.

## HACAT

Zellen der HaCaT-Linie (*human adult low calcium high temperature keratinocytes*, bereit gestellt von Prof. Dr. Fusenig, Deutsches Krebs-Forschungszentrum Heidelberg) sind spontan immortalisierte Keratinozyten. Sie sind aus kultivierten Keratinozyten eines 62-jährigen Mannes im deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg entstanden (Boukamp *et al.* 1988). Es sind adhärent wachsende Zellen, die im DMEM-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden. HaCaTs zeichnen sich dadurch aus, dass sie beispielsweise durch  $\text{CaCl}_2$  induziert, voll differenzierungsfähig sind.

## A431

A431-Zellen (DSMZ) sind aus einem epidermoiden Karzinom einer 85-jährigen Patientin isoliert wurden. Eine Besonderheit der Zellen ist, dass sie den EGF-Rezeptor außergewöhnlich hoch exprimieren. Sie wachsen adhärent und wurden im DMEM-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden.

## PRIMÄRE HUMANE KERATINOZYTEN

Primäre humane Zellen wurden entweder selbst aus Vorhäuten präpariert (siehe 3.8.4), oder von der Firma Promocell erworben (NHEK, *normal human epidermal keratinocytes*). Es sind adhärent wachsende Zellen, die in Zellkulturflaschen oder kollagenisierten Zellkulturplatten im KGM2-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden.

## PRIMÄRE MURINE KERATINOZYTEN

Primäre murine Keratinozyten wurden selbst aus Mausschwänzen präpariert, wie in 3.8.5 beschrieben. Es sind adhärent wachsende Zellen, die in Zellkulturflaschen oder kollagenisierten Zellkulturplatten im KGM2-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden.

## THP1

THP1-Zellen (DSMZ) sind monozytäre Zellen, welche aus dem Blut eines ein Jahr alten Patienten mit Leukämie gewonnen wurden (Tsuchiya *et al.* 1980). Es handelt sich um Suspensionszellen, die im RPMI-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie

beispielsweise durch PMA zu Makrophagen ausdifferenzieren können und in der Lage sind, zu phagozytieren (Denholm and Stankus 1995).

## HL-60

HL-60-Zellen (*human promyelocytic leukemia cells*, DSMZ) stammen aus dem Blut einer 36-jährigen Patientin mit Leukämie. Es sind promyeloide Suspensionszellen, die im RPMI-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden (Gallagher *et al.* 1979).

## EOL1

EOL1-Zellen (DSMZ) stammen vom Blut eines 33-jährigen Patienten mit Leukämie. Es ist eine Zelllinie aus eosinophilen Granulozyten (Mayumi 1992). Es sind Suspensionszellen, die im RPMI-Medium mit Zusätzen subkultiviert wurden.

### 3.8.2 KOLLAGENISIEREN VON ZELLKULTURPLATTEN

Damit sich primäre Keratinozyten und HEK293T-Zellen besser an der Oberfläche der Zellkulturplatten anheften konnten, wurden die Platten mit Kollagen beschichtet. Dies geschah durch eine mindestens 30 minütige Inkubation von 20 µg/ml Kollagen in 0,02 M HCl-Lösung bei 37°C mit einem entsprechenden Volumen, so dass die Oberfläche vollständig bedeckt war. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Für eine längere Lagerung bei RT wurden die kollagenisierten Platten getrocknet.

### 3.8.3 KRYOKONSERVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Für eine langfristige Lagerung werden eukaryotische Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden zunächst 90-100 % konfluente Zellen, die zuvor mit PBS gewaschen wurden, mit 1x Trypsin-EDTA vom Untergrund abgelöst. Danach wurde die proteolytische Aktivität durch Zugabe von Medium mit Zusätzen abgestoppt. Die so entstandene Zellsuspension wurde genauso wie Suspensionszelllinien bei RT für 5 min bei 200 xg zentrifugiert. Die so pelletierten Zellen wurden dann in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in einem Schraubdeckelröhrchen in einem Einfrierbehälter, welcher eine schonende Abkühlgeschwindigkeit von 1°C/min gewährleistet, für mindestens einen Tag bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde das Röhrchen für die endgültige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen von im Stickstoff langfristig gelagerten Zellen wurden diese Zellen nach der Entnahme aus dem Stickstofftank schnellstmöglich im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml 37°C-warmem Medium mit Zusätzen gewaschen und bei 200 xg und RT für 5 min zentrifugiert. Die so pelletierten Zellen wurden in neuem Medium

mit Zusätzen aufgenommen, ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag folgte ein Mediumwechsel.

|                |  |                                    |
|----------------|--|------------------------------------|
| Einfriermedium |  | entsprechendes Medium mit Zusätzen |
|                |  | 10 % FCS                           |
|                |  | 10 % DMSO                          |

### 3.8.4 PRÄPARATION VON PRIMÄREN HUMANEN KERATINOZYTEN

Die Präparation von primären humanen Keratinozyten erfolgte aus juvenilen oder adulten Vorhäuten. Das Material wurde durch eine Zirkumzision in der Praxis für Kinderchirurgie (Dr. A. Eckstein, Kiel) oder im Städtischen Krankenhaus Kiel gewonnen. Die Vorhäute wurden in 4°C kaltem DMEM transportiert und innerhalb eines Tages verarbeitet. Um mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere das Fett- und Bindegewebe, als auch die Unterhaut mit Blutgefäßen zu entfernen, wurde die ringförmige Vorhaut aufgeschnitten und flach in einer Petrischale ausgebreitet. Die daraus resultierende Haut aus Dermis und Epidermis wurde anschließend mit einem Skalpell in dünne Streifen geschnitten und in 0,1 % Trypsin für 24 h bei 4°C inkubiert. Der proteolytische Verdau durch Trypsin wurde dann mittels DMEM mit Zusätzen abgestoppt und die Epidermis wurde mit einer Pinzette von der Dermis abgezogen und in KGM2 überführt. Zum Vereinzeln der epidermalen Zellen wurden die Epidermisstücke durch ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße mittels eines Spritzenstempels gerieben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 200 *xg* und RT sedimentiert und anschließend in KGM2-Medium mit Zusätzen aufgenommen. Schließlich wurden die Zellen in Zellkulturflaschen oder in kollagenisierte Zellkulturplatten ausgebracht. Für die Versuche wurden die Zellen maximal sieben- bis achtmal passagiert.

### 3.8.5 PRÄPARATION VON PRIMÄREN MURINEN KERATINOZYTEN

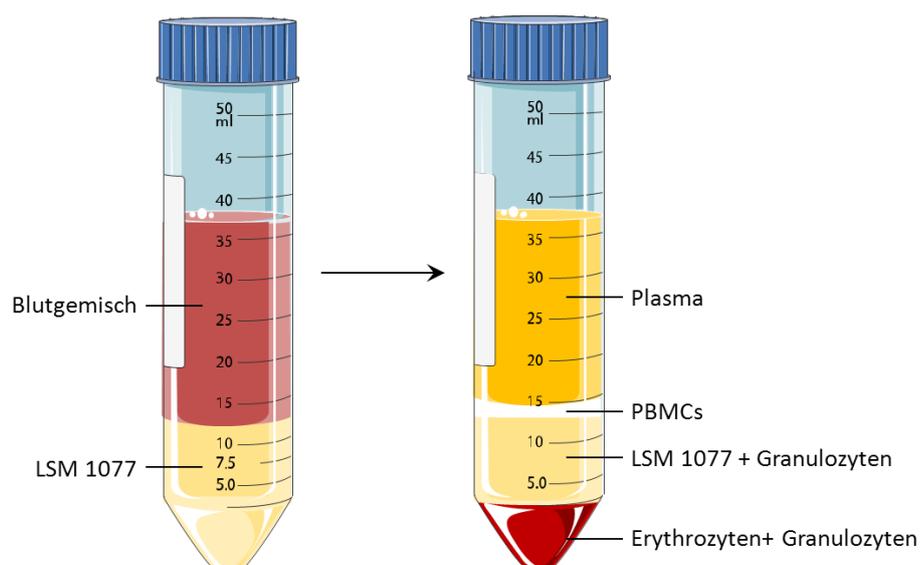
Primäre murine Keratinozyten wurden aus Schwänzen adulter Mäuse gewonnen. Der Schwanz wurde von einer zuvor durch Genickbruch getöteten Maus an der Schwanzwurzel abgetrennt. Dieser wurde anschließend in 10 % Iodlösung (Betaisodona) für 5 min desinfiziert. Durch dreimaliges kurzes Waschen in 70 % Ethanol wurde dieses wieder vom Schwanz entfernt. Zum Präparieren der Haut wurde der Schwanz zunächst der Länge nach eingeschnitten und die Haut dann mittels einer Pinzette abgezogen. Anschließend wurde diese Haut in etwa 3 cm lange Stücke geschnitten und mit der Dermis nach unten auf steriles Filterpapier angedrückt. Das so mit Haut bestückte Filterpapier wurde dann in einer Petrischale mit DMEM mit 1 % Trypsin für ca. 1–1,5 h bei 37 °C inkubiert.

Nach dieser Behandlung ließ sich die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abziehen. Das Trypsin wurde mit PBS und 10 % FCS abgestoppt. Um die so präparierten Epidermiszellen zu vereinzeln und von Haaren zu trennen, wurde die Epidermis durch ein 40 µm Zellsieb gerieben. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension bei 200 *xg* für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in KGM2 mit Zusätzen, 2 ng/ml mEGF und 1 µg/ml Cholera-Toxin aufgenommen und kultiviert. Schließlich konnten die Zellen auf kollagenisierten Platten ausgesät werden (2 bis 3 6-*well*-Platten/Schwanz).

### 3.8.6 LEUKOZYTEN-ISOLATION DURCH DICHTEGradientENZENTRIFUGATION

90 ml frisches peripheres Vollblut eines gesunden erwachsenen Spenders wurde durch Venenpunktion entnommen und mit Natriumcitrat-Monohydrat (0,38 %) versetzt, welches als Antikoagulant wirkt. Nachdem das Blut 1:2 mit PBS verdünnt wurde, wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 25 ml des Gemisches sehr langsam, um eine Durchmischung zu vermeiden, auf 12,5 ml LSM 1077 geschichtet. Anschließend wurde dieser Dichtegradient in einem Ausschwingrotor für 30 min bei 300 *xg* und RT (Einstellung: ↑0, ↓0) zentrifugiert. Die Zellen trennen sich aufgrund ihrer Dichte in verschiedene Fraktionen auf (Abbildung 5). *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) reichern sich dabei in der Interphase zwischen dem Plasma und dem LSM 1077 an. Eosinophile hingegen befinden sich als dünner Film direkt auf dem Erythrozytenpellet unter dem LSM 1077.

Zur Isolation von PBMCs wurde die Interphase entnommen und dreimal mit PBS durch Zentrifugation für je 10 min bei 300 *xg* und RT gewaschen.



**Abbildung 5: Zellfraktionierung von Blut durch Dichtegradientenzentrifugation.** Die Blutzellen werden aufgrund ihrer spezifischen Dichte bei der Zentrifugation mit LSM 1077 aufgetrennt.

Für eine Präparation von Eosinophilen wurde der dünne Film auf dem Erythrozytenpellet abgenommen und mit 50 ml PBS für 10 min bei 300 xg und RT gewaschen. Die dabei mit isolierten Erythrozyten wurden durch Zugabe von 50 ml eiskaltem Ery-Lyse-Puffer für 2 min auf Eis lysiert und anschließend für 10 min bei 300 xg und RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt bis nur noch ein weißes Zellpellet vorhanden war. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS durch Zentrifugation für je 10 min bei 300 xg und RT gewaschen. Eine weitere Aufreinigung der Eosinophilen erfolgte durch magnetische Separation mit Hilfe des *human eosinophil isolation kit*, bei dem andere Zellen mittels Negativselektion durch einen Antikörpercocktail von den Eosinophilen getrennt werden.

|                 |        |                    |
|-----------------|--------|--------------------|
| Ery-Lyse-Puffer | 0,01 M | KHCO <sub>3</sub>  |
|                 | 0,15 M | NH <sub>4</sub> Cl |
|                 | 0,1 mM | EDTA               |
|                 | pH     | 7,5                |

### 3.8.7 PRÄPARATION VON EOSINOPHILEN

Eosinophile wurden aus der Fraktion nach der Präparation aus Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation und der Erythrozytenlyse mit Hilfe des *human eosinophil isolation kit* isoliert. Dabei wurden nicht-eosinophile Zellen durch biotinylierte monoklonale Antikörper markiert und durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen Biotin, die an magnetischen *MicroBeads* gekoppelt waren, von den Eosinophilen in einem magnetischen Feld getrennt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

|             |        |                                  |
|-------------|--------|----------------------------------|
| MACS-Puffer | 137 mM | NaCl                             |
|             | 2,7 mM | KCl                              |
|             | 1,5 mM | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
|             | 8,1 mM | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|             | 0,5 %  | BSA                              |
|             | 2 mM   | EDTA                             |
|             | pH     | 7,2                              |

### 3.8.8 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst die Zellsuspension mit Hilfe von Trypanblau (0,2 %) angefärbt. Dieser Farbstoff kann eine intakte Membran nicht durchdringen, sodass lebende Zellen hell erscheinen. Tote Zellen hingegen werden blau angefärbt, da hier der Farbstoff in das Zytosol eindringt und mit den Proteinen interagieren kann. Die Zahl der lebenden Zellen wurde durch Auszählen der vier Quadranten einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dabei gilt:

$$\frac{ZZ}{\text{ml}} = \text{Summe der Zellen} / 4 \times \text{Vorverdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 3.8.9 STIMULATION VON ZELLEN UND EINSATZ VON INHIBITOREN

Für eine Analyse der mRNA-Expression als Reaktion der Keratinozyten auf eine Stimulation wurden die Zellen für 24 h in KGM2 ohne Zusätze stimuliert. Die Behandlung mit Sorbitol (human: 150 mM; murin: 75 mM) und CaCl<sub>2</sub> (human: 0,16 mM; murin: 0,15 mM) wurde für 7 d mit einem Mediumwechsel alle 2 d in KGM2 mit Zusätzen durchgeführt. Um den Einfluss von UV-Strahlung auf Keratinozyten zu untersuchen, wurden die Zellen mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB in PBS bestrahlt und anschließend für 24 h in KGM2 mit Zusätzen kultiviert bis sie geerntet wurden. Die mRNA wurde dann mit Hilfe von peqGOLD TriStar isoliert.

Zur Untersuchung der Proteinsekretion wurde 24 h nach Transfektion der Zellen ein Mediumwechsel auf Medium ohne Zusätze vorgenommen. Außerdem wurden die Zellen für 4 h, mit Ausnahme von Staurosporin und Ionomycin (30 min), stimuliert. Danach wurde der Überstand gesammelt, abzentrifugiert (12 000 rpm, 5 min, RT) und 100 µl davon für eine SDS-PAGE präpariert. Zudem wurden die Zellen lysiert und 50 µg davon ebenfalls für eine SDS-PAGE vorbereitet.

Um den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 bzw. EGFR zu untersuchen, hungerten die Zellen zunächst für 2 h in KGM2 ohne Zusätze. Anschließend wurden die Zellen, wenn nicht anders vermerkt, für 45 min mit 500 ng/ml rekombinantem humanen SPINK9 (rhSPINK9) stimuliert. Die eingesetzten Inhibitoren wurden 15 min vor der Stimulation prä-inkubiert.

Als Kontrolle dienten bei Stimulationsversuchen Zellen, die genauso wie die stimulierten Zellen und mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Stimulanzen behandelt wurden.

**Tabelle 1: Eingesetzte Inhibitoren.**

| Name  | Abkürzung    | Konzentration | Wirkung  |
|---|--------------|---------------|--|
| Brefeldin A   | <b>BFA</b>   | 1 µg/ml       | Inhibitor der Proteinsekretion                 |
| 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra (acetoxymethyl) ester | <b>BAM</b>   | 30 µM         | Membrangängiger Ca <sup>2+</sup> -Chelator     |
| LY294002  | <b>LY</b>    | 10 µM         | Inhibitor der PI3 Kinase                       |
| 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine                     | <b>PP2</b>   | 10 µM         | Inhibitor der Src-Kinase                       |
| Suramin   | <b>Sur</b>   | 200 µM        | Inhibitor der G-Protein gekoppelten Rezeptoren |
| Pyridoxalphosphate-6-Azophenyl-2',4',-Disulfonic Acid                               | <b>PPADS</b> | 200 µM        | Inhibitor der P2-Rezeptoren                    |
| Pertussis-Toxin   | <b>PTX</b>   | 100 ng/ml     | G-Protein gekoppelter Rezeptor-Inhibitor       |
| Adenosine 5'-triphosphate, periodate oxidized sodium salt                           | <b>oxATP</b> | 300 µM        | P2-Rezeptor-Antagonist                         |
| Marimastat  | <b>MM</b>    | 10 µM         | Metalloprotease-Inhibitor                      |
| Cetuximab   | <b>Cetux</b> | 10 µg/ml      | EGFR-blockierender Antikörper                  |

### 3.8.10 WUNDHEILUNGSVERSUCH

Um die Wirkung von Proteinen auf die Wundheilung der Haut untersuchen zu können, wurde ein *in vitro* Wundheilungsversuch durchgeführt. Hierzu wurden NHEKs (*normal human epidermal keratinocyte*) in eine kollagenisierte 6-*well*-Platte ausgesät. Bei einer Konfluenz von 100 % hungerten die Zellen zunächst für 5 h in KGM2 ohne Zusätze. Danach wurde in die einlagige Zellschicht mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers eine Wunde gekratzt. Abgelöste Zellen und Zelltrümmer wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen in KGM2 ohne Zusätze stimuliert und für 24 h inkubiert.

Zur Auswertung des Versuches wurden zum Zeitpunkt 0 h und 24 h mikroskopische Bilder derselben Stelle angefertigt (inverses Lichtmikroskop, Fotokamera, EOS 1100D mit Mikroskop-aufsatz). Die Fläche der zellfreien Region wurde mittels der Software „AxioVision Rel. 4.8“ von Zeiss ermittelt. Dabei dient die relative Flächenabnahme nach 24 h Inkubation verglichen mit der Fläche direkt nach der Wundsetzung (0 h) in Prozent als Maß der Zellmigration.

### 3.8.11 ZELLVIABILITÄTSVERSUCH

Um die Viabilität und das Proliferationsverhalten der Zellen zu analysieren, wurde der *CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay* genutzt. Der Versuch basiert auf der Quantifizierung von ATP, welches mit der Anzahl lebender Zellen korreliert. Für die Untersuchung der Viabilität beim Einsatz von Marimastat (10 µM) oder Cetuximab (10 µg/ml) wurden 100 % konfluente Keratinozyten in einer 48-*well*-Platte für 24 h in KGM2 ohne Zusätze analog zu einem Wundheilungsversuch inkubiert. Zur Analyse der Proliferation wurden 8.500 Zellen/*well* (subkonfluent) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen anschließend für weitere 24 h mit HB-EGF, AREG, EGF (alle 50 ng/ml), oder rhSPINK9 (500 ng/ml) in KGM2 ohne Zusätze inkubiert. Als Lebend-Kontrolle dienten mit dem Lösungsmittel der Stimulanzen behandelte Zellen und eine Tot-Kontrolle bei der die Zellen mit 0,2 % Triton X-100 behandelt wurden. Der Versuch wurde mit Fünffachwerten jeder Probe durchgeführt und erfolgte nach Herstellerangaben. Zum Schluss wurden die Messwerte der behandelten Proben mit denen der Lebend-Kontrolle (100 %) normalisiert.

### 3.8.12 CHEMOTAXIS ASSAY (MITTELS BOYDEN-KAMMER)

Zur Untersuchung von zielgerichteter Zellmigration entlang eines Stoffkonzentrationsgradienten wurde der *chemotaxis assay* genutzt. Als System wurde hier die BOYDEN-Kammer von Neuroprobe verwendet. Zunächst wurde in die untere Kammer RPMI ohne Zusätze und 0,2 %

BSA mit und ohne Stimulus pipettiert. Als Positivkontrolle diente für THP1- und PBMC-Zellen 10 nM MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und für HL-60-Zellen 100 nM fMLP (*N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine*). Die obere Kammer wurde mit 30  $\mu$ l PBMCs ( $2 \times 10^6$  ZZ/ml), THP1- ( $2 \times 10^6$  ZZ/ml) oder HL-60-Zellen ( $4 \times 10^6$  ZZ/ml) bestückt. Dabei wurden die beiden Kammern von einem Filter (Neuroprobe, 8  $\mu$ m), der zuvor in RPMI ohne Zusätze äquilibrierte und mit einem Zellschaber von überschüssigem Medium befreit wurde, voneinander separiert. Den Zellen ist es nur dann möglich durch diese Filterbarriere zu gelangen, wenn sie sich aktiv in Richtung des Stimulus bewegen.

Nach einer Inkubation bei 37 °C für 2 h (THP1, PBMC) oder 4 h (HL-60), wurde die obere Kammer und der Filter entfernt (Abbildung 6). Die Suspension der unteren Kammer wurde in eine 96-well-Platte überführt und die darin enthaltenen Zellen durch Zugabe von Triton X-100 (0,1 %) lysiert. Um die Zahl der gewanderten Zellen zu bestimmen, wurde anschließend ein Glucuronidase-assay durchgeführt. Als Substrat wurde 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucuronid (1,25 mg/ml) genutzt. Dieses wird durch Glucuronidase in Glucuronid und 4-Nitrophenol umgesetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °C, ün wurde die Reaktion mittels Glycinpuffer abgestoppt. Dabei dissoziiert 4-Nitrophenol zu Nitrophenolat, welches ein Absorptionsmaximum von 405 nm hat.

Als Standard diente eine 1:10-Zellverdünnungsreihe. Als Maß für die Migration wurde der Chemotaxis Index ermittelt, welcher das Verhältnis der Zellzahl der Probe mit Stimulus zur Kontrolle ohne Stimulus normiert wurde.

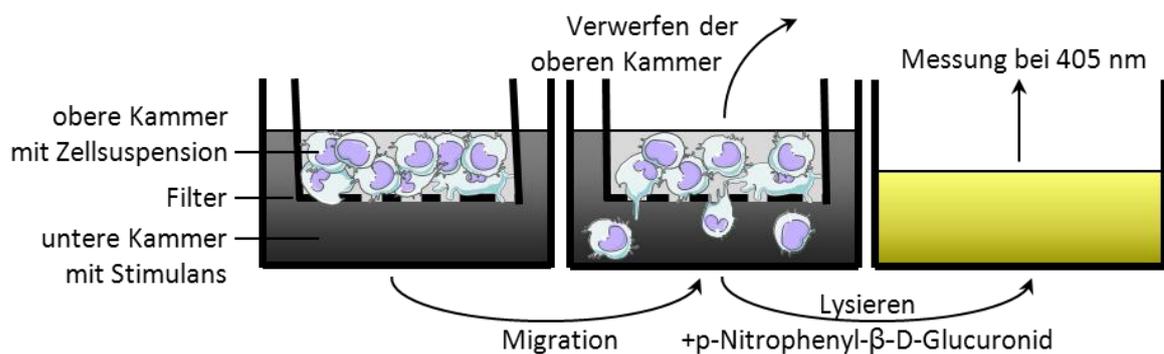


Abbildung 6: Schematische Durchführung eines *chemotaxis assays*.

|                |           |                                      |
|----------------|-----------|--------------------------------------|
| Glycinpuffer   | 0,4 M     | Glycin                               |
|                | pH 10,3   |                                      |
| Substratpuffer | 2,5 mg/ml | 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucuronid |
|                | 0,1 M     | Natriumacetat                        |
|                | pH 4,0    |                                      |

### 3.8.13 TRANSFEKTION

Die Zelllinie HEK293T wurde auf kollagenisierten 12-*well*-Platten und bei einer Konfluenz von 70-80 % mit *Turbofect* und HaCaT-Zellen mit *Attractene* transfiziert. Dazu wurde 1 µg Plasmid mit 100 µl DMEM ohne Zusätze vermischt, anschließend mit 3 µl Transfektionsreagenz versetzt, gevortext und für 20 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde dieser Ansatz zu den Zellen mit 500 µl DMEM ohne Zusätze getropft und für 6 h bebrütet bis dann ein Mediumwechsel auf DMEM mit Zusätzen stattfand. 20 h danach wurde wiederum ein Mediumwechsel auf DMEM ohne Zusätze durchgeführt, um so für 4 h FCS-freies Medium mit sekretierten Proteinen zu sammeln oder die Zellen wurden nach 24 h fixiert, um eine Fluoreszenzfärbung anzufertigen.

### 3.8.14 FLUORESZENZFÄRBUNG

Immunzytochemie wurde eingesetzt, um die zelluläre Lokalisation von Proteinen zu bestimmen. Dazu wurden HaCaT-Zellen auf zuvor kollagenisierten Deckgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz zwischen 70-90 % transfiziert, Eosinophile wurden in *chamberslides* ausgebracht. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen und für 15 min mit Saponinlösung (0,2 % Saponin in PBS) inkubiert. Danach folgte eine 10-minütige Inkubation in 0,12 % Glycerol in Saponinlösung und 1 h Blockierung mit 3 % BSA in Saponinlösung bei RT. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, der mit 3 % BSA in Saponinlösung verdünnt war, fand üN bei 4°C in einer feuchten Kammer statt (Tabelle 2). Daraufhin wurde dreimal mit Saponinlösung gewaschen und mit Fluoreszenz-gekoppeltem sekundären Antikörper für 1 h, die mit 3 % BSA in Saponinlösung verdünnt waren, bei RT inkubiert. Daraufhin wurde erneut dreimal mit Saponinlösung und anschließend zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Schließlich wurden die Deckgläschen auf Objektträgern mit Einbettungslösung eingedeckt. Die Proben wurden dann im Dunkeln bei 4°C gelagert. Zur Visualisierung stand das Fluoreszenzmikroskop von Zeiss (Axiovert mit Kamera 200M und Filter A350/A488/A595) zur Verfügung. Als Kontrollen dienten Zellen, welche ohne den primären Antikörper gefärbt wurden.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für Immunzytochemie und Fluoreszenzfärbung.

|                         | Anitgen   | Antikörper                                       | Wirt  | Konzentra-<br>tion | Verdünnung | Zeit und<br>Temperatur |
|-------------------------|-----------|--|-------|--------------------|------------|------------------------|
| primäre<br>Antikörper   | hSPINK9   | polyklonal<br>(Meyer-Hoffert <i>et al.</i> 2009) | Ziege | 1 mg/ml            | 1:50       | üN, 4°C                |
|                         | EMBP      | monoklonal BMK13 (Santa Cruz)                    | Maus  | 100 µg/ml          | 1:20       | üN, 4°C                |
| Sekundäre<br>Antikörper | Ziege IgG | Alexa Fluor 488 (Invitrogen)                     | Esel  | 2 mg/ml            | 1:500      | 1 h, RT                |
|                         | Maus IgG  | Alexa Fluor 594 (Invitrogen)                     | Esel  | 2 mg/ml            | 1:500      | 1 h, RT                |
|                         | Ziege IgG | biotinyliert (Vector, Biologo)                   | Pferd | 1,5 mg/ml          | 1:500      | 1 h, RT                |

|                   |                                 |
|-------------------|---------------------------------|
| Einbettungslösung | 1 ml Mowiol-Lösung              |
|                   | 100 µl DABCO (200 mg/ml in PBS) |
|                   | 1 µl DAPI (1 mg/ml)             |

### 3.9 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

#### 3.9.1 KULTIVIERUNG VON *E. COLI*

*Escherichia (E.) coli* wurde sowohl auf Luria-Bertani (LB)-Agar als auch in flüssigem LB-Medium bei 37°C (200 rpm) kultiviert. Durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin erfolgte die Selektion der ampicillin-resistenten Stämme.

|           |        |             |         |           |           |
|-----------|--------|-------------|---------|-----------|-----------|
| LB-Medium | 10 g/l | Trypton     | LB-Agar | LB-Medium |           |
|           | 5 g/l  | Hefeextrakt |         | 15 g/l    | Agar-Agar |
|           | 10 g/l | NaCl        |         |           |           |

#### 3.9.2 KRYOKONSERVIERUNG VON *E. COLI*

Für eine langfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerolstocks angelegt. Dafür wurde der Stamm über Nacht bei 37°C kultiviert, mit 13 % Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schlussendlich bei -80°C in Schraubdeckelröhrchen gelagert.

### 3.10 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 3.10.1 PRIMER

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe von *Clone manager 9* entworfen und in einer Konzentration von 100 µM erworben. Für eine Optimierung der *annealing*-Temperatur wurde mit den jeweiligen Primerpaaren eines Gradienten-PCR im Thermozykler *peqSTAR 96 universal* durchgeführt.

### 3.10.2 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente zur spezifischen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Zur Synthese von DNA-Fragmenten, welche zur Klonierung von Vektoren benötigt wurden, wurde die *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Sie besitzt aufgrund ihrer *proofreading*-Aktivität (3'→5' Exonukleaseaktivität) eine hohe Genauigkeit. Zur Überprüfung von Bakterienklonen wurde im Rahmen eine *colony-check-PCR* die *DreamTaq<sup>TM</sup> DNA-Polymerase* genutzt.

|            |                  |                       |              |        |         |           |
|------------|------------------|-----------------------|--------------|--------|---------|-----------|
| PCR-Ansatz | 1 U              | Polymerase            | PCR-Programm | Deckel | 120°C   | 30 Zyklen |
|            | 1 x              | Puffer                |              | 95°C   | 3 min   |           |
|            | 0,2 μM           | dNTPs                 |              | 95°C   | 30 sec  |           |
|            | 0,2 μM           | <i>forward</i> Primer |              | 55°C   | 30 sec  |           |
|            | 0,2 μM           | <i>reverse</i> Primer |              | 72°C   | 1-2 min |           |
|            |                  | Template              |              | 72°C   | 10 min  |           |
| ad 49 μl   | H <sub>2</sub> O |                       | 4°C          | ∞      |         |           |

### 3.10.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA UND MRNA

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA bzw. mRNA wurde das Spektrophotometer *NanoDrop 1000* genutzt. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da Nukleinsäuren hier ihr Absorptionsmaximum haben.

### 3.10.4 RESTRIKTIONSVERDAU

Für die präparative Restriktion von Plasmiden wurden Restriktionsenzyme von Fermentas (*FastDigest*) mit 1x *FastDigest buffer* nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Ansatz wurde für mindestens 5 min bei 37 °C inkubiert.

### 3.10.5 LIGATION

Die Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit einem Insert wurde mit Hilfe der *T4 DNA Ligase* durchgeführt. Dazu wurde ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 gewählt. Dabei gilt:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kbp Insert}}{\text{kbp Vektor}} \times \text{Verhältnis von} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{ng Insert}$$

Das Protokoll wurde nach Herstellerangeben durchgeführt.

### 3.10.6 TRANSFORMATION

Die elektrokompenten *E. coli* Top10-Zellen (Invitrogen, DE) wurden nach der Methode von Dower *et al.* (1988) hergestellt und bei -80°C gelagert. Zur Elektroporation wurden 50 μl der elektrokompenten Zellen und 1 μl Ligationsansatz, welcher zuvor mit 100 μl Chloroform

ausgeschüttelt wurde, eingesetzt. Dieses Gemisch wurde in eine vorgekühlte Küvette gegeben und einem elektrischen Puls von 1,8 kV (*MicroPulser*, Programm Ec1, 1,8 kV, 1 Puls) ausgesetzt. Nach Zugabe von 1 ml auf 37°C temperiertes SOC-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zur Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

|            |        |                   |
|------------|--------|-------------------|
| SOC-Medium | 0,5 %  | Hefeextrakt       |
|            | 2 %    | Trypton           |
|            | 10 mM  | NaCl              |
|            | 2,5 mM | KCl               |
|            | 10 mM  | MgCl <sub>2</sub> |
|            | 10 mM  | MgSO <sub>4</sub> |
|            | 20 mM  | Glucose           |
|            | pH 7,5 |                   |

### 3.10.7 PLASMIDPRÄPARATION

Zur Plasmidenpräparation von aus einer *E. coli*-Kultur wurde zunächst der jeweilige Stamm in LB-Medium, welches die Ampicillin (100 µg/ml) enthielt, üN bei 37°C, 250 rpm inkubiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (3 ml einer Übernachtskultur) wurde das *Plasmid Miniprep kit* genutzt. Zur Präparation aus 200 ml Kultur wurde das *Pure yield purification Midiprep system* verwendet. Bei beiden Kits erfolgte die Durchführung nach Herstellerangaben.

### 3.10.8 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese in einem waagerechten Agarosegel bei ca. 10 V/cm<sup>2</sup> in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die Proben wurden mit 6x DNA *loading dye* von Fermentas gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden *GeneRuler 1 kb DNA-ladder* und *GeneRuler 100 bp DNA-ladder* von Fermentas eingesetzt. Zur Dokumentation der Elektrophorese wurden die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe mit einem UV-Transilluminator (*Dual intensity Ultraviolet Transilluminator TM 20* und *BioDocII-Fotodokumentationsanlage*) nachgewiesen.

|                |        |        |            |           |                |
|----------------|--------|--------|------------|-----------|----------------|
| 10x TAE-Puffer | 400 mM | Tris   | Agarosegel | 1-2 %     | Agarose        |
|                | 200 mM | Acetat |            | 0,5 µl/ml | Ethidiumbromid |
|                | 10 mM  | EDTA   |            | 1 x       | TAE-Puffer     |
|                | pH 8,0 |        |            |           |                |

### 3.10.9 PRÄPARATION VON DNA-FRAGMENTEN AUS PCR-ANSÄTZEN

Um DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen aufzureinigen, wurde das *Gene Jet PCR purification kit* genutzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 3.10.10 PRÄPARATION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

DNA wurde mit Hilfe des *Gel Extraction Kits* aus dem Agarosegel extrahiert. Es wurde insbesondere darauf geachtet, dass die UV-Intensität niedrig und die Bestrahlungsdauer so gering wie möglich gehalten wurden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

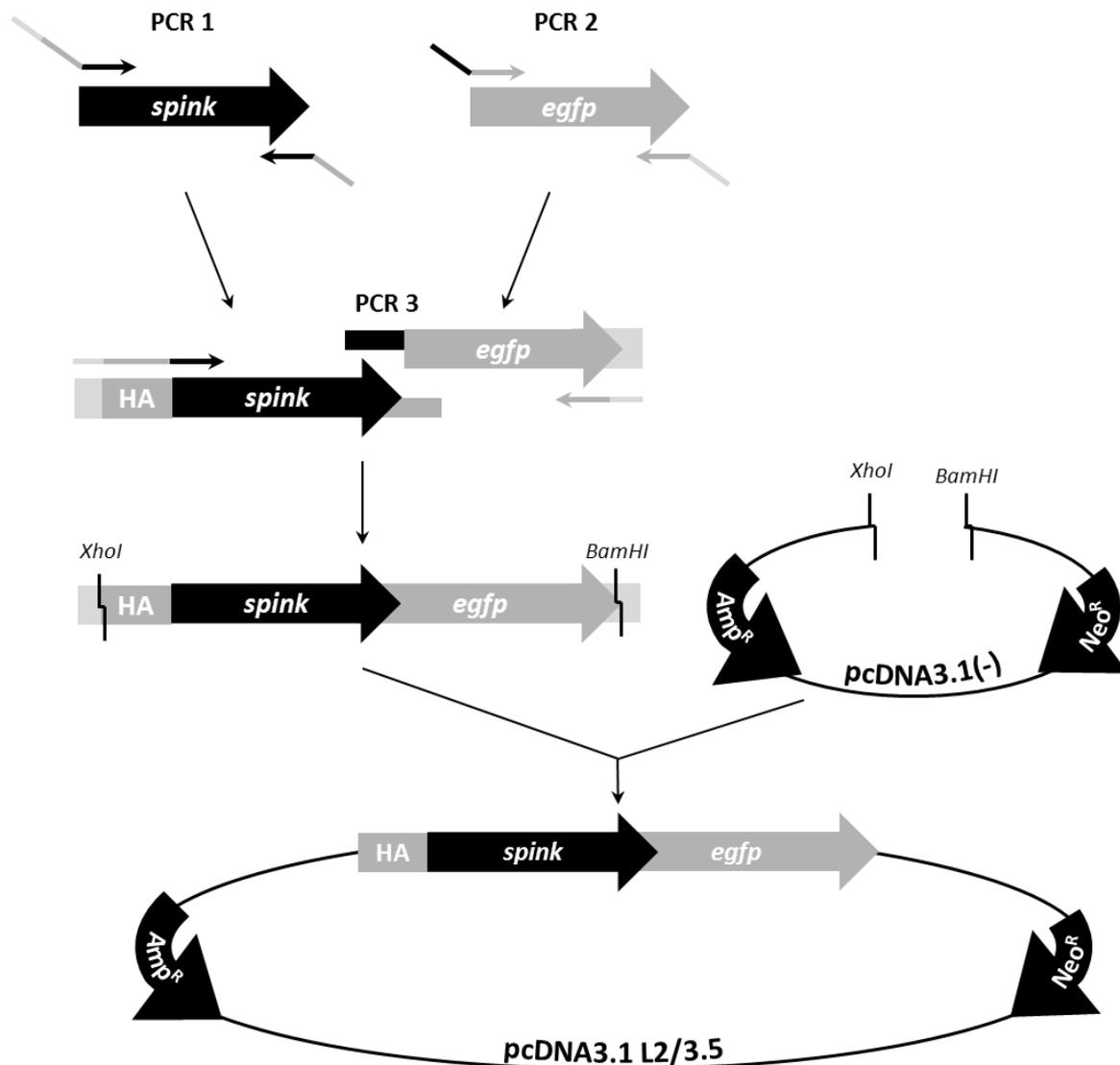
### 3.10.11 SEQUENZIERUNG

Zur Feststellung der korrekten Sequenz der in die Plasmide integrierten Fragmente wurden die DNA-Sequenzen nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) analysiert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab (Göttingen, DE)

### 3.10.12 KLONIERUNG VON VEKTOREN

Für die Untersuchung der Sekretion von hSPINK9 und hSPINK6 und deren Lokalisation wurden Vektoren generiert, welche zu einer Expression von hSPINK9 bzw. hSPINK6, die mit einem N-terminalen HA-tag versehen und C-terminal mit *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) fusioniert sind, führen. Dazu diente der Vektor pGEM-T, der die cDNA-Sequenz von *hspink9* und *hspink6* enthielt und freundlicherweise von Jan Fischer (AG Meyer-Hoffert, Dermatologie, UKSH, Campus Kiel, DE) zur Verfügung gestellt wurde, als *template*. Mit Hilfe einer ersten PCR wurden die *spink*-Gene mit den Primern L2.3for und L2.5overlap-1 bzw. L3.3for und L3.5overlap-1 amplifiziert (Tabelle 3). Dabei wurde durch den forward Primer vor dem Startcodon eine Schnittstelle für *XhoI* und eine Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak 1987) und direkt nach dem Startcodon die kodierende Sequenz für einen HA-tag eingefügt (Abbildung 7). Der reverse Primer enthielt die terminale Sequenz des *spink*-Gens ohne das Stoppcodon, einen *spacer*, der für zwei Proline kodiert, und die N-terminale Sequenz für eGFP. Bei einer zweiten PCR wurde das *egfp*-Gen mit den Primern L2.5overlap-2 und L2.5rev bzw. L3.5overlap-2 und L3.5rev vervielfältigt. Somit wurde die *egfp*-Sequenz N-terminal mit der C-terminalen Sequenz der *spink*-Gene und C-terminal mit einem Stoppcodon und einer Schnittstelle für *BamHI* versehen. Schließlich wurden die Amplifikate der ersten und zweiten PCR in einer dritten *overlap*-PCR mit den Primern L2.3for und L2.5rev bzw. L3.3for und L2.5rev miteinander fusioniert. Das so entstandene PCR-Produkt und der Zielvektor pcDNA3.1(-) wurden mittels Restriktionsverdau geschnitten, aufgereinigt und miteinander ligiert. Zur Vervielfältigung des entstandenen Plasmids wurde es in *E. coli* transformiert. Anhand einer Sequenzierung mit den Primern SeqpcDNA3.1-1 und SeqpcDNA3.1BGHrev wurde die Basensequenz kontrolliert. Der hSPINK9-Vektor mit N-terminalem HA- und C-terminalem eGFP-tag wurde pcDNA3.1 L2.5 und der hSPINK6-Vektor mit N-terminalem HA- und C-terminalen eGFP-tag wurde pcDNA3.1 L3.5

genannt. pcDNA3.1 L2.5 wurde in Zusammenarbeit mit Sarah Klünder (AG Reiss, Dermatologie, UKSH, Campus Kiel, DE) erstellt und ist deswegen auch in ihrer Diplomarbeit beschrieben (Klünder 2011). Die gesamte Klonierungsstrategie wurde mit Hilfe der *Software Clone Manager 9* geplant.



**Abbildung 7: Strategie zur Klonierung von hSPINK9/6-Überexpressionsvektoren.** Das Insert, bestehend aus *HA*, *spink* und *egfp*, wurde durch zwei PCRs gefolgt von einer *overlap*-PCR erzeugt. Anschließend wurde das entstandene Insert mit Hilfe von *XhoI* und *BamHI* in das Plasmid *pcDNA3.1(-)* eingebracht.

Tabelle 3: Zur Klonierung verwendete Primer.

| Name                     | Sequenz   | PCR           |
|--------------------------|---|---------------|
| <b>L2.3for</b>           | TATCTCGAGGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTA<br>GAGCAACAGCCATAGTCCTA  | 1, 3, hSPINK9 |
| <b>L2.5overlap-1</b>     | CTCCTCGCCCTTGCTCACTGGTGGACATTTTCCAAAATGTACAAAT                          | 1, hSPINK9    |
| <b>L3.3for</b>           | TATCTCGAGGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTA<br>AACTGTCAGGCATGTTTCTGC | 1, 3, hSPINK6 |
| <b>L3.5overlap-1</b>     | CTCCTCGCCCTTGCTCACTGGTGGCATTTCAGGATGCTTTAGG                             | 1, hSPINK6    |
| <b>L2.5overlap-2</b>     | GTACATTTTGGAAAATGTCCACCAGTGAGCAAGGGCGAGGAG                              | 2, 3, hSPINK9 |
| <b>L2.5rev</b>           | TATGGATCCTCAAGCTGATCTGAGTCCGGACTTG                                      | 2, hSPINK9/6  |
| <b>L3.5overlap-2</b>     | AAGCATCCTGGAAAATGCCACCAGTGAGCAAGGGCGAGGAG                               | 2, hSPINK6    |
| <b>SeqpcDNA3.1-1</b>     | CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  | Sequenzierung |
| <b>SeqpcDNA3.1BGHrev</b> | CTAGAAGGCACAGTCGAG  | Sequenzierung |

### 3.10.13 ISOLATION VON mRNA

Zur Lyse der Keratinozyten wurden zunächst 500 µl *peqGOLD TriStar* in die Vertiefung einer mit Keratinozyten zu 90-100 % konfluent bewachsenen 12-*well*-Zellkulturplatte gegeben, bei der zuvor das Medium verworfen wurde. Dazu wurden anschließend 100 µl Chloroform zugefügt, 30 sec vorsichtig durch Invertieren gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Mittels Zentrifugation bei 12.000 xg und 4°C für 15 min wurde die mRNA in der wässrigen Phase von DNA und Proteinen in der Inter- und Trizolphase separiert und in ein neues Gefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden 250 µl Isopropanol beigemischt, für 15 sec invertiert, anschließend für 1-2 h bei 4°C inkubiert und für 15 min bei 12.000 xg und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dreimal mit 500 µl Ethanol gewaschen und bei 7500 xg und 4°C für je 5 min zentrifugiert. Schließlich wurde dieses mRNA-Pellet getrocknet und in 20 µl *Aqua dest.* aufgenommen. Um eine Lösung des Pellets zu begünstigen, wurde die Probe für 5 min bei 55°C unter Schütteln erhitzt.

Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des *NanoDrop's* bei 260 nm ermittelt. Während der gesamten Prozedur wurden ausschließlich gestopfte RNase-freie Spitzen genutzt um Verunreinigungen vorzubeugen.

### 3.10.14 REVERSE TRANSKRIPTION

Aus Zellen isolierte mRNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden maximal 3 µg mRNA und ad 13,25 µl *Aqua dest.* mit 1 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Oligo d(T)s (18-mer, 100µM) und 0,5 µl *random hexamer primer* (100 µM) gemischt, für 5 min auf 65°C erhitzt und sofort danach mit Eis auf 4°C herunter gekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5x *reverse transcriptase buffer*, 0,5 µl *RiboLock RNase inhibitor* mit 0,25 µl *Maxima RT* zugegeben und eine PCR im Thermozykler *peqSTAR 96 universal* gefahren.

Vorbereitend für eine *real-time* PCR wurde anschließend die Konzentration der cDNA auf 10 ng/μl eingestellt. Während der gesamten Prozedur wurden ausschließlich gestopfte Spitzen genutzt um Verunreinigungen vorzubeugen.

|  |        |        |
|--|--------|--------|
| Reverse Transkriptase-<br>PCR-Programm | Deckel | 120°C  |
|  | 25°C   | 10 min |
|  | 50°C   | 30 min |
|  | 85°C   | 5 min  |
|  | 4°C    | ∞      |

### 3.10.15 REAL-TIME PCR

Die *real-time* PCR wird als Methode zur Quantifizierung von cDNA als Maß der Transkription bzw. Expression bestimmter Gene genutzt. Die erforderlichen Primer wurden mit Hilfe der Software *Clone manager 9* generiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese Intron-überspannend sind und somit eine Amplifikation von eventuell noch vorhandener genomischer DNA praktisch ausgeschlossen ist, die Primer eine Länge von 20 Basenpaaren (bp) haben, der GC-Gehalt zwischen 50 und 60 % ist, die Schmelztemperatur zwischen 55 und 60°C liegt und das gewünschte Amplifikat eine Länge zwischen 80 und 200 bp besitzt (Tabelle 4). Um die Spezifität der PCR weiterhin zu verbessern wurde eine sogenannte *touchdown*-PCR durchgeführt. Hierbei wird in den ersten Zyklen die *annealing*-Temperatur höher gewählt als die optimale Temperatur und pro Zyklus der optimalen Temperatur immer weiter angenähert. Dies hat zur Folge, dass während der ersten Zyklen nur Produkte mit besonders hoher Spezifität entstehen, welche in den folgenden Zyklen weiter amplifiziert werden. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde *SYBR premix Ex Taq II* eingesetzt, dessen Fluoreszenz sich proportional zur vorhandenen DNA-Menge verhält. Die *real-time* PCR wurde in einem *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* in *PCR MicroAmp optical 96-well-Platten* mit einem *optical adhesive film* mit dem *fast*-Programm durchgeführt. Um die Spezifität des entstanden Produktes einschätzen zu können, wurde nach der PCR eine Schmelzkurve erstellt. Die PCR-Amplifikate besitzen spezifische Schmelztemperaturen, welche dabei als *Peak* sichtbar werden und Rückschlüsse auf die Qualität der PCR zulassen.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (*cycle threshold*) verwendet. Das *housekeeping Gene* humanes *beta-2 microglobulin (hb2m)* wurde bei humanen Proben zur Normalisierung genutzt. Murine Proben wurden auf die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*mgapdh*) normalisiert. Es gilt:

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct} &= \text{Ct (zu untersuchendes Gen)} - \text{Ct (housekeeping Gen)} \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct (stimulierte Zellen)} - \text{Ct (mock)} \\ x - \text{fache Erhöhung} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}\end{aligned}$$

Sämtliche Arbeiten wurden ausschließlich mit gestopften Spitzen verrichtet.

**Tabelle 4: Eingesetzte Real-time PCR Primer.**

| Gen             | Protein | Name                         | Sequenz                                       |
|-----------------|---------|------------------------------|---|
| <i>hb2m</i>     | hB2M    | hGAPDH for<br>hGAPDH rev     | ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA<br>GGCATCTTCAAACCTCCATG |
| <i>hhprt</i>    | hHPRT1  | hHPRT for<br>hHPRT rev       | TTGCTGACCTGCTGGATTAC<br>CCCTGTTGACTGGTCATTAC  |
| <i>hspink6</i>  | hSPINK6 | hSPINK6 for<br>hSPINK6 rev   | GCAGGTGTCTTTCTGCTCCT<br>CCAGAGCTTTTCTCCAATGC  |
| <i>hspink9</i>  | hSPINK9 | hSPINK9 for<br>hSPINK9 rev   | CAACAGCCATAGTCCTACTC<br>CCATCTGTTTCGTCTGTTTG  |
| <i>mgapdh</i>   | mGAPDH  | mGAPDH for<br>mGAPDH rev     | TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC<br>ATTCTCGGCCTTGACTGTGC  |
| <i>mspink12</i> | mSPINK9 | mSPINK12 for<br>mSPINK12 rev | GATTCTCAGCGCCATGAAGC<br>GGGCCAGTGTCTTCTCATAG  |
| <i>mspink6</i>  | mSPINK6 | mSPINK6 for<br>mSPINK6 rev   | TCAGAGGGCCGATTTCCAGG<br>CCGCAGAGTGGGTGAGATTC  |

|                      |        |                         |
|----------------------|--------|-------------------------|
| Real-Time PCR-Ansatz | 5,2 µl | SYBR premix Ex Taq II   |
|                      | 0,5 µl | forward Primer (2,5 µM) |
|                      | 0,5 µl | reverse Primer (2,5 µM) |
|                      | 2,8 µl | H <sub>2</sub> O        |
|                      | 1,0 µl | cDNA (10 ng/µl)         |

|                        |        |                       |  |
|------------------------|--------|-----------------------|--|
| Real-Time PCR-Programm | 95°C   | 20 sec                | 6 Zyklen ( <i>Touchdown</i> : -1°C/Zyklus) |
|                        | 95°C   | 3 sec                 |  |
|                        | 64°C   | 30 sec                |  |
|                        | 95°C   | 3 sec                 | 40 Zyklen                                  |
|                        | 58°C   | 30 sec                |  |
|                        | 95°C   | 15 sec                | Schmelzkurve                               |
|                        | 60°C   | 1 min                 |  |
|                        | +0,3°C | /15 sec<br>(bis 95°C) |  |
|                        | 95°C   | 15 sec                |  |

## 3.11 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

### 3.11.1 HUMANES SPINK9/6

Sowohl rekombinantes humanes SPINK9 bzw. SPINK6 (rhSPINK9, rhSPINK6) als auch aus *S. corneum* präpariertes natürliches humanes SPINK9 (nSPINK9) wurden von Jan Fischer (AG Meyer-Hoffert, Dermatologie, UKSH, Campus Kiel, DE) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

rhSPINK9 wurde als Fusionprotein mit der Sequenz von natürlich vorkommendem hSPINK9-1, wie von Meyer-Hoffert *et al.* 2009 beschrieben, exprimiert. Nach der Abspaltung des pET32-

*Tags* durch eine Enterokinase wurde das rhSPINK9-Fragment durch eine Kationenaustauschchromatographie mit 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) über einen Gradienten mit dem Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8,0) von dem *tag* separiert. Als letzter Aufreinigungsschritt erfolgte eine analytische *reversed phase* C18-Chromatographie wie in Meyer-Hoffert *et al.* 2009 beschrieben. rhSPINK6 wurde als Fusionprotein mit der Sequenz von hSPINK6-1, wie in von Meyer-Hoffert *et al.* 2010 beschrieben, exprimiert und aufgereinigt. Zur Kontrolle der korrekten Aufreinigung wurde die Masse von rhSPINK9/6 durch *ESI-quadrupole TOF-MS* analysiert.

nSPINK9 wurde aus einem sauren *S. corneum*-Extrakt gesunder Personen präpariert. Dazu wurde der Extrakt zunächst gegen neutralen Puffer dialysiert (*cut off*: 8 kDa) und über eine Heparin-Sepharose-Säule gegeben. Die dort gebundenen Proteine wurden mittels einer weitporigen *reversed phase* C8-Chromatographie gefolgt von einer Kationenaustauschchromatographie (analytische C18) weiter aufgetrennt (Meyer-Hoffert *et al.* 2009). Durch den Einsatz von *ESI-quadrupole TOF-MS* wurde analysiert, welche natürlichen Formen von SPINK9 Antikörperisoliert wurden.

### 3.11.2 HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN

Zur Lyse von Zellen aus der Zellkultur wurde das Medium abgenommen und ADAM10-Lysispuffer, welcher den *Protease inhibitor mix Complete* (1:25, Roche) und den *phosphatase inhibitor cocktail PhosSTOP* (1:10, Roche) enthielt, dazugegeben. Anschließend wurde die Platte dreimal bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut und für 30 min bei 4°C inkubiert. Um Zelldebris von dem entstandenen Lysat zutrennen, wurde bei 12000 xg und 4°C für 5 min zentrifugiert.

|                    |     |     |              |
|--------------------|-----|-----|--------------|
| ADAM10-Lysispuffer | 1   | %   | Triton-X-100 |
|                    | 5   | mM  | Tris         |
|                    | 1   | mM  | EGTA         |
|                    | 250 | mM  | Saccharose   |
|                    | pH  | 7,4 |              |

### 3.11.3 BESTIMMUNG DER GESAMTPROTEINKONZENTRATION

Der Proteingehalt der Zelllysate wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurden 200 µl einer gebrauchsfertigen *Coomassie Plus*-Lösung in eine Vertiefung einer 96-well-Platte gegeben und mit 1 µl des Zelllysates gemischt. Als Leerwert dienten 200 µl *Coomassie Plus* mit 1 µl ADAM10-Lysispuffer. Die Standardreihe wurde mit BSA angefertigt. Die Extinktion bei 595 nm wurde mit dem 96-well-Platten-Absorption-Reader *EL800* gemessen.

### 3.11.4 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Mittels SDS-PAGE (*sodiumdodecylsulfate-polyacrylamidgel-electrophoresis*) wurden Proteine und deren Gemische elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Dafür wurden die Proben in 6x Ladepuffer für 5 min bei 95°C aufgekocht und damit anschließend das Gel beladen. Für Proben bei denen besonders kleine Proteine im Vordergrund standen, wurde ein Harnstoffgelsystem verwendet. Für alle anderen wurde standardmäßig ein 10 %iges Acrylamidgel eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 30 mA und max. 150 V.

|                 |        |                |                           |            |        |
|-----------------|--------|----------------|---------------------------|------------|--------|
| 6x Probenpuffer | 0,75 M | Tris           | Elektrophorese-<br>puffer | 25,1 mM    | Tris   |
|                 | 12 %   | SDS            |                           | 192 mM     | Glycin |
|                 | 6,54 M | Glycerin       |                           | 0,1 %      | SDS    |
|                 | 6 mM   | EDTA           |                           | pH 8,8-8,9 |        |
|                 | 120 mM | DTT            |                           |            |        |
|                 | 0,15 % | Bromphenolblau |                           |            |        |
|                 | pH 6,8 |                |                           |            |        |
| Trenngelpuffer  | 1,5 M  | Tris           | Sammelgel-<br>puffer      | 0,5 M      | Tris   |
|                 | 0,4 %  | SDS            |                           | 0,4 %      | SDS    |
|                 | pH 8,8 |                |                           | pH 6,8     |        |

**Tabelle 5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel**

|                                      | Sammelgel |         | Trenngel |         |
|--------------------------------------|-----------|---------|----------|---------|
|                                      | 4,5 %     | 7,5 %   | 10 %     | 12,5 %  |
| H <sub>2</sub> O                     | 2,9 ml    | 5,03 ml | 4,03 ml  | 3,29 ml |
| Sammelgelpuffer                      | 1,25 ml   | -       | -        | -       |
| Trenngelpuffer                       | -         | 2,5 ml  | 2,5 ml   | 2,5 ml  |
| Acrylamid/Bisacrylamid, 30 %, 37,5:1 | 0,835 ml  | 2,33 ml | 3,33 ml  | 4,17 ml |
| APS 10 % (w/v)                       | 30 µl     | 60 µl   | 60 µl    | 60 µl   |
| TEMED                                | 15 µl     | 30 µl   | 30 µl    | 30 µl   |

#### Harnstoffgelsystem für kleine Proteine

|                           |         |                        |                 |         |                        |
|---------------------------|---------|------------------------|-----------------|---------|------------------------|
| Elektrophorese-<br>puffer | 500 mM  | Tris                   | Tris-HCl-Puffer | 3 M     | Tris                   |
|                           | 500 mM  | Tricin                 |                 | 0,3 %   | SDS (w/v)              |
|                           | 0,5 %   | SDS (w/v)              |                 | pH 8,45 |                        |
|                           | pH 8,25 |                        |                 |         |                        |
| Bis-Tris-Puffer           | 2,76 g  | Bisacrylamid           | Trenngel        | 2,45 ml | Acrylamid/Bisacrylamid |
|                           | 99 ml   | Tris-HCl-Puffer        |                 | 2,12 ml | Bis-Tris-Puffer        |
|                           | 6,6 ml  | H <sub>2</sub> O       |                 | 2,16 g  | Harnstoff              |
|                           |         |                        |                 | 50 µl   | 10 % APS (w/v)         |
|                           |         |                        | 6 µl            | TEMED   |                        |
| Spacergel                 | 0,73 ml | Acrylamid/Bisacrylamid | Sam-<br>melgel  | 0,36 ml | Acrylamid/Bisacrylamid |
|                           | 0,99 ml | Tris-HCl-Puffer        |                 | 0,92 ml | Tris-HCl-Puffer        |
|                           | 1,28 ml | H <sub>2</sub> O       |                 | 2,46 ml | H <sub>2</sub> O       |
|                           | 30 µl   | 10 % APS (w/v)         |                 | 40 µl   | 10 % APS (w/v)         |
|                           | 6 µl    | TEMED                  |                 | 6 µl    | TEMED                  |

### 3.11.5 WESTERN BLOT

Für den Transfer von elektrophoretisch durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurde das *semi-dry-blot*-Verfahren oder das *tank-blot*-Verfahren eingesetzt. Hierbei wurden die Proteine auf 0,2 µm bzw. 0,45 µm Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Zunächst wurde Filterpapier in Transferpuffer äquilibriert und die PVDF-Membran erst mit Methanol aktiviert und dann ebenfalls mit Transferpuffer äquilibriert. Zwei Schichten Filterpapier, die PVDF-Membran, die SDS-PAGE und nochmals zwei Filterpapierschichten wurden übereinandergelegt und nach Herstellerangaben in die Apparatur gelegt.

Handelte es sich um Proben bei denen besonders kleine Proteine im Vordergrund standen, wurde das *semi-dry-blot*-Verfahren bei konstanten 1 mA/cm<sup>2</sup>, max. 25 V für 1,5 h angewandt. Ansonsten wurde das *tank-blot*-Verfahren mit 200 mA, max. 100 V für 3 h verwendet.

|                |     |     |          |
|----------------|-----|-----|----------|
| Transferpuffer | 192 | mM  | Glycin   |
|                | 25  | mM  | Tris     |
|                | 10  | %   | Methanol |
|                | pH  | 8,5 |          |

### 3.11.6 IMMUNOLOGISCHE DETEKTION VON WESTERN BLOTS

Nach dem Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mittels spezifischen Antikörpern detektiert. Dazu wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit 5 % Milchpulverlösung in TBS-T bei RT für 1 h bzw. bei 4 °C üN blockiert. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper, welcher in 5 % Milchpulverlösung verdünnt war, inkubiert. Es folgten drei 10-minütige Waschschrte mit TBS-T. Schließlich wurde die Membran mit *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert und dann ebenfalls dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die anschließende Detektion erfolgte mit 460 µl *ECL Select* und mit der *Fusion FX* Chemolumineszenzkamera. Zur Quantifizierung von *Western Blots* wurde die Software Bio1D verwendet. Färbungen mit Antikörpern, welche phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) erkannten, wurden mit Gesamt-ERK1/2 (tERK1/2=pERK1/1+ERK1/2) ins Verhältnis gesetzt und zur der Kontrollprobe normalisiert.

Tabelle 6: verwendete Antikörper für *Western Blot*

|                      | Antigen   | Antikörper                                    | Wirt      | Konzentration | Verdünnung | Zeit und Temperatur |
|----------------------|-----------|---|-----------|---------------|------------|---------------------|
| primäre Antikörper   | GAPDH     | FL-335 (Santa cruz)                           | Kaninchen | 2000 µg/ml    | 1:1000     | 1 h, RT             |
|                      | Tubulin   | E7 (DSHB)                                     | Maus      | 40 µg/ml      | 1:500      | 1 h, RT             |
|                      | GFP       | 7.1 + 13.1 (Roche)                            | Maus      | 0,4 mg/ml     | 1:1500     | 1 h, RT             |
|                      | HA        | 3F10 (Roche)                                  | Ratte     | 1 mg/ml       | 1:2000     | 1 h, RT             |
|                      | hSPINK9   | polyklonal (Meyer-Hoffert <i>et al.</i> 2009) | Ziege     | 1 mg/ml       | 1:1000     | 1 h, RT             |
|                      | hSPINK9   | monoklonal, L30-2 (AG Grötzinger)             | Maus      | ÜS            | 1:10       | 1 h, RT             |
|                      | hSPINK6   | polyklonal (Meyer-Hoffert <i>et al.</i> 2010) | Ziege     | 1 mg/ml       | 1:1000     | 1 h, RT             |
|                      | hCLK5     | Monoklonal, 193318( R&D)                      | Maus      | 500 µg/ml     | 1:500      | 1 h, RT             |
|                      | pERK1/2   | D13.13.4E (Cell Signalling)                   | Kaninchen |               | 1:3000     | üN, 4 °C            |
|                      | ERK1/2    | L34F12 (Cell Signalling)                      | Maus      |               | 1:3000     | üN, 4 °C            |
|                      | pEGFR     | D7A5 (Cell Signalling)                        | Kaninchen |               | 1:3000     | üN, 4 °C            |
|                      | EGFR      | D38B1 (Cell Signalling)                       | Kaninchen |               | 1:3000     | üN, 4 °C            |
| sekundäre Antikörper | Ziege     | HRP-gekoppelt (Jackson Immunores.)            | Esel      | 0,8 mg/ml     | 1:10000    | 1 h, RT             |
|                      | Maus      | HRP-gekoppelt (Jackson Immunores.)            | Schaf     | 0,8 mg/ml     | 1:10000    | 1 h, RT             |
|                      | Kaninchen | HRP-gekoppelt (Jackson Immunores.)            | Ziege     | 0,8 mg/ml     | 1:10000    | 1 h, RT             |
|                      | Ratte     | HRP-gekoppelt (Jackson Immunores.)            | Ziege     | 0,8 mg/ml     | 1:10000    | 1 h, RT             |

### 3.11.7 STRIPPEN VON WESTERN BLOTS

Um verschiedene Proteine nacheinander auf einem *Western Blot* detektieren zu können, müssen zunächst die gebundenen primären und sekundären Antikörper von der PVDF-Membran gelöst werden. Dies wurde durch eine Inkubation der Membran in *stripping*-Puffer bei 65 °C für 45 min bewerkstelligt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran wie schon beschrieben zunächst blockiert und dann mit primären und sekundären Antikörpern angefärbt.

|                          |      |     |                    |
|--------------------------|------|-----|--------------------|
| <i>stripping</i> -Puffer | 0,25 | M   | Tris               |
|                          | 8    | %   | SDS                |
|                          | 0,7  | %   | 2-Mercapthoethanol |
|                          | pH   | 6,7 |                    |

### 3.11.8 CO-IMMUNPRÄZIPITATION

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden 700 µg Gesamtprotein eines Zelllysates in 500 µl ADAM10-Lysispuffer aufgenommen und mit 2 µl G-Protein Sepharose zusammen mit 1 µg Maus-IgG für 30 min bei RT gerollt. Anschließend wurde dreimal mit PBS durch zentrifugieren bei 1000 xg und RT für 1 min gewaschen. Weiterhin wurde dem dabei entstandenen Überstand 1,8 µg Maus-anti-GFP-Antikörper und 40 µl G-Protein Sepharose hinzugegeben und üN bei 4°C gerollt. Der durch Zentrifugation bei 1000 xg, RT für 1 min entstandene Überstand wurde verworfen, das Pellet dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2x Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgekocht.

### 3.11.9 IMMUNHISTOCHEMIE

Fixierte Paraffinschnitte wurden zuerst entparaffinisiert. Dafür wurde der Schnitt zunächst für 1 h bei 63 °C oder bei 37 °C üN inkubiert. Danach erfolgte eine absteigende Alkoholreihe, beginnend mit zweimal 10 min in Xylolersatz, anschließend zweimal 2 min in 100 % Ethanol, zweimal 2 min in 96 % Ethanol, einmal 2 min in 80 % Ethanol, einmal 2 min in 70 % Ethanol und schließlich 10 min in destilliertem Wasser. Zum Freilegen der Epitope wurde der Schnitt für 20 min in Citratpuffer in einem Dampfgerat gegart und dann darin weiter bis zum Abkühlen inkubiert (45 min). Nach 5 min Waschen in TBS-T wurden die Schnitte mit einem *PAP-Pen* abgegrenzt. Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 12 % BSA für 20 min und 1x Rotimmunoblock (Carl Roth) für 20 min blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, welcher in TBS mit 1 % BSA verdünnt war (Tabelle 2). Nach zweimaligem Waschen für 3 min in TBS-T folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, welcher ebenfalls in TBS mit 1 % BSA verdünnt war. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde zweimal 3 min in TBS-T gewaschen. Danach folgte eine 30-minütige Inkubation mit AB-Reagenz (Vectastain ABC Kit AP Standard, Biologo) und anschließend dreimal 3 min Waschen in Tris-Base-Puffer. Schließlich wurde der Schnitt mit AP-Substrat (Vectastain ABC Kit, AP Substrat Kit I, Biologo) für 30 min angefärbt, einmal mit destilliertem Wasser gespült und anschließend 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Für die Kernfärbung wurde Hämalaun (30 % Meyer's Hämalaun) genutzt, welches maximal für 30 sec einwirkte und dann zum Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min abgespült wurde.

Zum Entwässern des Schnittes wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt (70 % EtOH, 80 % Ethanol, 2x 100 % Ethanol, 2x Xylolersatz). Zum Schluss wurde der Schnitt in Eukitt mit einem Deckglas eingedeckt.

|              |   |                 |  |
|--------------|---|-----------------|--|
| Citratpuffer | 1,8 % 0,1 M Zitronensäure<br>8,2 % 0,1 M Natriumcitrat<br>pH 6,0    | Tris-Basepuffer | 2,1 g Tris Base<br>Ad 1 l H <sub>2</sub> O<br>pH 8,2-8,5     |
| AB-Reagenz   | 1000 µl TBS<br>10 µl A<br>10 µl B<br>30-40 min bei RT vorinkubieren | AP-Substrat     | 1000 µl Tris-Base-Puffer<br>20 µl R1<br>20 µl R2<br>20 µl R3 |

#### 3.11.10 DNA-ASSOZIATIONSVERSUCH

Um zu untersuchen ob rhSPINK9 an DNA binden kann, wurde ein DNA-Assoziationsversuch (auch *DNA gel retardation assay*) durchgeführt (nach Bandyopadhyay *et al.* 2013). Dabei

wurden 100 ng des Plasmids pcDNA3.1(-) mit und ohne 600 ng rhSPINK9 in Assoziationspuffer für 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Um eventuelle DNase-Aktivitäten auszuschließen wurde ein weiterer Versuch mit 1 U DNaseI und 100 ng pcDNA3.1(-) für 5 min bei RT durchgeführt.

|                          |    |    |      |                          |    |    |      |
|--------------------------|----|----|------|--------------------------|----|----|------|
| Assoziationspuffer<br>P7 | 10 | mM | Tris | Assoziationspuffer<br>P9 | 10 | mM | Tris |
|                          | 50 | mM | NaCl |                          | 50 | mM | NaCl |
|                          | 1  | mM | EDTA |                          | 1  | mM | EDTA |
|                          |    | pH | 7,6  |                          |    | pH | 9,26 |

### 3.12 BIOINFORMATIK

*UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) diente zur Analyse der genomischen Organisation der *spink*-Gene (Kent *et al.* 2002; Karolchik *et al.* 2013). Die Klassifizierung Domänenstruktur von hSPINK9/6 wurde mit Hilfe des *InterPro Browsers* (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) durchgeführt (Quevillon *et al.* 2005; Hunter *et al.* 2012). Anhand von SWISS-MODEL (<http://beta.swissmodel.expasy.org/>) wurde die 3D-Struktur vorhergesagt (Arnold *et al.* 2006; Kiefer *et al.* 2009) und mittels der Software SWISS-PDB Viewer 4.1.0 dargestellt. Der pI sowie die Molekülmassen wurden mit ExpASY-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) ermittelt.

### 3.13 STATISTISCHE ANALYSE

Alle Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM), wenn nicht anders angegeben, abgebildet. Der Standardfehler wurde aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet. Die Varianzanalyse wurde durch eine *one-way ANOVA* mittels der Software *SigmaStat 3.1* oder durch einen paired Student's *t*-Test mittels GraphPad Prism 5 durchgeführt. Ein P-Wert von  $\leq 0,05$  war klassischerweise statistisch signifikant.

## 4 ERGEBNISSE

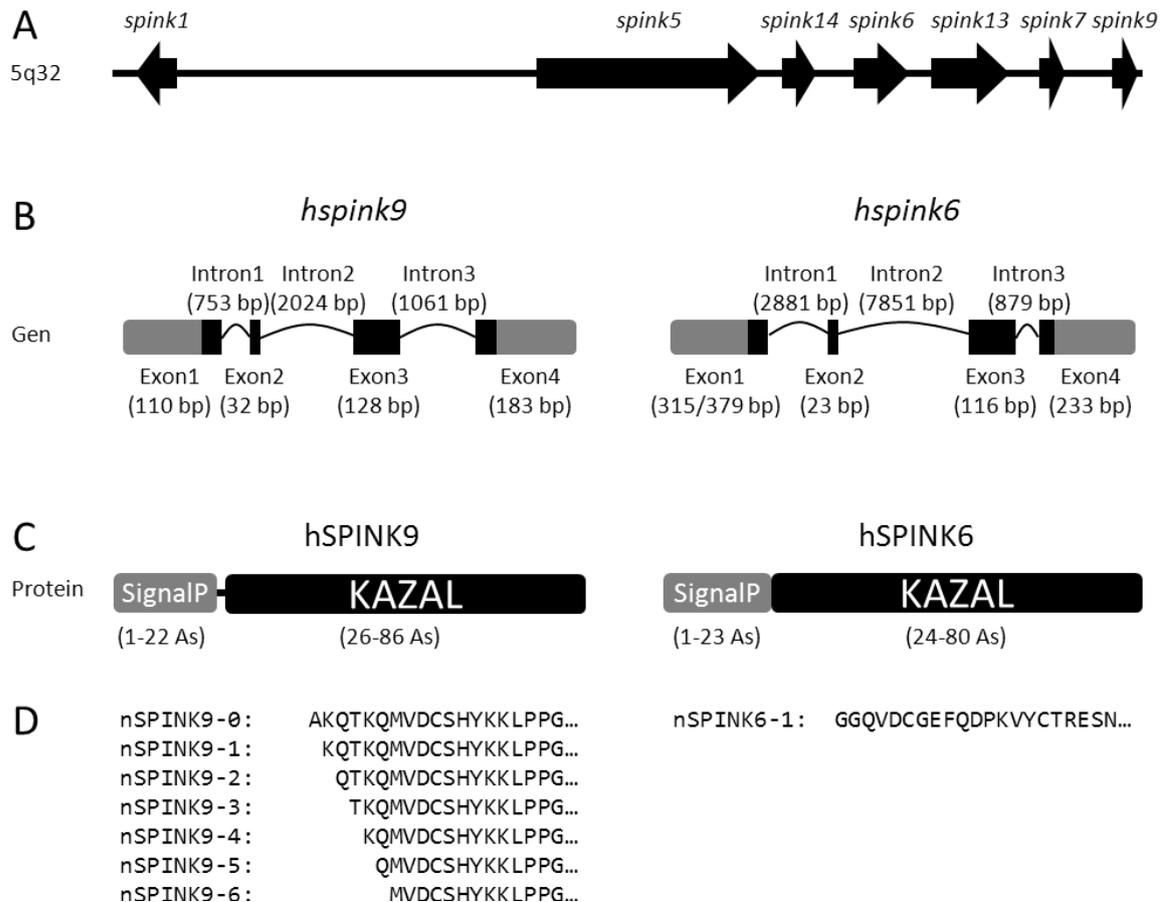
### 4.1 ORGANISATION DER *SPINK*-GENE UND STRUKTURVORHERSAGE VON SPINK9 UND SPINK6

Die Mitglieder der *spink*-Genfamilie sind, mit Ausnahme von *spink2* (Chromosom 4), *spink4* (Chromosom 9) und *spink8* (Chromosom 3), auf dem Chromosom 5 zu finden. Dort liegen sie am Genort 5q32 geclustert vor (Abbildung 8A). Außer *spink1* besitzen die Gene *spink5*, *spink6*, *spink7*, *spink9*, *spink13* und *spink14* die gleiche Orientierung vom Zentromer zum Telomer. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Proteine hSPINK9 und hSPINK6 werden von den Genen *hspink9* (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert *et al.* 2009) und *hspink6* (Meyer-Hoffert *et al.* 2010) kodiert. Das *hspink9*-Gen befindet sich nach *spink7* an der Position chr5: 147.715.122-147.719.412 und umfasst 4.291 Basenpaare (bp). *hspink6* liegt zwischen den Genen *spink14* und *spink13* an der Position chr5: 147.582.357-147.594.700 und ist 12.344 Basenpaare (bp) lang (UCSC *Genome Browser*).

Beide Gene bestehen aus je vier Exons, welche durch drei Introns voneinander getrennt sind (Abbildung 8B). Die 5'-Untranslated Region (UTR) von *hspink9* umfasst 55 bp und die 3'-UTR 137 bp (Meyer-Hoffert *et al.* 2009). Für das *hspink6*-Gen existieren, so zeigten Meyer-Hoffert *et al.* 2010, zwei Transkriptvarianten. Sie unterscheiden sich in ihrem Transkriptionsstart, welcher um 63 bp variiert. Beide Varianten nutzen aber das gleiche Polyadenylierungssignal. Die 3'-UTR von *hspink6* hat eine Basenlänge 186 bp (Meyer-Hoffert *et al.* 2010).

Zur Analyse der Domänenstrukturen der Proteinsequenzen wurde das Programm InterPro genutzt (Abbildung 8C). Sie ergab, dass hSPINK9 eine Signalpeptid-Domäne (Phobius, *signal peptide*) von Aminosäure (As) 1 bis 22 und eine Kazal-Typ-Domäne (Prosite, PS51465) von As 26 bis 86 besitzt. Auch hSPINK6 beinhaltet sowohl eine Signalpeptid-Domäne (1-23 As, Phobius, *signal peptide*) als auch eine Kazal-Typ-Domäne (24-80 As, Prosite, PS51465).

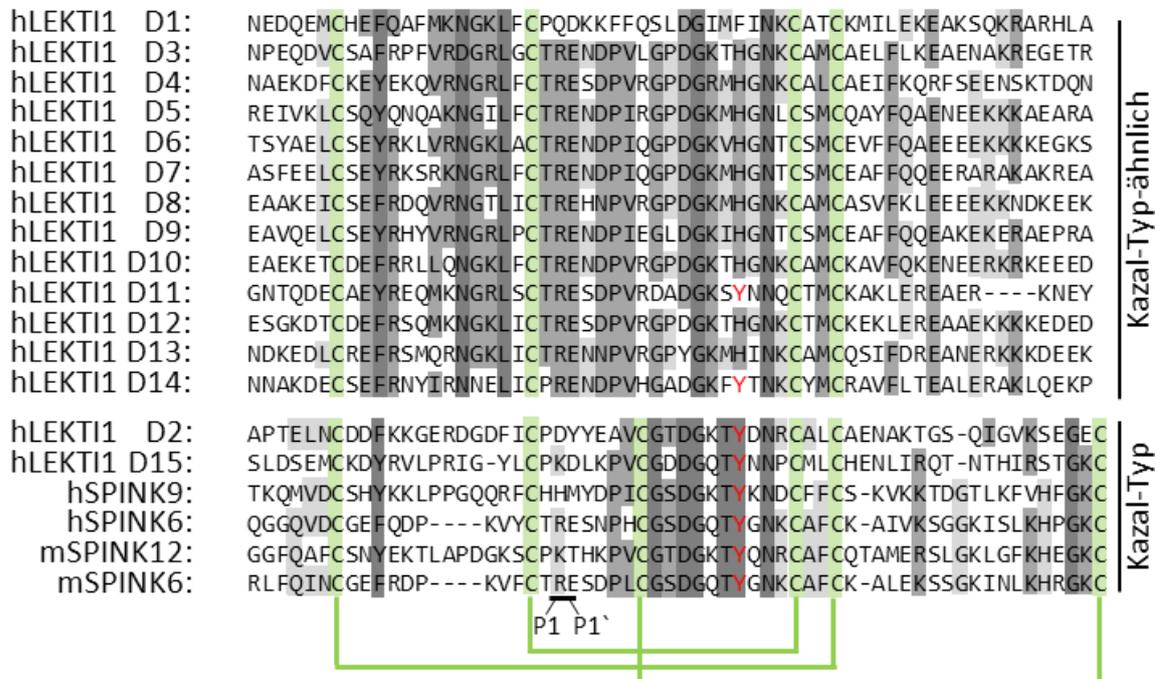
Bei der HPLC-Analyse von *S. corneum*-Extrakten konnte Jan Fischer (Dermatologie, UKSH Kiel) zeigen, dass hSPINK9 natürlicherweise in verschiedenen N-terminalen verkürzten Formen vorkommt (nicht publizierte Daten) (Abbildung 8D). Die dabei am häufigsten vorkommende Form in der Haut ist hSPINK9-3, beginnend mit TKQM. hSPINK6 hingegen konnte bis jetzt nur in einer Form in der Haut gefunden werden.



**Abbildung 8: Organisation der *spink*-Gene, Transkription und Translation.** Die auf dem Chromosom 5q32 befindlichen *spink*-Gene liegen geclustert vor (A). Die genomische DNA von *hspink9* und *hspink6* beinhaltet je vier Exons (Box) getrennt von drei Introns (Linie) (B). Die UTRs sind dabei grau dargestellt. Gezeigt sind weiterhin die vorhergesagten Domänenstrukturen von hSPINK9 und hSPINK6 (C). Sie bestehen beide aus einer Signalpeptid- (grau) und einer Kazal-Typ-Domäne (schwarz). (D) stellt die bisher aus der Haut isolierten natürlichen Formen von hSPINK9 (nSPINK9, links) und hSPINK6 (nSPINK6, rechts) dar.

hSPINK9 und hSPINK6 wurden bei der Erstbeschreibung von Meyer-Hoffert *et al.* 2009 und 2010 als Homologe von hLEKTI1 charakterisiert. Dies wird bei einem Sequenzvergleich der Kazal-Typ-Domänen hLEKTI1-Domäne 2 (hLEKTI1 D2) und hLEKTI1 D15 mit denen von hSPINK9 und hSPINK6 auf Proteinebene deutlich (ClustalW Software, Abbildung 9). Markant sind dabei die für den Kazal-Typ charakteristischen sechs konservierten Cysteine, die untereinander mit dem Muster 1-5/2-4/3-6 Cysteinbrücken ausbilden. Zwischen dem dritten und vierten Cystein scheint die Sequenz besonders stark konserviert zu sein, da hier eine hohe Sequenzidentität und –ähnlichkeit vorliegt. Auch das Kazal-Typ typische Tyrosin ist hier zu finden. Zum Vergleich ist ebenfalls ein *Alignment* von den Kazal-Typ-ähnlichen Domänen D1 und D3-14 des hLEKTI1 aufgeführt. Sie besitzen im Gegensatz dazu nur zwei der drei Cysteinpaare und ihnen fehlt größtenteils das konservierte Tyrosin. Das inhibitorische Zentrum dieser Domänen scheint mit

Arginin und Glutaminsäure konserviert zu sein, das der aufgeführten Proteine mit einer echten Kazal-Typ-Domäne hingegen variiert, was auf eventuelle funktionelle Unterschiede hinweist.



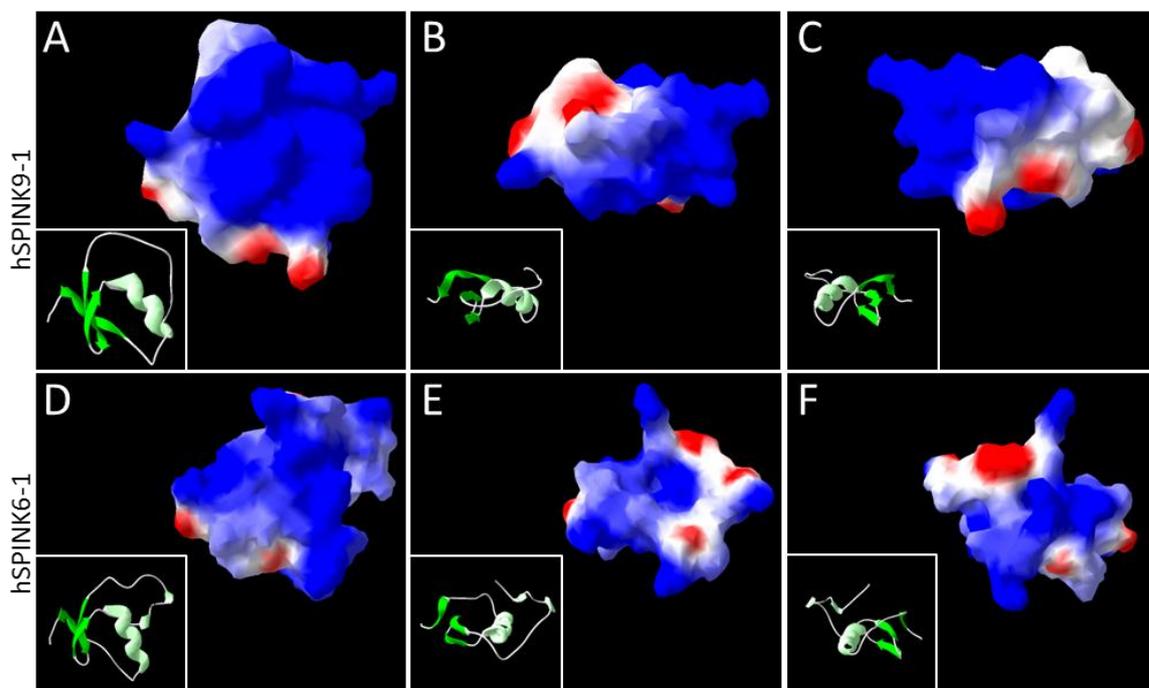
**Abbildung 9: Vergleich von humanen und murinen LEKTIs und SPINKs.** Das *alignment* der Proteinsequenzen zwischen Kazal-Typ-ähnlichen bzw. der Kazal-Typ LEKTIs wurde mittels ClustalW durchgeführt und mit Hilfe von *GeneDoc* dargestellt. Je dunkler der graue Hintergrund der Sequenzen desto konservierter ist die Aminosäure. Die grün-unterlegten ebenfalls konservierten Cysteine sind mit eckigen Klammern, welche die Kazal-Domäne-typischen Cysteinbrücken symbolisieren, verbunden. Das rote Y stellt das hochkonservierte Tyrosin dar und das inhibitorische Zentrum ist mit der P1- und P1'-Position mit Unterstreichung markiert.

Um die Maus als Modellorganismus zur Charakterisierung der kürzlich beschriebenen humanen SPINKs (hSPINKs) nutzen zu können, wurde nach murinen Orthologen zu hSPINK9 und hSPINK6 gesucht. mSPINK6 hat bei einem Proteinsequenzvergleich der Kazal-Domänen 80 % Identität zu hSPINK6 und 92 % Ähnlichkeit (Tabelle 1). Bei der Kazal-Domäne des mSPINK12 bestehen 38 % Identität und 56 % Ähnlichkeit zu der von hSPINK9. Beide murinen Proteine wurden deshalb bei dem *Alignment* von Kazal-Domänen mit einbezogen (Abbildung 9). Auch sie zeigen die für eine Kazal-Typ-Domäne typischen Sequenzmotive. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten und der phylogenetischen Analyse von Zhihong Wu (AG Schröder, UKSH, Campus Kiel, Dermatologie, nicht publizierte Daten) wurde mSPINK12 als putatives murines Ortholog von hSPINK9 und mSPINK6 von hSPINK6 definiert.

**Tabelle 7: Murine putative Orthologe von humanem SPINK9 und -6.** Dargestellt sind Identität (Ident.) und Ähnlichkeit (Ähnlichk.) der Kazal-Typ-Domänen von humanen und murinen LEKTIs. Die putativen murinen Orthologe sind grau unterlegt.

|  | human | hLEKT11<br>kodiert von <i>hspink5</i> | hSPINK9<br>kodiert von <i>hspink9</i> | hSPINK6<br>kodiert von <i>hspink6</i> |
|--|-------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>murin</b>                                   |       |                                       |                                       |                                       |
| <b>mSPINK5</b><br>kodiert von <i>mspink5</i>   |       | Ident.: 55 %<br>Ähnlichk.: 69 %       |                                       |                                       |
| <b>mSPINK12</b><br>kodiert von <i>mspink12</i> |       |                                       | Ident.: 38 %<br>Ähnlichk.: 56 %       | Ident.: 42 %<br>Ähnlichk.: 60 %       |
| <b>mSPINK6</b><br>kodiert von <i>mspink6</i>   |       |                                       | Ident.: 35 %<br>Ähnlichk.: 54 %       | Ident.: 80 %<br>Ähnlichk.: 92 %       |

Neben der Sequenzhomologie und der Untersuchung von Orthologen sind auch Strukturvergleiche zwischen Proteinen geeignet, um auf Homologien und somit auf eventuelle ähnliche Eigenschaften und Funktionen schließen zu können. Deswegen wurde weiterhin die 3D-Struktur von hSPINK9 und hSPINK6 durch SWISS-MODEL auf Grundlage schon bekannter Strukturen verwandter Proteine vorhergesagt (Abbildung 10). Beide Proteine beinhalten drei  $\beta$ -Faltblattstrukturen und eine  $\alpha$ -Helix. Sowohl hSPINK9-1 als auch hSPINK6-1 sind kationisch geladen, wobei hSPINK9-1 mit einem pI-Wert von 9,26 kationischer als hSPINK6-1 mit 8,61 ist. Damit ähneln beide in ihrer dreidimensionalen Struktur und ihre positiven Ladung stark der von AMPs wie hBD2.



**Abbildung 10: Die Strukturen von hSPINK9 und hSPINK6 zeichnen sich neben der kationischen Ladung durch drei  $\beta$ -Faltblätter und eine  $\alpha$ -Helix aus.** Die vorhergesagten 3D-Modelle von hSPINK9-1 (A-C) und hSPINK6-1 (D-F) wurden mit SWISS-MODEL generiert und mit Hilfe des Swiss PDB Viewers dargestellt. Zu sehen sind jeweils die Oberflächendarstellung (großes Bild) und die Sekundärstrukturelemente (kleines Bild unten rechts) der Proteine. In rot sind negative Ladungen und in blau positive Ladungen dargestellt.

## 4.2 EXPRESSIONSMUSTER VON hSPINK9 UND hSPINK6

Die Expression der beiden Inhibitoren hSPINK9 und hSPINK6 wurde auf Proteinebene bisher nur in der Haut charakterisiert (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert *et al.* 2009). Andere Organe wurden bislang lediglich durch mRNA-Analysen untersucht. In dieser Arbeit sollte deshalb zunächst das Expressionsmuster von hSPINK9 und hSPINK6 in verschiedenen Organen auf Proteinebene analysiert werden, um hSPINK9 und hSPINK6 näher zu charakterisieren und eventuell auf weitere Funktionen rückschließen zu können.

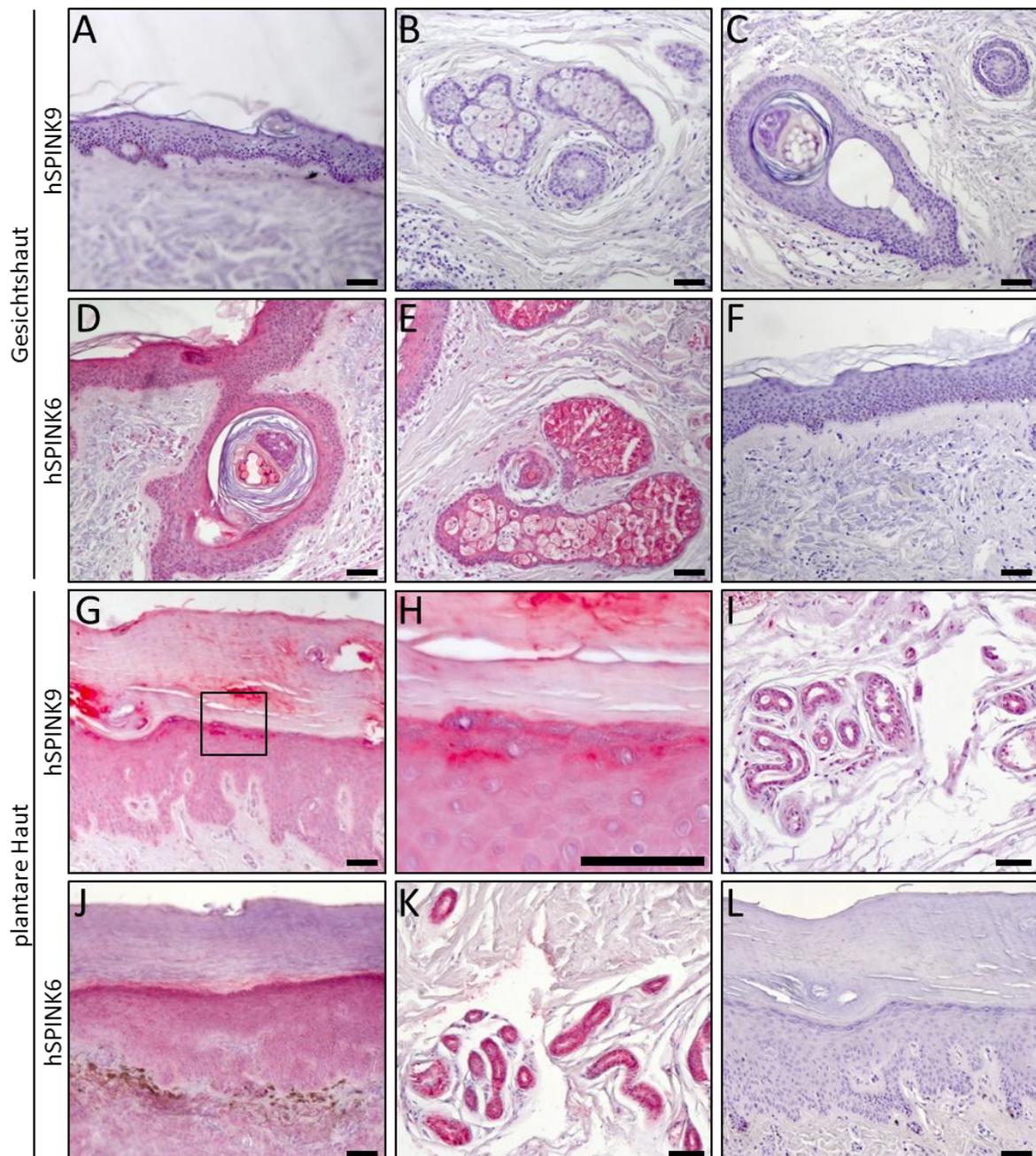
Immunhistologische Färbungen der Haut zeigten, dass hSPINK9 nur in palmoplantarer Haut exprimiert wird (Abbildung 11). Dort war hSPINK9 hauptsächlich im *S. granulosum* und *S. corneum*, den differenzierten Hautschichten, zu finden. Bei einer stärkeren Vergrößerung fiel auf, dass die Färbung in den Zellen punktiert war, was darauf hindeutet, dass hSPINK9 in der Zelle vesikulär vorliegt (Abbildung 11H). Weiterhin wurden auch ekkrine Schweißdrüsen leicht angefärbt. Nicht-palmoplantare Hautareale, wie die des Gesichts, waren hSPINK9-negativ.

Da die mRNA-Studien von Brattsand *et al.* (2009) und Meyer-Hoffert *et al.* (2009) eine hSPINK9-Expression in Thymus und Tonsillen nachwiesen, wurden ebenfalls Paraffinschnitte lymphatischer Organe gefärbt. Aufgrund dieser Färbung konnte auf die Art der exprimierenden Zellen genauer eingegangen werden. Bei Schnitten des Lymphknotens sind insbesondere einzelne Zellen mit einer starken hSPINK9-Färbung aufgefallen (Abbildung 12E, H). Sie besitzen einen zweilappigen Zellkern, welcher ein typisches Merkmal von Eosinophilen ist. Im Thymus konnte ebenfalls eine hSPINK9-Expression nachgewiesen werden. Hier sind es die äußeren Zellen der Hassall-Körperchen, die reaktiv waren (Abbildung 12F). Hassall-Körperchen sind zwiebelschalenartig zusammengeballte epitheliale Retikulumzellen im Thymusmark, dessen Differenzierung der von epidermalen Zellen gleicht (von Gaudecker and Schmale 1974) und deren Funktion noch nicht genau geklärt ist. In Tonsillen konnte hSPINK9 auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden.

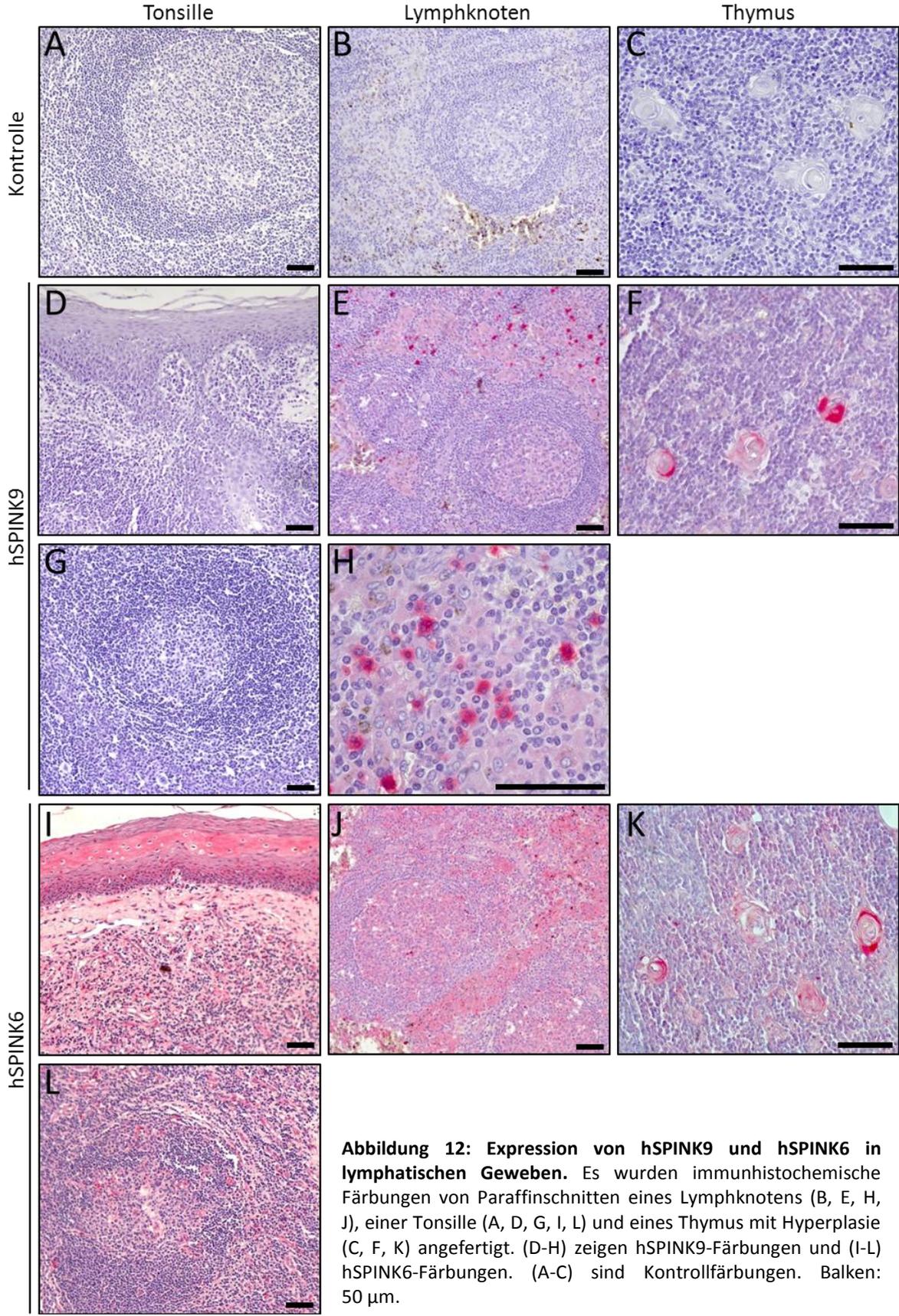
hSPINK6 konnte sowohl in palmoplantarer als auch in nicht-palmoplantarer Haut nachgewiesen werden (Abbildung 11). In der Epidermis wird es genauso wie hSPINK9 von den differenzierten Zellen des *S. granulosums* und *S. corneums* exprimiert. Aber auch Haarscheiden, ekkrine Schweißdrüsen und Talgdrüsen zeigten eine hSPINK6-Immunreaktivität. Im Lymphknoten sowie in den Tonsillen waren keine distinkten Regionen bzw. Zellen hSPINK6-positiv. Der Kortex und der Parakortex beider Organe wurden genauso wie das Epithel der Tonsille diffus vom hSPINK6-Antikörper angefärbt (Abbildung 12). Die immunhistologischen hSPINK6-Färbungen vom

Thymus zeigten das gleiche Färbeverhalten der äußeren Zellen der Hassall-Körperchen wie hSPINK9.

Die Kontrollen der immunhistologischen Färbungen zeigten bei keinem der Schnitte eine Reaktivität.



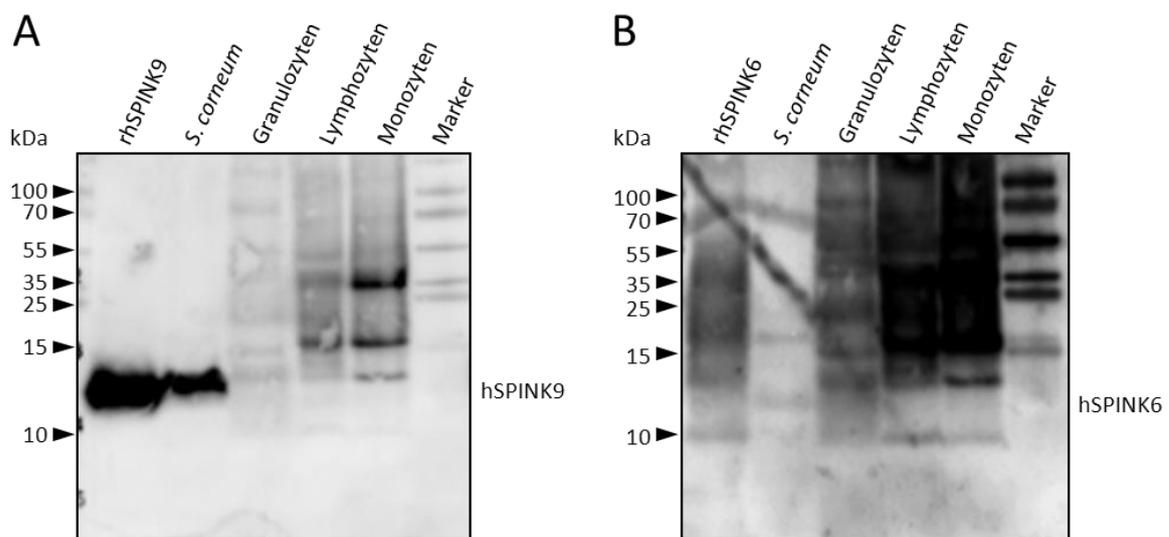
**Abbildung 11: Expression von hSPINK9 und hSPINK6 in der Haut.** Es wurden immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten der Gesichtshaut (A-F) und plantarer Haut (G-L) angefertigt. (A-C, G-I) zeigen hSPINK9-Färbungen und (D, E, J, K) hSPINK6-Färbungen. (F, L) sind Kontrollfärbungen. (C, D) zeigen ein Haarquerschnitt, (B, E) eine Talgdrüse und (I, K) eine ekkrine Schweißdrüse. (H) ist der markierte Bildausschnitt von (G). Balken: 50 µm.



**Abbildung 12: Expression von hSPINK9 und hSPINK6 in lymphatischen Geweben.** Es wurden immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten eines Lymphknotens (B, E, H, J), einer Tonsille (A, D, G, I, L) und eines Thymus mit Hyperplasie (C, F, K) angefertigt. (D-H) zeigen hSPINK9-Färbungen und (I-L) hSPINK6-Färbungen. (A-C) sind Kontrollfärbungen. Balken: 50 µm.

Neben der Immunhistologie wurde auch ein *Western Blot* zur Untersuchung der Expression auf Proteinebene durchgeführt. Hierzu wurden *S. corneum*-Extrakt und Lysate von Immunzellen eingesetzt (Abbildung 13). Zum Vergleich wurde 100 ng rekombinantes hSPINK9 bzw. -6 aufgetragen. Bei der Auftrennung des *S. corneum*-Extrakts (Details zur Methode siehe Schröder 1997) wurde eine distinkte hSPINK9-Bande auf der Höhe des rekombinanten Proteines sichtbar. Die Lysate von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten zeigten mehrere reaktive Banden mit unterschiedlichen Größen von ca. 13, 15 und 35 kDa.

Das rekombinante Protein rhSPINK6 war als diffuses Signal in der gesamten Spur detektierbar, innerhalb dieser waren vier verschwommenen Banden zu sehen, was auf eine Multimerbildung hindeutete. Auch die Lysate zeigten bei einer hSPINK6-Färbung ein ebensolches Signal mit vielen Banden. Zudem war auffällig, dass sowohl bei dem hSPINK9- als auch bei dem hSPINK6-*Blot* die Banden des Größenmarkers gleichermaßen angefärbt wurden. Dies wies darauf hin, dass sich der hSPINK9- bzw. hSPINK6-Antikörper für eine *Western Blot*-Analyse nicht eignet. Aus diesem Grund wurde von ihrem Einsatz für weitere *Western Blot*-Untersuchungen abgesehen.

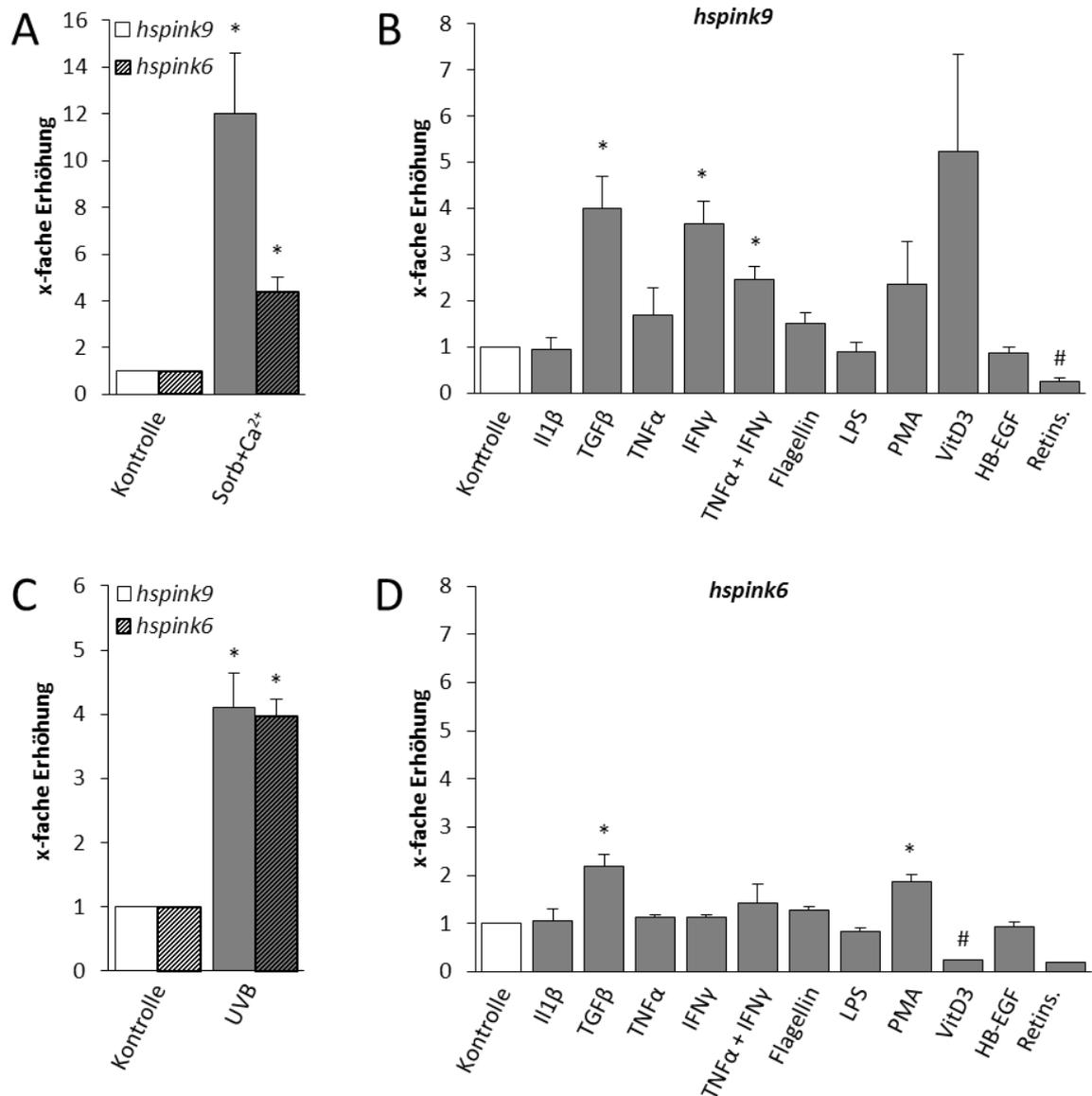


**Abbildung 13: Western blot zur Untersuchung von hSPINK9 und hSPINK6 in Lysaten.** Je 50 µg Zelllysat wurde neben 100 ng rekombinantes Protein in einem Harnstoffgel aufgetrennt. Die *Western Blot*-Analyse erfolgte mit einem polyklonalen hSPINK9- (A) oder hSPINK6-Antikörper (B) aus Ziege.

### 4.3 DIE mRNA-EXPRESSION DER *SPINK*-GENE IST INDUZIERBAR

Um zu untersuchen, ob und wie die Expression von hSPINK9/6 reguliert ist und ob sie induzierbar ist, wurden Keratinozyten isoliert, kultiviert und mit verschiedenen Stimulantien behandelt (Abbildung 14). Da die immunhistologischen Untersuchungen der Haut einen Hinweis darauf gaben, dass die Expression von hSPINK9 und hSPINK6 aufgrund ihres Nachweises im

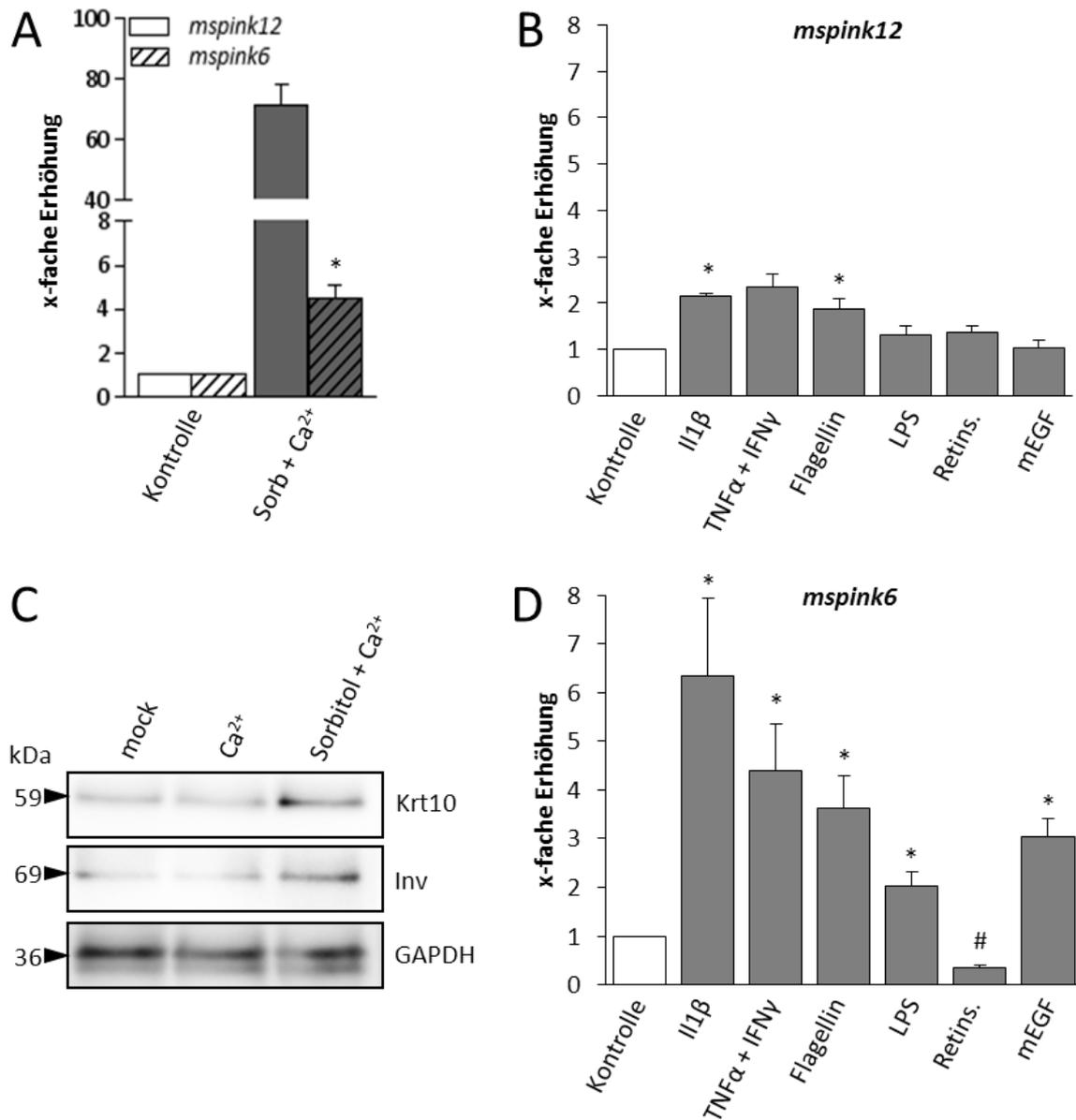
*S. granulosum* und *S. corneum* vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten abzuhängen scheint, wurden die Zellen für 7 d mit Sorbitol und Kalzium ausdifferenziert. Die mRNA-Expression des *hspink9*-Gens ist nach der Behandlung um das 12-fache und die von *hspink6* um das 4-fache signifikant angestiegen.



**Abbildung 14: Induzierbare mRNA-Expression der humanen SPINK9/6-Gene *hspink9* und *hspink6*.** Es wurde eine *Real-Time* PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression primärer humaner Keratinozyten durchgeführt, welche zur Differenzierung zuvor mit Sorbitol (Sorb, 150 mM) und CaCl<sub>2</sub> (0,16 mM) für 7 d behandelt wurden (A) oder für 24 h mit IL1 $\beta$  (10 ng/ml), TGF $\beta$  (20 ng/ml), TNF $\alpha$  (20 ng/ml), IFN $\gamma$  (20 ng/ml), LPS (100 ng/ml), Flagellin (200 ng/ml), PMA (10 ng/ml), Vitamin D3 (VitD3, 30  $\mu$ M), HB-EGF (50 ng/ml) oder trans-all-Retinsäure (Retins., 100 nM) stimuliert wurden (B, D). Außerdem wurden Keratinozyten mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt und nach 24 h ebenfalls analysiert (C). Die Ergebnisse wurden mit der  $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet (*Housekeeping Gene*: *hb2m* (A, C) oder *hhprt* (B, D)) und mit der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. \* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle und # für eine signifikante Reduktion. A: n=4; B: n $\geq$ 3; C: n=3; D: n $\geq$ 3  $\pm$  SEM; Student's *t*-test \**P*  $\leq$  0,05.

Da die Haut ständiger UVB-Strahlung ausgesetzt ist, sollte zudem getestet werden, ob diese einen Einfluss auf die *hspink9/6*-Expression hat. Hierzu wurden Keratinozyten mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt und deren mRNA-Expression 24 h danach untersucht (Abbildung 14). Sowohl die Transkription des *hspink9*- als auch des *hspink6*-Gens wurde dadurch um das 4-fache gesteigert. Da Vitamin D3 von Keratinozyten mit Hilfe von UVB-Strahlung generiert wird (Bikle 2004), es immunmodulatorisch, proliferationshemmend, differenzierungsfördernd und dem zytotoxischen Effekt der UV-Strahlung entgegen wirkt (Nagpal *et al.* 2005), wurde dessen Einfluss auf die Expression der *hspink*-Gene getestet. Eine *real-time* PCR-Analyse zeigte, dass die mRNA-Expression des *hspink9* nach 24 h erhöht und die des *hspink6* signifikant reduziert war. Des Weiteren wurden verschiedene Immunmediatoren und proinflammatorische Stimulantien auf ihre Wirkung getestet. TGFβ steigerte die Transkription sowohl von *hspink9* als auch von *hspink6* signifikant. Die Stimulation mit IFNγ und TNFα zusammen mit IFNγ zeigte nach 24 h nur bei *hspink9* eine signifikante Erhöhung. PMA steigerte und Retinsäure reduzierte die Expression beider Gene.

Zur Charakterisierung von Proteinen eignet sich der Einsatz von Modellorganismen, wie beispielsweise die Maus. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob sich die Maus für detailliertere Untersuchungen von hSPINK9 und hSPINK6 eignet, wurde ebenfalls die mRNA-Expression der putativen Orthologe *mspink12* und *mspink6* unter Einfluss von Stimulantien analysiert (Abbildung 15). Bei beiden war die Expression nach einer 7-tägigen Differenzierung mit Sorbitol und Kalzium ähnlich der von *hspink9/6* erhöht. Dabei ist die mRNA-Expression von *mspink12* um etwa das 70-fache und *mspink6* um das 5-fache gestiegen. Ein *Western Blot* der so differenzierten Zellen mit den Differenzierungsmarkern Keratin 10 und Involucrin zeigte, dass die Kombination von Sorbitol und Kalzium zur Differenzierung der murinen Keratinozyten geeignet war. Die 24 h-Stimulation mit IL1β steigerte die mRNA-Expression von *mspink12/6* im Gegensatz zu *hspink9/6*. Auch TNFα zusammen mit IFNγ und Flagellin zeigten eine Erhöhung der murinen Genexpression. Retinsäure hingegen reduzierte die mRNA von *mspink6* genauso wie *hspink6*. Die Behandlung mit dem murinen Wachstumsfaktor mEGF und LPS hatte auf *mspink12*, genauso wie der humane Wachstumsfaktor HB-EGF und LPS auf *hspink9/6*, keine Wirkung, steigerte jedoch die Transkription von *mspink6* signifikant. Differenzierte man die primären murinen Keratinozyten vorerst mit Sorbitol und Kalzium für 7 Tage und stimulierte sie anschließend, so hatte dies keinen signifikanten Effekt auf die Expression des *mspink6*-Gens, nur Retinsäure reduzierte die Expression signifikant (dargestellt in Fischer *et al.* 2013).



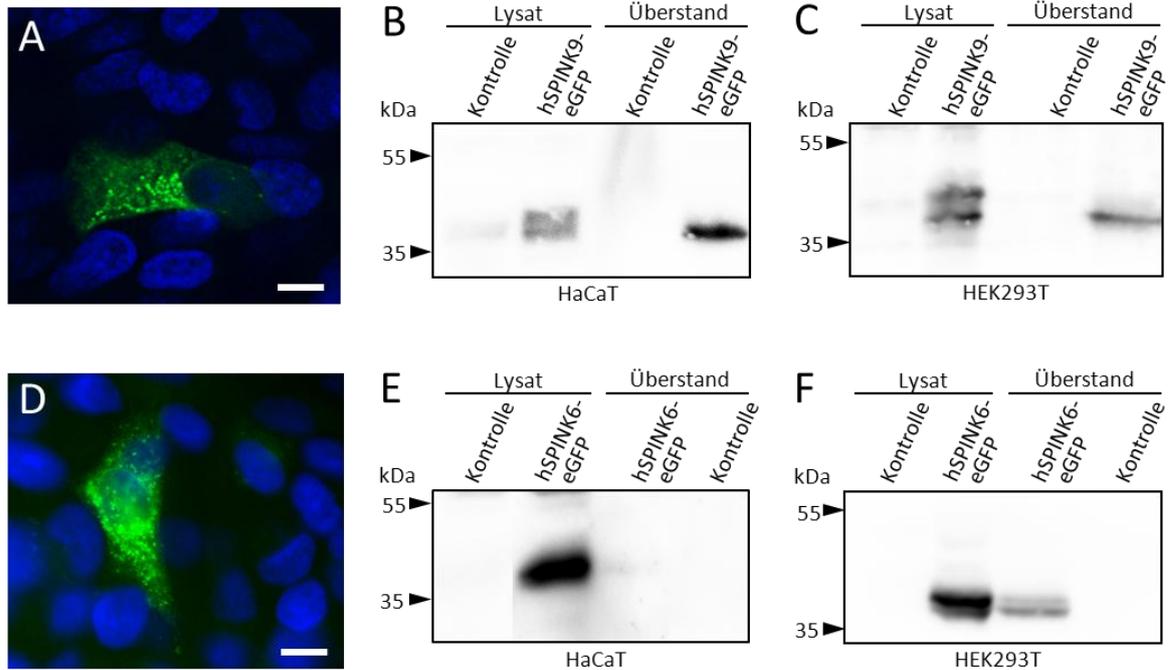
**Abbildung 15: Induzierbare mRNA-Expression der murinen Gene *mspink12* und *mspink6*.** Es wurde eine *real-time* PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression primärer muriner Keratinozyten durchgeführt, welche zuvor mit Sorbitol (Sorb, 75 mM) und CaCl<sub>2</sub> (0,15 mM) für 7 d behandelt wurden, um sie zu differenzieren (A, n=3). Des Weiteren wurden Keratinozyten für 24 h mit IL1 $\beta$  (10 ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml), IFN $\gamma$  (10 ng/ml), Flagellin (1  $\mu$ g/ml), LPS (1  $\mu$ g/ml), mEGF (20 ng/ml) oder trans-all-Retinsäure (Retins., 100 nM) stimuliert (B, D, n $\geq$ 3). Die Ergebnisse wurden mit der  $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet (*housekeeping gene*: *mgapdh*) und mit der unstimulierten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Zur Kontrolle des Differenzierungsexperimentes wurde ein *Western Blot* mit den Differenzierungsmarkern Keratin 10 (Krt10) und Involucrin (Inv) angefertigt (C). Als Ladekontrolle diente das *housekeeping protein* GAPDH. \* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle und # für eine signifikante Reduktion.  $\pm$  SEM; Student's *t*-test \**P*  $\leq$  0,05

## 4.4 hSPINK9 UND hSPINK6 SIND IN DER ZELLE VESIKULÄR LOKALISIERT UND WERDEN INDUZIERBAR SEKRETIERT

Die punktierte immunhistologische Färbung der Hautpräparate wies bereits auf eine vesikuläre Lokalisation von hSPINK9 und hSPINK6 innerhalb der Zelle hin (siehe 4.2). Um dies weiter zu verifizieren, wurden Expressionsvektoren kloniert, in denen hSPINK9 (pcDNA3.1 L2.5) bzw. hSPINK6 (pcDNA3.1 L3.5) N-terminal mit einem HA-Tag fusioniert und C-terminal mit eGFP getaggt sind. Diese wurden dann jeweils in die Keratinozytenzelllinie HaCaT transfiziert (Abbildung 16). Anhand von Fluoreszenzmikroskopie konnte die zelluläre Lokalisation der hSPINK9-eGFP- und hSPINK6-eGFP-Konstrukte aufgrund der Emission des eGFP-Tags in Vesikeln nachgewiesen werden.

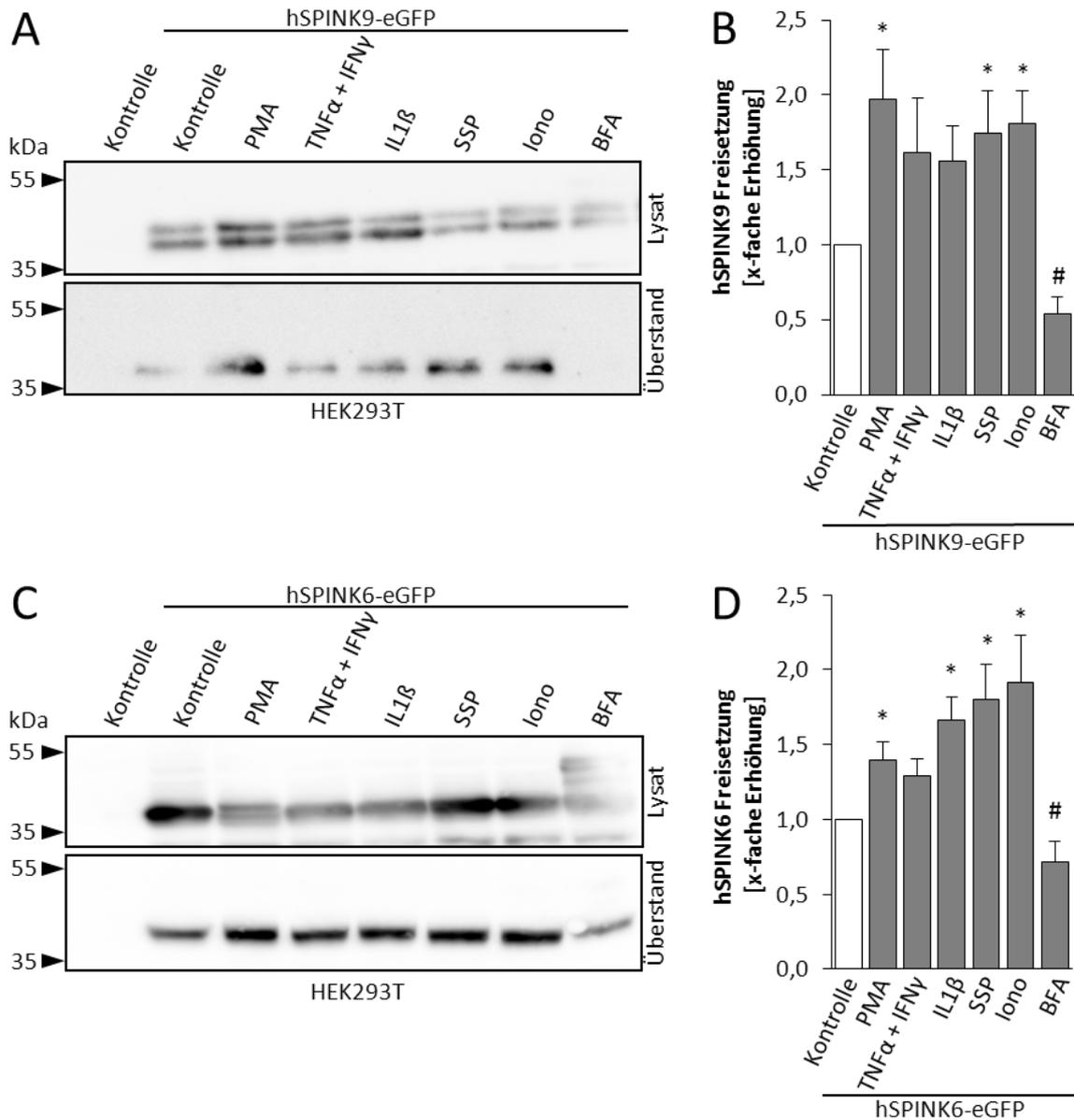
Weiterhin wurden diese Expressionsvektoren genutzt, um mittels *Western Blot*-Analyse zu untersuchen, ob hSPINK9/6 genauso wie hLEKTI1 sekretiert wird. Dazu wurden neben HaCaT-Zellen auch HEK293T transfiziert und sowohl deren Lysate als auch deren Überstände aufgetrennt und anti-GFP gefärbt (Abbildung 16). Die Lysate der pcDNA3.1 L2.5 transfizierten HaCaT- bzw. HEK293T-Zellen zeigten eine Doppelbande, wohingegen bei den Zellkulturüberständen nur die untere der beiden Banden detektiert werden konnte. Die Form von hSPINK9-eGFP mit Signalpeptid unterscheidet sich theoretisch von den maturen Formen ohne Signalpeptid um etwa 4 kDa. Die obere Bande der Doppelbande hat im *Western Blot* eine Größe von etwa 41 kDa und die untere circa 37 kDa. Somit liegt die Vermutung nahe, dass hSPINK9 intrazellulär prozessiert wird. Die einzelne 37 kDa-Bande des Überstandes weist darauf hin, dass das hSPINK9-eGFP in der prozessierten Form ohne das Signalpeptid konstitutiv sekretiert wurde. Eine Färbung des am Signalpeptid N-terminal fusionierten HA-tags generierte entgegen der anfänglichen Erwartung keine Banden. Die Ursache hierfür ist unklar.

Das Fusionsprotein hSPINK6-eGFP mit Signalpeptid unterscheidet sich theoretisch in der Molekülmasse von dem ohne Signalpeptid um 3,7 kDa. Das Lysat der pcDNA3.1 L3.5 transfizierten HaCaT-Zellen zeigte eine höhere starke Bande bei ca. 40 kDa und eine niedrigere sehr schwache Bande im Zellkulturüberstand. Die *Western Blot* Analyse der transfizierten HEK293T-Zellen zeigte eine bessere Expression und Auftrennung der Proben. Hier war genauso wie bei hSPINK9-eGFP eine Doppelbande im Lysat zu erkennen. Zudem wurde die untere Bande auch im Überstand von HEK293T-Zellen nachgewiesen, was vermuten lässt, dass hSPINK6 ebenfalls intrazellulär prozessiert und anschließend konstitutiv sekretiert wird.



**Abbildung 16: hSPINK9 und hSPINK6 sind vesikulär lokalisiert und werden konstitutiv sekretiert.** Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit den Expressionsvektoren pcDNA3.1 L2.5/L3.5 transfizierten HaCaT-Zellen zeigten eine vesikuläre Lokalisation der Fusionsproteine hSPINK9-eGFP (A) und hSPINK6-eGFP (D). Des Weiteren sind die Zelllysate (50 µg) und Zellkulturüberstände (100 µl) von HaCaT- (B, E) und HEK293T-Zellen (C, F) abgebildet, welche mit den Expressionsvektoren für hSPINK9-eGFP (B, C) und hSPINK6-eGFP (E, F) transfiziert und mit einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Eine *Western Blot*-Analyse mit GFP-Antikörpern wurde durchgeführt. Die Lysate und Überstände nicht-transfizierter Zellen dienten als Kontrollen.

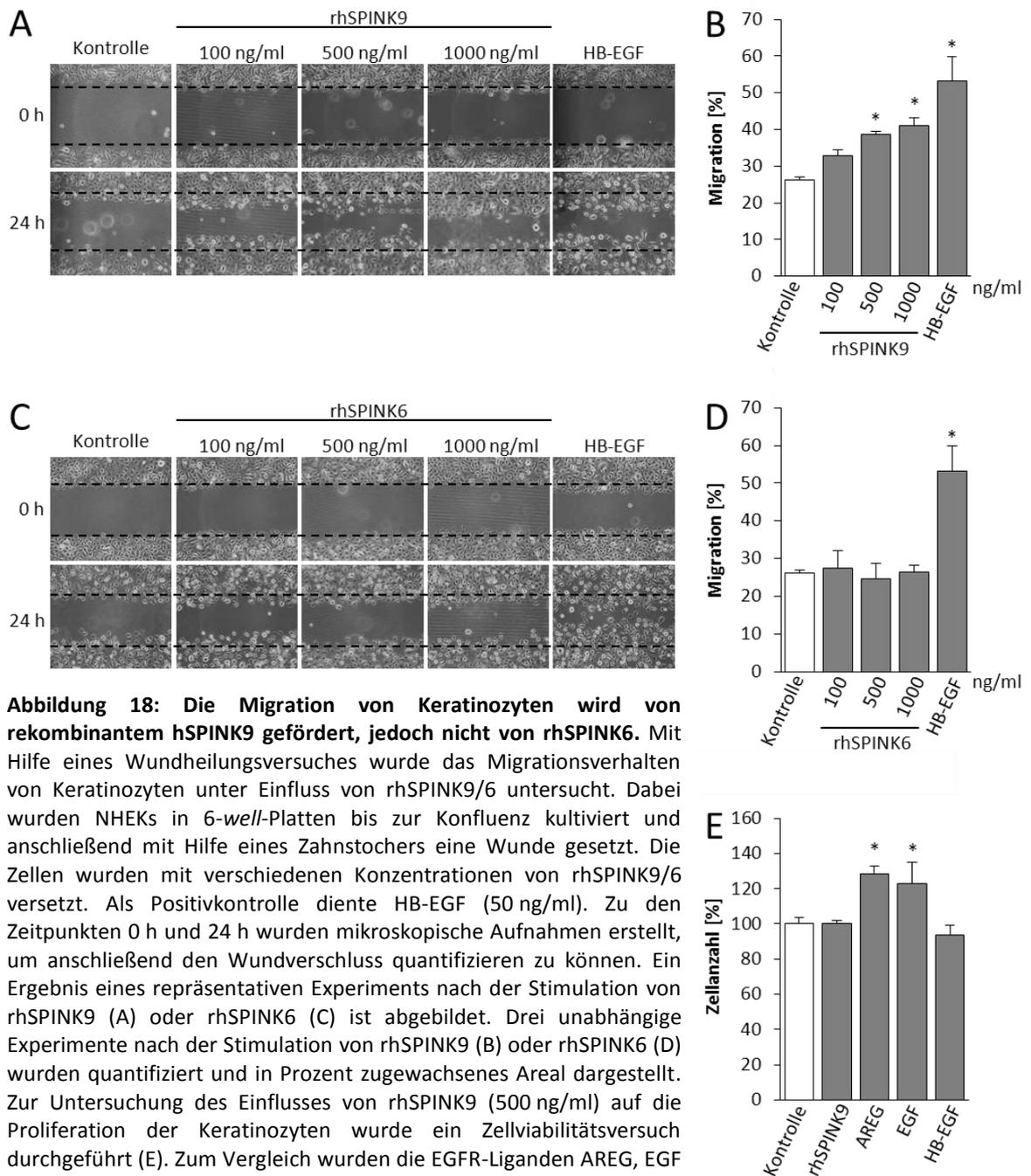
Um die Sekretion von hSPINK9 und hSPINK6 genauer zu untersuchen und zu testen, ob sie induzierbar ist, wurden die leicht zu transfizierenden HEK293T-Zellen genutzt. Wie bereits in Abbildung 16 nachgewiesen wurde, sind sie in der Lage die hSPINK9/6-eGFP-Fusionsproteine zu exprimieren und zu sekretieren. Durch den klassischen Inhibitor für Sekretionswege Brefeldin A wurde die Freisetzung beider Fusionsproteine aufgehoben bzw. reduziert (Abbildung 17). In den Lysaten von pcDNA3.1 L3.5 transfizierten HEK293T-Zellen, welche mit Brefeldin A behandelt wurden, sind zusätzlich größere Banden detektiert worden. Ein Grund dafür könnte eine Akkumulierung des Fusionsproteins sein. Die Stimulation von TNF $\alpha$  zusammen mit IFN $\gamma$  bewirkte eine leicht vermehrte Freisetzung von hSPINK9-eGFP und hSPINK6-eGFP. Eine signifikante Steigerung der Sekretion beider Fusionsproteine konnte auch durch die Stimulation mit dem Kalziumionophor Ionomycin, dem PKC-Aktivatoren PMA und dem nicht-spezifischen PKC-Inhibitor Staurosporin verzeichnet werden. Die scheinbare Diskrepanz zwischen der Wirkung von PMA und Staurosporin lässt sich durch den Nachweis erklären, dass Staurosporin auch als PKC-Agonist wirken kann, wie in Keratinozyten gezeigt wurde (Dlugosz and Yuspa 1991).



**Abbildung 17: Stimulierbare Sekretion von hSPINK9 und hSPINK6.** HEK293T-Zellen wurden jeweils mit den Expressionsvektoren für hSPINK9-eGFP (A, B) oder hSPINK6-eGFP (C, D) transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für 4 h mit PMA (100 ng/ml), TNF $\alpha$  kombiniert mit IFN $\gamma$  (je 20 ng/ml) und IL1 $\beta$  (40 ng/ml) stimuliert oder mit Brefeldin A (BFA, 1  $\mu$ g/ml) behandelt. Die Stimulation mit Staurosporin (SSP, 2  $\mu$ M) und Ionomycin (Iono, 1  $\mu$ M) erfolgte für 30 min. Zur Kontrolle dienten nicht-transfizierte und transfizierte unstimulierte Zellen. Die Proben wurden mit einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und eine *Western Blot*-Analyse mit GFP-Antikörpern durchgeführt. Es ist ein repräsentativer *Western Blot* (C, D) und eine densitometrische Auswertung abgebildet, bei der die Überstände auf die transfizierte unstimulierte Kontrolle normalisiert wurden. \* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle und # für eine signifikante Reduktion. B, D: n=6;  $\pm$  SEM; Student's *t*-test  $P \leq 0,05$

## 4.5 hSPINK9 FÖRDERT DIE MIGRATION VON KERATINOZYTEN

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von hSPINK9/6 mit AMPs und der antimikrobiellen Aktivität von hSPINK9 gegenüber *E. coli* (Wu *et al.* 2008), sollte getestet werden, ob hSPINK9/6 auch ähnlich wie beispielsweise die antimikrobiellen Peptide hBDs, LL-37 und Melittin (Tokumaru *et al.* 2005; Niyonsaba *et al.* 2007; Sommer *et al.* 2012) die Migration von Keratinozyten induziert. Dazu wurde ein Wundheilungsversuch mit Keratinozyten durchgeführt. Dabei wurde in die konfluente einlagige Zellschicht mit einem Zahnstocher eine künstliche Wunde gekratzt und dokumentiert in wie weit die Wunde nach 24 h durch die Migration der Zellen geschlossen wurde. Abbildung 18 zeigt, dass rhSPINK9 dosisabhängig die Migration von Keratinozyten fördert. Ab einer Konzentration von 500 ng/ml war der Effekt signifikant. rhSPINK6 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Migration der Zellen. Als Positivkontrolle diente der EGFR-Ligand HB-EGF, welcher dafür bekannt ist, die Migration von Keratinozyten zu stimulieren, jedoch nicht die Proliferation von Keratinozyten zu beeinflussen (Stoll *et al.* 2010; Poumay and de Rouvroit 2012). Um ausschließen zu können, dass rhSPINK9 durch eine Stimulation der Keratinozytenproliferation eine schnellere Wundheilung verursachte, wurde die Zellteilung unter Einfluss von rhSPINK9 untersucht. Das Proliferationsverhalten der Kontrollzellen wurde als 100 % definiert und das der stimulierten Proben wurde damit ins Verhältnis gesetzt. rhSPINK9 hatte im untersuchten Zeitraum genauso wie HB-EGF keine Wirkung auf das Proliferationsverhalten der Keratinozyten. AREG und EGF, ebenfalls EGFR-Liganden, wurden als Positivkontrollen genutzt. Weitere Wundheilungsversuche mit dem Proliferationsinhibitor Hydroxyurea (4 mM) bestätigten, dass allein die gesteigerte Migrationsrate durch den Einsatz von rhSPINK9 zu einer schnelleren Wundheilung führt.



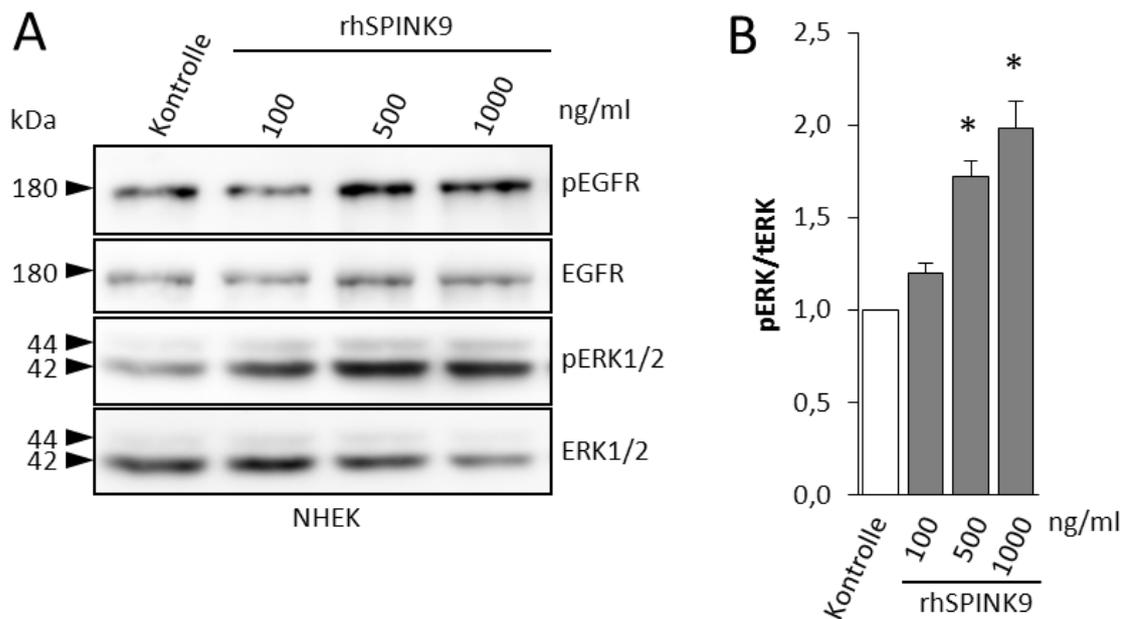
**Abbildung 18: Die Migration von Keratinozyten wird von rekombinantem hSPINK9 gefördert, jedoch nicht von rhSPINK6.** Mit Hilfe eines Wundheilungsversuches wurde das Migrationsverhalten von Keratinozyten unter Einfluss von rhSPINK9/6 untersucht. Dabei wurden NHEKS in 6-*well*-Platten bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit Hilfe eines Zahnstochers eine Wunde gesetzt. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rhSPINK9/6 versetzt. Als Positivkontrolle diente HB-EGF (50 ng/ml). Zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h wurden mikroskopische Aufnahmen erstellt, um anschließend den Wundverschluss quantifizieren zu können. Ein Ergebnis eines repräsentativen Experimentes nach der Stimulation von rhSPINK9 (A) oder rhSPINK6 (C) ist abgebildet. Drei unabhängige Experimente nach der Stimulation von rhSPINK9 (B) oder rhSPINK6 (D) wurden quantifiziert und in Prozent zugewachsenes Areal dargestellt. Zur Untersuchung des Einflusses von rhSPINK9 (500 ng/ml) auf die Proliferation der Keratinozyten wurde ein Zellviabilitätsversuch durchgeführt (E). Zum Vergleich wurden die EGFR-Liganden AREG, EGF und HB-EGF (je 50 ng/ml) genutzt. \* steht für eine signifikante Steigerung der Zellmigration im Vergleich zur Kontrollprobe.  $n = 3$ ;  $\pm$  SEM; Bonferroni-Test  $*P \leq 0,05$ .

## 4.6 DETAILLIERTE UNTERSUCHUNG DER FUNKTION VON hSPINK9

Um detaillierter aufschlüsseln zu können, in welcher Art und Weise Keratinozyten auf eine erhöhte Konzentration von extrazellulärem hSPINK9 reagieren, sollte untersucht werden, welche Mechanismen, Rezeptoren oder Signalwege zu einer Aktivierung der Zellen führen.

### 4.6.1 DIE AKTIVIERUNG DER KERATINOZYTEN DURCH rhSPINK9 IST METALLO-PROTEASE-ABHÄNGIG

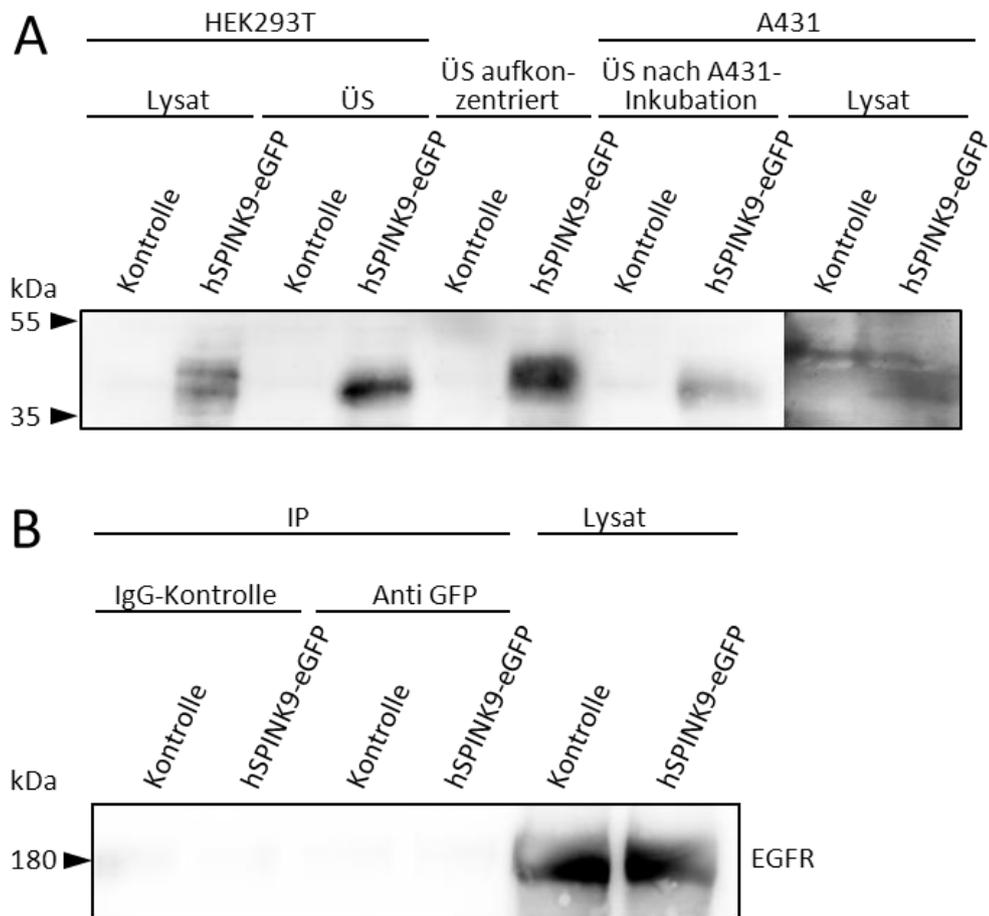
Der EGFR ist dafür bekannt, dass er sowohl Migration, Proliferation als auch Differenzierung der Keratinozyten vermitteln kann. Somit ist er für die Homöostase der Haut sowie für die Wundheilung essentiell. Durch eine Ligandenbindung wird der EGFR aktiviert und folglich eine Signalkaskade ausgelöst, die über die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 zu einer transkriptionellen Regulation von Zielgenen führt (Xue and Lucoq 1998). ERK1/2 spielt bei der Signaltransduktion ins Innere der Zelle eine zentrale Rolle, weshalb getestet wurde, ob rhSPINK9 die Phosphorylierung von EGFR und ERK1/2 beeinflusst. Hierzu wurden primäre humane Keratinozyten mit verschiedenen Konzentrationen von rhSPINK9 stimuliert. Eine *Western Blot*-Analyse der Zelllysate mit einem Antikörper der spezifisch an phosphoryliertem ERK1/2 (pERK) bindet, diente als *readout* für den Phosphorylierungsgrad des ERK1/2. Zum Vergleich wurde der *Western Blot* nach einem *stripping* mit einem Antikörper, welcher unphosphoryliertes ERK1/2 (ERK1/2) erkennt, angefärbt. Die densitometrische Auswertung der *Blots* erfolgte, indem das phosphorylierte ERK1/2 mit dem Gesamt-ERK1/2 (tERK), welches sich aus der Summe des pERK1/2 und ERK1/2 ergibt, ins Verhältnis gesetzt und mit der Kontrolle normalisiert wurde. Die Analyse der *Western Blots* zeigte eine Dosis-abhängige Phosphorylierung des Rezeptors EGFR und der MAP-Kinasen ERK1/2 (Abbildung 19). Ab einer Konzentration von 500 ng/ml führte rhSPINK9 genauso wie bei dem Wundheilungsversuch zu einer signifikanten Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung.



**Abbildung 19: rhSPINK9 stimuliert Keratinozyten über die Aktivierung von EGFR und die Phosphorylierung von ERK1/2.** Primäre humane Keratinozyten wurden mit 500 ng/ml rhSPINK9 stimuliert. Die Proben wurden mit einer 12,5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. (A) bildet einen repräsentativen *Western Blot* ab, mit für den phosphorylierten EGFR (pEGFR) oder phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) spezifischen Antikörpern im Vergleich zu danach gefärbten EGFR bzw. ERK1/2. (B) stellt eine densitometrische Quantifizierung vier unabhängiger Experimente dar. \* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle.  $n=4$ ,  $\pm$  SEM; Bonfferoni-Test,  $p \leq 0,05$

Für SPINK1, ebenfalls ein Mitglied der *spink*-Genfamilie, wurde von Ozaki *et al.* 2009 mittels Co-Immunopräzipitation eine direkte Interaktion mit dem EGFR nachgewiesen. Um zu untersuchen, ob hSPINK9 genauso wie SPINK1 eine Interaktion mit dem EGFR eingeht und somit den Rezeptor aktiviert, wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt (Abbildung 20). Zunächst wurden HEK293T-Zellen mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1 L2.5, welcher zur Expression des Fusionsproteins hSPINK9-eGFP führt, transfiziert. Anschließend wurde der für 4 h gesammelte zellfreie Zellkulturüberstand mit Hilfe eines *Amicon® Ultra centrifugal filters (cutt off: 10 kDa)* aufkonzentriert und für 15 min auf A431-Zellen gegeben. A431 ist eine EGFR-überexprimierende epidermoide Karzinom-Zelllinie und eignet sich besonders für die Untersuchung des EGFR. Eine Immunpräzipitation (IP) mit einem GFP-Antikörper isolierte vorerst hSPINK9-eGFP aus dem A431-Zellysate. Mittels *Western Blot*-Analyse wurde dann der womöglich co-immunpräzipitierte EGFR angefärbt. Die IP-Proben zeigten jedoch keine EGFR-Reaktivität. Die als Kontrolle eingesetzten A431-Lysate ohne IP bewiesen, dass A431 den EGFR exprimieren und er durch den eingesetzten EGFR-Antikörper nachweisbar war. Ein weiterer anti-GFP-*Western Blot* konnte bestätigen, dass der Expressionsvektor erfolgreich in die HEK293T-Zellen transfiziert, das Fusionsprotein in den Überstand sekretiert und der Überstand aufkonzentriert wurde. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach der 15-minütigen Inkubation

des aufkonzentrierten HEK293T-Überstands mit A431-Zellen zu einer Reduktion des hSPINK9-eGFPs im Überstand führt und das A431-Lysat eine schwache hSPINK9-eGFP-Bande dazugewinnt. Daraus kann geschlossen werden, dass hSPINK9 im Gegensatz zu SPINK1 nicht direkt am EGFR bindet, aber in irgendeiner anderen Art und Weise an der Zelle bindet.

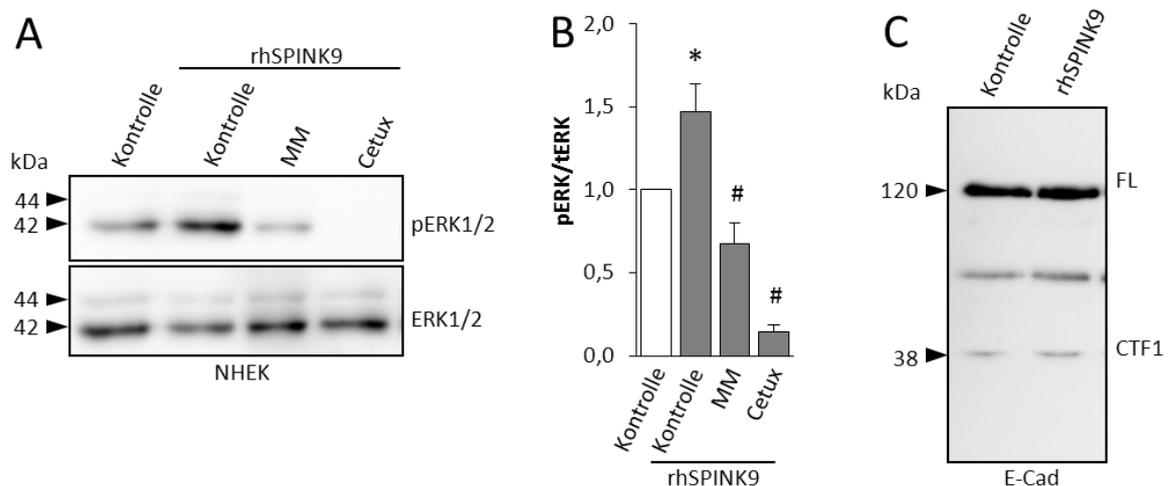


**Abbildung 20: hSPINK9 bindet nicht direkt am EGFR.** HEK293T-Zellen wurden mit dem Vektor pcDNA3.1 L2.5 transfiziert um hSPINK9-eGFP zu exprimieren (A). 24 h nach der Transfektion wurde für 4 h der Zellkultur-überstand gesammelt, aufkonzentriert und anschließend für 15 min auf A431-Zellen gegeben. Eine Immunpräzipitation (IP) mit einem GFP-Antikörper (B) zeigte, dass hSPINK9 nicht direkt mit dem EGFR interagiert. Die Proben wurden mit einer 12,5 %-igen (A) oder 7,5 %-igen (B) SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* mit einem GFP- (A) oder einem EGFR- Antikörper analysiert.

Für die beiden evolutionär entfernt-verwandten kationischen AMPs humanes Cathelicidin LL-37 und in Bienengift enthaltene Melittin wurde beschrieben, dass sie den EGFR aktivieren indem sie die von den Metalloproteasen ADAMs-vermittelte Proteolyse steigern. ADAMs *shedden* EGFR-Liganden und sind somit in der Lage die Phosphorylierung der EGFRs zu vermitteln. Um herauszufinden, ob die durch hSPINK9 induzierte EGFR-Aktivierung, ähnlich wie die von den AMPs LL-37 und Melittin, ADAM-vermittelt ist, wurde die EGFR-abhängige ERK1/2-Signaltransduktion unter Einfluss von Inhibitoren untersucht. Dafür wurden primäre humane

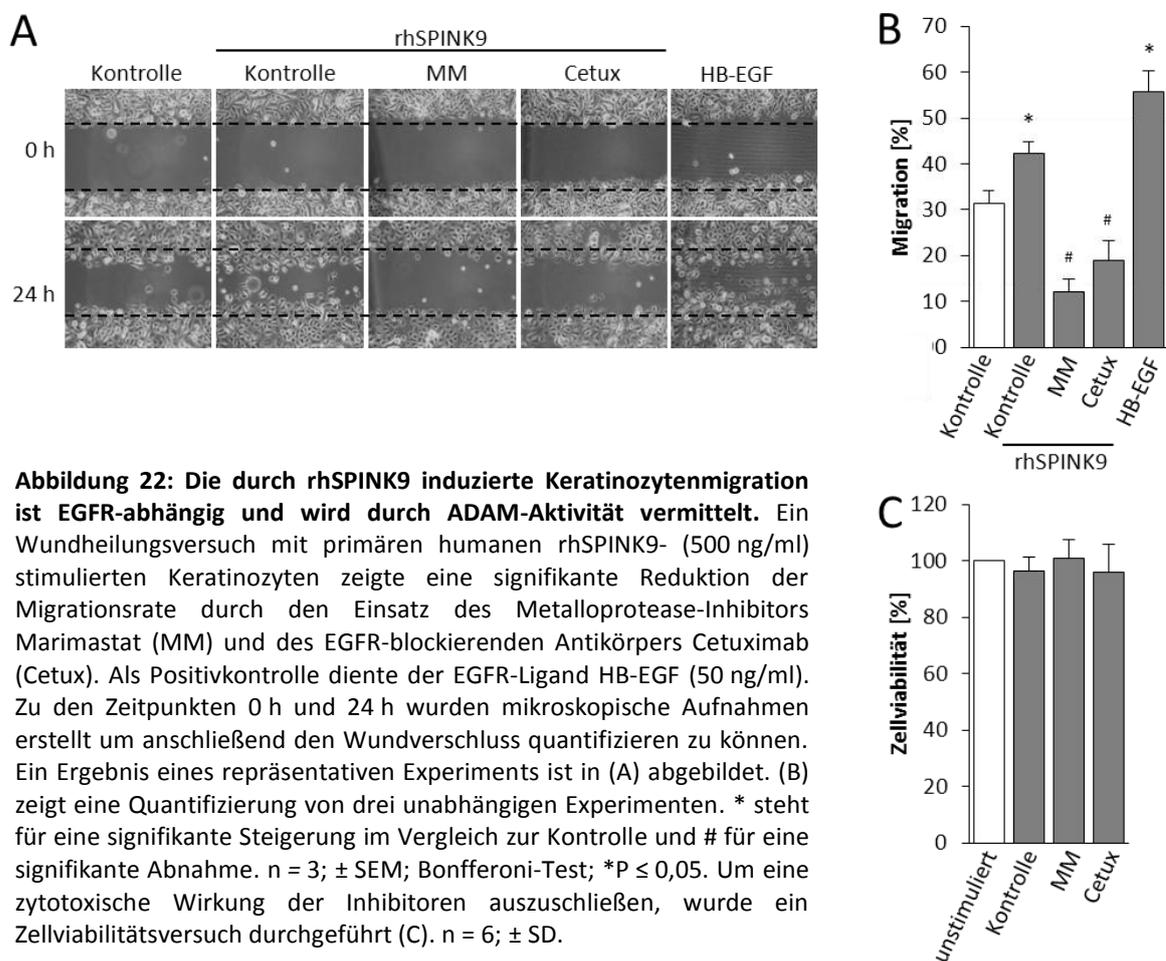
Keratinocyten mit und ohne den Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM) oder dem EGFR-blockierenden monoklonalen Antikörper Cetuximab (Cetux) mit rhSPINK9 stimuliert (Abbildung 21). Die Stimulation mit rhSPINK9 konnte sowohl von MM als auch von Cetux vollständig unterbunden werden.

Die am besten untersuchten ADAMs ADAM10 und ADAM17 sind beide in der Lage Liganden des EGFR freizusetzen. E-Cadherin wird von ADAM10, aber nicht von ADAM17 geschnitten und kann somit zur Unterscheidung der beiden genutzt werden. Primäre humane Keratinocyten wurden mit rhSPINK9 stimuliert und mit deren Zelllysate ein E-Cadherin-Western Blot angefertigt (Abbildung 21). Anhand dessen kann die Prozessierung von E-Cadherin verfolgt werden, da der eingesetzte E-Cadherin-Antikörper sowohl das Volllängen-E-Cadherin (FL) als auch das bei einer Spaltung entstehende C-terminale Fragment (CTF1) anfärbt. Der Western Blot wies nach, dass die rhSPINK9-Stimulation das E-Cadherin-Shedding nicht beeinflusste. Dies weist daraufhin, dass nicht die ADAM10-vermittelte Proteolyse gesteigert wird, sondern die ERK1/2-Aktivierung eher auf ADAM17 zurückgeht.



**Abbildung 21: Die durch rhSPINK9 EGFR-abhängige ERK1/2-Aktivierung ist Metalloprotease-abhängig.** Primäre humane Keratinocyten wurden mit rhSPINK9 (500 ng/ml) stimuliert und zusammen mit dem Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM) und dem EGFR-blockierenden Antikörper Cetuximab (Cetux), welche bereits 15 min vor der Stimulation zu den Zellen gegeben wurden, inkubiert. Zur Kontrolle dienten Zellen mit und ohne rhSPINK9. Die Proben wurden mit einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. (A) bildet einen repräsentativen mit einem für phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) spezifischen Antikörper im Vergleich zu danach ERK1/2-gefärbten Western Blots ab. (B) stellt eine densitometrische Quantifizierung sechs unabhängiger Versuche dar. (C) zeigt die einen E-Cadherin-Western Blot von rhSPINK9 stimulierten primären humanen Keratinocyten, welcher zuvor mit einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt wurden (C). \* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle und # für eine signifikante Reduktion. n=6, ± SEM; Bonfferoni-Test,  $p \leq 0,05$ .

Um nachzuweisen, dass die von hSPINK9 hervorgerufene Migration tatsächlich auf der Aktivierung der ADAMs und dadurch auf der Aktivierung des EGFRs beruht, wurde das Migrationsverhalten der Keratinozyten unter Einfluss von Inhibitoren untersucht. Dazu wurde ein weiterer *in vitro* Wundheilungsversuch mit primären humanen Keratinozyten durchgeführt. Nach 24 h wurde der Grad des Wundverschlusses mit und ohne den Metalloprotease-Inhibitor Marimastat oder den EGFR-blockierenden Antikörper Cetuximab dokumentiert. Beide reduzierten die stimulierende Wirkung von rhSPINK9 signifikant. Ein Zellviabilitätsversuch schloss aus, dass eine mögliche zytotoxische Wirkung der Inhibitoren der Grund für die verminderte Migration der Keratinozyten war.

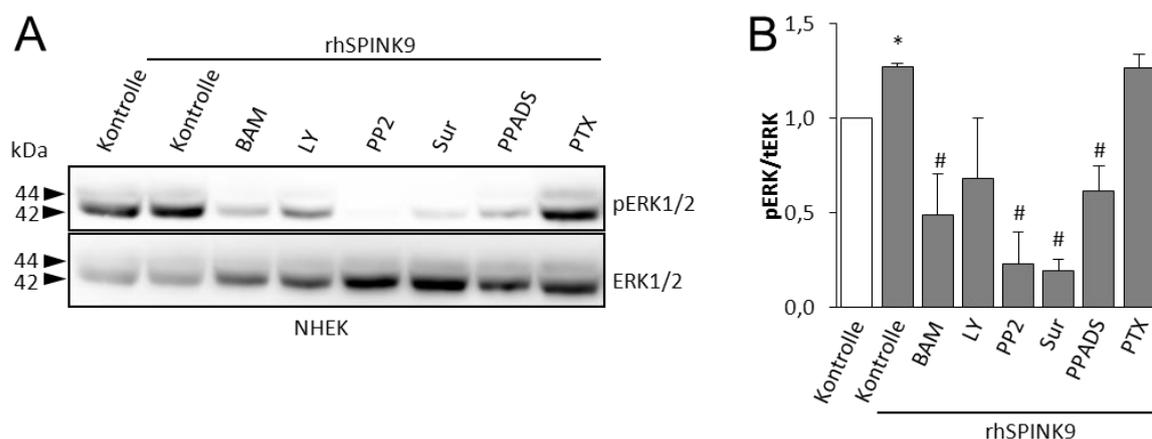


#### 4.6.2 P2-REZEPTOREN VERMITTELN DIE rhSPINK9 INDUZIERTER KERATINOZYTEN-AKTIVIERUNG

Es ist bekannt, dass verschiedene Aktivierungsmechanismen und Signalwege die ADAM-vermittelte Proteolyse stimulieren können. Dazu zählen unter anderem die Aktivierung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Src-Kinasen, PKC-Aktivierung und Kalziuminflus.

Auch P2-Rezeptoren sind in der Lage ADAMs zu stimulieren, denn sie sind an der durch die AMPs LL-37- und Melittin-induzierten EGFR-Signaltransduktion beteiligt (Elsner *et al.* 2004; Tomasinsig *et al.* 2008; Sommer *et al.* 2012).

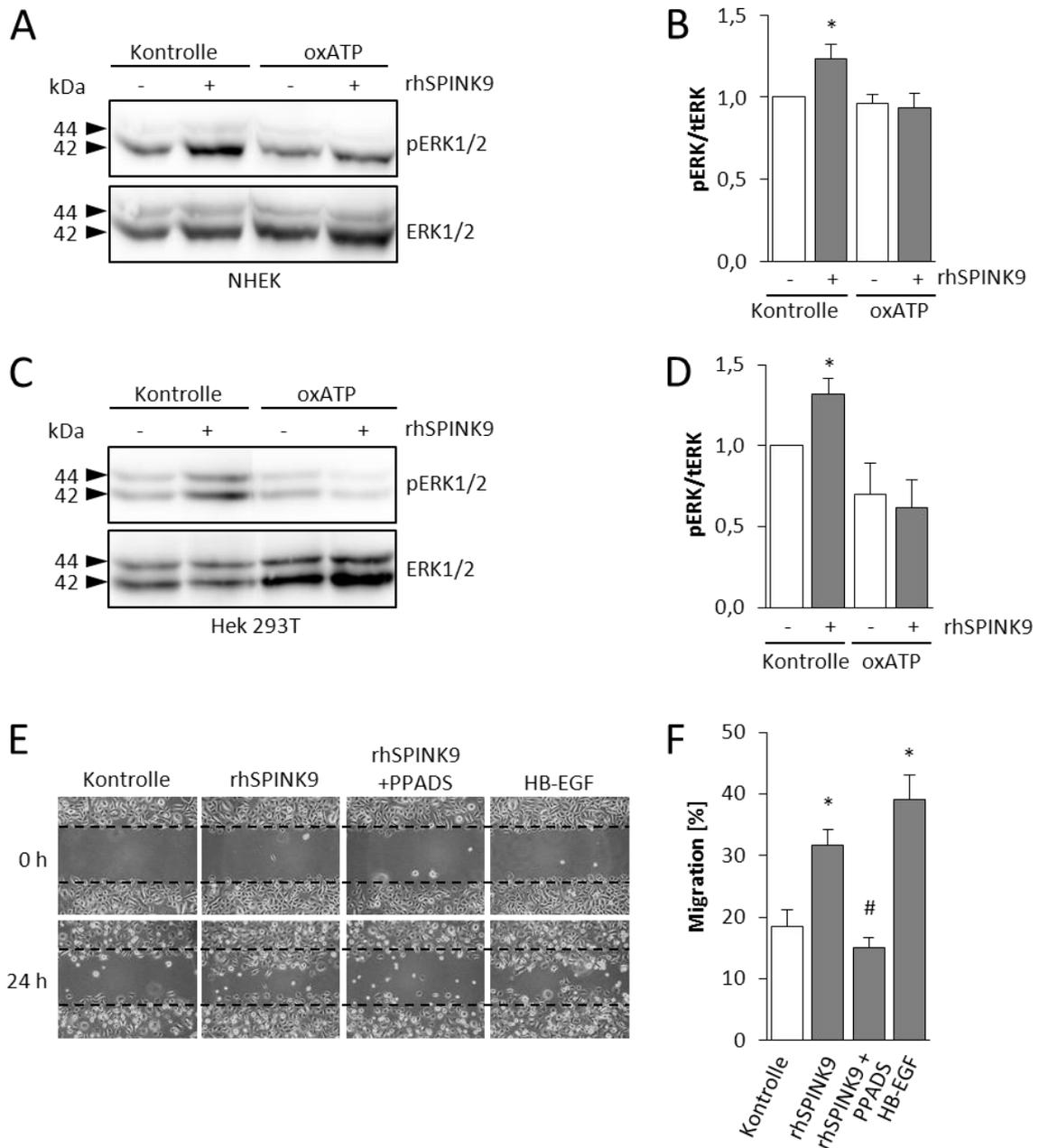
Um zu untersuchen, ob hSPINK9 genauso wie diese beiden AMPs ADAMs über P2-Rezeptoren aktiviert, wurden primäre humane Keratinozyten in An- und Abwesenheit diverser Inhibitoren mit rhSPINK9 stimuliert. *Western blot*-Analysen (Abbildung 23) zeigten eine signifikante Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung durch den Einsatz des intrazellulären Kalziumchelators Bapta AM (BAM), des Src-Kinase Inhibitors PP2 und der P2-Rezeptorinhibitoren *pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4',-disulfonic acid* (PPADS) und Suramin (Sur) (Ralevic and Burnstock 1998; Lambrecht 2000). Aber auch der PI3-Kinaseinhibitor LY294002 (LY) verminderte die EGFR-abhängige Phosphorylierung der ERK1/2 MAP-Kinasen. Der G-Protein gekoppelte Rezeptor-Inhibitor Pertussis-Toxin (PTX) hatte hingegen keinen Einfluss auf die Stimulation.



**Abbildung 23: Die durch rhSPINK9-induzierte Metalloprotease- und EGFR-vermittelte Keratinozytenstimulation ist von P2-Rezeptoren und nicht von GPCRs abhängig.** Primäre humane Keratinozyten wurden mit rhSPINK9 (500 ng/ml) stimuliert und zusammen mit Bapta AM (BAM), LY294002 (LY), PP2, Suramin (Sur), *pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4',-disulfonic acid* (PPADS) und Pertussis-Toxin (PTX), welche bereits 15 min vor der Stimulation zu den Zellen gegeben wurden, inkubiert. Zur Kontrolle dienten Zellen mit und ohne rhSPINK9. Die Proben wurden mit einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. (A) bildet einen repräsentativen mit einem für phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) spezifischen Antikörper im Vergleich zu danach ERK1/2-gefärbten *Western Blot* ab. (B) stellt eine densitometrische Quantifizierung drei unabhängiger Versuche dar. \* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle und # für eine signifikante Reduktion. n=3,  $\pm$  SEM; Bonfferoni-Test,  $p \leq 0,05$ .

Durch den Einsatz des spezifischen irreversibel-bindenden P2-Rezeptorantagonisten oxATP konnte die Aussage, dass die gesteigerte ADAM-vermittelte Proteolyse bei einer rhSPINK9-Stimulation durch P2-Rezeptoren vermittelt wird, weiter untermauert werden (Abbildung 24). Die konstitutive ERK1/2-Phosphorylierung wurde sowohl in primären humanen Keratinozyten

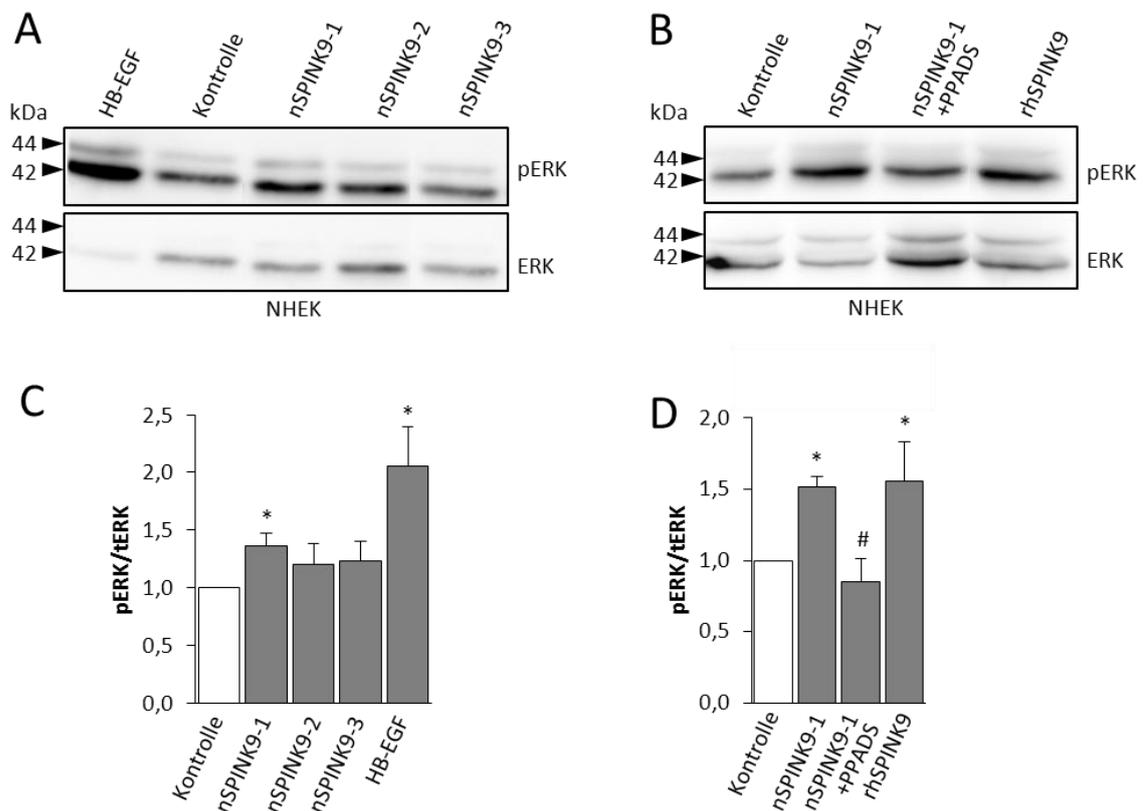
als auch in HEK293T-Zellen durch oxATP signifikant reduziert und die rhSPINK9-induzierte Stimulation inhibiert.



**Abbildung 24: In epithelialen Zellen sind P2-Rezeptoren bei der hSPINK9-induzierten ERK1/2/EGFR-Aktivierung essentiell.** Primäre humane Keratinozyten (A, B) sowie HEK293T-Zellen (C, D) wurden in An- und Abwesenheit des P2-Rezeptoreninhibitors oxATP mit rhSPINK9 (500 ng/ml) stimuliert. Dabei wurde oxATP bereits 15 min vor der Stimulation mit rhSPINK9 auf die Zellen gegeben. Die Proben wurden mit einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. (A, C) bilden je einen repräsentativen mit einem für phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) spezifischen Antikörper im Vergleich zu danach ERK1/2-gefärbten *Western Blot* ab. (B, D) stellen je eine densitometrische Quantifizierung unabhängiger Versuche von (A) von (B) dar. Des Weiteren wurde ein Wundheilungsversuch mit primären humanen Keratinozyten durchgeführt (E, F). Als Positivkontrolle diente der EGFR-Ligand HB-EGF (50 ng/ml). Ein Ergebnis eines repräsentativen Versuchs ist in (E) abgebildet. Die Quantifizierung dreier unabhängiger Versuche zeigt (F). Dabei steht \* für eine signifikante Steigerung und # für eine signifikante Reduktion. B: n=4, D: n=6, F: n=3;  $\pm$  SEM; Bonfferoni-Test,  $p \leq 0,05$ .

Um zudem die funktionelle Relevanz der P2-Rezeptor vermittelten ADAM-Aktivierung zu klären, wurde ein *in vitro* Wundheilungsversuch durchgeführt (Abbildung 24). Er zeigte, dass PPADS die Keratinozytenmigration, ausgelöst von rhSPINK9, unterbindet.

Um zu testen, ob das natürliche aus *S. corneum* aufgereinigte hSPINK9 (nSPINK9-1) den gleichen Effekt auf Keratinozyten hat, wie das bisher in dieser Arbeit verwendete rekombinante hSPINK9, wurden drei der aus dem *S. corneum* isolierten N-terminal trunkierten Formen (Abbildung 8D) zur Stimulation von Keratinozyten eingesetzt (Abbildung 25), wobei rhSPINK9 der natürlich vorkommenden Form nSPINK9-1 entspricht. Die natürlichen Formen führten ebenso wie rhSPINK9 zu einer ERK1/2-Phosphorylierung. Wobei es bei den jeweils um eine Aminosäure verkürzten Formen nSPINK9-2 und nSPINK9-3 zu einer leicht verminderten Reaktion zu kommen schien. Eine weitere Stimulation mit nSPINK9-1 zusammen mit PPADS zeigte, dass auch das natürliche Pendant zu rhSPINK9 die Keratinozyten P2-Rezeptor-abhängig stimuliert.

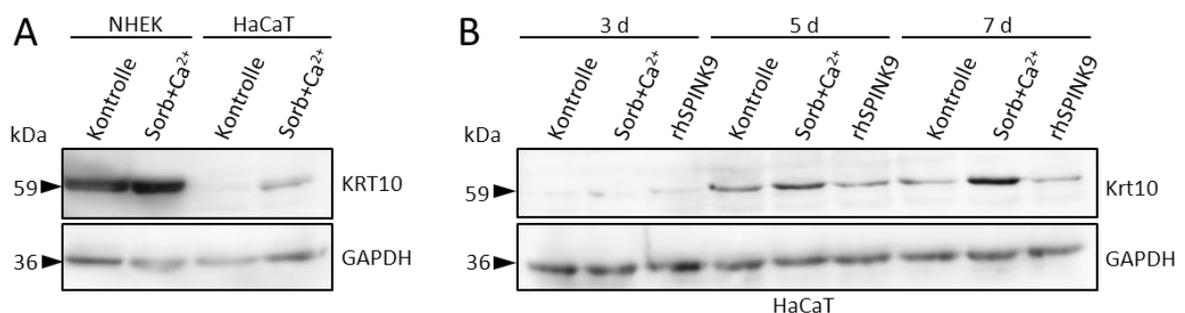


**Abbildung 25: Die natürlich vorkommenden hSPINK9-Formen aktivieren ebenfalls Keratinozyten und ihre Wirkung ist auch P2-Rezeptor-abhängig.** Primäre humane Keratinozyten wurden mit 500 ng/ml der aus *S. corneum* isolierten natürlichen Formen von hSPINK9 (nSPINK9) und rhSPINK9 stimuliert. In (B) wurde der P2-Rezeptoreninhibitor PPADS, welcher bereits 15 min vor der Stimulation zu den Zellen gegeben wurde, mit den Keratinozyten inkubiert. Die Proben wurden mit einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. (A, B) bilden je einen repräsentativen mit für phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) spezifischen Antikörpern im Vergleich zu danach ERK1/2-gefärbten *Western Blot* ab. (C, D) stellen eine densitometrische Quantifizierung unabhängiger Versuche von (A) und (B) dar. \* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle und # für eine signifikante Reduktion. C: n=3; D: n=6,  $\pm$  SEM; Bonferroni-Test,  $p \leq 0,05$ .

### 4.6.3 hSPINK9 BEEINFLUSST DIE DIFFERENZIERUNG VON KERATINOZYTEN NICHT

Die EGFR-vermittelte Signaltransduktion reguliert neben der Proliferation und Migration der Keratinozyten auch deren Differenzierung. Der Einfluss des EGFRs auf die Differenzierung konnte von Sabilia and Wagner 1995 anhand einer Maus, bei der EGFR deletiert war, gezeigt werden. Hier war neben anderen Beeinträchtigungen auch die Differenzierung stark gestört.

Da die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, dass hSPINK9 über P2-Rezeptoren und die Aktivierung der ADAMs die Freisetzung von EGFR-Liganden und somit die Phosphorylierung des EGFR beeinflusst, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob extrazelluläres hSPINK9 die Differenzierung von Keratinozyten beeinflusst. Hierzu wurden HaCaT-Zellen, eine Keratinozytenzelllinie, welche voll differenzierungsfähig ist (Boukamp *et al.* 1988), für verschiedene Zeiträume mit rhSPINK9 behandelt. Eine Keratin 10-Western Blot-Analyse dieser Proben im Vergleich zu Zellen, welche mit Sorbitol und Kalzium differenziert wurden, ist in Abbildung 26 dargestellt. Die Expression des Differenzierungsmarkers Keratin 10 wurde dabei zur Bestimmung des Differenzierungsgrades genutzt. Eine Gegenüberstellung von primären humanen Keratinozyten mit HaCaT-Zellen zeigte, dass sich die Zelllinie gut durch die Behandlung mit Sorbitol und Kalzium ausdifferenzieren lässt. Eine Zeitkinetik zeigte, dass schon nach einer fünftägigen Behandlung mit Sorbitol und Kalzium eine leichte Differenzierung festgestellt werden konnte, welche sich nach 7 d noch verstärkte. rhSPINK9 hatte hingegen weder einen stimulierenden noch einen inhibierenden Effekt auf die Zelldifferenzierung.

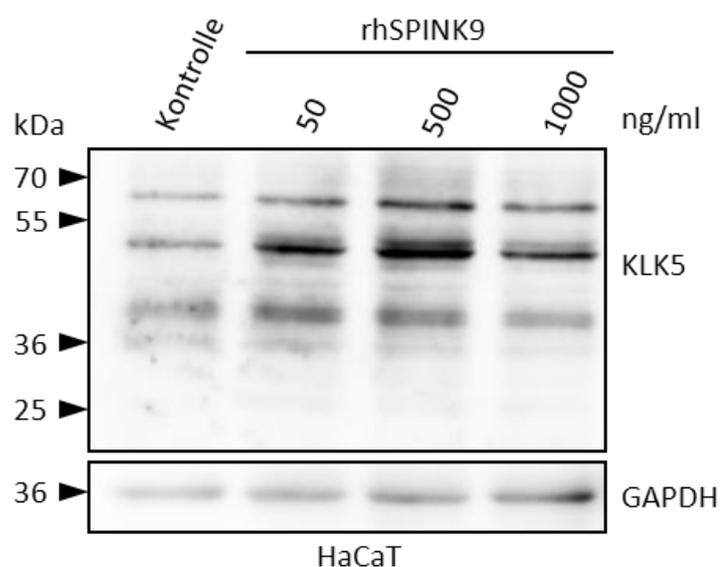


**Abbildung 26: hSPINK9 beeinflusst die Differenzierung von Keratinozyten nicht.** Primäre humane Keratinozyten bzw. die Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde zur Untersuchung der Differenzierung mit Sorbitol (Sorb, 150 mM) und Kalzium (Ca<sup>2+</sup>, 0,16 mM) oder mit rhSPINK9 (500 ng/ml) für 7 d (A) oder im Rahmen einer Zeitkinetik (B) behandelt. Die Proben wurden mit einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und ein *Western Blot* mit einem Antikörper gegen Keratin 10 (Krt10) und mit einem Antikörper gegen das *housekeeping* Protein GAPDH, welches als Ladekontrolle diente, angefertigt.

#### 4.6.4 hSPINK9 STIMULIERT DIE EXPRESSION VON KLK5

hSPINK9 ist ein Serin-Protease-Inhibitor, welcher spezifisch nur KLK5 hemmt (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert *et al.* 2009). Das KLK5 spielt wiederum eine Schlüsselrolle in der Aktivierungskaskade der KLKs, da es in der Lage ist, sowohl sich selbst als auch proKLK7 und proKLK14 zu spalten. hSPINK9 könnte also genau wie hLEKTI1 eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Kaskade spielen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass bei Patienten mit Netherton-Syndrom, welches durch eine Mutation im kodierenden *spink5*-Gen verursacht wird, einige KLKs veränderte Expressionslevel aufwiesen (Komatsu *et al.* 2008). Eine direkte Korrelation zwischen dem hLEKTI1-Defizit und den KLK-Expressionen konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob hSPINK9 die Expression von KLK5 beeinflussen kann, wurden HaCaT-Zellen für 24 h mit verschiedenen rhSPINK9-Konzentrationen stimuliert. Dazu wurden *Western Blot*-Analysen mit KLK5-Antikörpern durchgeführt (Abbildung 27). Die theoretische Größe von preproKLK5 beträgt 32 kDa und von murenen KLK5 25 kDa. Da KLK5 jedoch glykolysiert wird, ist es schwierig eine Aussage zu treffen, um welche Form des KLK5 es sich bei den Banden handelt. Es lässt sich jedoch vermuten, dass das KLK5-Level durch die Stimulation von hSPINK9 gesteigert wird, da alle detektierten Banden eine dosisabhängige Zunahme der Bandenintensität aufzeigten. Die stärkste war bei einer Konzentration von 500 ng/ml rhSPINK9.



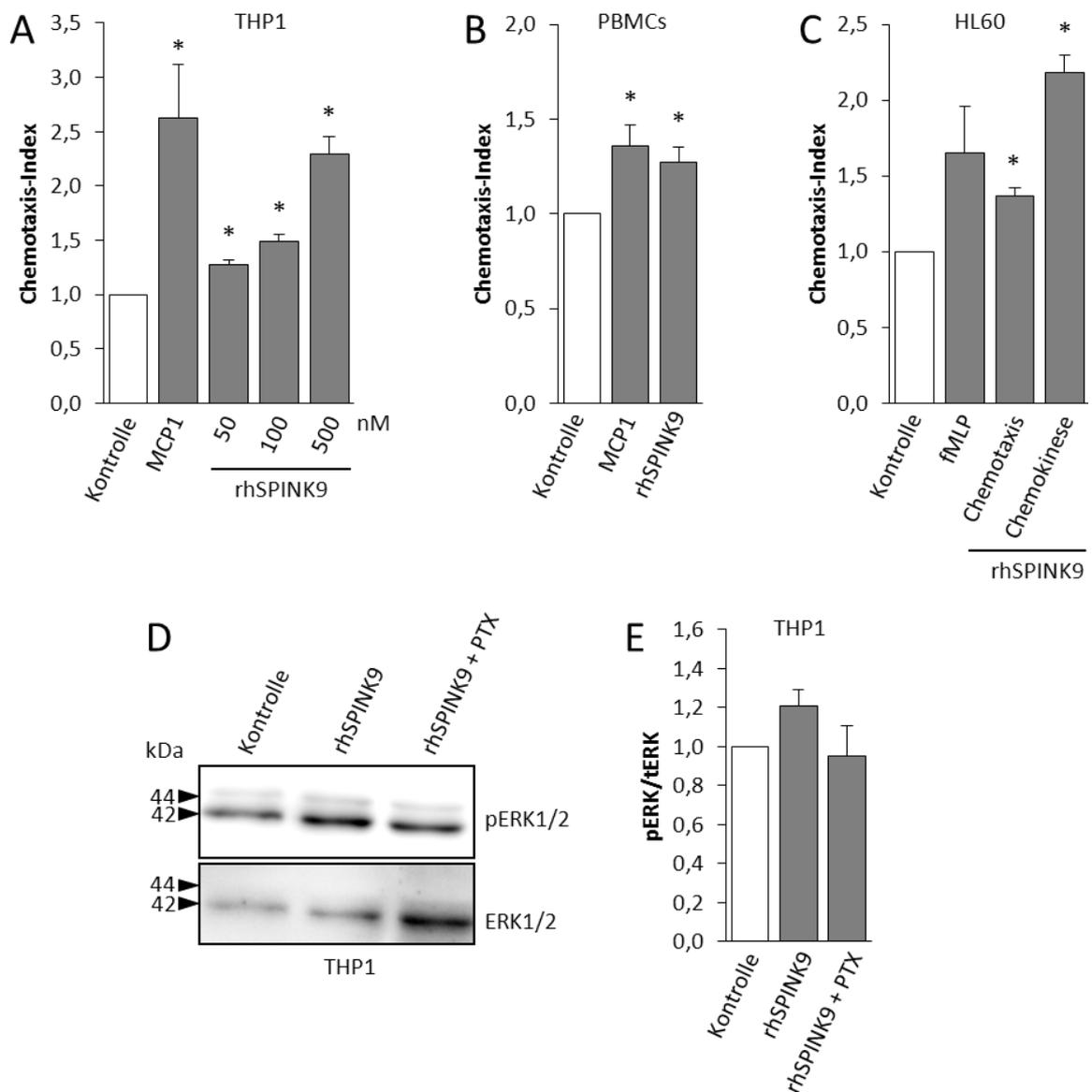
**Abbildung 27: hSPINK9 stimuliert die Expression von KLK5 in Keratinozyten.** Die Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an rhSPINK9 stimuliert. Anschließend wurden die Proben mit einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels KLK5-Antikörper im *Western Blot* angefärbt. Das *housekeeping* Protein GAPDH diente als Ladekontrolle.

## 4.7 Rolle von hSPINK9 IM IMMUNSYSTEM

### 4.7.1 hSPINK9 FÖRDERT DIE MOTILITÄT VON IMMUNZELLEN

AMPs wie LL-37 haben neben ihrer antimikrobiellen Aktivität auch eine stimulierende Wirkung auf die Immunantwort des Körpers. So wirkt LL-37 beispielsweise im Falle einer Verwundung als Reaktion auf eine eventuelle Infektion chemotaktisch auf Neutrophile, Monozyten, T-Lymphozyten und Mastzellen (Agerberth *et al.* 2000; De Yang *et al.* 2000). Aufgrund der bisher aufgeführten Ähnlichkeiten von hSPINK9 zu den AMPs sollte weiterhin untersucht werden, ob hSPINK9 ebenfalls eine chemotaktische Wirkung auf Immunzellen hat. Hierzu wurde mit primären PBMCs sowie mit der monozytären Zelllinie THP1 und der promyeloiden Zelllinie HL-60 ein *chemotaxis assay* durchgeführt. Dazu wurden in eine obere Kammer die Zellsuspension und in eine untere Kammer rhSPINK9 gegeben. Beide Kammern wurden mit einem Filter voneinander getrennt, durch dessen Poren die Zellen nur aufgrund einer aktiven Bewegung gelangen können. Nach einer Inkubation wurde die Anzahl der in die untere Kammer eingewanderten Zellen mit Hilfe eines Glucoronidase Assays bestimmt. rhSPINK9 wirkte auf alle drei Zellarten (PBMCs, THP1, HL-60) anlockend (Abbildung 28). Die Konzentration von 500 nM war diejenige mit der größten Wirkung auf die Immunzellen.

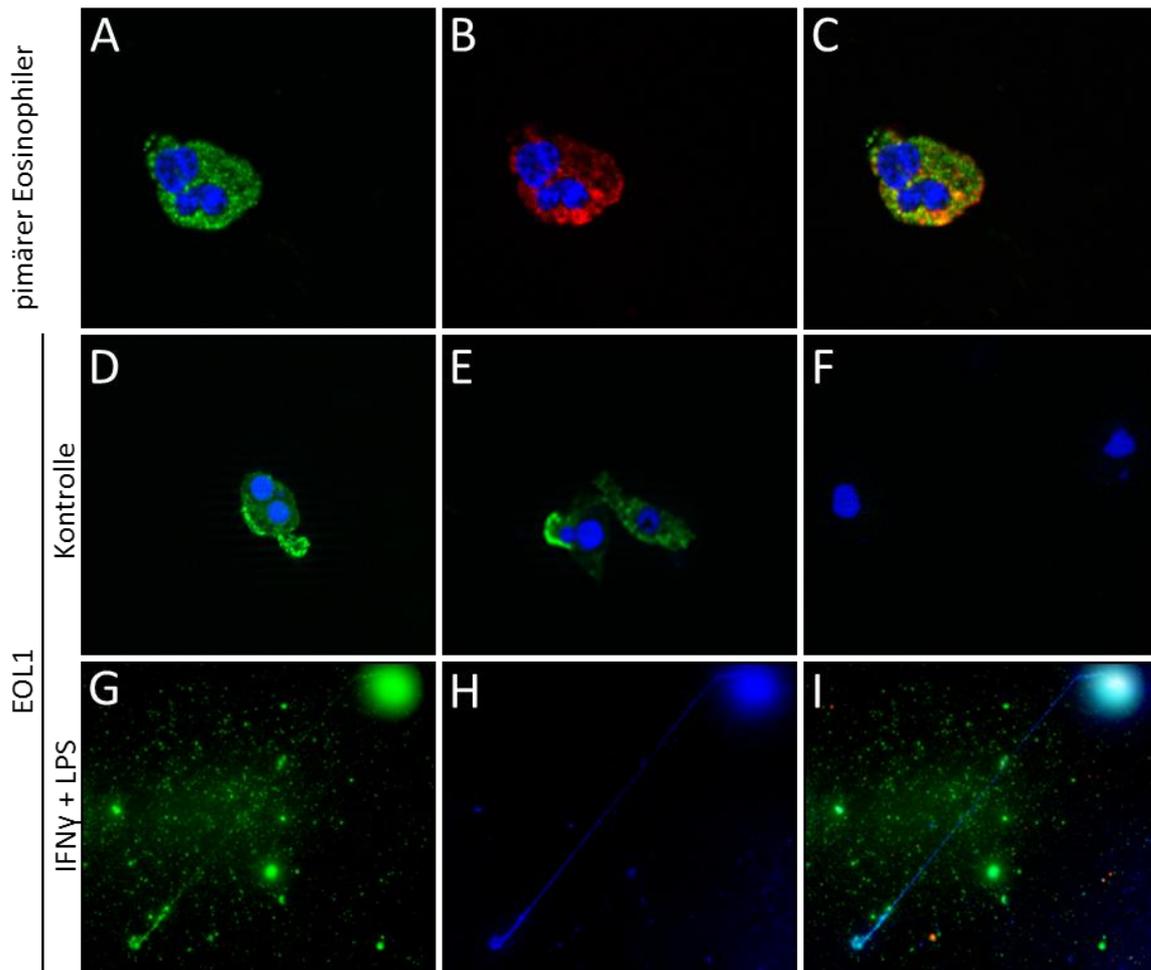
Da die Bewegung der Zellen aufgrund eines Konzentrationsgefälles des Stimulus, sprich Chemotaxis, oder einer grundsätzlichen Stimulation der Motilität, sprich Chemokinese, ausgelöst werden kann, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, um diese beide Arten zu unterscheiden. Zum Nachweis einer Chemokinese, wurde auch in die obere Kammer zu den HL-60-Zellen rhSPINK9 gegeben. Somit bestand zwischen beiden Kammern kein rhSPINK9-Gradient mehr. Dieser Versuch zeigte, dass die HL-60-Zellen in direktem Kontakt mit rhSPINK9 ohne einen Gradienten stärker in die untere Kammer migrierten als die mit einem Gradienten. Dies lässt darauf schließen, dass hSPINK9 die Motilität der Immunzellen Gradienten-unabhängig stimuliert, also keine Chemotaxis sondern eine Chemokinese vorliegt.



**Abbildung 28: rhSPINK9 wirkt als Chemoattraktant auf Immunzellen indem es die Motilität der Zellen erhöht.** Es wurde ein *chemotaxis assay* mit rhSPINK9 (500 nM) als Stimulus mittels BOYDEN-Kammer mit THP1- (A), primären PBMC- (B) und HL60-Zellen (C) durchgeführt. Dabei diente MCP1 als Positivkontrolle für THP1-Zellen und PBMC, fMLP für HL60-Zellen. Um zwischen Chemotaxis und Chemokinese unterscheiden zu können wurde in (C) rhSPINK9 sowohl in der unteren als auch in der oberen Kammer als Stimulus zugesetzt. Zudem wurde ein *Western Blot*, bei dem die Proben zuvor mit einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt wurden, mit Lysaten rhSPINK9-stimulierter (500 ng/ml) THP1-Zellen durchgeführt. Um zu testen ob hSPINK9 eine GPCR-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung hervorruft, wurde der G-Protein gekoppelte Rezeptor-Inhibitor Pertussis-Toxin (PTX) eingesetzt, der *Western Blot* zuerst mit einem Antikörper, welcher spezifische an phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) bindet und anschließend mit antiERK1/2 gefärbt. (D) zeigt einen repräsentativen *Western Blot* und (E) eine densitometrische Auswertung davon. \* steht für eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle. A: n=3, B: n=6, C: n=3, E: n=6; ± SEM; Student's *t*-test \**P* ≤ 0,05.

#### 4.7.2 hSPINK9 IN EOSINOPHILEN

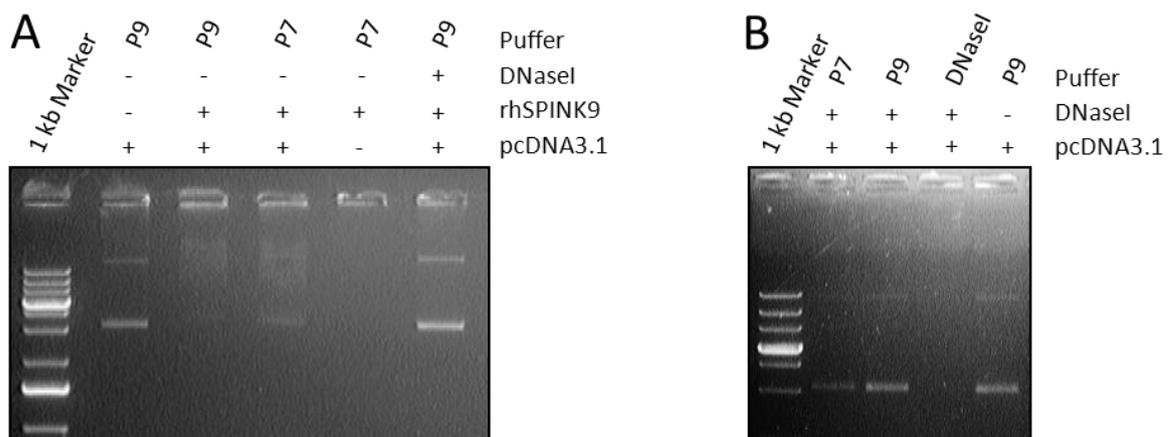
Wie die immunhistologischen Färbungen des Lymphknotens zeigten, ist hSPINK9 neben der Expression im *S. granulosum* und *S. corneum* auch in Eosinophilen zu finden. Eosinophile infiltrieren bei vielen Krankheiten wie beispielsweise bei Infektionen aber auch bei Allergien und Automimmkrankheiten die Haut (Simon and Simon 2007; Simon *et al.* 2010). Sie sind bekannt dafür Parasiten abzutöten indem sie zytotoxische kationische Proteine wie ECP und EDN degranulieren. 2008 brachten Yousefi *et al.* Eosinophile erstmals auch mit der Abwehr von Bakterien in Verbindung. Sie zeigten, dass durch die katapultartige Freisetzung von *eosinophil extracellular traps* (EETs), bestehend aus mitochondrialer DNA an der granuläre Proteine assoziiert sind, Bakterien gebunden und abgetötet werden. Es wird vermutet, dass die zytotoxisch-wirkenden Proteine der Eosinophilen durch die Assoziation an der DNA gezielter an Pathogenen, welche von der DNA gefangen werden, gelangen und somit effektiver wirken können und zudem die kollaterale Schädigung der benachbarten Eigengewebes minimiert wird. Vor Kurzem konnten Simon *et al.* EETs in verschiedenen Hautkrankheiten wie parasitäre Infektionen, bakteriell hervorgerufenen Entzündungen und Autoimmunkrankheiten nachweisen (Simon *et al.* 2011). Dies war ein Grund das antimikrobiell wirkende hSPINK9 in den Eosinophilen genauer zu untersuchen. Zunächst wurde Fluoreszenzfärbung von primären Eosinophilen angefertigt, um die zelluläre Lokalisation von hSPINK9 in Eosinophilen näher bestimmen zu können (Abbildung 29A-C). Die parallele Färbung von hSPINK9 und dem *eosinophil major basic protein* (EMBP) zeigte, dass hSPINK9 granulär vorliegt, aber nicht mit EMPB co-lokalisiert ist. Durch eine weitere Färbung konnte gezeigt werden, dass die Eosinophilenzelllinie EOL1 ebenfalls hSPINK9 exprimiert und sich somit für weitere Untersuchungen gut eignet. Des Weiteren sollte getestet werden, ob hSPINK9 genauso wie EMPB oder ECP bei der Freisetzung von EETs an der DNA assoziiert ist. Hierfür wurden EOL1-Zellen, wie von Yousefi *et al.* 2008 beschrieben, vorerst mit IFN $\gamma$  aktiviert und anschließend mit LPS stimuliert (Abbildung 29G-I). Dies löste wie erwartet die Freisetzung von EETs aus. Da sich die Fokusebene der Zelle von der DNA in der mikroskopischen Aufnahme unterschied, ist die Zelle am rechten oberen Rand des Bildes nur unscharf zu erkennen. Die freigesetzte DNA ist als dünne Linie zusehen. Diese Struktur ist auch bei der hSPINK9-Färbung zu erkennen, was vermuten lässt, dass hSPINK9 an der DNA der EETs gebunden hat. Jedoch sollten weitere Färbungen und Untersuchungen in dieser Hinsicht gemacht werden, um diese Aussage noch weiter zu verifizieren.



**Abbildung 29: hSPINK9 wird von Eosinophilen exprimiert.** Sowohl von primären aus Vollblut isolierten Eosinophilen (A-C) als auch von der Eosinophilenzelllinie EOL1 (D-I) wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder erstellt. In (G-H) wurden die EOL1-Zellen mit IFN $\gamma$  (100 ng/ml) für 20 min aktiviert und dann LPS (0,3  $\mu$ g/ml) und für 15 min stimuliert um die Freisetzung von EETs hervorzurufen. hSPINK9 wurde mit einem bei 488 nm emittierenden Sekundärantikörper angefärbt. Zusätzlich wurde in (B, C) der Eosinophilenmarker *eosinophil major basic protein* mit einem bei 594 nm emittierenden Sekundärantikörper gefärbt. Zur Kontrolle wurden die Zellen ohne einen ersten Antikörper gefärbt (F). (C) ist das übereinandergelagerte Bild von (A+B) und (I) das von (G+H).

Um zu testen ob hSPINK9 tatsächlich an DNA bindet, wurde ein DNA-Assoziationsversuch durchgeführt. Hierbei wurde rhSPINK9 zusammen mit dem Plasmid pcDNA3.1 inkubiert. Im Falle einer Interaktion sollte sich das Laufverhalten des Plasmides im Agarosegel verändern. Um zu unterscheiden, ob die eventuelle Interaktion auf der kationischen Ladung oder auf anderer Eigenschaften seitens rhSPINK9s beruht, wurde der Versuch in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Der Puffer P7 hatte einen pH-Wert von 7,6 in dem rhSPINK9 mit einer positiven Ladung vorliegt. Puffer P9 besaß hingegen einen pH-Wert von 9,26, welcher dem isoelektrischen Punkt von rhSPINK9 entspricht und es damit ungeladen ist. Sowohl im kationischen als auch im ungeladenen Zustand verschob bzw. reduzierte rhSPINK9 die

pcDNA3.1-Bande. Da die Intensität der Banden mit rhSPINK9 abnahm, kann darin begründet sein, dass rhSPINK9 so an der DNA bindet, dass der DNA-Farbstoff Ethidiumbromid daran gehindert wird in die DNA zu interkalieren. Um eine DNase-Verunreinigung, welche auch eine Reduktion der DNA-Banden zur Folge hätte, auszuschließen, wurde eine Probe mit DNaseI versetzt. Diese Probe zeigte keine veränderte Bandenintensität, was an einer schon zuvor funktionslosen oder durch den Puffer P9 inaktivierten DNaseI liegen kann. Um die Funktionalität der eingesetzten DNaseI zu überprüfen, wurde die DNaseI mit dem Plasmid sowohl in den Puffern P7, P9 als auch in den DNaseI-Puffer (*1x buffer DNaseI* +  $MgCl_2$ ) inkubiert. Die DNaseI verdaute das Plasmid in dem DNaseI-Puffer, jedoch nicht in Puffer P7 und P9, was wahrscheinlich an dem fehlenden  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -Ionen und dem EDTA liegt. Zusammen gefasst kann man sagen, dass hSPINK9 an DNA bindet. Eine eindeutige Aussage ob hSPINK9 genauso wie andere granuläre Proteine von Eosinophilen mit EETs freigesetzt werden, kann jedoch noch nicht getroffen werden. Dies muss in weiterführenden Versuchen untersucht werden.



**Abbildung 30: hSPINK9 bindet an DNA.** Mit Hilfe eines DNA-Assoziationsversuches wurde überprüft, ob rhSPINK9 (600 ng) an der Plasmid-DNA pcDNA3.1 (100 ng) bindet. Beide Komponenten wurden für 5 min in Assoziationspuffer P7, welcher einen neutralen pH von 7,6, oder in Puffer P9 mit einem basischen pH von 9,26, welcher dem pI von rhSPINK9 entspricht, inkubiert. Um eine eventuelle Verunreinigung durch DNasen auszuschließen, wurde zusätzlich eine Kontrollprobe von Plasmid und rhSPINK9 mit DNaseI in Assoziationspuffer P9 versetzt (A). Des Weiteren wurde getestet, ob die DNaseI grundsätzlich in dem Assoziationspuffer P9 aktiv war. Dazu wurde das Plasmid in den Puffern P7 bzw. P9 und als Positivkontrolle in einem DNaseI-Puffer (*1x Buffer DNaseI* +  $MgCl_2$ ) für 5 min inkubiert (B).

## 5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden kürzlich beschriebenen Serin-Protease-Inhibitoren SPINK9 und SPINK6 näher charakterisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression beider Inhibitoren stimulierbar ist und sie sowohl durch konstitutive als auch durch eine induzierbare Sekretion freigesetzt werden. Außerdem stellte sich heraus, dass das kationische hSPINK9 neben der Inhibition von KLK5 zusätzliche Funktionen hat. hSPINK9 fördert durch die Induktion der Keratinozytenmigration die Wundheilung. Dies geschieht, ähnlich wie es für die kationischen AMPs LL-37 und Melittin bekannt ist, durch die Aktivierung des EGFR. Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Aktivierung durch P2-Rezeptoren und Metalloproteasen (ADAMs) vermittelt wird. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass hSPINK9 Immunzellen anlockt, indem es ihre Motilität steigert. Es wird von Eosinophilen exprimiert und vermutlich an DNA assoziiert mittels *eosinophil extracellular traps* (EETs) freigesetzt. Somit ist es womöglich an der Abtötung von Bakterien beteiligt.

### 5.1 EXPRESSION UND REGULATION VON hSPINK9 UND hSPINK6

Das kürzlich beschriebene hSPINK9 wird vom *hspink9*-Gen und hSPINK6 vom *hspink6*-Gen kodiert. Beide befinden sich auf dem Chromosom 5 und liegen dort mit anderen *spink*-Genen (*spink1*, *spink5*, *spink6*, *spink7*, *spink9*, *spink13*, *spink14*) geclustert vor. Gene, welche geclustert vorkommen, haben oftmals einen gemeinsamen Vorfahren und kodieren somit für ähnliche Genprodukte mit ähnlichen Funktionen (El-Mabrouk and Sankoff 2012). Das umfangreich untersuchte hLEKTI1 wird vom *hspink5*-Gen kodiert und gehört zur Gruppe der Kazal-Typ-Inhibitoren, da es aus zwei Kazal-Domänen und 13 Kazal-Typ-ähnlichen Domänen besteht (Mägert *et al.* 1999). Es ist in der Lage, verschiedene Serin-Proteasen wie Kallikreine zu inhibieren. Auch hSPINK9 und hSPINK6 besitzen neben einer Signalpeptid-Domäne je ein Kazal-Motiv. Zudem haben Meyer-Hoffert *et al.* 2010 und Kantyka *et al.* 2011 gezeigt, dass hSPINK6 ähnlich wie hLEKTI1 in der Lage ist, die Aktivität verschiedener Kallikreine zu hemmen, namentlich KLK5, KLK7, KLK12, KLK13 und KLK14. hSPINK9 hingegen inhibiert spezifisch nur KLK5 (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert *et al.* 2009). Ein Grund für das unterschiedliche Wirkspektrum kann das aktive Zentrum (P1 und P1') sein. Der Großteil der Kazal- und Kazal-Typ-ähnlichen Inhibitoren einschließlich hSPINK6 sind in der Lage verschiedene Serin-Proteasen zu inhibieren und besitzen an ihren P1- und P1'-Positionen Arginin (R) und Glutaminsäure (E). Das

aktive Zentrum von hSPINK9 hingegen besteht aus Histidin (H) und Methionin (M). Bindet hSPINK9 an KLK5, so ist dies im sauren pH stabiler als im neutralen (Brännström *et al.* 2012). Wird jedoch HM im aktiven Zentrum des hSPINK9's durch RE ausgetauscht, so wird die inhibitorische Aktivität um das ca. 1000-fache gesteigert, wobei die KLK5-Spezifität erhalten bleibt (Brännström *et al.* 2012). Die vorerst pH-Wert-abhängige Bindung an KLK5 wird dabei pH-Wert-unabhängig. Das heißt, dass die P1- und P1'-Positionen nicht für das inhibitorische Wirkungsspektrum von hSPINK9 verantwortlich sind.

Immunhistologische Färbungen haben gezeigt, dass hSPINK9 und hSPINK6 hauptsächlich im *S. granulosum* exprimiert werden und auch im *S. corneum* palmoplantarer Haut zu finden sind. hSPINK6 ist aber, genauso wie hLEKT11, auch in nicht-palmoplantarer Haut nachgewiesen worden. Durch die stabilere KLK5-hSPINK9-Bindung bei saurem pH (Brännström *et al.* 2012) inhibiert hSPINK9 KLK5 in den äußersten Schichten des *S. corneum* (sinkender pH-Wert) scheinbar besser. Dies steht im Gegensatz zu hLEKT11, dessen inhibitorische Aktivität bei saurem pH sinkt (Deraison *et al.* 2007). Da KLK5 Korneodesmosomen spaltet und somit die Desquamation der obersten *S. corneum*-Schichten auslöst und eine Schlüsselfunktion bei der proteolytischen Aktivierung der KLK-Kaskade einnimmt (Yoon *et al.* 2007), ist dessen Regulation für die Homöostase der Haut essentiell. Dies geschieht unter anderem durch den pH-Gradienten aber auch durch die Serin-Protease-Inhibitoren hLEKT11 und womöglich auch durch hSPINK9 und hSPINK6. Durch die spezifische pH-Wert-abhängige KLK5-Inhibition und Lokalisation spielt hSPINK9 vermutlich speziell bei der Ausbildung und Homöostase palmoplantarer Haut eine wichtige Rolle. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass Netherton Syndrom-Patienten, deren Krankheit durch das Fehlen eines funktionellen hLEKT11 ausgelöst wird, unter einer erheblichen Barrierestörung der Haut leiden, welche jedoch nicht in Bereichen palmoplantarer Haut auftritt (Smith *et al.* 1995). Hier kompensiert eventuell die Expression von hSPINK9 das Fehlen des so wichtigen KLK-Regulators hLEKT11.

Neben der Sequenzähnlichkeit, der von einem gemeinsamen Gen-Vorfahren abstammenden homologen Proteine hLEKT11, hSPINK9 und hSPINK6, können auch Strukturähnlichkeiten auf entferntere Homologien zu anderen Proteinen hinweisen (Gibrat *et al.* 1996). Da die Struktur von Proteinen stärker konserviert ist als die Aminosäuresequenz (Sander and Schneider 1991) und die Funktion eines Proteins im Wesentlichen durch dessen Struktur bestimmt wird, können Strukturähnlichkeiten zwischen Proteinen auf funktionell ähnliche Wirkungsweisen hindeuten. Aus diesem Grund wurden die 3D-Strukturen von hSPINK9 und hSPINK6 vorhergesagt. Auffällig ist, dass beide, wie AMPs, kleine kationisch geladene Moleküle sind und die Anordnung ihrer drei  $\beta$ -Faltblätter und der  $\alpha$ -Helix der von dem AMP hBD2 oder Chemokinen nahe kommt (Bauer

*et al.* 2001; Fernandez and Lolis 2003; Anhang: Abbildung 32). Des Weiteren haben Wu 2005 und Wu *et al.* 2008 berichtet, dass hSPINK9 *E. coli* abtötet und damit antimikrobielle Aktivität aufweist. Ähnliches wurde auch für die Kazal-Typ-Serin-Protease-Inhibitoren PSKP-1 in *Phyllomedusa sauvagii* (Gebhard *et al.* 2004), welches *E. coli* abtötet und KAZAL2 in Hydra, welches anti-*Staphylococcus aureus*-Aktivität aufweist (Augustin *et al.* 2009), nachgewiesen. Dies und die Strukturähnlichkeiten legen die Vermutung nahe, dass die Expressionen von hSPINK9 und hSPINK6 ähnlich wie AMPs reguliert werden und dass die Proteine eventuell neben ihrer inhibitorischen Funktion noch weitere Funktionen besitzen. Eine experimentelle Aufschlüsselung der Strukturen von hSPINK9 und hSPINK6, könnte bessere Hinweise auf die Funktion und die KLK-Interaktionen geben.

Es ist bereits bekannt, dass Keratinozyten unter Einfluss von UV, Vitamin D3, PMA, bakteriellen Bestandteilen wie LPS und proinflammatorischen Mediatoren wie IL6, IL1 $\alpha$  und Retinsäure vermehrt AMPs wie hBD2 und hCAP18 (Vorläuferprotein von LL-37) exprimieren (Wang *et al.* 2004; Weber *et al.* 2005; Schauber *et al.* 2006; Radek and Gallo 2007). Das AMP RNase7 wird beispielsweise nach einer Stimulation mit den Cytokinen IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , und IL-1 $\beta$  stärker von den Keratinozyten synthetisiert (Harder and Schroder 2002). Aber auch der Differenzierungsgrad der Keratinozyten beeinflusst die Expression der AMPs (Sayama *et al.* 2005). Um zu untersuchen, ob die Expression von hSPINK9 bzw. hSPINK6 reguliert und sie ähnlich wie AMPs stimulierbar ist, wurde die mRNA-Expression der kodierenden Gene *hspink9* und *hspink6* in Keratinozyten analysiert. Die Behandlung mit Sorbitol und Kalzium führte zu einer erhöhten mRNA-Expression beider Serin-Protease-Inhibitoren und bestätigt die Ergebnisse der immunhistologischen Färbung der Haut, dass hauptsächlich differenzierte Keratinozyten hSPINK9 und hSPINK6 produzieren. Auch die Bestrahlung der Zellen mit UVB hatte einen signifikanten Anstieg der *hspink9* und *hspink6* mRNA-Expression zur Folge. Die UV-Strahlung wird in die Bereiche UVA (320 – 400 nm), UVB (280 – 320 nm) und UVC (200-280 nm) unterteilt, wobei nur Teile von UVA und UVB die Erdoberfläche und somit die Haut erreichen. Sie ist in einem gewissen Maße für den Menschen lebensnotwendig, da sie für die Produktion von Vitamin D3 essentiell ist. Bei einer zu hohen Strahlendosis kommt es jedoch zur Bildung stabiler Dimere aus nicht komplementären Basen oder zu DNA-Strangbrüchen, was dann in einer drastischen Hautschädigung endet. Dass Keratinozyten hSPINK9 und hSPINK6 bei UVB-Bestrahlung verstärkt synthetisieren, könnte auf eine regenerative Wirkung von hSPINK9 hinweisen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die weiteren Befunde, welche zeigten, dass hSPINK9 auf Keratinozyten Migrations-fördernd wirkt. Man könnte auch spekulieren, dass hSPINK9 zudem eine protektive Funktion gegenüber UV-Strahlung hat. Um diese Hypothese zu bestätigen eignet sich

beispielsweise ein TUNEL-Versuch (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) von UVB-bestrahlten, hSPINK9- bzw. hSPINK6- behandelten Keratinozyten, welcher die Anzahl apoptotischer Zellen determiniert. Das bei UV-Bestrahlung produzierte Vitamin D3 reguliert den Kalzium-Phosphat-Haushalt, die Knochenmineralisierung und wirkt zudem auch immunmodulatorisch, proliferationshemmend, differenzierungsfördernd (Nagpal *et al.* 2005). So zeigten Weber *et al.* 2005, dass Vitamin D3 beispielsweise die mRNA-Expression von hCAP18 induziert. Ähnlich wie bei hCAP18 war die mRNA-Expression von *hspink9* nach einer Stimulation mit Vitamin D3 erhöht, die von *hspink6* war im Gegensatz dazu signifikant reduziert. Des Weiteren wurde die Expression von *hspink9* durch die proinflammatorischen Mediatoren TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  zusammen mit IFN $\gamma$  und von PMA induziert, *hspink6* wurde lediglich von TGF $\beta$  und PMA induziert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Regulation der mRNA-Expression von hSPINK9 mehr der von AMPs gleicht, als die von hSPINK6. Retinsäure reduzierte wiederum sowohl die mRNA-Expression von *hspink9*, als auch die von *hspink6*, ähnlich der induzierbaren Expression von hBD1, -2, -3 und -4, welche von Retinsäure gehemmt wird (Harder *et al.* 2004).

Um zu untersuchen, ob die Maus sich als Modellorganismus zur weiteren Charakterisierung von hSPINK9 und hSPINK6 eignet, wurden in Kooperation mit Jan Fischer (AG Meyer-Hoffert, Dermatologie, UKSH, Campus Kiel, DE) putative murine Orthologe hinsichtlich ihrer Expression, Inhibition und auch Regulation untersucht (Reiss *et al.* 2011; Fischer *et al.* 2013b). mSPINK12, kodiert vom *mspink12*-Gen, gleicht bei einem Alignment der Proteinsequenzen eher hSPINK6 mit 42 % Identität und 60 % Ähnlichkeit als hSPINK9 mit 38 % Identität und 56 % Ähnlichkeit. Aufgrund der phylogenetischen Analyse durch Zhihong Wu (UKSH, Campus Kiel, Dermatologie, nicht publizierte Daten) wurde jedoch mSPINK12 als putatives murines Ortholog zu hSPINK9 und mSPINK6, kodiert vom *mspink6*-Gen, als putatives murines Ortholog zu hSPINK6 definiert. Beide Gene, *mspink12* und *mspink6*, wurden wie es aufgrund von immunhistologischen Schnitten zu erwarten war, von Sorbitol/Kalzium-behandelten differenzierten murinen Keratinozyten vermehrt exprimiert. Denn ähnlich wie hSPINK9 und hSPINK6 werden auch mSPINK12 und mSPINK6 besonders stark vom *S. granulosum* und *S. corneum* an den Unterseiten der Pfoten exprimiert (Reiss *et al.* 2011; Fischer *et al.* 2013b). Jedoch konnten mSPINK6 und mSPINK12 anders als hSPINK9 auch in anderen nicht so stark verhornten Hautarealen nachgewiesen werden (Reiss *et al.* 2011). Beide murine Orthologe konnten zudem auch im Nagelbett, genauso wie hSPINK9 und hSPINK6 nachgewiesen werden (Fischer *et al.* 2013b). Die Expression im humanen und murinen System ist in anderen Organen als der Haut teilweise sehr unterschiedlich. So konnte die Expression von hSPINK9 auf mRNA-Ebene in Thymus, Tonsille, Leber, Gehirn, Hoden und Plazenta nachgewiesen werden (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert

*et al.* 2009), wohingegen mSPINK12 in der Zunge, Magen, Niere, Uterus, Muskeln, Dünndarm, Hoden, Thymus, Milz und Gehirn gefunden wurde (Reiss *et al.* 2011). Die Expression von hSPINK6 wurde aufgrund von mRNA-Analysen im Gehirn, Thymus und in der Plazenta nachgewiesen (Meyer-Hoffert *et al.* 2010) und dessen putatives Ortholog mSPINK6 wurde bislang neben der Haut nur noch in der Zunge nachgewiesen (Fischer *et al.* 2013b). Für einen weiterführenden Vergleich fehlen hier jedoch Untersuchungen in anderen Geweben. Um die Regulation der mSPINK12- und mSPINK6-Expression in der Haut zu untersuchen, wurden primäre murine Keratinozyten mit bakteriellen Bestandteilen wie Flagellin und LPS, mit proinflammatorischen Mediatoren wie IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zusammen mit IFN $\gamma$  oder mit Retinsäure und mEGF stimuliert. Auch hier zeigten sich Unterschiede zwischen den putativen humanen und murinen Orthologen. Die inhibitorische Aktivität beider muriner SPINKs wurde gegenüber Kallikreinen getestet (Reiss *et al.* 2011; Fischer *et al.* 2013b). mSPINK6 wies dabei ein weites Wirkspektrum gegenüber den humanen Kallikreinen KLK2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK12, KLK13, KLK14 und dem murinen KLK5 auf, wobei hSPINK6 nur die humanen Kallikreine KLK5, KLK7, KLK13 und KLK14 hemmt (Meyer-Hoffert *et al.* 2010; Kantyka *et al.* 2011). mSPINK12 hingegen konnte keine der getesteten humanen Serin-Proteasen KLK5, KLK7, KLK14, Trypsin und Thrombin inhibieren, reduzierte aber die Trypsin-ähnliche Aktivität muriner Keratinozyten (Fischer *et al.* 2013b). Ein Grund für die inhibitorischen und regulatorischen Unterschiede zwischen den humanen LEKTIs und ihren murinen putativen Orthologen, könnte in der Organisation der KLK und LEKTIs/SPINKs liegen. Im Menschen sind 15 KLKs bekannt, wohingegen Mäuse 25 KLK-Gene besitzen (Yousef and Diamandis 2003). So ist es also möglich, dass in der Maus beispielsweise mehr KLKs als im Menschen für die Desquamation und somit für die Homöostase der Haut verantwortlich sind und mehrere murine KLKs zusammen die gleiche Funktion wie ein humanes KLK ausüben. Die Expression des murinen KLK5 beispielsweise wurde bisher noch nie in der Haut der Maus nachgewiesen. Es liegt nahe, dass auch die murinen SPINKs anders organisiert sind und sich die Maus als Modellorganismus nicht zwangsläufig gut für die Charakterisierung von hSPINK9 und hSPINK6 eignet, obwohl die Deletion des für murines LEKTI1 kodierenden *mspink5*-Gens einen geeigneten Phänotyp zur Untersuchung des Netherton-Syndroms hervorbrachte (Yang *et al.* 2004). Um jedoch eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, bedarf es weiterer Studien. Dass mSPINK6 die humanen KLKs so gut inhibiert, könnte an der Tatsache liegen, dass die Sequenz von hSPINK6 unter verschiedensten Arten, vom Frosch ausgehend bis zum Menschen hoch konserviert ist (Fischer *et al.* 2013b).

Bei näherer Betrachtung der immunhistologischen Schnitte plantarer Haut näher, so fällt nicht nur auf, dass hSPINK9 und hSPINK6 genauso wie hLEKTI1 in den obersten Schichten des

*S. granulosus* zu finden sind, sondern dass sie innerhalb der Zellen vesikulär vorliegen. Noch mehr verdeutlicht werden, konnte dies durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Keratinozytenzelllinie HaCaT, welche zuvor mit Plasmiden transfiziert wurde und eine Expression von eGFP-gekoppelten hSPINK9 bzw. hSPINK6 zur Folge hatte. Vermutlich werden hSPINK9 und hSPINK6 in LBs gespeichert und in den extrazellulären Raum des *S. corneum* sekretiert. Dies wurde bereits für die Serin-Protease-Inhibitoren hLEKT11, welches separat von den Serin-Proteasen wie KLK5 und KLK7 sekretiert wird (Sondell *et al.* 1995; Ishida-Yamamoto *et al.* 2004, 2005), Elafin, welches zusätzlich eine antimikrobielle Aktivität besitzt (Pfundt *et al.* 1996; Simpson *et al.* 1999) sowie für die AMPs hBD2 (Oren *et al.* 2003) und LL-37 (Braff *et al.* 2005) beschrieben. Für die Sekretion von hSPINK9 und hSPINK6 spricht neben der Tatsache, dass sowohl hSPINK9, als auch hSPINK6 eine Signalpeptid-Domäne besitzen, welche für eine Translokation in den extrazellulären Raum verantwortlich ist, auch, dass sie im *S. corneum* nachgewiesen wurden. Bekannt ist, dass hSPINK6 durch Transglutaminasen mit anderen Proteinen quervernetzt wird und dabei seine inhibitorische Aktivität beibehält, sodass vermutet werden kann, dass das sekretierte hSPINK6 durch die Transglutaminierung vor einer Auswaschung aus den obersten Schichten der Haut und vor der Degradierung durch beispielsweise KLKs geschützt wird (Fischer *et al.* 2013a). Des Weiteren ist anzunehmen, dass auch hSPINK9 transglutaminiert wird. Dies muss jedoch in weiteren Studien noch untersucht werden.

Menon *et al.* 1992 und Rassner *et al.* 1999 zeigten, dass im Falle einer Verletzung der Haut der Inhalt der LBs vermehrt sekretiert wird. Um zu untersuchen, ob und wie die Sekretion von hSPINK9 und hSPINK6 ebenfalls reguliert ist, wurden Plasmide in die Zelllinien HaCaT und HEK293T transfiziert, welche eine Expression von N-terminal HA-gekoppelten und C-terminal eGFP-gekoppelten hSPINK9 bzw. hSPINK6 zur Folge hatte. Insbesondere anhand der erstellten anti-GFP-*Western Blots* von der Zelllinie HEK293T war zu sehen, dass sowohl hSPINK9 als auch hSPINK6 konstitutiv in einer vermutlich prozessierten Form sekretiert werden. Durch den Einsatz des klassischen Inhibitors für Sekretionswege Brefeldin A wurde die Freisetzung blockiert, genau so wie Rassner *et al.* 1999 anhand von LBs gezeigt haben. Es ist stark anzunehmen, dass es sich hierbei um eine Form handelt, bei der das Signalpeptid abgespalten wurde. Die Anfärbung des N-terminal am Signalpeptid fusionierten HA-tags gelang nicht, sodass dazu bisher keine endgültige Aussage getroffen werden kann. Ein Grund dafür könnte ein schneller Abbau des bei einer Prozessierung entstehenden N-terminalen Fragmentes oder ein für eine HA-Antikörperbindung ungünstige Faltung sein. Ob die Sekretion auch stimulierbar ist, wurde durch den Einsatz verschiedener Stimuli untersucht. Das eingesetzte PMA induzierte

durch die Aktivierung der PKC eine Entzündungsreaktion (Castagna *et al.* 1982). PMA und auch die bei einem Wundheilungsprozess ausgeschütteten proinflammatorischen Cytokine IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zusammen mit IFN $\gamma$  steigerten die Sekretion der hSPINK9- und hSPINK6-Fusionsproteine. Aber auch der nicht-spezifische PKC-Inhibitor Staurosporin hatte einen stimulierenden Effekt auf die Sekretion. In einer Studie von 1991 konnten Dlugosz und Yuspa 1991 jedoch zeigen, dass Staurosporin in Keratinozyten auch als PKC-Agonist wirken kann. Im Falle einer Barrierestörung kommt es insbesondere zu einer Störung des Kalziumgradienten in den obersten Schichten der Epidermis, was schließlich zu der gesteigerten Sekretion der LBs führt (Elias *et al.* 2002). Ähnliches konnte auch bei der Untersuchung der induzierbaren Sekretion von hSPINK9 und hSPINK6 mit dem Kalziumionophor Ionomycin gezeigt werden, da es die Sekretion beider Inhibitoren steigerte. Alle Versuche zur induzierbaren Sekretion wurden mit der Zelllinie HEK293T durchgeführt, da diese sehr effizient transfiziert werden kann. Um eine genaue Aussage treffen zu können, ob hSPINK9 und hSPINK6 *in vivo* wirklich bei einer Barrierestörung vermehrt exprimiert und sekretiert werden, müssen weitere Studien beispielsweise an Barriere-gestörter Haut durchgeführt werden.

## 5.2 hSPINK9 FÖRDMERT KERATINOZYTENMIGRATION METALLO-PROTEASE- UND P2-REZEPTOREN-ABHÄNGIG

Wird die Barriere der Haut beispielsweise durch eine Wunde gestört, werden unter anderem Serin-Protease-Inhibitoren und AMPs vermehrt sekretiert und deren Expression gesteigert. Die AMPs können im Heilungsprozess verschiedene Funktionen haben. Zum Einen sind sie aufgrund ihrer antimikrobiellen Aktivität Teil des angeborenen Immunsystems und schützen somit vor einer Infektion, zum Anderen sind manche auch zusätzlich in der Lage die Reepithelialisierung zu fördern, bei der die dermalen und epidermalen Schichten wieder hergestellt werden. So stimulieren sie die Freisetzung von Cytokinen (Brown *et al.* 2011), Angiogenese (Kocuzulla *et al.* 2003) und fördern die Migration der Keratinozyten, wie an den Beispielen von LL-37, hBD2, -3 und -4 nachgewiesen wurde (Niyonsaba *et al.* 2007; Carretero *et al.* 2008). Da hSPINK9 und hSPINK6 strukturell AMPs ähneln und für hSPINK9 auch eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob sie neben der Inhibition von KLKs ebenfalls weitere Funktionen haben.

Mittels eines *in vitro*-Wundheilungsversuchs mit Keratinozyten wurde getestet, ob hSPINK9 und hSPINK6 einen Einfluss auf den Wundverschluss haben. Hierbei förderte hSPINK9 den Wundverschluss dosisabhängig. Dieser war bei einer Konzentration von 500 ng/ml signifikant erhöht. hSPINK6 hingegen hatte keinen Effekt auf den Wundverschluss, obwohl sich hSPINK9 und

hSPINK6 in ihrer Struktur und Sequenz sehr ähneln. Dies könnte beispielsweise durch die schwächere kationische Ladung von hSPINK6, mit einem  $pI$  von 8,61, im Vergleich zu hSPINK9, mit einem  $pI$  von 9,26, begründet sein. Anhand der vorhergesagten 3D-Strukturen wird deutlich, dass die positiv geladene Region von hSPINK9 zudem eine höhere kationische Ladungsdichte besitzt als hSPINK6. Außerdem konnte im Gegensatz zu hSPINK9 für hSPINK6 noch keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden und auch die verschiedenen inhibitorischen Wirkspektren der beiden Peptide und das unterschiedliche Expressionsmuster weisen daraufhin, dass hSPINK9 und hSPINK6 trotz ihrer strukturellen und sequenziellen Ähnlichkeiten verschiedene Funktionen im Körper haben.

Der von hSPINK9-induzierte Wundverschluss kann sowohl durch Zellproliferation als auch durch Zellmigration erfolgen. Um zwischen diesen beiden Vorgängen zu differenzieren, wurde ein Wundheilungsversuch mit dem Proliferationsinhibitor Hydroxyurea und ein Zellviabilitätsversuch durchgeführt, welcher Proliferation quantifizieren kann. hSPINK9 förderte die Proliferation der Keratinozyten nicht und auch Hydroxyurea beeinflusste den hSPINK9-induzierten Wundverschluss nicht, sodass geschlussfolgert werden kann, dass hSPINK9 hauptsächlich die Keratinozytenmigration fördert, nicht jedoch die Proliferation. Einen ähnlichen Effekt wies der EGFR-Ligand HB-EGF auf. Auch er steigerte die Migration der Keratinozyten. Im Kontrast zu AREG und EGF blieb die Proliferation durch die Stimulation von HB-EGF jedoch unverändert. Dies deckt sich mit den Angaben der Literatur (Stoll *et al.* 2010; Poumay and de Rouvroit 2012) und auch LL-37 stimuliert zwar die Migration, aber nicht die Proliferation, wie Carretero *et al.* 2008 gezeigt haben. In weiteren Versuchen wurde geklärt, in welcher Art und Weise hSPINK9 Keratinozyten zur Migration anregt.

Keratinozytenproliferation und -migration werden durch eine EGFR-Aktivierung vermittelt. Dies kann direkt durch Bindung eines EGFR-Liganden oder indirekt, indem ein Stimulus über Effektoren zur Aktivierung von EGFR führt, geschehen. Solch eine indirekte Aktivierung wird als Transaktivierung bezeichnet und konnte beispielsweise anhand von Epithelzellen der Atemwege für LL-37 nachgewiesen werden (Tjabringa *et al.* 2003; von Haussen *et al.* 2008; Shaykhiev *et al.* 2010). Zudem wurde die Wirkung von LL-37 auch in weiteren Zelltypen wie Fibroblasten, Keratinozyten und anderen nachgewiesen (Tokumaru *et al.* 2005; Tomasinsig *et al.* 2008), was den Schluss zulässt, dass LL-37 eine Rolle bei der Wundheilung spielt. Dies konnten Carretero *et al.* 2008 anhand der verbesserten Reepithelialisierung durch den adenoviralen Transfer von LL-37 in eine Maus beweisen. Auch für die AMPs hBD2, -3, -4 und Melittin wird durch die Förderung von Keratinozytenproliferation und -migration eine wundheilungsfördernde Wirkung, welche über den EGFR vermittelt wird, beschrieben (Niyonsaba *et al.* 2007; Sommer *et*

al. 2012). Durch die Aktivierung des EGFRs, wird der Rezeptor autophosphoryliert, welcher das Signal über die ERK1/2-Kaskade ins Zellinnere transduziert (Xue and Luocq 1998; Wells 1999; Katzel *et al.* 2009). Ob hSPINK9 ähnlich wie die AMPs die Migration über die Aktivierung des EGFRs fördert und ob dies direkt oder durch eine Transaktivierung geschieht, wurde in weiteren Versuchen untersucht. Dafür wurde ein *Western Blot* zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrads von EGFR und ERK1/2 durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass sowohl der EGFR als auch ERK1/2 durch die Stimulation mit submikromolaren Konzentrationen von rekombinantem hSPINK9 dosisabhängig aktiviert werden, ähnlich der Wirkung von LL-37 und Melittin.

In weiteren Analysen wurde untersucht, wie hSPINK9 den EGFR aktiviert. SPINK1, ein weiteres Mitglied der SPINK-Familie, fördert zudem das Wachstum von verschiedenen Zellarten, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Darmepithelzellen (Ozaki *et al.* 2009). Mittels einer Co-Immunopräzipitation konnte eine direkte Interaktion zwischen SPINK1 und dem EGFR nachgewiesen werden (Ozaki *et al.* 2009). Um zu untersuchen, ob ebenfalls hSPINK9 direkt am EGFR bindet und ihn aktiviert, wurde ein Plasmid in HEK293T-Zellen transfiziert, welches die Expression von eGFP-gekoppeltem hSPINK9 zur Folge hat. Der Zellkulturüberstand, welcher das sekretierte hSPINK9-eGFP-Konstrukt enthielt, wurde anschließend auf A431-Zellen gegeben, welche dafür bekannt sind, besonders viel EGFR zu exprimieren. Ein *Western Blot* dieser Zellen deutete darauf hin, dass hSPINK9 sich an die A431 anlagert. Die Immunpräzipitation des eGFP-gekoppelten hSPINK9s mit anschließendem *anti-EGFR-Western Blot* zeigte jedoch, dass hSPINK9 nicht direkt an den EGFR bindet sondern anscheinend mit anderen Zellbestandteilen interagiert. Zudem sprechen auch die eingesetzten hSPINK9-Konzentrationen gegen eine direkte Liganden-Rezeptor-Interaktion.

Die Aktivierung des EGFRs geschieht klassischerweise durch eine Ligandenbindung, welche eine Dimerisierung und folglich eine Phosphorylierung zur Folge hat (Ogiso *et al.* 2002; Ferguson *et al.* 2003). EGFR-Liganden liegen zunächst als membrangebundene Vorläuferproteine vor und werden durch das *Shedding* von ADAM-Metalloproteasen maturiert und freigesetzt. Im Speziellen ist das *Shedding* des proHB-EGF durch ADAM17 für die Keratinozytenmigration verantwortlich (Maretzky *et al.* 2011). Der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Cetuximab, welcher am EGFR bindet und somit dessen Aktivierung verhindert, bestätigte dass hSPINK9 eine EGFR-abhängige Signalkaskade auslöst. Zur Prüfung, ob die EGFR-Phosphorylierung durch das Liganden-*Shedding* von ADAMs hervorgerufen wird, wurde der Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat eingesetzt. Er blockierte die aktivierende Wirkung von hSPINK9 auf die EGFR-ERK1/2-Kaskade. Durch diesen Versuch konnte nachgewiesen werden, dass der Effekt von

hSPINK9 auf Keratinozyten Metalloprotease-abhängig ist. Ein *in vitro*-Wundheilungsversuch mit den Inhibitoren Marimastat und Cetuximab zeigte, dass der EGFR und ADAMs auch an den funktionellen Prozessen der hSPINK9-induzierten Migration beteiligt sind. Eine potentielle zytotoxische Wirkung von Marimastat und Cetuximab konnte durch einen Zellviabilitätsversuch ausgeschlossen werden. ADAM10 und ADAM17, die beiden am besten untersuchten ADAMs, sind beide in der Lage EGFR-Liganden freizusetzen. Um unterscheiden zu können, welche der beiden Metalloproteasen die hSPINK9-induzierte EGFR-Aktivierung hervorruft, wurde mit rhSPINK9-stimulierten Keratinozyten ein E-Cadherin-Western Blot erstellt. Das besondere an E-Cadherin ist, dass es nicht von ADAM17, jedoch aber von ADAM10 prozessiert wird. Da die Stimulation mit rhSPINK9 keinen Effekt auf das E-Cadherin-Shedding hatte, kann gefolgert werden, dass die EGFR-ERK1/2-Aktivierung auf ADAM17 zurückgeht. Diese Annahme muss jedoch noch durch weitere Experimente bestätigt werden. Dazu eignet sich der Einsatz der spezifischen Inhibitoren GI254023X, GW280264X oder siRNA-Studien. Für die beiden AMPs LL-37 und Melittin ist bekannt, dass sie ebenfalls in submikromolaren Konzentrationen Keratinozytenmigration über ADAMs und den EGFR vermitteln (Tokumaru *et al.* 2005; Sommer *et al.* 2012). Aufgrund der Annahme, dass die hSPINK9-induzierte EGFR-Aktivierung ADAM17-vermittelt ist und des ähnlichen Proliferationsverhaltens zu HB-EGF, ist zu vermuten, dass auch hSPINK9 ähnlich wie LL-37 den EGFR über das Shedding von HB-EGF aktiviert (Tokumaru *et al.* 2005).

Im Allgemeinen kann die ADAM-vermittelte Proteolyse beispielsweise durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Src-Kinasen, PKC-Aktivierung und Kalziuminflux reguliert werden (Gutwein *et al.* 2000; Ohtsu *et al.* 2006). Für die AMPs  $\beta$ -Defensine und Cathelicidine ist bekannt, dass sie ihre Wirkung auf Keratinozyten über GPCRs und den EGFR vermitteln (Schauber and Gallo 2007). Anhand der AMPs LL-37 und Melittin konnte zudem gezeigt werden, dass auch P2-Rezeptoren ADAMs stimulieren und somit eine EGFR-Signaltransduktion auslösen (Elssner *et al.* 2004; Tomasinsig *et al.* 2008; Sommer *et al.* 2012). Ob P2-Rezeptoren oder auch andere Signalwege bei der hSPINK9-induzierten ADAM17-Stimulation involviert sind, wurde deshalb im Anschluss geklärt. Hierzu wurden Keratinozyten mit rhSPINK9 in Kombination mit diversen Inhibitoren stimuliert. Der intrazellulär wirkende Kalziumchelator Bapta AM wies nach, dass die Wirkung von hSPINK9 auf die Zelle Kalzium-abhängig, LY294002, dass sie PI3-Kinase-abhängig und PP2, dass sie Src-Kinase-abhängig ist. Da der Effekt von hSPINK9 in Anwesenheit des klassischen GPCR-Inhibitors Pertussis Toxin nicht beeinflusst war, ist die Vermittlung des hSPINK9-induzierten Signals über einen GPCR unwahrscheinlich. Die klassischen P2-Rezeptor-Inhibitoren Suramin, PPADS und der hochspezifische P2-Rezeptor-Antagonist oxATP dagegen

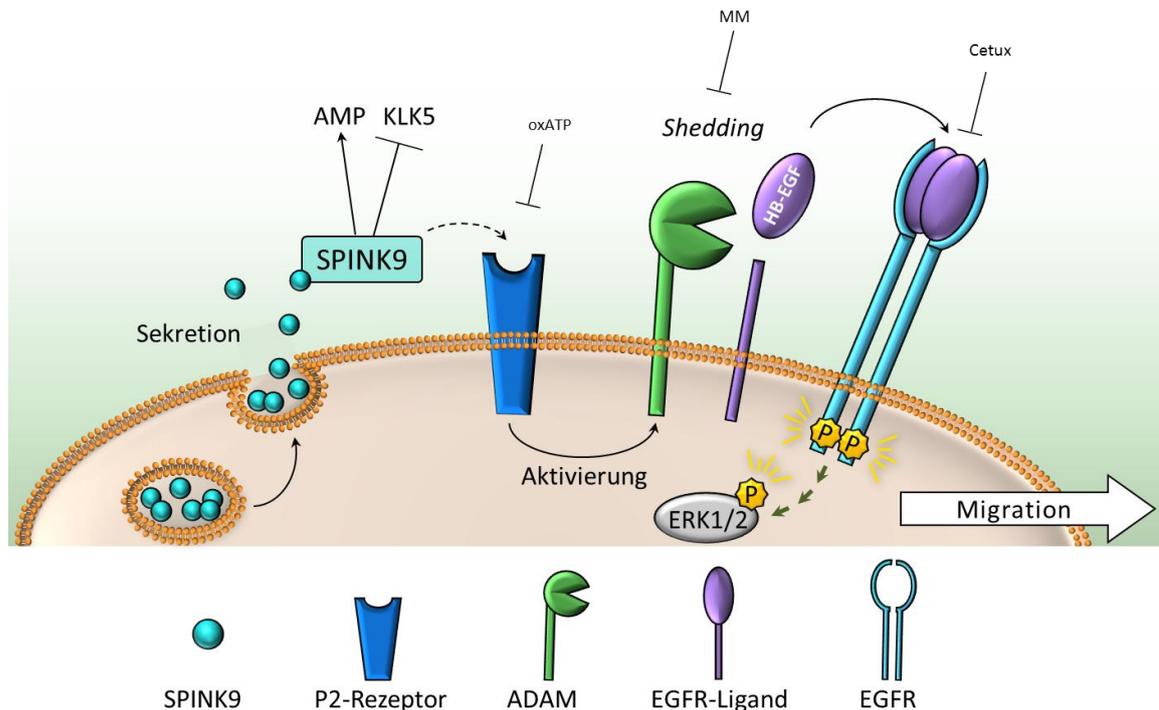
inhibierten das Signal vollständig, sodass davon ausgegangen werden kann, dass hSPINK9 genauso wie LL-37 und Melittin die ADAM-Aktivität P2-Rezeptoren-vermittelt ist. Die funktionelle Relevanz der P2-Rezeptor-vermittelten hSPINK9-Stimulation konnte anhand eines *in vitro* Wundheilungsversuchs nachgewiesen werden. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass kationische AMPs generell P2-Rezeptoren stimulieren und somit die Aktivität von ADAMs regulieren. Dass ADAMs durch P2-Rezeptoren stimuliert werden können, wurde beispielsweise am *Shedding* von L-Selektin von humanen (Jamieson *et al.* 1996; Gu *et al.* 1998; Elliott *et al.* 2005) und CD27 von murinen Lymphozyten (Moon *et al.* 2006), als auch von CD23 in dendritischen Zellen beschrieben (Sluyter and Wiley 2002). Auch das ADAM-abhängige *Shedding* des *amyloid precursor protein* (APP) wird durch P2-Rezeptoren vermittelt (Camden *et al.* 2005; Delarasse *et al.* 2011) und führt zu einer EGFR-abhängigen Signaltransduktion (Ratchford *et al.* 2010).

Wie genau aber hSPINK9 die P2-Rezeptoren stimuliert, ist noch unklar. Für LL-37 gibt es Hinweise, dass es zu einem ATP-Efflux führt, welcher wiederum die P2-Rezeptoren stimuliert (Elssner *et al.* 2004). Jedoch wurde in dieser Veröffentlichung eine sehr hohe Konzentration an LL-37 eingesetzt (10  $\mu$ M), sodass dieser Effekt eventuell auch unspezifisch sein könnte. Für Melittin konnte gezeigt werden, dass ATP-hydrolysierende Agenzien dessen Wirkung auf die Zellen hemmen, jedoch konnte dabei keine vollständige Inhibition nachgewiesen werden (Sommer *et al.* 2012). In den hSPINK9-Untersuchungen konnte kein ATP-Efflux gezeigt werden und auch der Einsatz von ATPasen hatte keinen Effekt, sodass vermuten werden kann, dass AMPs womöglich über einen anderen Mechanismus als die Freisetzung von ATP die P2-Rezeptoren aktiviert, wie beispielsweise eine direkte Bindung oder eine veränderte Mobilität von Membranrezeptoren als Folge von einer Interaktion mit der Plasmamembran wie Di Nardo *et al.* 2007 am Beispiel von LL-37 nachgewiesen haben. Des Weiteren könnte das kationische Peptid zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren führen, was wiederum zu einer Stimulation führen könnte. Es bedarf jedoch weiterführender Studien um dies im Detail klären zu können. Wie Reiss und Bhakdi 2012 in einem Review über die Regulation von ADAM-Aktivität durch *pore-forming bacterial toxins* (PFTs) und AMPs zusammengefasst haben, führt eine Änderung bzw. Störung der Plasmamembran zu einem ATP-Efflux. Dies hat eine Aktivierung von P2-Rezeptoren zur Folge, welche über *downstream events* in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und  $\text{K}^{+}$ -Efflux resultiert. Schließlich kommt es zur Generation von Ceramiden, was dann zur Aktivierung von ADAMs führt.

Da in dieser Arbeit hauptsächlich das rekombinant hergestellte hSPINK9 (rhSPINK9) verwendet wurde, stellte sich die Frage, ob auch das natürliche aus dem *S. corneum* isolierte hSPINK9

(nSPINK9) eine vergleichbare Stimulation der Zellen zur Folge hat. nSPINK9 kommt in diversen N-terminal verkürzten Formen in der Haut vor (AG Schröder und AG Meyer-Hoffert, Dermatologe, UKSH, nicht publizierte Daten). Das nSPINK9-1, für welches eine antimikrobielle Aktivität beschrieben wurde (Wu 2005; Wu *et al.* 2008), löste eine ähnliche P2-Rezeptoren-abhängige EGFR-ERK1/2-Signaltransduktion aus, wie das rhSPINK9. Für die um je eine Aminosäure weiter verkürzten Formen nSPINK9-2 und -6 konnte nur noch ein reduziertes EGFR-ERK1/2-Signal detektiert werden, was sich mit der Beobachtung deckt, dass auch nur die Formen nSPINK9-1 und -2 eine antimikrobielle Aktivität aufwiesen und kürzere Varianten nicht mehr (Wu *et al.* 2008). Was genau die Ursache dieses Funktionsverlustes ist, ist noch unklar.

Das Schema in Abbildung 31 stellt zusammenfassend die Wirkung von hSPINK9 auf Keratinozyten dar. Das hauptsächlich in palmoplantarer Haut exprimierte hSPINK9 wird demnach konstitutiv, aber auch induzierbar durch Stimulanzen, welche eine Wunde bzw. eine Entzündung simulieren, in einer N-terminal verkürzten Form vermutlich von *lamellar bodies* sekretiert. Extrazellulär wirkt es als AMP und als spezifischer Inhibitor von KLK5. Somit ist es vermutlich bei dem Aufbau palmoplantarer Haut involviert, indem es die Desquamation feinabstimmend reguliert. Außerdem ist für KLK5 bekannt, dass es unter anderem das LL-37-Vorläuferprotein *human cathelicidin antimicrobial protein 18* (hCAP18), welches entweder durch Leukozyten in die Haut gelangt oder von Keratinozyten selbst synthetisiert wird, prozessiert. Das dabei entstehende antimikrobiell aktive Fragment LL-37, kann anschließend durch KLK5 oder KLK7 in noch kürzere Peptide degradiert werden (Yamasaki *et al.* 2006). Es kann also angenommen werden, dass hSPINK9 wie hLEKTI1 einen Teil zum Gleichgewicht der Generation und Degradation von LL-37 beiträgt und teilweise die antimikrobielle Funktion übernimmt. Die Bedeutung dieses Gleichgewichts konnten beispielsweise Yamasaki *et al.* 2007 anhand von Rosacea-Patienten zeigen, bei denen andere hCAP18-Fragmente durch eine anormale KLK5-Aktivität entstehen. Zudem fördert hSPINK9 die Migration der Keratinozyten, indem es die ADAM17-vermittelte Proteolyse über P2-Rezeptoren steigert, es zu einer vermehrten Freisetzung von EGFR-Liganden kommt, welche wiederum die EGFR-ERK1/2-Signalkaskade aktiviert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass hSPINK9 zur Homöostase palmoplantarer Haut beiträgt und vermutlich auch die Wundheilung fördert. Ob es in einer Wunde tatsächlich zu einer vermehrten Expression von hLEKTI2 kommt oder hSPINK9 beispielsweise von den obersten Schichten im Falle einer Wunde in die unteren eingetragen wird, muss jedoch durch beispielsweise immunhistochemischen Färbungen weiter untersucht werden.



**Abbildung 31: Schematische Darstellung der Wirkung von hSPINK9 auf Keratinozyten.** hSPINK9 wird konstitutiv und induzierbar sekretiert. Extrazellulär kann es als AMP fungieren und als ein spezifischer Inhibitor von KLK5 die Desquamation der Haut und die Funktion von LL-37 beeinflussen. Zudem induziert es die Keratinozytenmigration, indem es die ADAM-Aktivität über P2-Rezeptoren steigert, was dann durch die vermehrte Freisetzung von EGFR-Liganden zu einer ERK1/2-Phosphorylierung führt. Somit kann hSPINK9 positiv auf die Wundheilung einwirken.

Bekannt ist, dass die ADAM17-EGFR-Signaltransduktion die Differenzierung der Keratinozyten mit reguliert. So zeigten Franzke *et al.* 2012, dass die Keratinozyten-spezifische Deletion von ADAM17 in der Maus eine Fehlregulation der Keratinozyten zur Folge hatte. Die Deletion von EGFR endet ebenfalls in einer Differenzierungsstörung (Sibilia and Wagner 1995). Da hSPINK9 die ADAM17-vermittelte Proteolyse steigert, aber auch KLK5 inhibiert, war zu vermuten, dass es die Differenzierung der Keratinozyten beeinflusst. Eine *Western Blot*-Analyse des Differenzierungs-markers Keratin 10 konnte dies jedoch auch nach einer 7-tägigen Stimulation mit hSPINK9 nicht bestätigen, sodass festgehalten werden kann, dass eine höhere Konzentration von hSPINK9 keinen Einfluss auf die Keratinozytendifferenzierung hat.

Bei Patienten mit dem Netherton-Syndrom ist auffällig, dass nicht nur die Aktivität der KLKs sondern auch deren Expression verändert ist (Komatsu *et al.* 2008). Eine direkte Korrelation zwischen dem hLEKT11-Defizit und den KLK-Expressionen konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Expression, der bisher einzig bekannten

Protease KLK5, welche von hSPINK9 inhibiert wird (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert *et al.* 2009) unter Einfluss von hSPINK9 untersucht. Es konnte mittels *Western Blot*-Analyse gezeigt werden, dass hSPINK9 die Expression von KLK5 fördert. Es lässt sich vermuten, dass eine höhere Konzentration von hSPINK9 eine Art *feed back loop* auslöst. Ob wiederum eine höhere Konzentration an KLK5 die Expression hSPINK9 steigert, muss noch untersucht werden. Da das KLK5 eine Schlüsselrolle in der Aktivierungskaskade der KLKs spielt, könnte hSPINK9 genau wie hLEKTI1 eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Kaskade zukommen.

### 5.3 ROLLE VON hSPINK9 IM IMMUNSYSTEM

Während der Wundheilung spielen neben der Reepithelialisierung, welche vermutlich durch die hSPINK9-induzierte Keratinozytenmigration gefördert werden kann, auch die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen eine essentielle Rolle (Singer and Clark 1999). Angelockt werden sie von Chemokinen (Behm *et al.* 2012). Chemokine teilen einige wichtige Eigenschaften, wie ihre geringe Größe, ihre kationische Ladung und ihre Rolle im Immunsystem, mit den AMPs. Mitglieder der Chemokinfamilie werden als Pro-Protein synthetisiert und durch die Abspaltung des Signalpeptides maturiert. Charakteristisch für die maturen Chemokine sind neben zwei konservierten Cysteinbrücken, eine 3D-Struktur, die bei allen Mitgliedern identisch ist (Fernandez and Lolis 2002). Sie besteht aus einem N-terminalen *Loop*, drei gegenläufigen  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix (Anhang: Abbildung 32). Diese Struktur erinnert stark an die vorhergesagte 3D-Struktur von hSPINK9 und -6. Ähnlich wie hSPINK9 haben auch einige Chemokine eine antimikrobielle Aktivität. So zeigten beispielsweise Yang *et al.* 2003, dass von 30 getesteten Chemokinen, 17 antimikrobiell wirken. Für CCL20 konnte sogar eine parasitizide Wirkung nachgewiesen werden (Söbirk *et al.* 2013). Aufgrund der Ähnlichkeiten von hSPINK9 zu Chemokinen und AMPs, welche auch chemotaktisch auf Immunzellen wirken können, wie am Beispiel von LL-37 gezeigt wurde (Agerberth *et al.* 2000; De Yang *et al.* 2000), ist in dieser Arbeit untersucht worden, ob auch hSPINK9 rekrutierend auf Immunzellen wirken kann. Ein *chemotaxis assay* zeigte, dass sowohl die monozytäre Zelllinie THP1 und die promyeloide Zelllinie HL-60 als auch primäre *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) von hSPINK9 angelockt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich dabei nicht um Chemotaxis, welche einen Stimulusgradienten erfordert, sondern um Chemokinese, welche auf der Steigerung der Zellmotilität beruht, handelt. Da bereits nachgewiesen wurde, dass hSPINK9 die Migration von Keratinozyten fördert, kann vermutet werden, dass hSPINK9 eventuell auch die Motilität weiterer Zellarten fördert. Dies sollte durch weitere Migrationsversuche untersucht werden.

Chemokine initiieren ihre chemotaktische Wirkung auf Immunzellen über die Aktivierung von GPCRs (Mellado *et al.* 2001). Aber auch das AMP LL-37 wird über einen GPCR, namentlich *formyl peptide receptor-like 1* (FPRL-1) vermittelt (De Yang *et al.* 2000). Die Aktivierung von THP1-Zellen durch hSPINK9 ließ sich mit Hilfe des klassischen GPCR-Inhibitors Pertussis Toxin nicht eindeutig nachweisen. Die geringere Phosphorylierung von ERK1/2 wies jedoch darauf hin, dass die von hSPINK9-ausgelöste Chemokinese GPCR gekoppelt ist, im Gegensatz zur ERK1/2-Aktivierung in Keratinozyten, die GPCR-unabhängig war. Es ist daher davon auszugehen, dass hSPINK9 von Keratinozyten durch P2-Rezeptoren und von Immunzellen durch GPCRs erkannt wird.

Die hSPINK9- und hSPINK6-Expression wurde in der Haut auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in für das Immunsystem wichtigen Organen gefunden. Dabei wurde hSPINK9 in den lymphatischen Geweben Tonsille und Thymus (Brattsand *et al.* 2009; Meyer-Hoffert *et al.* 2009) und hSPINK6 im Thymus nachgewiesen (Meyer-Hoffert *et al.* 2010). Um genauer differenzieren zu können, welche Zellen hSPINK9 bzw. -6 exprimieren, wurden immunhistologische Schnitte angefertigt. Sie zeigten, dass hSPINK9 im Lymphknoten von Eosinophilen und sowohl hSPINK9 als auch hSPINK6 von den im Thymus befindlichen Hassall-Körperchen exprimiert werden. Die Hassall-Körperchen bestehen aus epithelialen Retikulumzellen deren Differenzierung der von epidermalen Zellen gleicht (von Gaudecker and Schmale 1974). Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass sie genauso wie differenzierte Keratinozyten palmoplantarer Haut hSPINK9 und hSPINK6 synthetisieren. Die genaue Funktion der Hassall-Körperchen konnte noch nicht geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass sie bei der Reifung von T-Lymphozyten beteiligt sind, da sie beispielsweise *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) exprimieren (Watanabe *et al.* 2005; Raica *et al.* 2006).

Bei einer Verletzung der Haut infiltrieren neben Neutrophilen und Monozyten, welche dann zu Makrophagen ausdifferenzieren, auch Eosinophile das entzündliche Gewebe, wie anhand von Infektionen und Autoimmunkrankheiten gezeigt wurde (Simon and Simon 2007; Simon *et al.* 2010). Die Besonderheit an Eosinophilen sind deren eosinophile Granula. Sie enthalten verschiedenste Enzyme und toxische Proteine aber auch Chemokine und Cytokine, die freigesetzt werden können (Logan *et al.* 2003; Rothenberg and Hogan 2006), um auch größere Pathogene wie Parasiten zu bekämpfen (Klion and Nutman 2004). Durch Immunfluoreszenzmikroskopie konnte hier gezeigt werden, dass auch das AMP hSPINK9 in den Granula der Eosinophilen vorliegt. Neutrophile töten Bakterien indem sie sie phagozytieren, Granula freisetzen oder genomische DNA sezernieren, an welcher antimikrobiell-wirkende Proteine ihrer Granula assoziiert sind (Brinkmann *et al.* 2004; Papayannopoulos and Zychlinsky 2009). Dieser DNA-Protein-Komplex wird *neutrophil extracellular traps* (NETs) genannt. Der

Vorteil von *extracellular traps* ist, dass Bakterien von dem Komplex eingefangen und immobilisiert werden, die Konzentration der antimikrobiell-wirkenden Agenzien am Bakterium höher ist, da eine Diffusion verhindert wird und gleichzeitig eine Schädigung des umgebenden Gewebes vermindert wird. Auch Eosinophile können *extracellular traps* ausbilden (Yousefi *et al.* 2008; Simon *et al.* 2011), die als *eosinophil extracellular traps* (EETs) bezeichnet werden. Anders als bei der Freisetzung von NETs, welche den Tod der Neutrophilen zur Folge hat, kommt es bei den EETs zur katapultartigen Sezernierung von mitochondrialer DNA. Simon *et al.* konnten 2011 erstmals EETs sowohl in infektiöser Haut (Ektoparasiten, *Larva migrans*) als auch in allergischer Haut (Wells Syndrom, hypereosinophiles Syndrom, Kontaktdermatitis, Medikamenten-überempfindlichkeiten) und Autoimmunkrankheiten (*Bullous pemphigoid*, *Pemphigus foliaceus*, *Dermatitis herpetiformis*) nachweisen. Erste Untersuchungen darüber, ob auch hSPINK9 mit EETs freigesetzt wird, wiesen darauf hin, dass es auch ähnlich wie die kationischen Proteine ECP oder EMBP an dem DNA-Protein-Komplex beteiligt ist. Ein DNA-Assoziationsversuch unterstützt dieses Ergebnis, sodass spekulieren werden kann, dass auch hSPINK9 durch seine antimikrobielle Aktivität an der Abtötung von Pathogenen durch EETs beteiligt sein könnte. Da dies jedoch nur vorläufige Ergebnisse sind, bedarf es weiteren eingehenderen Untersuchungen um dies eindeutig beweisen zu können.

## 5.4 AUSBLICK

Mittels Zellkulturversuchen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass hSPINK9 die Keratinozytenmigration fördert. Dies und die vermehrte Sekretion von hSPINK9 und hSPINK6 bei einer Stimulation mit Agenzien, welche eine wundähnliche Zellreaktion hervorrufen können, lassen vermuten, dass hSPINK9 bei der Wundheilung eine Rolle spielt. Auch dass hSPINK9 nur in palmoplantarer Haut exprimiert wird, schließt dies nicht aus. Im Gegenteil, denn dies sind die Bereiche, welche insbesondere durch den Kontakt mit der Umwelt mechanischen Belastungen trotzen müssen und in denen die Gefahr einer Verletzung am höchsten ist. Zudem ist noch zu überprüfen, ob auch nicht-palmoplantare Bereiche der Haut bei einer Verwundung hSPINK9 exprimieren. Dies kann beispielsweise anhand von Patientenproben untersucht werden. Das AMP PR-39, welches durch die Degradation von LL-37 entsteht, induziert die Expression von Oberflächen-Heparansulfat-Proteoglykanen, welches wiederum die proliferative und migrationsfördernde Wirkung von *heparin-binding growth factors* vermittelt (Gallo *et al.* 1994). Ob dies auch für hSPINK9 gilt, muss noch getestet werden.

hSPINK9 fördert die Keratinozytenmigration, indem es P2-Rezeptoren aktiviert, welche dann die ADAM-vermittelte Proteolyse steigern, was wiederum den EGFR aktiviert. Dieser Weg der

ADAM-Stimulation ist bisher nur noch von den beiden kationischen AMPs LL-37 und Melittin beschrieben worden. Welcher P2-Rezeptor ADAMs aktiviert, in welcher Art und Weise und ob dies eventuell auch ein genereller Aktivierungsmechanismus durch positivgeladene Peptide ist, muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Die Regulation der ADAMs steht in der Forschung in einem besonderen Fokus, da ihre Aktivität in Zusammenhang mit Krankheiten wie Krebs, neurologische und kardio-vaskuläre Krankheiten, Asthma, Alzheimer, Infektionen und entzündlichen Prozessen steht (Edwards *et al.* 2008). Somit könnte hSPINK9 eine Möglichkeit sein, die ADAM-Aktivität in diesen Krankheiten positiv zu beeinflussen.

Die lokale Begrenzung der hSPINK9-Expression, deutet des Weiteren daraufhin, dass es womöglich für die Homöostase und die Generation des für palmoplantare Haut typische dicke *S. corneum* eine Rolle spielt. Differenzierungsversuche nach einer Deletion von hSPINK9, beispielsweise durch shRNA-Transfektion, könnten dies eventuell nachweisen.

Weitere Untersuchungen sollten zudem zum Thema hSPINK9 und dessen Rolle im Immunsystem durchgeführt werden. Es scheint auch hier Wundheilung zu fördern in dem es Immunzellen anlockt. Zudem sollten weitere Studien zur Aufklärung der Funktion von hSPINK9 in Eosinophilen durchgeführt werden und getestet werden ob es auch wie andere AMPs noch weitere Funktionen wie beispielsweise die Förderung von Angiogenese, aufweist.

hSPINK6 als Inhibitor für KLK5, KLK7, KLK12, KLK13 und KLK14 und hSPINK9 als spezifischer KLK5-Inhibitor könnten auch für diverse Krankheiten, wie Atopische Dermatitis bei der die Aktivität von KLK5 und KLK14 oder dem Netherton-Syndrom bei dem die KLK5- und KLK7-Aktivität erhöht ist, wichtig sein. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Netherton-Patienten an palmoplantaren Hautbereichen nahezu symptomlos sind. Womöglich kompensieren hSPINK9 und eventuell auch hSPINK6 das Fehlen des funktionstüchtigen LEKT11 in diesen Bereichen, sodass hSPINK9 und hSPINK6 sich eventuell sogar als Therapeutikum für solche Hautkrankheiten eignen.

Zur Charakterisierung von humanen Proteinen wird oftmals die Maus als Modelorganismus verwendet und auch gefordert. Sie wird genutzt um grundlegende biologische Prozesse zu verstehen, aber auch um Krankheiten zu studieren. Dabei wird die Möglichkeit die Maus gentechnisch verändern zu können, genutzt. Ob sich die Maus in jedem Fall als guter Modelorganismus eignet, wird jedoch kontrovers diskutiert (Aitman *et al.* 2011; Seok *et al.* 2013). Insbesondere die Untersuchungen mit dem Maus-Modell zu Prozessen in der Haut sind fraglich, da hier neben den generellen Unterschieden zwischen Maus und Mensch, die Maus durch das Fell einen zusätzlichen Schutz vor Umwelteinflüssen besitzt. Im Fall der putativen murinen

Orthologe mSPINK12 und mSPINK6 von den humanen hSPINK9 und hSPINK6 konnte gezeigt werden, dass sie sich in ihrem Expressionsmuster, inhibitorischen Wirkspektrum und der induzierbaren mRNA-Expression unterscheiden. Wahrscheinlich eignet sich die Maus demnach nicht als Modellorganismus zur Charakterisierung dieser beiden Proteine, eine endgültige Aussage darüber kann jedoch erst nach weiteren Studien getroffen werden. Durch *genome-wide association studies* (GWASs) und beispielsweise genetische Manipulationen von humanen Zelllinien durch Transfektionen von Expressionsvektoren oder siRNA, sind heutzutage viele Untersuchungen und Erkenntnisse auch ohne Modelorganismen möglich. Des Weiteren können auch Modellsysteme wie das 3D-Hautmodell genutzt werden um komplexere Prozesse zu untersuchen.

Zusammenfassend betrachtet könnte hSPINK9 eine unterstützende Rolle bei einer Wundheilung spielen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Falle einer Verwundung hSPINK9 A) vermehrt exprimiert und sekretiert wird, B) die Migration von Keratinozyten fördert, C) durch seine antimikrobielle Aktivität vor einer Infektion schützt, D) durch seine anlockende Wirkung auf PBMCs immunmodulatorisch wirkt und E) von Eosinophilen mit EETs freigesetzt wird und womöglich bei der Verteidigung gegen Bakterien und Parasiten beteiligt ist. So stellt hSPINK9 womöglich eine neue Perspektive für die Behandlung von Wunden und Krankheiten dar.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Für die Homöostase der Haut ist das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Desquamation essentiell. Die Desquamation findet durch die proteolytische Spaltung der Korneodesmosomen durch Kallikreine statt. Deren Aktivität wird unter anderem durch Serin-Protease-Inhibitoren wie hLEKTI1 reguliert. Kürzlich wurden zwei Homologe zu hLEKTI1, hSPINK9 und hSPINK6 beschrieben. hSPINK6 hemmt selektiv die Kallikreine KLK5, KLK7, KLK12, KLK13 und KLK14, welche wichtig für die Hauthomöostase sind und wird in verschiedenen Hautarealen exprimiert. hSPINK9 hingegen inhibiert nur spezifisch KLK5, ist nur in palmoplantaren Hautbereichen nachzuweisen und hat eine antimikrobielle Aktivität. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Serin-Protease-Inhibitoren hSPINK9 und hSPINK6 näher charakterisiert.

Es konnte mittels mRNA-Analyse gezeigt werden, dass die Expression beider Inhibitoren induzierbar ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass sie in der Zelle vesikulär vorliegen und sowohl konstitutiv als auch stimulierbar sekretiert werden. Für das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung ist die MAPK-Kaskade für die Hauthomöostase ein wichtiger regulatorischer Bestandteil. Dieser Signalweg wird dabei hauptsächlich durch MAPK-Signalweges hauptsächlich durch den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) vermittelt. Die Liganden des EGFR werden durch die ADAM-Metallproteasen freigesetzt, sodass die Regulation der ADAM-vermittelten Proteolyse ebenfalls für die Homöostase der Haut eine wichtige Komponente ist. Interessanterweise haben hSPINK9 und hSPINK6 strukturelle Ähnlichkeiten zu kationischen antimikrobiellen Peptiden (AMPs). Zwei Vertreter der AMPs, LL-37 und Melittin, sind in der Lage die Keratinozytenmigration zu fördern indem sie den EGFR durch eine gesteigerte ADAMs-vermittelte Proteolyse aktivieren. *In vitro* Wundheilungsversuche und *Western Blots* zeigten, dass auch hSPINK9 die Migration von Keratinozyten induziert indem der EGFR transaktiviert wird. Durch den Einsatz des Breitband-Metalloprotease-Inhibitors Mariamastat und des EGFR-blockierenden Antikörpers Cetuximab konnte nachgewiesen werden, dass eine gesteigerte ADAM-vermittelte Proteolyse der EGFR-Liganden zur Transaktivierung führt. Die klassischen P2-Rezeptoren-Antagonisten oxATP und PPADS blockierten die durch hSPINK9 ausgelöste EGFR-Aktivierung analog zu den kürzlich publizierten Erkenntnissen von LL-37 und Melittin. Dies lässt schlussfolgern, dass P2-Rezeptoren womöglich eine essentielle vermittelnde Funktion bei der Regulation der ADAM-vermittelten Proteolyse durch kationische AMPs spielt. Weitere Untersuchungen deuten daraufhin, dass hSPINK9 genauso wie andere

kationische AMPs auch immunmodulatorisch wirkt. Es ist beispielsweise in der Lage, PBMCs anzulocken, indem es die Motilität der Zellen steigert und wird von Eosinophilen exprimiert. Erste Ergebnisse weisen daraufhin, dass hSPINK9 mit *eosinophil extracellular traps* freigesetzt wird und bei der Verteidigung gegen Bakterien und Parasiten involviert ist.

Zusammenfassend hat diese Arbeit gezeigt, dass hSPINK9 neben der spezifischen Inhibition von KLK5 und der antimikrobiellen Aktivität weitere Funktionen besitzt. Durch die migrationsfördernde und immunmodulatorische Wirkung als auch die regulatorische Rolle gegenüber der ADAM-vermittelten Proteolyse, kann hSPINK9 eine neue Perspektive zur Behandlung von Wunden und Hautbarrierestörungen darstellen.

## 7 SUMMARY

The balance between proliferation, differentiation and desquamation is essential to maintain the skin homeostasis. The desquamation of the uppermost layers of the epidermis is mediated by kallikreins which proteolytically cleave the corneodesmosomes. These kallikreins are regulated inter alia by serine protease inhibitors like hLEKTI1. Recently, two homologs of hLEKTI1, namely hSPINK9 and hSPINK6, were described. hSPINK6 selectively inhibits the kallikreins KLK5, KLK7, KLK12, KLK13 and KLK14 and is expressed in various skin areas. In contrast, hSPINK9 is only expressed in palmoplantar skin and specifically inhibits KLK5. Furthermore it is proposed to be antimicrobially active against *E. coli*. In this study hSPINK9 and hSPINK6 were further characterized.

mRNA analyses showed, that the expression of both inhibitors are inducible. Furthermore, hSPINK9 and hSPINK6 were found to be intracellularly localized in vesicles and are constitutive as well as inducible released. The MAPK cascade is responsible for the regulation of proliferation and differentiation in skin homeostasis. This signalling pathway is mediated by the activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR). The ligands of the EGFR are shed by ADAM metalloproteases. Thus the regulation of ADAMs is an important component for the skin homeostasis. Interestingly, hSPINK9 and hSPINK6 have structural similarities to cationic antimicrobial peptides (AMPs). Recently, it was reported that the two AMPs LL-37 and melittin promote keratinocyte migration via activating ADAMs. *In vitro* wound healing assays and western blots showed that also hSPINK9 transactivates the EGFR resulting in cell migration. The increase in ADAM-mediated proteolysis by hSPINK9 was evidenced by suppression with the broad range metalloprotease inhibitor marimastat and the EGFR-blocking antibody Cetuximab. The classical purinergic receptor antagonists oxATP and PPADS effectively inhibited EGFR-transactivation by hSPINK9, indicating that in analogy to what has recently been reported for the AMPs LL-37 and melittin, purinergic receptors play an essential bridging role in promoting the upregulation of ADAM-function by the cationic peptide. Additional analyses indicated that hSPINK9, just like other cationic AMPs has an immunomodulatory function such as attracting PBMCs via increasing cell motility. Moreover it is expressed in eosinophil granulocytes. Preliminary data showed that hSPINK9 is released with eosinophil extracellular traps and might thus be involved in the defence against bacteria and parasites.

Taken together, hSPINK9 has further functions besides its inhibition of KLK5 and its antimicrobial activity. As demonstrated by this work hSPINK9 can function as immunomodulator,

migration promotor and trigger of ADAM-mediated transsignalling of the EGF receptor. Therefore it might support wound healing or skin barrier disorders.

## 8 LITERATUR

- Aberg KM, Radek KA, Choi E-H, Kim D-K, Demerjian M, Hupe M, Kerbleski J, Gallo RL, Ganz T, Mauro T, Feingold KR, Elias PM (2007). Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J Clin Invest* 117: 3339–49.
- Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96: 3086–93.
- Aitman TJ, Boone C, Churchill GA, Hengartner MO, Mackay TFC, Stemple DL (2011). The future of model organisms in human disease research. *Nat Rev Genet* 12: 575–82.
- Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 117: 106–11.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22: 195–201.
- Augustin R, Siebert S, Bosch TCG (2009). Identification of a kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of Hydra's innate immune system. *Dev Comp Immunol* 33: 830–7.
- Bandyopadhyay S, Lee M, Sivaraman J, Chatterjee C (2013). Model membrane interaction and DNA-binding of antimicrobial peptide Lasioglossin II derived from bee venom. *Biochem Biophys Res Commun* 430: 1–6.
- Bauer F, Schweimer K, Klüver E, Conejo-Garcia JR, Forssmann WG, Rösch P, Adermann K, Sticht H (2001). Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci* 10: 2470–9.
- Bazley LA, Gullick WJ (2005). The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 12: S17–27.
- Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S (2012). Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26: 812–20.
- Bertani G (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62: 293–300.
- Bikle DD (2004). Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem* 92: 436–44.
- Bitoun E, Micheloni A, Lamant L, Bonnart C, Tartaglia-Polcini A, Cobbold C, Al Saati T, Mariotti F, Mazereeuw-Hautier J, Boralevi F, Hohl D, Harper J, Bodemer C, D'Alessio M, Hovnanian A (2003). LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Hum Mol Genet* 12: 2417–30.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385: 729–33.
- Blank IH (1953). Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 21: 259–71.

- Blanpain C, Fuchs E (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 207–17.
- Blaydon DC, Biancheri P, Di W-L, Plagnol V, Cabral RM, Brooke MA, van Heel DA, Ruschendorf F, Toyne M, Walne A, O'Toole EA, Martin JE, Lindley K, Vulliamy T, Abrams DJ, MacDonald TT, Harper JJ, Kelsell DP (2011). Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med* 365: 1502–8.
- Bode W, Gomis-Rüth F-XX, Stöckler W (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” *FEBS Lett* 331: 134–40.
- Borgoño CA, Michael IP, Komatsu N, Jayakumar A, Kapadia R, Clayman GL, Sotiropoulou G, Diamandis EP (2007). A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J Biol Chem* 282: 3640–52.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761–71.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–54.
- Braff MH, Di Nardo A, Gallo RL (2005). Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 124: 394–400.
- Brännström K, Öhman A, von Pawel Rammingen U, Olofsson A, Brattsand M (2012). Characterization of SPINK9, a KLK5-specific inhibitor expressed in palmo-plantar epidermis. *Biol Chem* 393: 369–77.
- Brattsand M, Egelrud T (1999). Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem* 274: 30033–40.
- Brattsand M, Stefansson K, Hubiche T, Nilsson SK, Egelrud T (2009). SPINK9: a selective, skin-specific Kazal-type serine protease inhibitor. *J Invest Dermatol* 129: 1656–65.
- Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T (2005). A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 124: 198–203.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (80- )* 303: 1532–5.
- Brogden KA (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238–50.
- Brown KL, Poon GFT, Birkenhead D, Pena OM, Falsafi R, Dahlgren C, Karlsson A, Bylund J, Hancock REW, Johnson P (2011). Host Defense Peptide LL-37 Selectively Reduces Proinflammatory Macrophage Responses. *J Immunol* 186: 5497–505.
- Burnstock G, Knight GE, Greig AVH (2012). Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *J Invest Dermatol* 132: 526–46.
- Camden JM, Schrader AM, Camden RE, González FA, Erb L, Seye CI, Weisman GA (2005). P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 280: 18696–702.

- Carretero M, Escámez MJ, García M, Duarte B, Holguín A, Retamosa L, Jorcano JL, Río M Del, Larcher F (2008). In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. *J Invest Dermatol* 128: 223–36.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257: 7847–51.
- Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G (2004). Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 122: 1235–44.
- Chalaris A, Adam N, Sina C, et al. (2010). Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med* 207: 1617–24.
- Chan DI, Hunter HN, Tack BF, Vogel HJ (2008). Human macrophage inflammatory protein 3alpha: protein and peptide nuclear magnetic resonance solution structures, dimerization, dynamics, and anti-infective properties. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 883–94.
- Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine a D, Bonafé JL, Wilkinson J, Taïeb A, Barrandon Y, Harper JI, de Prost Y, Hovnanian A (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* 25: 141–2.
- Cohen S (1965). The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 12: 394–407.
- Conlon RA, Reaume AG, Rossant J (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121: 1533–45.
- Davidson DJ, Currie AJ, Reid GSD, Bowdish DME, MacDonald KL, Ma RC, Hancock REW, Speert DP (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol* 172: 1146–56.
- Delarasse C, Auger R, Gonnord P, Fontaine B, Kanellopoulos JM (2011). The Purinergic Receptor P2X7 Triggers -Secretase-dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem* 286: 2596–606.
- Denholm EM, Stankus GP (1995). Changes in the expression of MCP-1 receptors on monocytic THP-1 cells following differentiation to macrophages with phorbol myristate acetate. *Cytokine* 7: 436–40.
- Deraison C, Bonnard C, Lopez F, Besson C, Robinson R, Jayakumar A, Wagberg FF, Brattsand M, Hachem J-PP, Leonardsson G, Hovnanian A (2007). LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell* 18: 3607–19.
- Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel D V. (1984). Human transforming growth factor- $\alpha$ : Precursor structure and expression in E. coli. *Cell* 38: 287–97.
- Descargues P, Deraison C, Prost C, Freitag S, Mazereeuw-Hautier J, D'Alessio M, Ishida-Yamamoto A, Bodemer C, Zambruno G, Hovnanian A (2006). Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol* 126: 1622–32.
- DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM (1998). MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest* 101: 1693–8.

- Dlugosz AA, Yuspa SH (1991). Staurosporine induces protein kinase C agonist effects and maturation of normal and neoplastic mouse keratinocytes in vitro. *Cancer Res* 51: 4677–84.
- Doedens JR, Mahimkar RM, Black RA (2003). TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 331–8.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127–45.
- Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Colton SW, Abraham W, Strauss JS (1987). Skin lipids: an update. *J Invest Dermatol* 88: S2–S6.
- Dumesic PA, Scholl FA, Barragan DI, Khavari PA (2009). Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *J Cell Biol* 185: 409–22.
- Dykes PJ, Jenner LA, Marks R (1982). The effect of calcium on the initiation and growth of human epidermal cells. *Arch Dermatol Res* 273: 225–31.
- Eckert RL, Sturniolo MT, Broome A-M, Ruse M, Rorke E a (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124: 481–92.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29: 258–89.
- Egelrud T, Lundström A (1990). The dependence of detergent-induced cell dissociation in non-palmo-plantar stratum corneum on endogenous proteolysis. *J Invest Dermatol* 95: 456–9.
- Ekholm IE, Brattsand M, Egelrud T (2000). Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol* 114: 56–63.
- Elias PM (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 125: 183–200.
- Elias PM (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* 29: 3–14.
- Elias PM, Ahn SK, Denda M, Brown BE, Crumrine D, Kimutai LK, Kömüves L, Lee SH, Feingold KR (2002). Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol* 119: 1128–36.
- Elias PM, Cullander C, Mauro T, Rassner U, Kömüves L, Brown BE, Menon GK (1998). The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3: 87–100.
- Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassidy-Cain RL, Wooding C, Linton K, Alexander DR, Higgins CF (2005). Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol* 7: 808–16.
- El-Mabrouk N, Sankoff D (2012). Analysis of gene order evolution beyond single-copy genes. *Methods Mol Biol* 855: 397–429.
- Elsner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD (2004). A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol* 172: 4987–94.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127: 514–25.

- Fartasch M, Williams ML, Elias PM (1999). Altered Lamellar Body Secretion and Stratum Corneum Membrane Structure in Netherton Syndrome. *Arch Dermatol* 135: 823–32.
- Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho H-S, Leahy DJ, Lemmon MA (2003). EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Mol Cell* 11: 507–17.
- Fernandez EJ, Lolis E (2002). Structure, Function, and Inhibition of Chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469–99.
- Fischer J, Koblyakova Y, Latendorf T, Wu Z, Meyer-Hoffert U (2013a). Cross-Linking of SPINK6 by Transglutaminases Protects from Epidermal Proteases. *J Invest Dermatol* 133: 1–8.
- Fischer J, Wu Z, Kantyka T, Sperrhacker M, Dimitrieva O, Koblyakova Y, Ahrens K, Graumann N, Baurecht H, Reiss K, Schröder J-M, Proksch E, Meyer-Hoffert U (2013b). Characterization of Spink6 in Mouse Skin: The Conserved Inhibitor of Kallikrein-Related Peptidases Is Reduced by Barrier Injury. *J Invest Dermatol*.
- Frank S, Kämpfer H, Wetzler C, Stallmeyer B, Pfeilschifter J (2000). Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J* 347: 265–73.
- Franzke C-W, Cobzaru C, Triantafyllopoulou A, Löffek S, Horiuchi K, Threadgill DW, Kurz T, van Rooijen N, Bruckner-Tuderman L, Blobel CP (2012). Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *J Exp Med* 209: 1105–19.
- Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stähle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272: 15258–63.
- Le Gall SM, Marezky T, Issuree PDA, Niu X-D, Reiss K, Saftig P, Khokha R, Lundell D, Blobel CP (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci* 123: 3913–22.
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54: 713–33.
- Gallo RL, Hooper L V (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12: 503–16.
- Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M (1994). Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11035–9.
- Von Gaudecker B, Schmale EM (1974). Similarities between Hassall's corpuscles of the human thymus and the epidermis. An investigation by electron microscopy and histochemistry. *Cell Tissue Res* 151: 347–68.
- Gebhard LG, Carrizo FU, Stern AL, Burgardt NI, Faivovich J, Lavilla E, Ermácora MR (2004). A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*. *Eur J Biochem* 271: 2117–26.
- Gibrat JF, Madej T, Bryant SH (1996). Surprising similarities in structure comparison. *Curr Opin Struct Biol* 6: 377–85.

- 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.
- Gomis-Rüth FX (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol* 24: 157–202.
- Gschwind A, Hart S, Fischer OM, Ullrich A (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J* 22: 2411–21.
- Gu B, Bendall LJ, Wiley JS (1998). Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* 92: 946–51.
- Gutwein P, Oleszewski M, Mechtersheimer S, Agmon-Levin N, Krauss K, Altevogt P (2000). Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem* 275: 15490–7.
- Hachem J-P, Wagberg F, Schmuth M, Crumrine D, Lissens W, Jayakumar A, Houben E, Mauro TM, Leonardsson G, Brattsand M, Egelrud T, Roseeuw D, Clayman GL, Feingold KR, Williams ML, Elias PM (2006). Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol* 126: 1609–21.
- Hancock RE., Diamond G (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8: 402–10.
- Hansson L, Strömquist M, Bäckman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T (1994). Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem* 269: 19420–6.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276: 5707–13.
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder J-M (2004). Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 123: 522–9.
- Harder J, Schroder J-M (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277: 46779–84.
- Harder J, Siebert R, Zhang Y, Matthiesen P, Christophers E, Schlegelberger B, Schröder JM (1997). Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* 46: 472–5.
- Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lübke T, Lena Illert A, von Figura K, Saftig P (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11: 2615–24.
- Von Haussen J, Koczulla R, Shaykhiev R, Herr C, Pinkenburg O, Reimer D, Wiewrodt R, Biesterfeld S, Aigner A, Czubyko F, Bals R (2008). The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer* 59: 12–23.
- Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M (2003). The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 120: 379–89.

- Hewish DR, Barnham KJ, Werkmeister JA, Kirkpatrick A, Bartone N, Liu ST, Norton RS, Curtain C, Rivetta DE (2002). Structure and activity of D-Pro14 melittin. *J Protein Chem* 21: 243–53.
- Higashiyama S, Abraham J a, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science (80- )* 251: 936–9.
- Houben E, De Paepe K, Rogiers V (2007). A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol Physiol* 20: 122–32.
- Hunter S, Jones P, Mitchell A, *et al.* (2012). InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res* 40: D306–12.
- Huovila A-PJ, Turner AJ, Peltö-Huikko M, Kärkkäinen I, Ortiz RM (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 30: 413–22.
- Ishida-Yamamoto A, Deraison C, Bonnart C, Bitoun E, Robinson R, O'Brien TJ, Wakamatsu K, Ohtsubo S, Takahashi H, Hashimoto Y, Dopping-Hepenstal PJC, McGrath J a, Iizuka H, Richard G, Hovnanian A (2005). LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *J Invest Dermatol* 124: 360–6.
- Ishida-Yamamoto A, Simon M, Kishibe M, Miyauchi Y, Takahashi H, Yoshida S, O'Brien TJ, Serre G, Iizuka H (2004). Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J Invest Dermatol* 122: 1137–44.
- Jackson LF, Qiu TH, Sunnarborg SW, Chang A, Zhang C, Patterson C, Lee DC (2003). Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J* 22: 2704–16.
- Jamieson GP, Snook MB, Thurlow PJ, Wiley JS (1996). Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors. *J Cell Physiol* 166: 637–42.
- Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev M V, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, Blobel CP, Himanen J-P, Lackmann M, Nikolov DB (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123: 291–304.
- Jayakumar A, Kang Y, Mitsudo K, Henderson Y, Frederick MJ, Wang M, El-Naggar AK, Marx UC, Briggs K, Clayman GL (2004). Expression of LEKTI domains 6-9' in the baculovirus expression system: recombinant LEKTI domains 6-9' inhibit trypsin and subtilisin A. *Protein Expr Purif* 35: 93–101.
- Jia T, Pamer EG (2009). Immunology. Dispensable but not irrelevant. *Science* 325: 549–50.
- Kantyka T, Fischer J, Wu Z, Declercq W, Reiss K, Schröder J-M, Meyer-Hoffert U (2011). Inhibition of kallikrein-related peptidases by the serine protease inhibitor of Kazal-type 6. *Peptides* 32: 1187–92.
- Karolchik D, Barber GP, Casper J, *et al.* (2013). The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res* 42: D764–70.
- Kato A, Fukai K, Oiso N, Hosomi N, Murakami T, Ishii M (2003). Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br J Dermatol* 148: 665–9.
- Katzel JA, Fanucchi MP, Li Z (2009). Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 2: 2.

- Kazal L, Spicer D, Brahinsky R (1948). Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J Am Chem Soc* 70: 3034–40.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12: 996–1006.
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 37: D387–92.
- Klion AD, Nutman TB (2004). The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* 113: 30–7.
- Klünder S (2011). Untersuchungen zur Expression, Lokalisation und Funktion der Serinproteaseinhibitoren LEKTI-2 und hSPINK6 in Epithelzellen. *Diplomarbeit CAU Kiel, Dermatologie Nov.*
- Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, et al. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 111: 1665–72.
- Komatsu N, Saijoh K, Jayakumar A, Clayman GL, Tohyama M, Suga Y, Mizuno Y, Tsukamoto K, Taniuchi K, Takehara K, Diamandis EP (2008). Correlation between SPINK5 gene mutations and clinical manifestations in Netherton syndrome patients. *J Invest Dermatol* 128: 1148–59.
- Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, Ohka R, Otsuki N, Hussack G, Takehara K, Diamandis EP (2005). Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *Br J Dermatol* 153: 274–81.
- Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Ohka R, Amano O, Takehara K, Saijoh K (2002). Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *J Invest Dermatol* 118: 436–43.
- Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Toyama T, Ohka R, Takehara K, Saijoh K (2003). Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *J Invest Dermatol* 121: 542–9.
- Kozak M (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15: 8125–48.
- Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L (2001). The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40: 3016–26.
- Lambrecht G (2000). Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 340–50.
- Lauber T, Schulz A, Schweimer K, Adermann K, Marx UC (2003). Homologous Proteins with Different Folds: The Three-dimensional Structures of Domains 1 and 6 of the Multiple Kazal-type Inhibitor LEKTI. *J Mol Biol* 328: 205–19.
- Lee D, Rose T, Webb N, Todaro G (1985). Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor- $\alpha$ . *Nature* 313: 489–91.
- Liu AY, Destoumieux D, Wong A V, Park CH, 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: 275–81.

- Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R (2003). Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 111: 923–32.
- Lorenzen I, Lokau J, Düsterhöft S, Trad A, Garbers C, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett* 586: 1093–100.
- Lundström A, Egelrud T (1988). Cell shedding from human plantar skin in vitro: evidence of its dependence on endogenous proteolysis. *J Invest Dermatol* 91: 340–3.
- Lundwall A, Brattsand M (2008). Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci* 65: 2019–38.
- Madison KC, Howard EJ (1996). Ceramides are transported through the Golgi apparatus in human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 106: 1030–5.
- Mägert HJ, Ständker L, Kreutzmann P, Zucht H-D, Reinecke M, Sommerhoff CP, Fritz H, Forssmann W-G (1999). LEKTI, a Novel 15-Domain Type of Human Serine Proteinase Inhibitor. *J Biol Chem* 274: 21499–502.
- Maretzky T, Evers A, Zhou W, Swendeman SL, Wong P-M, Rafii S, Reiss K, Blobel CP (2011). Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat Commun* 2: 229.
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9182–7.
- Mayumi M (1992). EoL-1, a human eosinophilic cell line. *Leuk Lymphoma* 7: 243–50.
- Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Mañes S, Martínez-A C (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 19: 397–421.
- Menon GK, Feingold KR, Elias PM (1992). Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 98: 279–89.
- Menon GK, Grayson S, Elias PM (1985). Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 84: 508–12.
- Meyer-Hoffert U, Wu Z, Kantyka T, Fischer J, Latendorf T, Hansmann B, Bartels J, He Y, Gläser R, Schröder J-M (2010). Isolation of SPINK6 in human skin: selective inhibitor of kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 285: 32174–81.
- Meyer-Hoffert U, Wu Z, Schröder J-M (2009). Identification of lympho-epithelial Kazal-type inhibitor 2 in human skin as a kallikrein-related peptidase 5-specific protease inhibitor. *PLoS One* 4: e4372.
- Meyer-Hoffert U, Zimmermann A, Czapp M, Bartels J, Koblyakova Y, Gläser R, Schröder J-M, Gerstel U (2011). Flagellin delivery by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids induces the antimicrobial protein psoriasin in human skin. *PLoS One* 6: e16433.
- Milstone LM (2004). Epidermal desquamation. *J Dermatol Sci* 36: 131–40.
- Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol* 175: 2454–62.

- Mitsudo K, Jayakumar A, Henderson Y, Frederick MJ, Kang Y, Wang M, El-Naggar AK, Clayman GL (2003). Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, and elastase by LEKTI: a kinetic analysis. *Biochemistry* 42: 3874–81.
- Moon H, Na H-Y, Chong KH, Kim TJ (2006). P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol Lett* 102: 98–105.
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, *et al.* (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385: 733–6.
- Nagpal S, Na S, Rathnachalam R (2005). Noncalcemic Actions of Vitamin D Receptor Ligands. *Endocr Rev* 26: 662–87.
- Di Nardo A, Braff MH, Taylor KR, Na C, Granstein RD, McInturff JE, Krutzik S, Modlin RL, Gallo RL (2007). Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J Immunol* 178: 1829–34.
- Nemes Z, Steinert PM (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 31: 5–19.
- Netherton EW (1958). A unique case of trichorrhexis nodosa; bamboo hairs. *AMA Arch Derm* 78: 483–7.
- Nicholas K, Nicholas H (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *Distrib by author <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>*.
- Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui C, Clevers H, Dotto GP, Radtke F (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 33: 416–21.
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H (2007). Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127: 594–604.
- Nonomura K, Yamanishi K, Yasuno H, Nara K, Hirose S (1994). Up-regulation of elafin/SKALP gene expression in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 103: 88–91.
- Nowell C, Radtke F (2013). Cutaneous notch signaling in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a017772.
- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim J-H, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S (2002). Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* 110: 775–87.
- Ohman H, Vahlquist A (1998). The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the “acid skin mantle”? *J Invest Dermatol* 111: 674–7.
- Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S (2006). ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1–10.
- Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T (2003). In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 74: 180–2.
- Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341: 501–13.
- Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, Declercq W (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci* 34: 453–63.

- Ozaki N, Ohmuraya M, Hirota M, Ida S, Wang J, Takamori H, Higashiyama S, Baba H, Yamamura K-I (2009). Serine protease inhibitor Kazal type 1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Res* 7: 1572–81.
- Papayannopoulos V, Zychlinsky A (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 30: 513–21.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, *et al.* (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* (80-) 282: 1281–4.
- Pfundt R, van Ruissen F, van Vlijmen-Willems IM, Alkemade HA, Zeeuwen PL, Jap PH, Dijkman H, Franssen J, Croes H, van Erp PE, Schalkwijk J (1996). Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J Clin Invest* 98: 1389–99.
- Poumay Y, de Rouvroit CL (2012). HB-EGF, the growth factor that accelerates keratinocyte migration, but slows proliferation. *J Invest Dermatol* 132: 2129–30.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17: 1063–72.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33: W116–20.
- Radek K, Gallo R (2007). Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29: 27–43.
- Raica M, Encică S, Motoc A, Cîmpean AM, Scridon T, Bârsan M (2006). Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus. *Ann Anat* 188: 345–52.
- Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413–92.
- Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 20: 3427–36.
- Rassner U, Feingold KR, Crumrine DA, Elias PM (1999). Coordinate assembly of lipids and enzyme proteins into epidermal lamellar bodies. *Tissue Cell* 31: 489–98.
- Ratchford AM, Baker OJ, Camden JM, Rikka S, Petris MJ, Seye CI, Erb L, Weisman GA (2010). P2Y2 nucleotide receptors mediate metalloprotease-dependent phosphorylation of epidermal growth factor receptor and ErbB3 in human salivary gland cells. *J Biol Chem* 285: 7545–55.
- Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *J Biol Chem* 275: 14608–14.
- Reiss K, Bhakdi S (2012). Pore-forming bacterial toxins and antimicrobial peptides as modulators of ADAM function. *Med Microbiol Immunol* 201: 419–26.
- Reiss K, Meyer-Hoffert U, Fischer J, Sperrhacker M, Wu Z, Dimitrieva O, Krenek P, Suchanova S, Buryova H, Brauer R, Sedlacek R (2011). Expression and regulation of murine SPINK12, a potential orthologue of human LEKT12. *Exp Dermatol* 20: 905–10.

- Rodero MP, Khosrotehrani K (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol* 3: 643–53.
- Rosenberg HF, Domachowske JB (2001). Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol* 70: 691–8.
- Rothenberg ME, Hogan SP (2006). The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24: 147–74.
- Sahin U, Blobel CP (2007). Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17. *FEBS Lett* 581: 41–4.
- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou H-M, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164: 769–79.
- Sander C, Schneider R (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* 9: 56–68.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463–7.
- Sass V, Pag U, Tossi A, Bierbaum G, Sahl H-G (2008). Mode of action of human beta-defensin 3 against *Staphylococcus aureus* and transcriptional analysis of responses to defensin challenge. *Int J Med Microbiol* 298: 619–33.
- Sass V, Schneider T, Wilmes M, Körner C, Tossi A, Novikova N, Shamova O, Sahl H-G (2010). Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect Immun* 78: 2793–800.
- Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K (2005). New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immunol* 35: 1886–95.
- Schäfer B, Gschwind A, Ullrich A (2004). Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 23: 991–9.
- Schauber J, Dorschner RA, Yamasaki K, Brouha B, Gallo RL (2006). Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology* 118: 509–19.
- Schauber J, Gallo RL (2007). Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127: 510–2.
- Schechter NM, Choi E-J, Wang Z-M, Hanakawa Y, Stanley JR, Kang Y, Clayman GL, Jayakumar A (2005). Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol Chem* 386: 1173–84.
- Scheuplein RJ, Blank IH (1971). Permeability of the skin. *Physiol Rev* 51: 702–47.
- Schlöndorff J, Becherer JD, Blobel CP (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* 347: 131–8.
- Scholl FA, Dumesic PA, Barragan DI, Harada K, Bissonauth V, Charron J, Khavari PA (2007). Mek1/2 MAPK kinases are essential for Mammalian development, homeostasis, and Raf-induced hyperplasia. *Dev Cell* 12: 615–29.

- Schröder JM (1997). Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease. *Methods Enzymol* 288: 266–97.
- Schröder JM, Harder J (1999). Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 645–51.
- Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, Reiss K (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 102: 1192–201.
- Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M, Downward J (2001). Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 15: 981–94.
- Seals DF, Courtneidge S a (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17: 7–30.
- Segre J (2003). Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier. *Curr Opin Cell Biol* 15: 776–82.
- Seok J, Warren HS, Cuenca AG, *et al.* (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 3507–12.
- Serre G, Mills V, Haftek M, Vincent C, Croute F, Réano A, Ouhayoun JP, Bettinger S, Soleilhavoup JP (1991). Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol* 97: 1061–72.
- Shaykhiev R, Sierigk J, Herr C, Krasteva G, Kummer W, Bals R (2010). The antimicrobial peptide cathelicidin enhances activation of lung epithelial cells by LPS. *FASEB J* 24: 4756–66.
- Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, Folkman J (1993). Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 259: 1604–7.
- Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ (1989). Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 243: 1074–6.
- Sibilia M, Wagner EF (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science (80- )* 269: 234–8.
- Simanski M, Dressel S, Gläser R, Harder J (2010). RNase 7 protects healthy skin from *Staphylococcus aureus* colonization. *J Invest Dermatol* 130: 2836–8.
- Simon D, Hoesli S, Roth N, Staedler S, Yousefi S, Simon H-U (2011). Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* 127: 194–9.
- Simon D, Simon H-U (2007). Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 119: 1291–300.
- Simon D, Wardlaw A, Rothenberg ME (2010). Organ-specific eosinophilic disorders of the skin, lung, and gastrointestinal tract. *J Allergy Clin Immunol* 126: 3–13; quiz 14–5.
- Simpson AJ, Maxwell AI, Govan JR, Haslett C, Sallenave JM (1999). Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett* 452: 309–13.
- Singer AJ, Clark RA (1999). Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med* 341: 738–46.
- Sluyter R, Wiley JS (2002). Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X7 receptors. *Int Immunol* 14: 1415–21.

- Smith D, Smith J, Wong S, DeShazo R (1995). Netherton's syndrome: A syndrome of elevated IgE and characteristic skin and hair findings. *J Allergy Clin Immunol* 95: 116–23.
- Söbirk SK, Mörgelin M, Egesten A, Bates P, Shannon O, Collin M (2013). Human chemokines as antimicrobial peptides with direct parasitocidal effect on *Leishmania mexicana* in vitro. *PLoS One* 8: e58129.
- Sommer A, Fries A, Cornelsen I, Speck N, Koch-Nolte F, Gimpl G, Andrä J, Bhakdi S, Reiss K (2012). Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. *J Biol Chem* 287: 23678–89.
- Sondell B, Thornell LE, Egelrud T (1995). Evidence that stratum corneum chymotryptic enzyme is transported to the stratum corneum extracellular space via lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 104: 819–23.
- Sotiropoulou PA, Blanpain C (2012). Development and homeostasis of the skin epidermis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a008383.
- Stefansson K, Brattsand M, Ny A, Glas B, Egelrud T (2006). Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biol Chem* 387: 761–8.
- Stefansson K, Brattsand M, Roosterman D, Kempkes C, Bocheva G, Steinhoff M, Egelrud T (2008). Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *J Invest Dermatol* 128: 18–25.
- Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA (1981). Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 4097–101.
- Stokes DL (2007). Desmosomes from a structural perspective. *Curr Opin Cell Biol* 19: 565–71.
- Stoll SW, Johnson JL, Bhasin A, Johnston A, Gudjonsson JE, Rittié L, Elder JT (2010). Metalloproteinase-mediated, context-dependent function of amphiregulin and HB-EGF in human keratinocytes and skin. *J Invest Dermatol* 130: 295–304.
- Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, Sleeman MA, Watson JD, Kumble KD (2001). Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem* 276: 18265–71.
- Suzuki Y, Nomura J, Koyama J, Horii I (1994). The role of proteases in stratum corneum: involvement in stratum corneum desquamation. *Arch Dermatol Res* 286: 249–53.
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo J-L, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325: 612–6.
- Tartaglia-Polcini A, Bonnart C, Micheloni A, Cianfarani F, Andrè A, Zambruno G, Hovnanian A, D'Alessio M (2006). SPINK5, the defective gene in netherton syndrome, encodes multiple LEKTI isoforms derived from alternative pre-mRNA processing. *J Invest Dermatol* 126: 315–24.
- Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, Drijfhout JW, Sørensen OE, Borregaard N, Rabe KF, Hiemstra PS (2003). The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol* 171: 6690–6.

- Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K (2005). Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol* 175: 4662–8.
- Tomasinsig L, Pizzirani C, Skerlavaj B, Pellegatti P, Gulinelli S, Tossi A, Di Virgilio F, Zanetti M (2008). The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *J Biol Chem* 283: 30471–81.
- Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takayama Y, Isobe T, Okuyama T, Hanada K (1995). Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 270: 7495–500.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26: 171–6.
- Walley a J, Chavanas S, Moffatt MF, Esnouf RM, Ubhi B, Lawrence R, Wong K, Abecasis GR, Jones EY, Harper JI, Hovnanian A, Cookson WO (2001). Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet* 29: 175–8.
- Wang G (2008). Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J Biol Chem* 283: 32637–43.
- Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH, Hanrahan JH (2004). Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 173: 2909–12.
- Wang X, Pasolli HA, Williams T, Fuchs E (2008). AP-2 factors act in concert with Notch to orchestrate terminal differentiation in skin epidermis. *J Cell Biol* 183: 37–48.
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5578–82.
- Watanabe N, Wang Y-H, Lee HK, Ito T, Wang Y-H, Cao W, Liu Y-J (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436: 1181–5.
- Watkinson A, Harding C, Moore A, Coan P (2001). Water modulation of stratum corneum chymotryptic enzyme activity and desquamation. *Arch Dermatol Res* 293: 470–6.
- Weber G, Heilborn JD, Chamorro Jimenez CI, Hammarsjo A, Törmä H, Stahle M (2005). Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. *J Invest Dermatol* 124: 1080–2.
- Wells A (1999). EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 637–43.
- Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E (1998). Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 904–9.
- Willems SH, Tape CJ, Stanley PL, Taylor NA, Mills IG, Neal DE, McCafferty J, Murphy G (2010). Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J* 428: 439–50.
- Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila A-PJ, Primakoff P, Myles DG, White JM (1995). ADAM, a Widely Distributed and Developmentally Regulated Gene Family Encoding Membrane Proteins with A Disintegrin And Metalloprotease Domain. *Dev Biol* 169: 378–83.

- Wu Z (2005). Analysis of Two Human Gene Clusters Involved in Innate Immunity. *Diss UKSH Kiel, Dermatologie Mai*.
- Wu Z, Bartels J, Schröder J-M (2008). Lympho-epithelial-Kazal-type-inhibitor (LEKTI)-2: a novel epithelial peptide antibiotic. *J Invest Dermatol* 128: S178 (Abstr.).
- Xue L, Lucocq J (1998). ERK2 Signalling from Internalised Epidermal Growth Factor Receptor in Broken A431 Cells. *Cell Signal* 10: 339–48.
- Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, Dorschner RA, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Morhenn VB, Gallo RL (2007). Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 13: 975–80.
- Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner R a, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL (2006). Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J* 20: 2068–80.
- Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ (2003). Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 74: 448–55.
- De Yang, Chen Q, Schmidt a P, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 192: 1069–74.
- Yang T, Liang D, Koch PJ, Hohl D, Kheradmand F, Overbeek PA (2004). Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in Spink5<sup>-/-</sup> mice. *Genes Dev* 18: 2354–8.
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127–37.
- Yoon H, Laxmikanthan G, Lee J, Blaber SI, Rodriguez A, Kogot JM, Scarisbrick IA, Blaber M (2007). Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 282: 31852–64.
- Yousef GM, Diamandis EP (2001). The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 22: 184–204.
- Yousef GM, Diamandis EP (2003). An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin Biochem* 36: 443–52.
- Yousefi S, Gold J a, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ, Simon H-U (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14: 949–53.
- Zanetti M, Gennaro R, Romeo D (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 374: 1–5.

## 9 PUBLIKATIONEN

### 9.1 PUBLIKATION 3: CHARAKTERISIERUNG VON HUMANEN SPINK9 ALS STIMULUS ZUR AKTIVIERUNG DES EGF-REZEPTORS VIA P2-REZEPTOR- UND ADAM-AKTIVIERUNG

**SPINK9 Stimulates Metalloprotease/EGFR-Dependent Keratinocyte Migration via Purinergic Receptor Activation.**

**Sperrhacker M**, Fischer J, Wu Z, Klünder S, Sedlacek R, Schroeder JM, Meyer-Hoffert U, Reiss K (2014).

*J Invest Dermatol.* PMID: 24441102.

### 9.2 PUBLIKATION 2: ERSTBESCHREIBUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MURINEM SPINK6

**Characterization of Spink6 in Mouse Skin: The Conserved Inhibitor of Kallikrein-Related Peptidases Is Reduced by Barrier Injury.**

Fischer J, Wu Z, Kantyka T, **Sperrhacker M**, Dimitrieva O, Koblyakova Y, Ahrens K, Graumann N, Baurecht H, Reiss K, Schröder JM, Proksch E, Meyer-Hoffert U (2013).

*J Invest Dermatol.* PMID: 24352040.

### 9.3 PUBLIKATION 1: ERSTBESCHREIBUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MURINEM SPINK12

**Expression and regulation of murine SPINK12, a potential orthologue of human LEKTI2.**

Reiss K, Meyer-Hoffert U, Fischer J, **Sperrhacker M**, Wu Z, Dimitrieva O, Krenek P, Suchanova S, Buryova H, Brauer R, Sedlacek R (2011).

*Exp Dermatol.* 20(11): 905-11. PMID: 21899598.

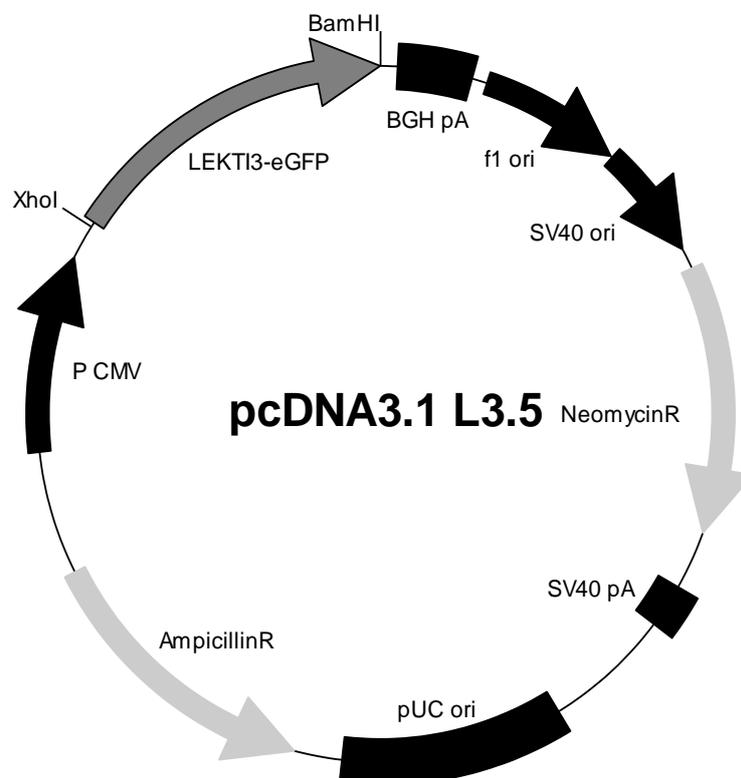


CAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACA  
ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTG  
CTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGT  
CCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCAG  
CTTGAGGATCCGAG  
*BamHI*

### 10.3 AMINOSÄURESEQUENZ VON hSPINK9-eGFP

MYPYDVPDYARATAIVLLLLALTLATMFSIECAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHHMYDPICGSDGKTYKND  
 HA-Tag      Signalpeptid      hSPINK9      Kazal  
FFCskVKKTDGTLKfVHFgKcPPVskGEELFTGVVPIlVELDGDVNGHKfSVsGEGEGDATYgKLTLKfICTTG  
 Spacer  
KLPVPWPTLVTTlTYGVQCFsRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKfEGDTLVNRIEL  
 eGFP  
KGIDFKEDGNILGHKLEYNYNshNVYIMADKQKNGIKVNFkIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH  
YLSTQsALSKDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYKsGLRSA

### 10.4 VEKTORKARTE VON pCDNA3.1 L3.5



## 10.5 GENSEQUENZ VON hSPINK6-eGFP

AGACTCGAGGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAAACTGTCAGGCATGTTTCTGCTCCTCTC  
*XhoI*    *Kozak*    *HA-Tag*

TCTGGCTCTTTTCTGCTTTTTAACAGGTGTCTTCAGTCAGGGAGGACAGGTTGACTGTGGTGAGTTCAGGACA  
CCAAGGTCTACTGCACTCGGGAATCTAACCCACACTGTGGCTCTGATGGCCAGACATATGGCAATAAATGTGCC  
*hspink6*

TTCTGTAAGGCCATAGTGAAAAGTGGTGGAAAGATTAGCCTAAAGCATCCTGGAAAATGCCACCAGTGAGCAA  
*spacer*

GGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA  
GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAG  
CTGCCCCTGCCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCA  
CATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGG  
ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG  
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTA  
*egfp*

TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG  
*hSPINK6-eGFP*

TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTAC  
CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGAC  
CGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCAGCTTGAGGATCCGAG  
*BamHI*

## 10.6 AMINOSÄURESEQUENZ VON hSPINK6-eGFP

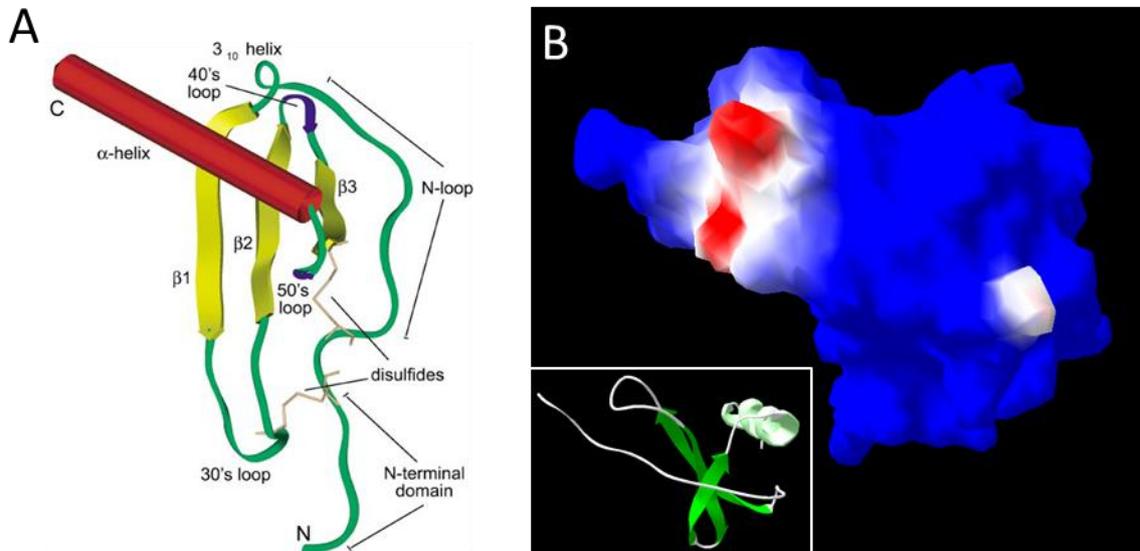
MYPYDVPDYAKLSGMFLLLSLALFCFLTGVFSQGGQVDCGEFQDTKVYCTRESNPHCGSDGQTYGNKCAFCKAI  
*HA-Tag*    *Signalpeptid*    *hSPINK6*    *Kazal*

VKSGGKISLKHPGKCPPVSKGEELFTGVVPIVLVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPW  
*Spacer*

PTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFK  
*eGFP*

EDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS  
ALSKDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYKSGLRSA

## 10.7 CHEMOKINE



**Abbildung 32: 3D-Struktur von Chemokinen.** (A) Gezeigt sind die Strukturelemente von CXCL8, welche in allen Chemokinen identisch sind (Fernandez and Lolis 2002). (B) stellt die Oberfläche eines CCL20-Monomers (großes Bild) und dessen Sekundärstrukturelemente (kleines Bild unten rechts) dar. In rot sind negative Ladungen und in blau positive Ladungen dargestellt (Chan *et al.* 2008).

# 11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut. ....  | 2  |
| Abbildung 2: AMPs sind kationische Peptide. ....  | 10 |
| Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Kazal-Motivs. ....  | 15 |
| Abbildung 4: Die Aktivität der KLKs, welche die Desquamation initiieren wird durch LEKTI1 reguliert. ....   | 17 |
| Abbildung 5: Zellfraktionierung von Blut durch Dichtegradientenzentrifugation. ....   | 29 |
| Abbildung 6: Schematische Durchführung eines <i>chemotaxis assays</i> . ....  | 33 |
| Abbildung 7: Strategie zur Klonierung von hSPINK9/6-Überexpressionsvektoren. ....   | 39 |
| Abbildung 8: Organisation der <i>spink</i> -Gene, Transkription und Translation. ....   | 50 |
| Abbildung 9: Vergleich von humanen und murinen LEKTIs und SPINKs. ....  | 51 |
| Abbildung 10: Die Strukturen von hSPINK9 und hSPINK6 zeichnen sich neben der kationischen Ladung durch drei $\beta$ -Faltblätter und eine $\alpha$ -Helix aus. .... | 52 |
| Abbildung 11: Expression von hSPINK9 und hSPINK6 in der Haut. ....  | 54 |
| Abbildung 12: Expression von hSPINK9 und hSPINK6 in lymphatischen Geweben. ....   | 55 |
| Abbildung 13: <i>Western blot</i> zur Untersuchung von hSPINK9 und hSPINK6 in Lysaten. ....   | 56 |
| Abbildung 14: Induzierbare mRNA-Expression der humanen SPINK9/6-Gene <i>hspink9</i> und <i>hspink6</i> . ....   | 57 |
| Abbildung 15: Induzierbare mRNA-Expression der murinen Gene <i>mspink12</i> und <i>mspink6</i> . ....   | 59 |
| Abbildung 16: hSPINK9 und hSPINK6 sind vesikulär lokalisiert und werden konstitutiv sekretiert. ....  | 61 |
| Abbildung 17: Stimulierbare Sekretion von hSPINK9 und hSPINK6. ....   | 62 |
| Abbildung 18: Die Migration von Keratinozyten wird von rekombinantem hSPINK9 gefördert, jedoch nicht von rhSPINK6. ....   | 64 |
| Abbildung 19: rhSPINK9 stimuliert Keratinozyten über die Aktivierung von EGFR und die Phosphorylierung von ERK1/2. ....   | 66 |
| Abbildung 20: hSPINK9 bindet nicht direkt am EGFR. ....   | 67 |
| Abbildung 21: Die durch rhSPINK9 EGFR-abhängige ERK1/2-Aktivierung ist Metalloprotease-abhängig. ....   | 68 |
| Abbildung 22: Die durch rhSPINK9 induzierte Keratinozytenmigration ist EGFR-abhängig und wird durch ADAM-Aktivität vermittelt. ....                                 | 69 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 23: Die durch rhSPINK9-induzierte Metalloprotease- und EGFR-vermittelte Keratinozyten-stimulation ist von P2-Rezeptoren und nicht von GPCRs abhängig..... | 70 |
| Abbildung 24: In epithelialen Zellen sind P2-Rezeptoren bei der hSPINK9-induzierten ERK1/2/EGFR-Aktivierung essentiell. ....  | 71 |
| Abbildung 25: Die natürlich vorkommenden hSPINK9-Formen aktivieren ebenfalls Keratinozyten und ihre Wirkung ist auch P2-Rezeptor-abhängig. ....                     | 72 |
| Abbildung 26: hSPINK9 beeinflusst die Differenzierung von Keratinozyten nicht.. ....  | 73 |
| Abbildung 27: hSPINK9 stimuliert die Expression von KLK5 in Keratinozyten. ....   | 74 |
| Abbildung 28: rhSPINK9 wirkt als Chemoattraktant auf Immunzellen indem es die Motilität der Zellen erhöht.. ....  | 76 |
| Abbildung 29: hSPINK9 wird von Eosinophilen exprimiert.. ....   | 78 |
| Abbildung 30: hSPINK9 bindet an DNA. ....   | 79 |
| Abbildung 31: Schematische Darstellung der Wirkung von hSPINK9 auf Keratinozyten.....   | 92 |
| Abbildung 32: 3D-Struktur von Chemkinen. ....   | XI |

## 12 TABELLENVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Eingesetzte Inhibitoren.....  | 31 |
| Tabelle 2: Verwendete Antikörper für Immunzytochemie und Fluoreszenzfärbung..... | 35 |
| Tabelle 3: Zur Klonierung verwendete Primer.....                                 | 40 |
| Tabelle 4: Eingesetzte Real-time PCR Primer.....                                 | 42 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....                         | 44 |
| Tabelle 6: verwendete Antikörper für <i>Western Blot</i> .....                   | 46 |
| Tabelle 7: Murine putative Orthologe von humanem SPINK9 und -6.....              | 52 |

## 13 DANKSAGUNG

Zunächst danke ich **Prof. Dr. Thomas Roeder** für die unkomplizierte Übernahme meiner offiziellen Betreuung und dass er das Gutachten für diese Arbeit übernommen hat.

Frau **Prof. Dr. Karina Reiß** möchte ich für die Vergabe des interessanten, breitgefächerten Themas danken und dass sie es mir ermöglicht hat meine Promotion in ihrer Abreitsgruppe zu verfassen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen, den gefräßigen Reiss-Schrecken - **Björn Ahrens, Astrid Evers, Nancy Speck, Felix Kordowski, Anselm Sommer, Marie Düppe** und **Joscha Büch**. Sicherlich von Beginn an eine der „größten Herausforderungen“ und bis heute immer wieder erheiternd, war die gegenseitige linguistische Weiterbildung in sächsischer und norddeutscher Sprache sowie die weiteren sprachlichen Ausfälle, die mir sehr fehlen werden! Danke für die fachlichen Diskussionen im Labor und Büro, welche oft mit Spaß und Witz gepaart waren, ebenso für die schöne Zeit ausserhalb der Derma wie beispielsweise bei Retreats, Grill- oder Singstarabenden, welche mir lange in Erinnerung bleiben werden.

Mein besonderer Dank gilt **Nancy**, die zu jeder Zeit für mich da war und sich aufopferungsvoll der Korrektur meiner Arbeit gewidmet hat. Du bist mir eine echt gute Freundin geworden. Vielen Dank!

Und dir **Björni**, einen lieben Dank dafür, dass du immer ein Auge auf die Organisation unser Labores hattest.

Danken möchte ich auch **Sarah Klünder**, die ich während ihrer Diplomarbeit betreut habe. Durch ihre offene, interessierte und pfiffige Art, wurde mir bewusst, dass auch das Anleiten und Betreuen mir besonders Freude macht.

Desweiteren möchte ich mich bei **Britta Hansmann, Uli Gerstel, Jan Fischer** und allen anderen Kollegen des sechstens Stocks für die nette Atmosphäre bedanken.

Großer Dank gilt meiner **Familie**, durch deren Unterstützung mein Studium möglich war und die mir jederzeit bedingungslos Rückhalt geben. Meiner Schwester **Tina** danke ich, dass sie trotz des fehlenden fachlichen Verständnisses auf der Suche nach Rechtschreib- und Kommafehlern war.

Von ganzen Herzen möchte ich **Martin Hahn** danken. Er war zu jeder Zeit für mich da und hat mir den Rücken gestärkt.

## 14 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Maria Sperrhacke, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen akademischen Betreuer, selbst und selbstständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Ich habe zu dem Thema noch keine Zulassung zur Promotion an anderer Stelle beantragt oder und in noch keiner anderen Universität eine Dissertation zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Desweiteren habe ich an keiner anderen Hochschule oder keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsvorhaben endgültig nicht bestanden und mir wurde noch kein akademischer Grad entzogen.

Teile dieser Arbeit wurden in dem folgenden Artikeln veröffentlicht:

**SPERRHACKE M**, FISCHER J, WU Z, KLÜNDER S, SEDLACEK R, SCHROEDER JM, MEYER-HOFFERT U, REISS K (2014). SPINK9 Stimulates Metalloprotease/EGFR-Dependent Keratinocyte Migration via Purinergic Receptor Activation. *J Invest Dermatol*. PMID: 24441102.

FISCHER J, WU Z, KANTYKA T, **SPERRHACKE M**, DIMITRIEVA O, KOBLYAKOVA Y, AHRENS K, GRAUMANN N, BAURECHT H, REISS K, SCHRÖDER JM, PROKSCH E, MEYER-HOFFERT U (2013). Characterization of Spink6 in Mouse Skin: The Conserved Inhibitor of Kallikrein-Related Peptidases Is Reduced by Barrier Injury. *J Invest Dermatol*. PMID: 24352040.

REISS K, MEYER-HOFFERT U, FISCHER J, **SPERRHACKE M**, WU Z, DIMITRIEVA O, KRENEK P, SUCHANOVA S, BURYOVA H, BRAUER R, SEDLACEK R (2011). Expression and Regulation of murine SPINK12, a Potential Orthologue of human LEKT12. *Exp Dermatol*. 20(11): 905-11. PMID: 21899598.

Kiel,

---

Maria Sperrhacke

## 15 LEBENSLAUF

|                     |                   |
|---------------------|-------------------|
| Name                | Maria Sperrhacker |
| geboren am          | 20.09.1984        |
| in                  | Dresden           |
| Staatsangehörigkeit | deutsch           |

### HOCHSCHULAUSBILDUNG

|           |   |
|-----------|---|
| seit 2009 | DOKTORARBEIT an der Klinik für Dermatologie des UKSH, Campus Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karina Reiß unter externer Betreuung von Prof. Dr. Thomas Roeder<br><br>„Charakterisierung der Serin-Protease-Inhibitoren SPINK9 und SPINK6“                     |
| 2007-2008 | DIPLOMARBEIT am Institut für Mikrobiologie der technischen Universität in der Arbeitsgruppe Allgemeine Mikrobiologie von Prof. Dr. Gerold Barth<br><br>„Entwicklung neuer Wirts-Vektor-Systeme zur Selektion von Transformanden der Hefe <i>Yarrowia lipolytica</i> “ |
| 2003-2008 | BIOLOGIESTUDIUM (DIPL.), Mikrobiologie und Genetik, Technische Universität Dresden  |

### SCHULAUSBILDUNG

|           |  |
|-----------|--|
| 2003      | ABITUR, Leistungskurse: Biologie und Mathematik                                |
| 1995-2003 | GYMNASIUM, Erich-Wustmann-Gymnasium, Dresden<br>Naturwissenschaftliches Profil |
| 1991-1995 | Grundschule, Dresden   |