

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

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON LORICRIN ALS
PRECURSOR EINES BACTERIOCIN-ANALOGONS**

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

Vorgelegt von
LOUIS FROESEWITTE
aus Preetz

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jens-Michael Schröder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Björn Rabe, Biochemisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2017

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 28.08.2017

gez. Prof. Dr. Johann Roider, Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Für meine Mama

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE HAUT	1
1.2 DER AUFBAU DER MENSCHLICHEN HAUT	1
1.3 DER EPIDERMAL E DIFFERENZIERUNGSKOMPLEX	4
1.4 DER <i>CORNIFIED ENVELOPE</i>	4
1.5 LORICRIN	5
1.6 RIBOSOMAL SYNTHETISIERTE, POSTTRANSLATIONAL MODIFIZIERTE PEPTIDE (RIPPS)	5
1.6.1 <i>Thiazol/Oxazol-modifizierte Microcine (TOMMs)</i>	6
1.6.1.1 Microcin B17 (MccB17)	6
1.7 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....	7
2 MATERIAL UND METHODEN.....	8
2.1 MATERIAL.....	8
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	8
2.1.2 <i>Vektoren</i>	8
2.1.3 <i>Oligonukleotide</i>	8
2.1.3.1 Oligonukleotide für die Nested-PCR	9
2.1.3.2 Oligonukleotide für das Profinity eXact pPal7-System.....	9
2.1.3.3 Oligonukleotide für die Colony-Check-PCR und Sequenzierungen	9
2.1.4 <i>Enzyme</i>	9
2.1.5 <i>Puffer und Lösungen</i>	9
2.1.6 <i>Nährmedien</i>	10
2.1.7 <i>Einwegmaterial</i>	11
2.1.8 <i>Kits</i>	11
2.1.9 <i>Geräte</i>	11
2.1.10 <i>Mikroorganismen</i>	13
2.1.11 <i>Software</i>	14
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	14
2.2.1 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	14

2.2.1.1	Design der Oligonukleotide für die Nested-PCR	14
2.2.1.2	Amplifikation der zu klonierenden Sequenzen mittels Nested-PCR	16
2.2.1.3	Colony-Check-PCR zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung	18
2.2.2	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	19
2.2.3	<i>Gel-Extraktion</i>	20
2.2.4	<i>Restriktionshydrolyse</i>	20
2.2.5	<i>Ligation</i>	22
2.2.6	<i>Herstellung elektrokompenter E. coli Zellen</i>	23
2.2.7	<i>Transformation</i>	24
2.2.8	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i>	26
2.2.9	<i>DNA-Sequenzierung</i>	26
2.2.10	<i>Herstellung eines Glycerol-Stocks der positiv sequenzierten Kolonie</i>	27
2.3	REKOMBINANTE EXPRESSION VON LORICRIN ₁₋₈₈ IN <i>E. COLI</i>	28
2.3.1	<i>Identifikation von Rare codons</i>	28
2.3.2	<i>Transformation von E. coli Rosetta-Gami™ 2 Zellen</i>	28
2.3.3	<i>Das Profinity eXact™ Protein Purification System</i>	29
2.3.4	<i>Struktur des Expressionsvektors</i>	29
2.3.5	<i>Durchführung der Expression</i>	30
2.3.5.1	Starterkulturen.....	30
2.3.5.2	Photometrische Bestimmung der optischen Bakteriendichte	31
2.3.5.3	Induktion und Zellkultivierung	31
2.3.5.4	Zellaufschluss	32
2.4	CHROMATOGRAPHISCHE AUFREINIGUNG VON LORICRIN ₁₋₈₈	32
2.4.1	<i>Flüssigchromatographie Profinity eXact™ Protein Purification System</i>	33
2.4.1.1	Vorbereiten der Pufferlösungen	33
2.4.1.2	Auftragen der Probe und Waschung.....	33
2.4.1.3	Elution des Fusionsproteins	33
2.4.1.4	Reinigung der Profinity eXact™-Säule.....	34
2.4.2	<i>Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)</i>	34
2.4.2.1	C8-Umkehrphasen-HPLC.....	35
2.4.2.2	C2/C18-Umkehrphasen-HPLC	35
2.5	PROTEINANALYTIK	36
2.5.1	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i>	36
2.5.2	<i>Massenspektrometrie</i>	36
2.6	ANTIMIKROBIELLE TESTVERFAHREN	37
2.6.1	<i>Radialer Plattendiffusionstest</i>	38
3	ERGEBNISSE	40

3.1	REKOMBINANTE EXPRESSION VON LORICRIN ₁₋₈₈	40
3.1.1	Amplifikation der Loricrin ₁₋₈₈ Gensequenz mittels PCR.....	40
3.1.2	Klonierung in das pPal7-System	42
3.1.2.1	Ligation und Transformation in TOP10 <i>E. coli</i> Zellen	44
3.1.2.2	DNA-Sequenzierung Loricrin ₁₋₈₈	45
3.1.2.3	Transformation und Expression in <i>E. coli</i> Rosetta-Gami TM 2 Zellen	45
3.2	AUFREINIGUNG VON LORICRIN ₁₋₈₈	45
3.2.1	„On-Column Digest“ des pPal7-Loricrin ₁₋₈₈ -Fusionsproteins	46
3.2.2	C8 und C2/C18-HPLC	47
3.3	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER AUFGEREINIGTEN LORICRIN ₁₋₈₈ -FRAKTIONEN.....	48
3.4	ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT VON LORICRIN ₁₋₈₈ IM RADIALEN PLATTENDIFFUSIONSTEST	50
4	DISKUSSION	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	54
6	ANHANG	55
6.1	VEKTORKARTE DES pPAL7 EXPRESSIONSVEKTORS	55
6.2	DATENBLATT ROSETTA-GAMI TM 2	56
6.3	SEQUENZEN	56
6.3.1	<i>cDNA und Proteinsequenz des humanen Loricrin</i>	56
6.3.2	<i>Nukleotidsequenz von Loricrin₁₋₈₈</i>	56
6.3.3	<i>Aminosäuresequenz von Loricrin₁₋₈₈</i>	56
7	LITERATUR	57
8	DANKSAGUNG	61
9	LEBENS LAUF	63
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	65

Abkürzungsverzeichnis

A	Desoxyadenin
Abb.	Abbildung
AMP	Antimikrobiell wirksame Peptide
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
B	Beta
BamH	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
Bsa	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Desoxycytidin
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cm	Zentimeter
CV	Column Volume - Säulenvolumen
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisierungs-Massenspektrometrie
FD	Fast Digest
g	Gramm / Erdbeschleunigung
G	Desoxyguanosin
h	Stunden
hBD	Humanes beta-Defensin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IKMB	Institut für klinische Molekularbiologie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
LB	<i>Lysogenic Broth</i>
M	molar

MEK	Minimale Effektive Konzentration
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MS	Massenspektrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD 600	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphate-Buffered Saline Solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFLG	Profilaggrin
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff Ionen Aktivität
pI	Isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Desoxythymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TKA-Wasser	Gereinigtes Laborwasser durch Umkehrosiose u. Filtration
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Einheiten (<i>Units</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V/V	Volumen-zu-Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl--D-Galaktopyranosid

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER AUFBAU DER MENSCHLICHEN EPIDERMIS.....	3
ABBILDUNG 2: SEQUENZVERGLEICH MCCB17-PRECURSOR UND LORICRIN ₁₋₈₈	7
ABBILDUNG 5: ETHIDIUMBROMID-GEFÄRBTES AGAROSEGEL MIT PRODUKTEN DER PRÄ-NESTED PCR	41
ABBILDUNG 6: ETHIDIUMBROMID GEFÄRBTES AGAROSEGEL MIT PRODUKTEN DER NESTED PCR.	42
ABBILDUNG 7: ETHIDIUMBROMID GEFÄRBTES AGAROSEGEL MIT DEM PPAL7 VEKTOR ZIRKULÄR UND LINEARISIERT	43
ABBILDUNG 8: ETHIDIUMBROMID-GEFÄRBTES AGAROSEGEL DER COLONY CHECK PCR	44
ABBILDUNG 9: DNA-SEQUENZIERUNG LORICRIN ₁₋₈₈ (SER29GLY)	45
ABBILDUNG 10: CHROMATOGRAMM DER AUFREINIGUNG UND SPALTUNG DES LORICRIN ₁₋₈₈ -FUSIONSPROTEINS ÜBER DAS PROFINITY EXACT PURIFICATION SYSTEM	47
ABBILDUNG 11: CHROMATOGRAMM EINES C2/C18-HPLC-LAUFES ZUR AUFREINIGUNG VON LOR ₁₋₈₈	48
ABBILDUNG 12: MASSENBESTIMMUNG DER LORICRIN ₁₋₈₈ FRAGMENTE MITTELS QTOF-MASSENSPEKTROMETRIE.	49
ABBILDUNG 13: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PPAL7-EXPRESSIONSVEKTORS	55
ABBILDUNG 14: CERTIFICATE OF ANALYSIS, ROSETTA-GAMI TM 2, NOVAGENE 06/2011	56

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ANTIBIOTIKA-RESISTENZEN DER VERWENDETEN <i>E. COLI</i> -STÄMME	25
TABELLE 2: ANTIBIOTIKA-RESISTENZEN DER VERWENDETEN VEKTOREN	25
TABELLE 3: HÄUFIGE <i>RARE CODONS</i> IN <i>E. COLI</i> (ZHANG ET AL., 1991)	28
TABELLE 4: MÖGLICHE TRIGGER-IONEN DER PROTEASEAKTIVITÄT	29
TABELLE 5: LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR DAS PROFINITY EXACT PROTEIN PURIFICATION SYSTEM	33
TABELLE 6: KULTIVIERUNG DER VERSCHIEDENEN MIKROORGANISMEN IM RADIALDIFFUSIONSTEST	38
TABELLE 7: ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT VON LOR_{1-88} IM RADIALEN PLATTENDIFFUSIONSTEST	50

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut des adulten Menschen besitzt in Abhängigkeit von Körpergröße und Körpergewicht eine Oberfläche von ca. 2 m² (Du BOIS & Du BOIS, 1916) und stellt die direkte Grenzfläche zwischen Körper und Umwelt dar. Bedingt durch diese exponierte Lage muss die Haut in der Lage sein, den Körper sicher gegen Umwelteinflüsse zu schützen und gleichzeitig eine gewisse Durchlässigkeit zur Umwelt zu bewahren, zum Beispiel für die Thermoregulation durch Transpiration. Die Barrierefunktion wird überwiegend durch die Zusammensetzung und Architektur des mehrschichtig verhornenden Plattenepithels sichergestellt. Dieses bietet Schutz gegen mechanische Kräfte, sowie chemische Noxen und verhindert weiterhin einen unkontrollierten Wasserverlust. Die andererseits vorhandene Durchlässigkeit des Integuments dient der Homöostase, wie z.B. der Regulation des Wasserhaushaltes oder der Thermoregulation. Die Haut ist zudem mit einer Vielzahl Rezeptoren versehen, zu denen die Meissner-Tastkörperchen, die Ruffini-Körperchen, die Vater-Pacini-Körperchen und die Merkel-Zellen gehören (Lüllmann-Rauch, 2006). Sie vermitteln über protopathische sowie epikritische Sensibilität die Wahrnehmung verschiedenartiger Reize aus der Umwelt (Druck, Schmerz, Temperatur, Tastsinn, Vibration). Außerdem erfolgt über die Haut auch auswärts gerichtete Kommunikation in Form von Erröten oder Erblassen sowie der Abgabe von Pheromonen. In Zusammenschau der vielfältigen Funktionen von Schutz, Regulation des Wasserhaushaltes sowie den sensorischen und exkretorischen Funktion stellt die Haut die essentielle Grundlage für die Anpassung an das terrestrische Leben dar (Elias, 2005, 2008; Harding, 2004).

1.2 Der Aufbau der menschlichen Haut

Die Hautdecke des Menschen, auch als *Integumentum commune* bezeichnet, lässt sich in die Haut (*Cutis*) und die Unterhaut (*Subcutis*) unterteilen. Die *Cutis* wiederum besteht aus der Oberhaut (*Epidermis*) und der Lederhaut (*Dermis*), die durch eine Basallamina voneinander getrennt sind. Die embryologische Differenzierung der Haut erfolgt aus dem äußeren Keimblatt (Ektoderm), aus dem auch das Nervensystem entsteht und dem mittleren Keimblatt (Mesoderm), aus dem auch die Zellen des Immunsystems hervorgehen. Aus dem Ektoderm entwickeln sich vorwiegend die epithelialen strukturellen Bestandteile der Haut wie

Einleitung

Haare, Nägel und Epidermis. Die Dermis mit der Blutgefäßversorgung entsteht aus dem Mesoderm (Sadler, 2008).

Die Epidermis ist ein mehrschichtig, verhornendes Plattenepithel, das zu über 90 % aus Keratinozyten besteht. Weitere zelluläre Bestandteile sind die Pigment bildenden Melanozyten, die bereits oben genannten Merkel-Zellen, sowie die dem Immunsystem zugehörigen Langerhans-Zellen. Histologisch lässt sich die Epidermis in vier Schichten gliedern, welche die Keratinozyten während ihres circa dreiwöchigen Differenzierungsprozesses durchwandern. Von basal nach superfizial, entsprechend von undifferenziert zu differenziert handelt es sich um folgende Schichten (siehe Abbildung 1):

- *Stratum basale* (Basalzellschicht)
- *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht)
- *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht)
- *Stratum corneum* (Hornschicht)

Das *Stratum basale* besteht aus einer einzelnen Lage hochprismatischer Zellen, die direkt auf der Basallamina aufsitzen. Aus den interfollikulären Stammzellen werden die Zellen der Epidermis gebildet. In einem intakten epidermalen Gefüge finden sich hier daher Mitosefiguren. Durch die kontinuierliche Zellvermehrung in der Basalzellschicht kommt es zur Migration der Keratinozyten nach superfizial. Die folgende Schicht ist das *Stratum spinosum*. Es besteht aus etwa zwei bis fünf Lagen von polygonal geformten Zellen. Aufgrund artifizieller Schrumpfung im Rahmen der Aufarbeitung zur mikroskopischen Analyse zeigen sich Desmosomen-Kontakte besonders deutlich und weisen ein stachelförmiges Erscheinungsbild auf. Weiterhin finden sich die sogenannten Odland-Körperchen. Diese Körperchen werden im nun folgenden *Stratum granulosum* in den Zwischenzellraum abgegeben und bilden einen wichtigen Teil der lipidhaltigen Barriere der späteren Hornschicht. Die Körnerzellschicht besteht aus ungefähr drei Zelllagen, welche die charakterisierenden Keratohyalin granula tragen. Diese stellen die Vorstufen der späteren Keratinmatrix dar. In dieser Schicht kommt es zu weiteren metabolischen Veränderungen. Zellkerne werden zunehmend pyknotisch. Zellorganellen werden degradiert. Die Zellen dehydrieren und die Zellmembran wird durch den sogenannten *cornified envelope* ersetzt, welcher über Korneodesmosomen zusammengehalten wird. Die Veränderungen sind im *Stratum corneum* abgeschlossen. Das Ergebnis sind starre und immobile Zellverbände, die fest untereinander fixiert sind und eine mechanische Barriere darstellen entsprechend dem sogenannten *brick and mortar* Modell (Nemes & Steinert, 1999). Die Korneozyten (Hornzellen) bestehen aus Keratin-Filamenten umgeben von einer amorphen Lipidmatrix; sie sind avital. Die Zahl der Zelllagen variiert in den unterschiedlichen Bereichen der Haut. Im

Einleitung

Bereich von Handinnenflächen und Fußsohlen sind es bis zu 100; in diesem Bereich liegt die sogenannte Leistenhaut. Im übrigen Bereich des Körpers liegt die sogenannte Felderhaut vor, hier sind es etwa 25 Zellschichten (Lüllmann-Rauch, 2006). Die gesetzmäßige Veränderung der Keratinozyten von basal nach superfizial wird als terminale Differenzierung bezeichnet und dauert in etwa zwei bis vier Wochen. Während der Differenzierung erfolgt die verstärkte Expression unterschiedlicher Proteine, von denen die Vielzahl zu dem sogenannten epidermalen Differenzierungskomplex gehören (siehe 1.3.).



Abbildung 1: Schematischer Aufbau der menschlichen Epidermis

Die menschliche Epidermis lässt sich in die folgenden vier Schichten unterteilen (von basal nach superfizial): *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulare* und *Stratum corneum*. Das Stratum basale ist durch eine Basallamina, hier als einfache Linie dargestellt, von der Dermis getrennt. Über Hemidesmosomen (HD) ist das Stratum basale an Kollagenfasern Typ III (Koll III) verankert. Die Zell-Zell-Adhäsion erfolgt über Desmosomen (D). (M) Melanozyt. Nicht dargestellt sind die zum Immunsystem gehörenden Langerhans-Zellen.

Das unterhalb der Epidermis liegende Gewebe, welches sich in die Tiefe bis hin zum subkutanen Bindegewebe erstreckt wird als Dermis bezeichnet. Hier finden sich terminale Blutgefäße, Nerven und elastisches Bindegewebe. Die zellulären Hauptbestandteile sind unter anderem Fibroblasten, Mastzellen und Meissner-Tastkörperchen, die in einer Grundsubstanz aus Proteoglykanen eingebettet sind (Lüllmann-Rauch, 2006).

In der Subkutis sind vor allem die epifaszialen Leitungsbahnen in das lockere Binde- und Fettgewebe eingefasst. Insbesondere das Fettgewebe zeigt ein von den unterschiedlichen Körperregionen und dem Geschlecht und Alter abhängiges Verteilungsmuster und dient der

Einleitung

Energiespeicherung, Isolation, Druckpolster oder auch als sogenanntes Baufett (z.B. orbitales Fettgewebe).

1.3 Der epidermale Differenzierungskomplex

Während der terminalen Differenzierung erfolgt die Expression spezifischer Proteine, die im sogenannten epidermalen Differenzierungskomplex kodiert werden (siehe 1.2). Hierunter versteht man ein Gencluster, also auf einem Chromosom dicht beieinander liegende Genfamilien, die sich durch eine deutliche Sequenzhomologie auszeichnen. Die unter anderem an der Ausbildung der Epidermis beteiligten Proteine werden zu einem großen Teil in der Region 1q21.3 codiert (Hohl, 1990; Kalinin et al., 2002; Marenholz et al., 1996; Volz et al., 1993). Diese Proteine lassen sich verschiedenen Proteinfamilien zuordnen, so dass man dies auch als Genkomplex bezeichnet. Aus diesem Grund wird die Region 1q21.3 auch als epidermaler Differenzierungskomplex bezeichnet (Mischke et al., 1996).

Die Proteine die im epidermalen Differenzierungskomplex kodiert werden lassen sich im Wesentlichen vier Familien zuordnen:

- S100 Proteine
- *Late cornified Envelope* Proteine
- *Cornified Cell Envelope Precursor* Proteine
- *S100 Fused Type* Proteine

Zu der S100 Fused Type Familie gehören Cornulin, Filaggrin, Filaggrin-2, Hornerin, Repetin, Trichohyalin und Trichohyalin-like1. Diese Proteine weisen zusätzlich Sequenzmerkmale der *Cornified Cell Envelope Precursor* Proteine auf. Charakteristisch für die S100 Proteine sind die namensgebende S100-Domäne und die 2 Ca²⁺ bindende EF-Hand-Domäne. Loricrin gehört zu den *Cornified Cell Envelope Precursor* Proteinen. Diese zeichnen sich durch eine unterschiedliche Anzahl an Tandemsequenzrepetitionen aus (Candi et al., 2005).

1.4 Der *cornified Envelope*

Der *cornified Envelope* ist eine etwa 14-15 nm dicke, kompakte und im wässrigen Medium schwer lösliche Struktur die die Zellmembran der Korneozyten ersetzt (siehe 1.2), die sich mehrheitlich aus folgenden Proteinen zusammensetzt: Involucrin, Filaggrin, *small proline rich proteins* (SPR), Repetin und weiteren Proteinen der S100 Familie (Krieg et al., 1997; Marekov & Marekov, 1995). Das am häufigsten vorkommende Protein ist Loricrin. Die Gene

Einleitung

der genannten Proteine befinden sich im Cluster des epidermalen Differenzierungskomplexes, Chromosom 1q21 (siehe 1.3). Die Entwicklung des *cornified envelopes* während der terminalen Differenzierung stellt eine spezielle Form des programmierten Zelltodes dar (Candi et al., 2005). Vermutlich ist ein Anstieg der Calciumkonzentration für eine Vernetzung von Involucrin-Molekülen verantwortlich, die an die Zellmembran gebunden werden und eine Art Grundgerüst bilden. Im Anschluss werden vor allem Loricrin, die SPR's und Repetin über Disulfidbrücken und Isopeptidbindungen mit N-(gamma-glutamyl)-Lysin mit dem Grundgerüst verbunden. Keratin-Filamente bilden zusammen mit Filaggrin weitere Komplexe, die ebenfalls mit dem Involucrin-Grundgerüst vernetzt werden (Kalinin et al., 2002).

1.5 Loricrin

Loricrin vom lateinischen *lorica* (= Rüstung, Panzer) weist in seinem Gen mit circa 85 % den höchsten Cytosin- und Guaningehalt aller bekannten humanen Gene auf (Kalinin et al., 2002; Yoneda et al., 1992). Das Gen ist im Bereich des epidermalen Differenzierungskomplexes im Chromosomenabschnitt 1q21 lokalisiert (siehe 1.3), weist eine Länge von 2,4 kb auf und besteht aus zwei Exons (Marenholz et al., 1996). Die kodierende Sequenz beträgt 959 bp. Es sind mehrere Sequenzvariationen bekannt, die zur Insertion von vier Aminosäuren in den Bereich der Glycin-, Serin-, Cystein-Schleifen führen, jedoch ohne Krankheitswert zu sein scheinen und nicht die Funktion des Proteins beeinträchtigen (Dreier et al., 2007; Schmuth et al., 2004; Yoneda et al., 1992). Hiervon abgesehen sind Mutationen bekannt, die mit dem Auftreten ichthyosiformer Keratosen assoziiert sind (A Ishida-Yamamoto et al., 1997; Akemi Ishida-Yamamoto, 2003; O'Driscoll et al., 2002).

Loricrin selbst hat eine Größe von 26 kDa und weist einen basischen pI von 8,5 sowie eine hochgradige Unlöslichkeit auf. Strukturell besteht es aus vielen repetitiven Einheiten von Glycin-, Serin-, Cystein-Schleifen (*loops*), die von glutamin- und serinreichen Abschnitten unterbrochen werden (Hohl et al., 1991). Die weiteren Aminosäuren sind Tyrosin, Phenylalanin und Isoleucin. Loricrin stellt den Hauptbestandteil des *cornified envelopes* dar und wird erstmalig im *Stratum granulosum* exprimiert.

1.6 Ribosomal synthetisierte, posttranslational modifizierte Peptide (RiPPs)

RiPPs stellen eine funktional heterogene Gruppe der sog. *natural Products* dar, deren Nomenklatur sich sowohl an den produzierenden Organismen (z.B. Proteusine, Botromycine) als auch an der biologischen Aktivität orientiert (z.B. Bacteriozine). Nahezu

Einleitung

alle der RiPPs werden initial als längeres Vorläuferpeptid mit ca. 20 bis 110 Aminosäuren synthetisiert. Von besonderer Bedeutung ist die N-terminale Sequenz, die als Erkennungssequenz für die posttranslational modifizierenden Enzyme als auch für den Export aus dem Zytosol fungiert. Nach der Modifikation zeigt sich vielfach eine antimikrobielle Aktivität (Arnison et al., 2013).

1.6.1 Thiazol/Oxazol-modifizierte Microcine (TOMMs)

Die Thiazol/Oxazol-modifizierten Microcine stellen eine der großen Gruppen posttranslational modifizierter Peptide neben z.B. den Lanthipeptiden dar (Melby et al., 2011). Der Begriff Microcin bezeichnet ribosomal synthetisierte, antimikrobiell aktive Peptide der *Enterobacteriaceae* insbesondere *E. coli* mit einer Masse von weniger als 10 kDa. Hierbei werden Microcine der Klasse I mit einer Masse <5 kDa (z.B. Microcin B17, J25, Microcin C) und Microcine der Klasse II mit einer Masse von 5-10 kDa unterschieden. Zu der Klasse II gehören u.a. die Microcine L,V,N, die ohne posttranslationale Modifikation gebildet werden (Arnison et al., 2013). Die meisten Microcine sind Plasmid kodiert. Das Gen-Cluster enthält das *precursor* Peptid, ein Selbstimmunitätsgen, die für die posttranslationale Modifikation notwendigen Enzyme sowie ein Exportsystem. Charakteristisch für die TOMMs sind die namensgebenden posttranslational gebildeten Thiazol- und/oder Oxazol-Heterozyklen auf Basis der Seitenketten der Aminosäuren Glycin, Cystein sowie Serin. Diese Heterozyklen finden sich bei einer Reihe bioaktiver Substanzen wie Thiostrepton, Trunkamide, Goadsporin, Ritonavir und Microcin B17. Die Microcine weisen eine antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien, insbesondere Enterobakterien auf. Sie werden meist über Siderophor-Rezeptoren aufgenommen und weisen eine Wirksamkeit bereits im nanomolaren Bereich auf.

1.6.1.1 Microcin B17 (MccB17)

Das Microcin B17 ist einer der bekanntesten Vertreter der TOMMs. Es wird von *E. coli* Stämmen produziert, die das 70 kb große Plasmid pMccB17 beherbergen (Davagnino et al., 1986). Aus einem 69 Aminosäuren langen Vorläuferpeptid (McbA) wird über einen trimeren Synthetasekomplex aus McbB (Cyclodehydratase), McbC (Dehydrogenase) und McbD das fertige Peptid mit jeweils 4 Oxazol- und 4 Thiazolringen, die von N- nach C-terminal gebildet werden, erzeugt (Li et al., 1996). Entscheidend für die posttranslationale Modifikation scheint insbesondere die N-terminale *Linker*-Region, bestehend aus 10 Glycinen zu sein (Jill C. Milne et al., 1999; Oman & van der Donk, 2010). Die antimikrobielle Aktivität des MccB17

Einleitung

beruht auf der Inhibierung der DNA-Gyrase, indem der Komplex aus DNA und Gyrase als sog. *Cleavage Complex* ähnlich wie bei den Fluorchinolonen stabilisiert wird (Heddle et al., 2001; Thompson et al., 2014)

1.7 Fragestellung der Arbeit

Der Sequenzvergleich zwischen verschiedenen RiPPs und Strukturproteinen der Haut zeigte für das MccB17-Vorläuferpeptid und Loricrin ausgeprägte Ähnlichkeiten in der Anordnung der für die Bildung der Oxazole notwendigen Glycin-Serin-Motive als auch der für die Bildung der Thiazole notwendigen Glycin-Cystein-Motive (siehe Abbildung 2). Möglicherweise stellt Loricrin ein Substrat, vergleichbar dem MccB17-Vorläuferpeptid (McbA), für den MccB17-Synthasecomplex dar. Ziel dieser Arbeit war es, die ersten 88 Aminosäuren des N-Terminus von Loricrin rekombinant zu exprimieren, um sie in weiterführenden Untersuchungen einsetzen zu können.

```
Loricrin      M S Y Q K K Q P T P Q P P V D C V K T S - - - - - G G G G G G G S G G G G C
| . . : . . : . . . . | | . : | . |           | . | | | | | | . | | | . |
Microcin B17  M E L K A S E F G V V L S V D A L K L S R Q S P L G V G I G G G G G G G G G S C

Loricrin      G F F G G G G S G G G S S G S G C G Y S G G G G Y S G G G C G G G S S G G G G G
| | . | |           | |           | | | . . | . | | | . | |
Microcin B17  - - - - - G G Q G G - - - - - G C - - - - - - - - - G G C S N G C S G G N G G -

Loricrin      G I G G C G G G S G G S V
. | | | | . . :
Microcin B17  - - - - - S G G S G S H I
```

Abbildung 2: Sequenzvergleich MccB17-Precursor und Loricrin₁₋₈₈

Darstellung des Aminosäuresequenzvergleiches von Loricrin₁₋₈₈ und dem MccB17-Vorläuferpeptid. Es wurde der Ein-Buchstabencode der Aminosäuren verwendet. Bindestriche (-) stellen fehlende Aminosäuren dar. Senkrechte Striche (|) zwischen den Sequenzen weisen auf identische Aminosäuren hin, Doppelpunkte (:) zeigen das Vorhandensein von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften wie Seitenkettenstruktur oder Hydrophobizität an. Einfache Punkte (.) indizieren Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften. Froesewitte et al. ADF-Poster *Is Loricrin a Trojan Horse Antimicrobial Peptide mimicking a Bacterial Microcin B17 precursor?* 2012

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten aber in der nachfolgenden Liste nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

2.1.1 Chemikalien

1 kb-DNA-Größenstandard	New England Biolabs, Ipswich, USA
100 bp-DNA-Größenstandard	New England Biolabs, Ipswich, USA
Acetonitril	LGC Standards, Middlesex, UK
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Coomassie Brillant Blau R250	Thermo Scientific, Waltham, USA
dNTPs	Thermo Scientific, Waltham, USA
EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	affymetrix USB, Santa Clara, USA
H ₂ O (HPLC-grade)	LGC Standards, Middlesex, UK
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue® Plus2 Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Tetrazyklin	Serva, Heidelberg
Trifluoressigsäure (TFA)	LGC Standards Middlesex, UK
Tryptic Soy Broth (TSB)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Vektoren

pPAL7 Supercoiled	BIO-RAD, Berkeley, USA
-------------------	------------------------

2.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert.

2.1.3.1 Oligonukleotide für die Nested-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
LOR-F-nc	TGGGCTCTCCTTCCTTCTCAGACA
LOR-R-nc	CAACTCCTTCGCCTCCGTGGTA

2.1.3.2 Oligonukleotide für das Profinity eXact pPal7-System

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
pPAL7-LOR-forward	TTAAGCTTTGATGTCTTATCAGAAAAAGCAGCCCAC
pPAL7-LOR-88-reverse	TTGCGGCCGCTTAGACGCTCCCACCGGAGC
pPAL7-LOR-reverse	TTGCGGCCGCCTATTTGGACGGCCAGGTAG

2.1.3.3 Oligonukleotide für die Colony-Check-PCR und Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Profinity seq. Forward	TATGTAGACGCAGCTAGC

2.1.4 Enzyme

Long PCR Enzyme Mix	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fast Digest® restriction enzymes	Thermo Scientific, Waltham, USA
T4-DNA-Ligase + Ligation Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer „LVI“ (6x)	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin 10 mM Tris/HCL pH 7,0
---------------------------	--

C8-RP-HPLC-Lösungen

Puffer A	0,1 % Trifluoressigsäure in H ₂ O
Puffer B	0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril (v/v)

Material und Methoden

Human Genomic DNA	Promega, Madison, USA
MES-SDS-Laufpuffer [20x]	1 M MES 1 M Tris 69,3 mM SDS 20,5 mM EDTA pH 7,4
Natriumphosphat-Puffer [0,1 M, pH 7,2]	Na ₂ HPO ₄ (aq) [1 M] 68,4 ml NaH ₂ PO ₄ (aq) [1 M] 31,6 ml Aquadest. ad 1000 ml
Profinity-Lösungen	
Profinity-Waschpuffer	Natriumphosphatpuffer [0,1 M], pH 7,2
Profinity-Elutionspuffer	Natriumphosphatpuffer [0,1 M], Natriumfluorid [0,1 M], pH 7,2
Profinity-Reinigungslösung	Phosphorsäure [0,1 M]
Profinity-Lagerungspuffer	Natriumphosphatpuffer [0,1 M], Natriumazid [0,1 M], pH 7,2
TAE-Puffer (50x)	Tris-Base [2 M] 24,2 g Natriumacetat [1 M] 5,71 g EDTA [0,5 M, pH 8] 10 ml
TKA-Wasser	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Nährmedien

Lysogenic Broth (LB)-Medium	1 % Sojamehlpepton 0,5 % NaCl 0,5 % Hefe-Extrakt ad 1000 ml mit H ₂ O, pH 7,4 (mit HCL adjustiert), autoklaviert
-----------------------------	---

Material und Methoden

MicroPulser BIO-RAD, Berkeley, USA

Elektroporationsküvetten „EC1“ BIO-RAD, Berkeley, USA

Gefriereinheiten

Kryosafe (-80° C) Kryotec, Hamburg

Premium (-20° C) Liebherr, Biberach

Geldokumentationsanlage und Auswertungssoftware Biometra, Göttingen

Gelkammern

Horizon 11.14 Biometra, Göttingen

Xcell sure lock Mini-Cell-Gelsystem Invitrogen, Karlsruhe

High Performance Liquid Chromatography

Detektor

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

Gradientenpumpen

Liquid Chromatograph LC-10AT VP Shimadzu, Duisburg

FCV-10 AL VP Shimadzu, Duisburg

SpectraSystem P4000 Spectra Physics, Darmstadt

Entgaser

Degasser DG-4 Henggeler, Riehen, Schweiz

Integrator

SP 4270/4290 Integrator Spectra Physics, Darmstadt

Trennsäulen

SP 250/10 NUCLEOSIL 300 – 7 C8 Macherey-Nagel, Düren

Jupiter C18 Phenomenex, Torrance, USA

Konzentratoren

Concentrator 5301 Eppendorf, Hamburg

Laborwaage

Kern, Albstadt

Lyophilisator

Alpha 2-4 LSC Christ, Osterode

Massenspektrometrie

QTOF II Micromass, Manchester, UK

Material und Methoden

MassLynx-Auswertungssoftware	Micromass, Manchester, UK
Photometer	
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipetten	
Mechanische Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mechanische Einkanalpipetten	VWR, West Chester, USA
Rotationsschüttler (Vortexer)	
Vortex-Genie	neoLab Migge, Heidelberg
Thermoblock	
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	
peqStar	peqlab, Erlangen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Ultraschall-Zellysator	
Sonopuls GM70	Bandelin Elektronik, Berlin
UV-Transilluminator	
High Performance Transilluminator	UVP, LLC, Upland, USA
Zentrifugen	
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

2.1.10 Mikroorganismen

<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	ATCC, Manassas, Virginia, USA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	ATCC, Manassas, Virginia, USA
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-Gami™ 2	Merck, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> Top10F'	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	ATCC, Manassas, Virginia, USA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC, Manassas, Virginia, USA

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

2.1.11 Software

ProtParam Tool	ExPaSy (Export Protein Analysis System, http://www.expasy.org/tools/protparam.html , Swiss Institute of Bioinformatics (SIB))
----------------	--

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, ist ein Verfahren zur in-vitro Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes (Mullis et al., 1986). Sie fand Anwendung bei der Amplifikation der Loricrin₁₋₈₈-Fragmente, sowie der Überprüfung von Plasmiden auf inserierte PCR-Produkte. Die klassische PCR besteht aus den Phasen Denaturierung, Oligonukleotid-Anlagerung und Kettenverlängerung, für die jeweils unterschiedliche Temperaturen notwendig sind. Diese wurden in Abhängigkeit der verwendeten Polymerase, der Länge des zu erwartenden Produktes und des errechneten Schmelzpunktes für das jeweilige Oligonukleotid variiert. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler jeweils in einem Gesamtvolumen von 20 µl bzw. 50 µl durchgeführt.

Die für die PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer sind unter 2.1.3 aufgeführt. Die einzelnen PCR-Anwendungen werden im Folgenden erläutert.

2.2.1.1 Design der Oligonukleotide für die Nested-PCR

Um die DNA-Sequenz des Loricrin, sowie des Loricrin₁₋₈₈-Fragmentes im weiteren Verlauf in den pPal7-Vektor ligieren und eine Restriktionshydrolyse durchführen zu können, ist es notwendig gewesen, neben der eigentlichen Oligonukleotidsequenz weitere Basenpaare zu addieren, siehe Abbildung 3.

pPal7-LOR-forward

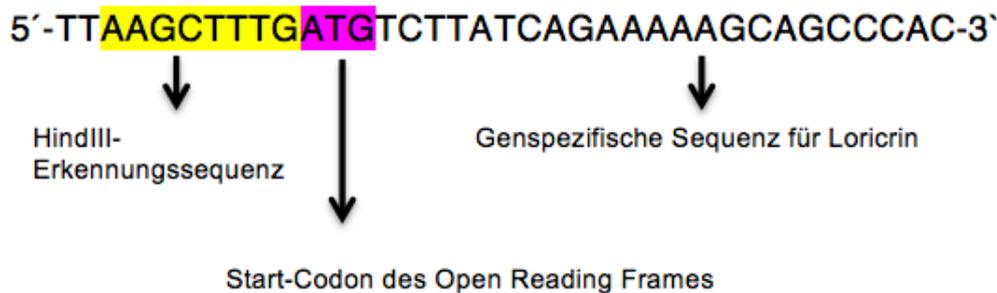


Abbildung 3: Oligonukleotidkonstruktion am Beispiel des pPal7-LOR-forward

Die Basenfolge **AAGCTTTG** ist die für das Restriktionsenzym HindIII vorgesehene Erkennungssequenz. Die Basenfolge **ATG** stellt das erste Codon des offenen Leserahmens (ORF) dar. Bei den ersten zwei Basen handelt es sich um optional angehängte Basen, die eine gesteigerte Effizienz der Restriktionsendohydrolyse bewirken. Die Wahl der Nukleotide erfolgt willkürlich, hierbei ist nicht von Bedeutung, welche Basen verwendet werden.

Die Basenabfolge des gegensinnigen Oligonukleotids wird an folgendem Beispiel verdeutlicht siehe Abbildung 4:

LOR-88-reverse

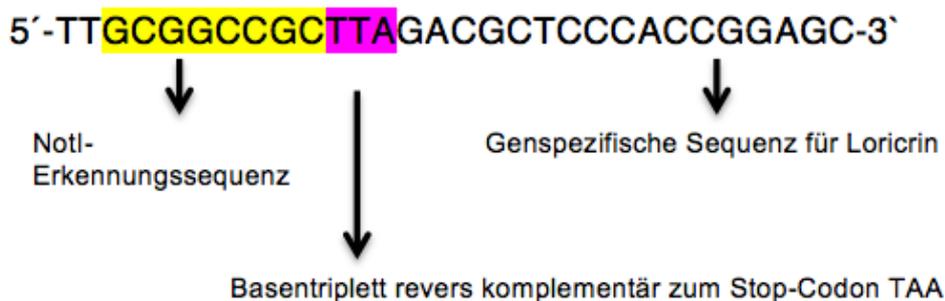


Abbildung 4: Oligonukleotidkonstruktion am Beispiel des LOR-88-reverse

Die Basenfolge **GCGGCCGC** stellt die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NotI dar. Die Basen **TTA** sind revers komplementär zu UAA und kodieren somit für einen Stop-Codon, also das Ende der Translation. Auch bei dem hier gezeigten rückwärtsorientierten Oligonukleotid wurden vor die oben genannte Erkennungssequenz zusätzliche Nukleotide gesetzt siehe Abbildung 4, um die Effektivität der Restriktionshydrolyse zu steigern.

2.2.1.2 Amplifikation der zu klonierenden Sequenzen mittels Nested-PCR

Bei der Nested-PCR werden zunächst mit spezifischen Oligonukleotiden, die einige Basenpaare vor und nach der eigentlich zu amplifizierenden DNA-Sequenz binden, Matrizen erstellt. Diesen Vorgang kann man auch als Prä-Nested-PCR bezeichnen. Im Rahmen der dann durchgeführten Nested-PCR wurden mit weiter „innen“ liegenden Oligonukleotiden die gewünschten DNA-Sequenzen auf Basis der vorher erstellten Matrizen amplifiziert. Die Anwendung des Nested-PCR-Verfahrens kann sinnvoll sein, wenn Oligonukleotide zusätzliche, nicht genspezifische, Sequenzen tragen und / oder aufgrund der Nukleotidsequenz ein niedriger Schmelzpunkt notwendig ist. Hierbei kommt es häufig zur Amplifikation unspezifischer Genprodukte. Sowohl durch die Vermehrung des potentiellen Targets, als auch durch die Verkürzung des DNA-Fragmentes durch die zuerst durchgeführte Prä-Nested-PCR wird die Wahrscheinlichkeit der Bindung an unspezifische DNA-Abschnitte und somit die Amplifikation unspezifischer Produkte deutlich vermindert.

Zunächst wurde ein Fragment mit Hilfe des Oligonukleotidpaares (LOR-F-nc und LOR-R-nc), welches außerhalb der codierenden Sequenz bindet, auf Basis humaner genomischer DNA erstellt. Dieses Fragment diente nun in der zweiten PCR als Matrize. Das zu klonierende Fragment LOR₁₋₈₈ wurde durch die Oligonukleotide pPAL7-LOR-forward und pPAL7-LOR-88-reverse vervielfältigt.

Für die Durchführung der einzelnen PCR wurde der Long PCR Enzyme Mix verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus einer thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase und einer weiteren DNA-Polymerase mit 3'-5-Exonukleaseaktivität, die der Hersteller nicht weiter benennt. Durch dieses sogenannte *proof reading* werden falsch eingebaute Nukleotide entfernt und somit die Genauigkeit der DNA-Synthese erhöht (Kunkel, 2004).

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Prä-Nested-PCR, 50 µl-Reaktionsansatz:

- 27,5 µl TKA-Wasser
- 5 µl 10x Long PCR Buffer mit [15 mM] MgCl₂
- 2 µl DMSO
- 1 µl LOR-F-nc-Primer [10 µM]
- 1 µl LOR-R-nc-Primer [10 µM]

Material und Methoden

- 5 µl dNTPs [2 mM]
- 8 µl genomische DNA
- 0,5 µl Long PCR Enzyme Mix [5 U/µl] (Polymerase)

PCR-Programm:

94° C – 3 min

95° C – 20 s

56° C – 30 s

68° C – 1,5 min

} 30 Zyklen

68° C – 10 min

8° C - ∞

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.2.2). Die Bande der berechneten Größe wurde ausgeschnitten und mittels GeneJET Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert. Die im Eluat enthaltene DNA wurde im Weiteren für die nun folgende Nested-PCR verwendet.

Nested-PCR, 50 µl-Reaktionsansatz:

- 27,5 µl TKA-Wasser
- 5 µl 10x Long PCR Buffer mit [15 mM] MgCl₂
- 2 µl DMSO
- 1 µl pPAL7-LOR-forward [10 µM]
- 1 µl pPAL7-LOR-88-reverse [10 µM]
- 5 µl dNTPs [2 mM]
- 8 µl DNA (aus Prä-Nested-PCR, nach Gel-Extraktion)
- 0,5 µl Long PCR Enzyme Mix [5 U/µl] (Polymerase)

PCR-Programm:

94° C – 3 min

95° C – 20 s

55° C – 30 s

} 30 Zyklen

Material und Methoden

68° C – 1,5 min

68° C – 10 min

8° C - ∞

Im Anschluss an die PCR wurde das Amplifikationsprodukt durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechende Bande ausgeschnitten und mittels GeneJET Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert. Die DNA aus dem Eluat wurde daraufhin mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI geschnitten (siehe 2.2.4) und anschließend in den pPal7-Vektor ligiert. Der nun das Insert enthaltende Vektor wurde genutzt um damit kompetente *E. coli* Top10F'-Zellen zu transformieren (siehe 2.2.7)

2.2.1.3 Colony-Check-PCR zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung

Die sogenannte Colony-Check-PCR ist ein Verfahren zur Überprüfung, ob eine Bakterienkolonie nach Transformation den Vektor mit dem gewünschten Insert aufgenommen hat. Im Anschluss an die Transformation (siehe 2.2.7) wurden die Bakterien auf Ampicillin-Agar ausplattiert. Aus den herangewachsenen Kolonien wurden zehn bis zwanzig ausgewählt und direkt mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze vom Nähragar in Reaktionsgefäße mit 25 µl PCR-Ansatz (siehe unten) überführt.

Als Oligonukleotide kamen folgende zum Einsatz: Profinity seq. Forward, sowie der pPAL7-LOR-88-reverse. Durch die Verwendung von Ampicillin im Agar ist davon auszugehen, dass die gewachsenen Kolonien den Vektor aufgenommen haben, da auf diesem ein Resistenzgen kodiert ist. Da auch „leere“ Vektoren das Resistenzgen tragen, erfolgt die Unterscheidung zwischen diesen beiden Klonen durch eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, da durch die Verwendung von vektorspezifischen Oligonukleotiden zusammen mit den Insert spezifischen Oligonukleotiden nur Produkte bei enthaltenem ligierten LOR₁₋₈₈-Fragment entstehen.

Colony-Check-PCR, 25 µl-Reaktionsansatz:

- 17,75 µl TKA-Wasser
- 2,5 µl 10x Long PCR Buffer mit 15 mM MgCl₂
- 1 µl DMSO

Material und Methoden

- 0,5 µl Profinity seq. Forward [10 µM]
- 0,5 µl pPAL7-LOR-88-reverse [10 µM]
- 2,5 µl dNTPs [2 mM]
- 0,25 µl Long PCR Enzyme Mix [5 U/µl] (Polymerase)

PCR-Programm:

94° C – 3 min

95° C – 20 s

48° C – 30 s

68° C – 1,5 min

} 30 Zyklen

68° C – 10 min

8° C - ∞

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe und Topologie durch eine Matrix, die in unserem Fall aus Agarose besteht (Lumpkin et al., 1985). Das Gel stellt ein molekulares Sieb dar, dessen Porengröße abhängig von der gewählten Konzentration der Agarose ist. Die antreibende Kraft ist hierbei ein elektrisches Feld mit einer Gleichstromspannung von circa 100 V. Aufgrund der negativen Ladung der DNA bewegt sich diese Richtung Anode. Durch Zugabe eines mit doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes (Ethidiumbromid) lassen sich unter UV-Illumination die DNA-Fragmente detektieren.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur präparativen Gewinnung von PCR-Produkten (siehe 2.2.1), zur Analyse von PCR-Produkten, Untersuchung von Gel-Extrakten, Plasmidpräparationen sowie den Produkten aus Restriktionshydrolysen eingesetzt. Es wurden horizontale Agarosegele mit Konzentrationen von 0,8 % bis 1,5 % verwendet.

Zur Herstellung der Gele wurden 0,8 g bis 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris/HCL, 20 mM Acetat, 1 mM Na₂EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf circa 50 °C wurden 6 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml] hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung in eine horizontale Laufkammer mit Probenkamm gefüllt. Nach Gelieren des Gels wurde der Probenkamm entfernt, die Laufkammer mit einfach konzentriertem TAE-

Material und Methoden

Puffer aufgefüllt. Die Taschen wurden mit der zu trennenden DNA gefüllt, nachdem diese zuvor mit dem Ladepuffer (siehe 2.1.5) versetzt wurden. Um den entsprechenden Lauffronten später eine Größe zuordnen zu können, wurde als Marker in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgröße entweder ein 100 bp-DNA-Komigrationsstandard oder ein 1 kb-DNA-Komigrationsstandard verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Banden mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei einer Wellenlänge von 266 nm sichtbar gemacht, photographisch dokumentiert und gegebenenfalls mit einem sterilen Einmalskalpell ausgeschnitten. Wenn die DNA-Fragmente weiterverarbeitet werden sollten, wurde die UV-Exposition so kurz wie möglich gehalten, um eine Schädigung der DNA, wie zum Beispiel durch die Bildung von Thymin-Dimeren, zu verringern.

2.2.3 Gel-Extraktion

Um die zuvor per Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente weiter verarbeiten zu können, erfolgte anschließend die Gel-Extraktion mit dem GeneJET Gel Extraction Kit. Hierfür wurde in einem abgewogenen 1,5 ml Probengefäß das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Es erfolgte die Zugabe von Bindungspuffer im Verhältnis 1:1 zum Gewicht des aufzulösenden Gelstücks. Nach einer Inkubation von zehn Minuten bei 55° C im Thermomixer wurden maximal 800 µl des gelösten Geles in die Aufreinigungssäule gegeben. Bei DNA-Fragmenten unter 500 bp wurde zuvor 100 % Isopropanol zugegeben. Die Säule wurde anschließend für eine Minute bei 12000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 700 µl Waschpuffer befüllt und erneut für eine Minute bei 12000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Durchlauf verworfen wurde, erfolgte ein erneutes Zentrifugieren ohne vorherige Befüllung. Abschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Probengefäß gesteckt, mit 50 µl Elutionspuffer beladen und für eine Minute bei 12000 rpm zentrifugiert. Es erfolgt die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels photometrischer Bestimmung am NanoDrop (siehe 2.1.9).

Zur Kontrolle wurden teilweise 2 µl der gewonnenen Probe einer erneuten Gelelektrophorese unterzogen. Die Abschätzung des DNA-Gehaltes erfolgte anhand eines Vergleiches der Bandenintensitäten mit einem DNA-Komigrationsstandard.

2.2.4 Restriktionshydrolyse

Die Restriktionshydrolyse ist ein elementares Werkzeug der Molekularbiologie. Hierbei handelt es sich um einen enzymatischen Prozess, mit dem DNA-Fragmente, je nach verwendetem Restriktionsenzym, gezielt ausgeschnitten und anschließend in bestehende

Material und Methoden

DNA-Konstrukte, wie zum Beispiel Plasmide, eingefügt werden können. Dies kann man sich zu Nutze machen, um DNA-Abschnitte zu klonieren und wie in unserem Fall Bakterienzellen anschließend zu transformieren.

Entdeckt wurden die Restriktionsendonukleasen in Bakterien. Hier dienen sie höchst wahrscheinlich dem Schutz vor Fremd-DNA, insbesondere von Bakteriophagen (Boyer, 1971). Restriktionsenzyme erkennen Fremd-DNA am Fehlen des entsprechenden Methylierungsmusters oder anhand von DNA-Sequenzen, die normalerweise in der DNA-Sequenz der entsprechenden Zelle nicht vorkommen. In Abhängigkeit von Erkennungsmechanismus, Entfernung der Hydrolyse vom Erkennungsort und Methyltransferase-Aktivität unterscheidet man vier Typen von Restriktionsendonukleasen. Die in unserem Fall verwendeten Restriktionsenzyme entsprechen dem Typ II, dies bedeutet Hydrolyse innerhalb der Erkennungssequenz und keine Methyltransferase-Aktivität. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist das sogenannte Schnittmuster. Der Schnitt kann gerade erfolgen, was zu sogenannten *blunt ends*, also glatten Enden führt, oder versetzt erfolgen, was zu sogenannten *sticky ends*, also klebrigen Enden führt. *Sticky ends* haben den Vorteil, dass sie in der Lage sind, mit ihren komplementären Basen zu hybridisieren, finden daher häufiger zusammen und sind somit leichter zu ligieren. Aus diesem Grund wurden nur Restriktionsendonukleasen angewendet, die zur Bildung der sogenannten klebrigen Enden führen. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch, dass es einen fehlenden Einfluss auf die Orientierung des Inserts im Vektor gibt. Die Nomenklatur folgt bestimmten Gesetzmäßigkeiten, welche die Gattung und Art des Organismus, in denen diese entdeckt wurden, sowie die Reihenfolge der Entdeckung berücksichtigen (Smith & Nathans, 1973).

Die Wahl der Restriktionsenzyme ist ein Schritt, der bereits bei der Erstellung geeigneter Oligonukleotide berücksichtigt werden muss. Hierbei wählt man eine Erkennungssequenz, die in der *Multiple Cloning Site* des Vektors je einmal und in der DNA-Sequenz des Inserts gar nicht vorkommt (s. 2.2.1.1). In unserem Fall sind dies HindIII und NotI.

Fast Digestion-Restriktionsverdau pPal7-Vektor, 20 µl-Reaktionsansatz:

- 6 µl TKA-H₂O
- 2 µl 10x FD GreenBuffer
- 10 µl [0,1 µg/µl]
- 1 µl FD NotI
- 1 µl FD HindIII

Fast Digestion-Restriktionsverdau LOR₁₋₈₈, 20 µl-Reaktionsansatz:

- 2 µl 10x FD Buffer
- 16 µl LOR₁₋₈₈ [9,5 ng/µl]
- 1 µl FD NotI
- 1 µl FD HindIII

Fast Digestion-Programm:

37° C – 20 min

80° C – 10 min

Im Anschluss an den Restriktionsverdau wurde der gesamte Reaktionsansatz per Gelelektrophorese aufgetrennt, um noch nicht hydrolisierte DNA-Fragmente zu entfernen. Um den Erfolg der Restriktionshydrolyse abschätzen zu können, wurden gleichzeitig ein DNA-Komigrationsstandard, sowie unbehandelte DNA mit aufgetragen. Es erfolgte die Gelextraktion (siehe 2.2.3) sowie die photometrische Konzentrationsbestimmung.

2.2.5 Ligation

Mittels Ligation ist es möglich, amplifizierte DNA-Sequenzen in Vektoren zu integrieren, um damit anschließend Bakterienstämme zu transformieren. Hierzu gibt man die zuvor durch Restriktionsverdau vorbereiteten DNA-Fragmente und den Vektor zusammen. Bedingt durch die Brown'sche Molekularbewegung finden die komplementären Basen der *Sticky-Ends* (siehe 2.2.4) zusammen und bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus. Durch Zugabe des Enzyms T4-DNA-Ligase erfolgt die Ausbildung einer stabilen Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxy-Ende der DNA.

Bei dem verwendeten Vektor handelt es sich um den pPAL7-Expressionsvektor der in der *supercoiled* Form vorliegt. Es wurde das zu ligierende DNA-Fragment in neunfach molarem Überschuss zum Vektor eingesetzt. Folgende Ligationsansätze wurden verwendet:

Material und Methoden

Konzentration nach Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Gelextraktion:

pPAL7-Vektor [24,0 ng/μl]

LOR₁₋₈₈-Insert [7,6 ng/μl]

Berechnung des molaren Verhältnisses:

$$\frac{\text{Konzentration Vektor} \times \text{bp Insert}}{\text{bp Vektor}} \times \frac{\text{Verhältnis Insert}}{\text{Vektor}}$$

$$\text{LOR}_{1-88} : \frac{12,5 \text{ ng} * 287 \text{ bp}}{5901 \text{ bp}} * \frac{9}{1} = 5,47 \cong 0,75 \mu\text{l} [7,6 \text{ ng}/\mu\text{l}]$$

Ligationsansatz pPAL7-LOR₁₋₈₈, 20 μl-Reaktionsansatz:

- 15,75 μl TKA-H₂O
- 2,0 μl 10x T4 DNA Ligase Buffer
- 0,5 μl Vektor pPal7 NotI, HindIII geschnitten (24 ng/μl)
- 0,75 μl Insert LOR₁₋₈₈
- 1,0 μl T4 DNA Ligase [1 U/μl]

Ligations-Programm:

22° C – 20 min

65° C – 10 min

2.2.6 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung erfordert eine zwei tägige Vorbereitungsphase. Am eigentlichen Produktionstag ist es wichtig, konsequent „auf Eis“ zu arbeiten, dies bedeutet zum einen alle Gefäße zwischen den Verarbeitungsschritten auf Eis zu kühlen, aber auch die notwendigen Flüssigkeiten, sowie die Zentrifugen rechtzeitig zu kühlen.

Tag 1:

- Ausstreichen der Bakterien auf einem LB-Agar, der mit den entsprechenden Antibiotika versetzt ist; Inkubation bei 37° C über Nacht.

Material und Methoden

Tag 2:

- Vorbereiten einer Vorkultur. Hierfür 20 ml LB-Medium, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einer Einzelkolonie animpfen. Die Übertragung erfolgt durch sterile Pipettenspitzen. Inkubation im Wärmeschüttler bei 37° C, 300 rpm.

Tag 3:

- Animpfen von 200 ml Antibiotika haltigem LB-Medium mit 2 ml der Vorkultur, Inkubation bei 37° C, 300 rpm, bis die OD₆₀₀ im Bereich von 0,5 und 0,7 liegt.
- Transfer der Kultur in vorgekühlte 50 ml Zentrifugengefäße
- Zentrifugation für 15 min bei 4000 x g, 4° C
- Überstand entfernen und Pellet in 5 ml eisgekühltem Aqua-bidest resuspendieren, den Inhalt von je zwei Zentrifugengefäßen zusammengeben und auf insgesamt 50 ml Volumen mit eisgekühltem Aqua-bidest auffüllen.
- Zentrifugation für 15 min bei 4000 x g, 4° C
- Überstand verwerfen und Pellet in 5 ml eisgekühltem Aqua-bidest resuspendieren, Zentrifugengefäße erneut auf 50 ml Gesamtvolumen auffüllen.
- Zentrifugation für 15 min bei 4000 x g, 4° C
- Überstand verwerfen und Pellet in 10 ml Glycerinlösung [10 %], eisgekühlt, resuspendieren
- Zentrifugation für 20 min bei 3000 x g, 0° C
- Überstand entfernen und Pellet in 1 ml Glycerinlösung [10 %], eisgekühlt, resuspendieren
- Aliquotieren von 50 µl-Einheiten in 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Trockeneis
- Schockfrostern in flüssigem Stickstoff und Lagern in Cryobox bei -80° C

2.2.7 Transformation

Die Transformation beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA in prokaryotische Zellen, wobei hier die Übertragung durch Viren nicht mit inbegriffen ist, dieser Weg wird Transduktion genannt. Das Einbringen von Makromolekülen in das Zytoplasma lebender Zellen ist heute für die biochemische und biomedizinische Forschung ein elementares experimentelles Verfahren. Hierbei bedient man sich üblicherweise biologischer, chemischer oder physikalischer Verfahren. Zu den heute am meisten etablierten Verfahren gehören zum einen die Verwendung sogenannter chemisch kompetenter Organismen, deren Zellmembran durch die Zugabe von divalenten Kationen in Form von Calciumchlorid mit anschließendem Hitzeschock permeabilisiert wurde (Mandel & Higa, 1970) und die Elektroporation, bei der

Material und Methoden

durch die Anlage eines transienten externen Spannungsfeldes die Permeabilität der Membran temporär erhöht wird (Dower et al., 1988).

In dieser Arbeit fand die Methode der Transformation durch Elektroporation Anwendung. Hierzu wurde zunächst ein 50 µl-Aliquot von elektrokompetenten *E. coli* pro Transformation auf Eis aufgetaut, ein Mikroliter des Ligationsansatzes (siehe 2.2.5) hinzugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden die Bakterienzellen für eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in die eisgekühlten Elektroporationsküvetten überführt und die Elektroporation durchgeführt. Im Anschluss daran wurde sofort 1 ml auf 37° C vorgeheiztes SOC-Medium hinzugefügt, durchmischt und eine Stunde bei 37° C, 225 rpm inkubiert. Nach der Dauer der Inkubation wurden jeweils 200 µl, 100 µl und 50 µl in gewohnter 3-Strich-Technik auf vorgewärmte LB-Agarplatten ausplattiert. Bei der 3-Strich-Technik werden die Bakterienzellen mittels sterilisierter Impföse in drei senkrecht zueinander ausgerichteten Streichrichtungen auf der Agarplatte verteilt, wodurch möglichst singuläre Bakterienkolonien erzeugt werden sollen. Diese Platten sind zuvor mit Ampicillin-Lösung [100 µg/ml] behandelt worden. Da die TOP10F'-Zellen nativ keine Antibiotika-resistenz aufweisen, soll die Zugabe des Antibiotikums die Vermehrung von nicht erfolgreich transformierten Zellen verhindern. Es erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37° C. Als Kontrollen wurden auch immer *E. coli* Zellen ausplattiert, die ohne die Zugabe von DNA, oder mit Zugabe des unbehandelten zirkulären Vektors elektroporiert worden sind. Die Kolonien wurden markiert und anschließend per Colony-Check-PCR (siehe 2.2.1.3) auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme inklusive der Antibiotikaresistenzen sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i>-Stamm	Antibiotika Resistenz
TOP 10 F'	Keine
Rosetta Gami 2	Tetrazyklin [12,5 µg/ml] Streptomycin [50 µg/ml] Chloramphenicol [34 µg/ml]

Tabelle 2: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten Vektoren

Vektor	Antibiotika-Resistenz	Verwendete Agarplatten
pPAL7	Ampicillin [100 µg/ml]	LB-Agar-Platten

2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Die im Rahmen der Colony-Check-PCR (siehe 2.2.1.3) positiv getesteten Klone wurden in LB-Flüssigkultur, mit Ampicillin [100 µg/ml] versetzt, übertragen und über Nacht bei 37° C, 225 rpm inkubiert, um anschließend die Plasmid-DNA zur Sequenzierung und gegebenenfalls weiteren Verarbeitung verwenden zu können.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit verwendet. Das Prinzip basiert auf einer Kombination von alkalischer Zellyse, der Bindung der DNA an eine Siliziumdioxid-Membran, Separation von Zelldetritus und nachfolgender Elution.

Hierzu wurden die einzelnen Klone in 3 ml LB-Medium, mit Ampicillin [100 µg/ml] versetzt, übertragen und wie oben angegeben inkubiert. Am Folgetag wurden die Kulturen bei Raumtemperatur für zwei Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Das Pellet wurden in 250 µl RNase-A haltiger Lösung resuspendiert und in ein 1,5 ml Probengefäß transferiert. Hinzugegeben wurden 250 µl Lysis-Lösung und nach gründlichem Mischen 350 µl Neutralisationslösung. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm, für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde anschließend auf die GeneJET-Säule übertragen und diese für eine Minute bei 12000 x g zentrifugiert. Es erfolgen zwei Reinigungsschritte mit je 500 µl Waschlösung und Zentrifugation von einer Minute bei 12000 x g. Abschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Elutionspuffer und nach einer Wartezeit von zwei Minuten eine letzte Zentrifugation für zwei Minuten bei 12000 x g. Die Konzentration der DNA im Eluat wurde mittels Photometrie am NanoDrop bestimmt und durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2) überprüft. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20° C aufbewahrt.

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte im Institut für klinische Molekularbiologie (IKMB), des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, mit der Methode des Kettenabbruches nach Sanger. Hierzu wurden 5 µl Plasmid mit einer Konzentration von 100 ng/µl mit einem µl des Oligonukleotid Profinity seq. Forward (siehe 2.1.3.3) verwendet.

Die Sequenzierung nach Sanger, auch als Kettenabbruchsynthese oder Didesoxymethode bekannt, basiert auf dem Prinzip der Zugabe von Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxynucleosidtriphosphaten (ddNTPs) zu einem PCR-Ansatz. Dies führt dazu, dass anstelle der auch vorhandenen Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) per Zufallsprinzip die

oben genannten ddNTPs eingebaut werden, was zu einem Kettenabbruch führt, da die für die Kettenverlängerung notwendige 3'-Hydroxygruppe fehlt (Sanger et al., 1977).

Ursprünglich wurden vier Reaktionen benötigt, bei denen jeweils nur eine der Basen als ddNTP hinzugegeben wird. Entscheidend ist hier das Zufallsprinzip, da hierdurch Kettenabbrüche nach unterschiedlicher Kettenlänge erfolgen, so dass man theoretisch an jeder entsprechenden Stelle der DNA einmal einen Kettenabbruch erhält. Man erhält somit DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, von denen man weiß, welche Base an der Stelle des Abbruches steht. Die Fragmente werden anschließend mit hochauflösender Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, anhand der man schließlich die DNA-Sequenz ablesen kann. Voraussetzung für die gezielte Sequenzierung ist das Vorhandensein einer bekannten Sequenz, für den Einsatz entsprechender Oligonukleotide. Die Methode ist nur für eine begrenzte Länge des zu sequenzierenden DNA-Fragments geeignet, da mit zunehmender Länge die Wahrscheinlichkeit für den „vorzeitigen“ Kettenabbruch zunimmt.

Die im IKMB angewendete sogenannte Kapillarsequenzierung ist eine Abwandlung der Methode nach Sanger. Es kommen Fluoreszenzfarbstoff markierte ddNTPs mit unterschiedlichen UV-Spektren zum Einsatz. Hierdurch können anhand der Wellenlänge alle vier Basen gleichzeitig untersucht werden. Die Auftrennung des gesamten Reaktionsansatzes erfolgt elektrophoretisch über eine Kapillare, die ein Polyacrylamid-Gel enthält. Am Ende der Kapillare werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch Laserlicht angeregt und die Emission unterschiedlicher Wellenlänge detektiert.

2.2.10 Herstellung eines Glycerol-Stocks der positiv sequenzierten Kolonie

Diejenige Kolonie, die im Rahmen der Sanger-Sequenzierung positiv getestet wurde, das heißt mit der richtigen DNA-Sequenz und Orientierung des DNA-Inserts, ist für spätere Verwendung in einen Glycerol-Stock überführt worden. Hierunter versteht man die Anzucht des entsprechenden Bakteriums in LB-Flüssigmedium, anschließender Zentrifugation, Resuspendierung des Pellets in einem LB-Nährmedium mit Glycerin. Hierzu wurden 20 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (Ampicillin [100 µg/ml]) mit dem Klon angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37° C, 225 rpm inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wird die Kultur bei 600 rpm für 5 min zentrifugiert (4 °C). Das Pellet wird in 1,4 ml LB-Medium und 0,6 ml Glycerin (87 %) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

2.3 Rekombinante Expression von Loricrin₁₋₈₈ in *E. coli*

2.3.1 Identifikation von *Rare codons*

Bei seltenen Codons, auch *Rare codons* genannt, handelt es sich um Basentriplets, für die es nur wenig entsprechende Transfer-RNA (tRNA) in einer Zelle gibt. Bei der Expression von eukaryotischen Genen in prokaryotischen Organismen liegt häufig ein Mangel an tRNA für die in Tabelle 3 dargestellten seltenen Codons vor. Als Folge einer Nichtbeachtung, kann es zu einer Effizienzminderung bei der Expression kommen.

Tabelle 3: Häufige *Rare Codons* in *E. coli* (Zhang et al., 1991)

Codon	Aminosäure
AGG, AGA, CGA, CGG	Arginin (R)
GGA, GGG	Glycin (G)
AUA	Isoleucin (I)
CUA	Leucin (L)
CCC	Prolin (P)
UCG	Serin (S)

Die Analyse der Sequenz von Loricrin₁₋₈₈ ergab folgende seltene Codons: GGA, GGG, CCC.

Um die Effizienz der Expression zu optimieren wurde als Mikroorganismus Rosetta-Gami™ 2 ausgewählt. Diese Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie zum einen in der Lage sind, Proteinfaltung durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zu ermöglichen, und zum anderen besitzen sie ein Chloramphenicol-Resistenzgen tragendes Plasmid (pRARE2) welches für die tRNA AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, CGG codiert.

2.3.2 Transformation von *E. coli* Rosetta-Gami™ 2 Zellen

Mit dem per Sanger-Sequenzierung bestätigten Plasmid (siehe 2.2.9) mussten die zur Expression ausgewählten Mikroorganismen Rosetta-Gami™ 2 transformiert werden. Das Vorgehen entspricht dem der Transformation von Top10 F'-Zellen (siehe 2.2.7). Unterschiede finden sich lediglich in der Anwendung der entsprechenden Antibiotika in den Nährmedien: Ampicillin [100 µg/ml], Tetrazyklin [12,5 µg/ml], Streptomycin [50 µg/ml], Chloramphenicol [34 µg/ml].

2.3.3 Das Profinity eXact™ Protein Purification System

Das Prinzip der Expression mit anschließender Aufreinigung von Proteinen basiert bei vielen Verfahren darin, dem Zielprotein eine Erkennungssequenz („Tag“) anzuhängen, man spricht hier auch vom sogenannten Fusionsprotein (= Zielprotein + „Tag“), das eine Isolation des Proteins aus der Gesamtheit aller Bestandteile der Bakterien ermöglicht. Dieser sogenannte „Tag“ kann dann in einem weiteren Schritt durch eine Protease abgespalten und in einem Reinigungsschritt entfernt werden. Dies birgt neben einem hohen Zeitaufwand auch eine geringere Ausbeute des Zielproteins, da jeder Aufreinigungsschritt mit Verlusten behaftet ist.

Eine neue Methode stellt das Profinity eXact™ Protein Purification System dar (Ruan et al., 2004). Auch dieses System bedient sich einem Fusionsprotein. Der entscheidende Unterschied ist, dass die proteolytische Spaltung der Erkennungssequenz *on site* erfolgt, also an derselben Matrix, an der das Fusionsprotein adhärent ist. Eine weitere Besonderheit ist, dass die Affinitätssequenz für die Säulenmatrix eine Prodomäne für die Protease enthält. Somit ist das Enzym erst nach Bindung zu einer Spaltung fähig.

Zur Anwendung kommt hier ein mutiertes Subtilisin, welches in einer Matrix aus Agarose quervernetzt ist. Hierbei handelt es sich um eine alkalische Serin-Protease, die von *Bacillus subtilis* als extrazelluläre Protease sezerniert wird. Diese Subtilisin-Mutante weist eine hohe Affinität zum 8,2 kDa großen Profinity eXact-Tag auf, der wie oben angegeben eine Prodomäne für das finale Subtilisin beinhaltet. Die Proteaseaktivität lässt sich mittels diverser Anionen aktivieren (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Mögliche Trigger-Ionen der Proteaseaktivität

Trigger-Anion	Salz	Konzentration
F ⁻	NaF, KF	100 mM
N ₃ ⁻	NaN ₃	10 mM
NO ₂ ⁻	NaNO ₂	5 mM
HCO ₃ ⁻	NaHCO ₃	25 mM
Cl ⁻	NaCl, KCl	75 mM

2.3.4 Struktur des Expressionsvektors

Für die Expression von Loricrin₁₋₈₈ in *E. coli* Rosetta-Gami™ 2 wurde der pPAL7-Vektor (5901 bp) verwendet. Dieser Vektor ermöglicht es, rekombinante Fusionsproteine mit N-

terminalem Profinity eXact-Tag (8,2 kDa), zu exprimieren. Dieser Fusionstag ist Grundlage für die Adhäsion und spätere Spaltung durch die Subtilisin-Mutante (siehe 2.3.3).

Der pPAL7-Vektor verfügt über eine T7-Lac-Promotor-Region, über welche die Expression der Profinity eXact-Tag Fusionsproteine kontrolliert wird. Hierzu wird die in den *E. coli* Rosetta-Gami™ 2-Zellen vorhandene T7-RNA-Polymerase durch IPTG induziert (siehe 2.3.5.3). Weiterhin ist ein Gen für Ampicillin-Resistenz Teil des Vektors, die Resistenz ist für die Selektion bei der Anzucht von pPAL7-Vektor tragenden *E. coli* Bakterien von Bedeutung. Theoretisch wachsen in Nährmedien mit Ampicillin nur Bakterien, die im Rahmen der Transformation den pPAL7-Vektor aufgenommen haben.

Zur Erzeugung von DNA-Abschnitten, die in den pPAL7-Vektor ligiert werden können, wurden pPAL7-LOR-forward- und pPAL7-LOR-88-reverse Oligonukleotide (siehe 2.1.3.2) verwendet; diese weisen neben den zu amplifizierenden Genabschnitt zusätzlich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NotI und HindIII auf (siehe 2.2.4).

2.3.5 Durchführung der Expression

Die Expression von Loricrin₁₋₈₈ wurde in *E. coli* Rosetta-Gami™ 2 Bakterienzellen durchgeführt. Diese Bakterien weisen das Gen für die T7-RNA-Polymerase auf, welche unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht. Nach Induktion mit IPTG transkribiert die T7-RNA-Polymerase die klonierten Gene, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Hierdurch hat man die Möglichkeit, die Expression erst dann zu induzieren, sobald eine entsprechend ausreichende Zahl Bakterienzellen herangewachsen ist.

2.3.5.1 Starterkulturen

Für die Vorkultur wurden 10 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (Ampicillin [100 µg/ml], Streptomycin [50 µg/ml], Tetrazyklin [12,5 µg/ml], Chloramphenicol [34,5 µg/ml]) mit einer Einzelkolonie *E. coli* Rosetta-Gami™ 2, die das gewünschte Plasmid enthält, angeimpft und über Nacht bei 37° C, 225 rpm schüttelnd inkubiert. Besser wäre es, die Vorkulturen regelmäßig auf ihre optische Dichte zu untersuchen, um den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (siehe 2.3.5.2) zu erkennen und mit Bakterien, die sich in dieser Phase befinden, die eigentliche Expressionskultur anzuimpfen. Dies ist jedoch aus logistischen Gründen nur schwer umzusetzen.

2.3.5.2 Photometrische Bestimmung der optischen Bakteriendichte

Das Wachstum von Bakterien verläuft in vier Phasen. Zu Beginn liegt die Latenzphase (*lag Phase*) vor, in der sich die Zellen an ihre Umwelt anpassen müssen und Gene für den Metabolismus der im Nährmedium enthaltenen Substrate vermehrt exprimieren. Hierauf folgt die exponentielle Wachstumsphase (*log Phase*), in der die Vermehrung vor allem durch die Generationszeit bedingt ist. Sobald das Nährstoffangebot zurückgeht und die Konkurrenzsituation der Zellen zunimmt, geht das Wachstum in die stationäre Phase über, bevor es letztendlich zur Absterbephase kommt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt idealerweise zu Beginn der *log Phase*, hier weisen die Zellen die höchste Stoffwechselaktivität auf. Zur Abschätzung der Wachstumsphase wird die optische Dichte in einem Spektrophotometer bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Aber auch das Animpfen der Expressionskultur durch eine Vorkultur sollte nur durch eine bestimmte Menge einer Vorkultur erfolgen, da diese üblicherweise über Nacht inkubiert werden und sich somit meist in der stationären Phase befinden. Abhängig von der OD_{600} der Vorkultur stellt man in der Expressionskultur eine OD_{600} von 0,025 ein. Hierdurch wird der Einfluss toxischer Metabolite und die Zahl bereits untergegangener Bakterienzellen um den Faktor 200 reduziert. Als Leerwert diente das für die Anzucht verwendete LB-Kulturmedium. Die Messung der OD_{600} erfolgte ab einer OD_{600} von 1,5 in einer Verdünnung von 1:10.

2.3.5.3 Induktion und Zellkultivierung

Je 250 ml LB-Medium werden mit 500 μ l Ampicillin [50 mg/ml], 500 μ l Tetrazyklin [6,25 mg/ml], 250 μ l Chloramphenicol [34 mg/ml] versetzt und mit der Vorkultur auf eine Ziel- OD_{600} von 0,02 angeimpft. Unter regelmäßiger OD_{600} -Kontrolle erfolgte die Inkubation bei 37° C, 225 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,6. Zur Herstellung von Backup-Kulturen wurden 500 μ l der angesetzten Kultur vor Induktion mit 180 μ l Glycerin [87%] versetzt und bei -80° C gelagert. Bei Erreichen der OD_{600} von 0,5 bis 0,6 erfolgte die Induktion der Expression des Fusionsproteins mit 250 μ l IPTG [1 M]. Nach einer weiteren Inkubationszeit von drei Stunden unter den oben genannten Bedingungen wurde die Kultur in 50 ml Probengefäße gefüllt und für fünf Minuten mit 6000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets je in 5 ml 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer resuspendiert und bei -80° C bis zur Weiteren Verwendung gelagert.

2.3.5.4 Zellaufschluss

Die Bakterienzellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Ultraschallhomogenisator besteht aus drei Teilen: Ein Generator erzeugt eine hochfrequente Spannung im Bereich von 15 bis 40 kHz, mit der ein piezoelektrischer Kristall angeregt wird und die elektrischen Impulse in mechanische Schwingungen umwandelt. Diese Schwingungen werden mittels Sonotrode auf das Medium übertragen. Durch die Trägheit des Mediums kann dieses den Schwingungen nicht folgen. Das Medium reißt auf und es entsteht ein Vakuum, das sofort mit Wasserdampf gefüllt wird. Dieses Phänomen wird auch als Kavitation (Shah et al., 1999) bezeichnet. Ab einer Größe von circa 150 µm fallen die Kavitationsblasen wieder zusammen und es entstehen hohe Temperaturen und hoher Druck. Zudem entstehen beim Kollabieren Wirbel deren Scherkräfte ein Mechanismus des Zellaufschlusses darstellen. Implodiert eine Kavitationsblase an einer Zellwand, kommt es zur Ausbildung von Microjets, dies sind Flüssigkeitsstrahlen die mit hoher Geschwindigkeit auf die Zellwand treffen und diese perforieren.

Für die Ultraschallbehandlung wurden die gefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend einer zwölf Zyklen umfassenden Prozedur von je 12 s Ultraschall mit einer anschließenden Pause von 30 s auf Eis unterzogen. Die Pause diente der Vermeidung einer Denaturierung des Zielproteins durch die bei physikalischen Aufschlussverfahren entstehende Wärme. Das Zellysate wurde im Anschluss für 30 min bei 11000 rpm, 4° C zentrifugiert. Der das Fusionsprotein enthaltende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter gegeben und auf Eis gelagert.

2.4 Chromatographische Aufreinigung von Loricrin₁₋₈₈

Die affinitätschromatographische Anreicherung des Zielproteins aus dem Bakterienlysat erfolgte mit dem Profinity eXact™ Protein Purification System. Anschließend wurde das Eluat mittels C8-Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen mittels Massenspektrometrie untersucht. Die Fraktionen in denen Loricrin₁₋₈₈ nachgewiesen werden konnte, wurden dann mit einer C18-Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt. Dieser Schritt ermöglichte gleichzeitig die Bestimmung der Proteinmenge. Im Anschluss erfolgte die Lyophilisation der Proben um diese später hinsichtlich möglicher antimikrobieller Aktivität zu untersuchen.

2.4.1 Flüssigchromatographie Profinity eXact™ Protein Purification System

Für die Flüssigkeitschromatographie des Fusionsproteins wurden Bio-Scale Cartridges mit einem Milliliter Säulen-Volumen verwendet.

2.4.1.1 Vorbereiten der Pufferlösungen

Alle vorbereiteten Pufferlösungen werden auf 4° C temperiert. Es werden folgende Lösungen vorbereitet (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Lösungen und Puffer für das Profinity eXact Protein Purification System

Pufferlösung	Zusammensetzung
Profinity-Waschpuffer	Natriumphosphat [0,1 M], pH 7,2
Profinity-Elutionspuffer	Natriumphosphat [0,1 M], Natriumfluorid [0,1 M], pH 7,2
Profinity-Reinigungslösung	Phosphorsäure [0,1 M]
Profinity-Lagerungspuffer	Natriumphosphat [0,1 M], Natriumazid [0,1 M], pH 7,2

2.4.1.2 Auftragen der Probe und Waschung

Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule zunächst mit 10 CV (*Column Volume*) mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min equilibriert. Dies diente der Elimination des Azid-Ions aus dem Lagerungspuffer der Säule. Wie in Tabelle 4 angegeben gehören Azid-Ionen (N_3^-) zu den Trigger-Ionen für den Subtilisin-Rest. Das Auftragen des Zellextraktes erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min, wobei ein Gesamtvolumen von 5 ml optimal war. Anschließend erfolgte die Waschung der Säule mit 10 CV Waschpuffer bei einem Flow von 3 ml/min. Die Vollständigkeit konnte durch ein Erreichen der *Base-Line* im UV-Detektor nachvollzogen werden. Durch die höhere Geschwindigkeit während des Reinigungsschrittes wurde zum einen die Dauer verkürzt und dadurch die Rate der intrinsischen Spaltung des Fusionsproteins reduziert, indem die Kontaktzeit zwischen möglichen Triggerionen aus dem Waschpuffer und der Protease reduziert wurde.

2.4.1.3 Elution des Fusionsproteins

Zum Auslösen der Spaltung wurde die Säule mit 2 CV des Elutionspuffers gespült (Fließgeschwindigkeit 3 ml/min), beziehungsweise bis der Wert der Leitfähigkeit das Maximum erreicht hatte. Es erfolgte eine Inkubation für mindestens 30 min bei

Raumtemperatur. Nach 30 min Inkubationszeit wurde das geschnittene Protein mit Elutionspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min eluiert, bis die UV-Absorption bei 280 nm die Basislinie erreicht hatte. Über den UV-Detektor wurde das Vorhandensein von entsprechenden absorbierenden Stoffen angezeigt und damit die automatische Probensammlung initiiert und beendet.

2.4.1.4 Reinigung der Profinity eXact™-Säule

Im Anschluss an die Elution wurde die Säule zunächst mit 5 CV des Waschpuffers bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min gespült. Dann wurde mit 3 CV der Reinigungslösung (siehe Tabelle 5, Fließgeschwindigkeit: 3 ml/min) der Profinity-Tag von der Säule eluiert. Anschließend wurde mit 5 CV Waschpuffer (Fließgeschwindigkeit: 3 ml/min) die Reinigungslösung ausgewaschen und die Säule neutralisiert. Am Ende sind mindestens 2 CV Lagerungspuffer appliziert worden, dessen bakterizides Azid-Ion vor einer Verkeimung schützen soll. Die Säule wurde bei 4° C gelagert.

2.4.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC ist ein etabliertes analytisches Verfahren mit hoher Trennleistung. Man unterscheidet eine mobile Phase, die das sogenannte Laufmittel (Elutionsmittel) enthält, und die stationäre Phase, die in Form einer Matrix an ein Säulenmaterial gebunden ist; bei dem Säulenmaterial handelt es sich meist um Silizium. Man unterscheidet Normalphasen-HPLC, bei der die stationäre Phase polare Eigenschaften aufweist, von der Umkehrphasen-HPLC. Im Fall der sogenannten Umkehrphasen-HPLC macht man sich hydrophobe Wechselwirkungen zu Nutze, in dem man die stationäre Phase mit Alkanen entsprechender Kettenlänge chemisch verknüpft und somit hydrophob macht. Die Retentionszeit der einzelnen Analyten ist abhängig von der jeweiligen Interaktion mit der stationären Phase aber auch von den Elutionseigenschaften der mobilen Phase.

Die Probe wird unter Verwendung eines polaren Lösungsmittels auf die Säule aufgetragen. Durch das Vorhandensein unpolarer Aminosäuren kommt es zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Peptiden und stationärer Phase, die Peptide werden adhären. Der mobilen Phase wird nun kontinuierlich ansteigend ein unpolares Elutionsmittel beigemischt, wodurch die Wechselwirkungen zwischen Peptid und Matrix reduziert wird und die Peptide in Abhängigkeit ihrer Hydrophobizität in die mobile Phase übergehen und folglich eluiert werden. Anhand des wählbaren Gradienten lässt sich das Auflösungsverhalten des Verfahrens beeinflussen.

2.4.2.1 C8-Umkehrphasen-HPLC

Die durch die Anwendung des Profinity eXact™ Protein Purification Systems gewonnene Proben wurden im Anschluss einer C8-Umkehrphasen-HPLC unterzogen. Hierzu wurde eine SP 250/10 300-7 C8-HPLC-Säule verwendet. Zur Trennung wurde ein Gradient durchlaufen, der von dem polaren Puffer A (0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) in TKA-Wasser) hin zu dem polaren Puffer B (0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in Acetonitril) verändert wurde. Die gewählte Fließgeschwindigkeit betrug 3 ml/min, die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 215 nm. Zunächst wurde die Säule für 10 min equilibriert. Dazu wurde ein Gemisch aus 90 % Puffer A und 10 % Puffer B verwendet. Es erfolgte das Auftragen der Proben. Der Gradient, mit dem auch die Equilibrierung erfolgte wurde nun für 5 min fortgesetzt, steigt dann in den folgenden 25 min auf ein Verhältnis von 40 % Puffer A und 60 % Puffer B. Danach wurde der Gradient innerhalb von 5 min steil auf 100 % Puffer B erhöht. Diese Einstellung wurde für 5 min beibehalten. Die Fraktionierung anhand der Peaks erfolgte manuell. Die asservierten Proteinfractionen wurden mittels massenspektrometrischer Analyse (siehe 2.5.2) überprüft. Anschließend wurde der Proteingehalt derjenigen Proben bestimmt, deren gemessene Masse mit den berechneten Massen von Lorocrin₁₋₈₈ und des Profinity eXact-Tags übereinstimmten. Zur weiteren Verwendung wurden Aliquots von jeweils 100 µg lyophilisiert und bei -20° C gelagert.

2.4.2.2 C2/C18-Umkehrphasen-HPLC

Der letzte chromatographische Aufreinigungsschritt wurde mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Zur Anwendung kam eine Jupiter C18 Säule an einer Äkta Explorer-Anlage. Durch die längeren Alkanketten der stationären Phase weist diese Säule eine höhere Retentionszeit auf. Als Elutionsmittel wurde ein Gradient von Puffer A (0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in TKA-Wasser) zu Puffer B (0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in Acetonitril) bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 µl/min verwendet. Initial wurde die Säule mit 100 % Puffer A equilibriert. Es erfolgte das Auftragen der Proben. Innerhalb der ersten 10 min wurde ein linearer Gradient bis zu einem Verhältnis von 75% Puffer A zu 25 % Puffer B gewählt. Dann folgte ein weiterer linearer Gradient, der innerhalb von 30 min auf ein Verhältnis von 30 % Puffer A zu 70 % Puffer B angestiegen ist. Für die letzten 10 min wurde der Gradient auf 100 % Puffer B erhöht. Es wurden die folgenden Wellenlängen detektiert: 215 nm und 254 nm bzw. 256 nm und 280 nm. Die Fraktionierung erfolgte manuell.

Durch Ermittlung der Fläche eines einzelnen Peaks ist es möglich die Proteinmenge näherungsweise durch die AUC (*area under the curve*) zu bestimmen.

2.5 Proteinanalytik

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine, die nach Durchführung der chromatographischen Verfahren vorlagen, erfolgte mittels eines errechneten molaren Extinktionskoeffizienten unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Dies war unter anderem notwendig, um die Bindungskapazitäten der HPLC-Säulen nicht zu überschreiten, was einen unnötigen Verlust an exprimierten Proteinen zur Folge haben könnte. Zur Ermittlung der Absorption wurde eine Messung dieser mittels Einstrahlphotometer (NanoDrop 1000) bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Die Besonderheit bei dem verwendeten Photometer ist, dass die Messung ohne die üblicherweise notwendige Küvette durchgeführt werden kann. Aus diesem Grund sind lediglich Probenmengen von 0,5 µl bis 2,0 µl notwendig, die direkt in den Strahlengang der optischen Messeinheit pipettiert werden. Durch Herunterklappen des Gerätearmes entsteht eine Flüssigkeitssäule, deren Schichtdicke automatisch für die Messung eingestellt wird (0,1 mm und 1,0 mm). Der zur Berechnung der Proteinkonzentration notwendige molare Extinktionskoeffizient ist unter anderem abhängig von der Anzahl der vorhandenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie der Ausbildung von Disulfid-Brücken. Bei bekannter Aminosäuresequenz eines zu analysierenden Proteins kann der zugehörige molare Extinktionskoeffizient berechnet werden. Hierfür wurde das Programm „ProtParam“, auf der Internetseite des ExPaSy Proteomic Servers (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) verwendet. Anschließend konnte die Konzentration der Proteine mit Hilfe des Gesetzes nach Lambert-Beer ermittelt werden. Dieses Gesetz besagt, dass sich die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge proportional zur Konzentration der Lösung verhält, solange die Schichtdicke der Lösung, durch die gemessen wird, gleich bleibt:

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

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

2.5.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Verfahren, bei dem der Analyt ionisiert in den gasförmigen Zustand überführt wird. Diese Ionen werden anhand ihres Masse-Ladungs-

Verhältnisses (m/q) getrennt und detektiert. Hiermit lässt sich eine exakte Massenbestimmung von Analyten, wie diversen Biomolekülen (z.B. Peptide und Proteine oder Lipide) durchführen. Prinzipiell weisen Massenspektrometer drei Grundelemente in folgender Reihenfolge auf: Ionenerzeugung, Ionentrennung, Ionennachweis.

Wir verwendeten die Elektronenspray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) an einem Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF II). Bei der Elektronenspray-Ionisierung handelt es sich um ein schonendes Ionisierungsverfahren, das auch für empfindliche Moleküle geeignet ist. Hierbei wird die Probenlösung durch eine Metallkapillare geleitet, bei der durch das Anlegen einer Spannung ein elektrisches Feld zu einer Gegenelektrode besteht. Durch Zugabe von Ameisensäure wird sichergestellt, dass die Proteine ausreichend positive Ladungen aufweisen. Die Ionen der Probenlösung bewegen sich in Richtung der Gegenelektrode, wodurch sich am Ende der Kapillare gleichartig geladenen Ionen anhäufen und sich gegenseitig so stark abstoßen, dass sie in Form eines feinen Aerosols die Kapillare verlassen. Durch Zugabe eines inerten Trägergases, hierbei kommt häufig Stickstoff zur Anwendung, wird die Vernebelung zusätzlich verstärkt und die Tropfengröße zusätzlich verringert. Die Ionentrennung erfolgt im Wechselfeld der Quadrupol-Stäbe anhand des Masse-Ladungs-Verhältnisses. Der Time-of-Flight-Detektor dient dazu, die getrennten Ionen zu zählen und in elektrische Signale umzusetzen.

Die Analyse von Loricrin₁₋₈₈ und des Profinity eXact-Tags erfolgte im Positiv-Ionen-Modus. Rohdaten kombinierter Spektren wurden Hintergrund-bereinigt und die monoisotopischen Massen in Dalton über die MaximumEntropy 1 (MaxEnt1)-Dekonvolution der MassLynx-Software aus der gemessenen Masse und dem Ladungszustand die Masse eines einfach geladenes Moleküls berechnet. Zum Vergleich der gemessenen Massen wurden über das Programm „ProtParam“ (ExPaSy Proteomic Servers, Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)) Massendaten für Loricrin₁₋₈₈ sowie den Profinity eXact-Tag berechnet und verglichen.

2.6 Antimikrobielle Testverfahren

Nach der erfolgreichen Aufreinigung des rekombinant hergestellten humanen Loricrin₁₋₈₈ wurde dies auf das Merkmal der antimikrobiellen Aktivität gegen den Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, gegen die Gram-negativen Bakterienstämme *E. coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 sowie den Hefepilz *Candida albicans* ATCC 24433 untersucht. Zur Untersuchung auf die antimikrobielle Aktivität wurde der radiale Plattendiffusionstest verwendet (siehe 2.6.1).

Dieser Test wurde freundlicherweise im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, von Frau Silvia Voss durchgeführt.

2.6.1 Radialer Plattendiffusionstest

Mit dem radialen Plattendiffusionstest (Bauer et al., 1966) kann der Einfluss von diffusionsfähigen Agentien auf Mikroorganismen untersucht werden. Dabei wird in eine Petrischale eine Schicht Mikroorganismen haltiger Agar gegossen, diese Schicht wird *Underlay* genannt. Nach dem Gelieren werden die zu testenden Proben eingebracht. In unserem Fall wurden hierfür zunächst Löcher ausgestanzt (Lochtest) und in diese Löcher 5 µl der Probe gegeben. Die Flüssigkeit diffundiert in den Agar und wird über Nacht inkubiert. Am Folgetag wird eine weitere Schicht Nährstoff reicher Agar aufgebracht, diese Schicht wird *Overlay* genannt. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Stunden kann das Ergebnis anhand des Wachstumsverhaltens der Bakterien abgelesen werden. Weist eine zu testende Substanz antimikrobielle Aktivität auf, entsteht um die Probe ein sogenannter Hemmhof, in dem es zu keinem Wachstum kommt. Der Durchmesser eines Hemmhofes ist proportional zur antimikrobiellen Aktivität der eingesetzten Substanz.

Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Mikroorganismen (siehe 2.1.10) zunächst in 8 ml BHI-Medium angesetzt und über Nacht bei 37° C, 120 rpm inkubiert. Außerdem wurden *Underlay* und *Overlay* angesetzt. Am folgenden Tag wurden in Abhängigkeit von der Bakteriengattung verschiedene Volumina der Vorkultur (Übernachtskultur) in je 8 ml BHI-Medium überführt und für 2 - 3,5 h stehend bzw. schüttelnd inkubiert. Eine Übersicht über die Volumina, den Modus der Inkubation sowie das verwendete Volumen im *Underlay* zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Kultivierung der verschiedenen Mikroorganismen im Radialdiffusionstest

Mikroorganismus	Übertragenes Volumen aus der Übernachtskultur	Inkubationsmodus der Kultur bei 37° C	Verwendetes Volumen in 10 ml Underlay
<i>E. coli</i>	50 µl	Standkultur	50 µl
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 µl	Standkultur	50 µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	100 µl	Standkultur	100 µl
<i>Candida albicans</i>	200 µl	Schüttelkultur	200 µl

Die *Underlay*-Agarose (1 % Agarose, 0,02 % Tween20, 1 % TSB-Medium, 10 mM Natriumphosphatpuffer) wurde durch Erhitzen verflüssigt und konstant auf 46° C gehalten. In

Material und Methoden

je 10 ml der verflüssigten Agarose wurden die in Tabelle 6 angegebenen Volumina der verschiedenen Bakteriensuspensionen gegeben, vermischt und anschließend in Petrischalen gegossen. Nach einer Ruhezeit von 15 min wurden die Petrischalen zum Aushärten für 30 min in den Kühlschrank (8° C) gegeben. Im Anschluss wurden mittels Hautstanze Löcher von 3 mm Durchmesser gestanzt und mit jeweils 5 µl Testlösung gegeben, wobei die zu testenden Proben vorher in 0,01 % Essigsäure gelöst wurden. Neben den auf antimikrobielle Aktivität zu testenden Proben wurden als Positivkontrolle humanes Lysozym (0,1 mg in 100 µl Essigsäure [0,01 %]) und als Negativkontrolle Essigsäure [0,01 %] aufgetragen.

Im Anschluss wurde eine Schicht *Overlay*-Agarose (1 % Agarose, 3,4 % Caseinpepton, 0,6 % Sojamehlpepton, 0,5 % D(+)-Glucose-Monohydrat, 1 % NaCl, 0,5 % Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,2-7,4) über die zuvor präparierte *Underlay*-Agarose geschichtet. Hierzu wurde diese ebenso thermisch verflüssigt und konstant auf 46 °C gehalten und zum gegebenen Zeitpunkt vorsichtig über das Underlay gegossen. Nach Erkalten erfolgte eine abschließende Inkubation für 2 – 3 h bei 37° C. Anschließend konnten die Durchmesser der Hemmhöfe vermessen werden. Bei dem Vorhandensein antimikrobieller Aktivität bei mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen lässt sich die sogenannte „Minimale Effektive Konzentration“ (MEK) berechnen (Steinberg & Lehrer, 1997). Hierzu werden von den gemessenen Hemmhofwerten der Durchmesser der Stanzlöcher subtrahiert und tatsächliche Hemmhofwert in Einheiten umgerechnet. 10 Einheiten entsprechen einem Millimeter Hemmhofwert. Anschließend werden die Einheiten halblogarithmisch gegen die Konzentration der jeweiligen Proben aufgetragen. Die MEK ist am Schnittpunkt der Regressionsgraden mit der Abszisse ablesbar.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Expression von Loricrin₁₋₈₈

Die Thiazol/Oxazol-modifizierten Microcine stellen eine große Gruppe der ribosomal synthetisierten, posttranslational modifizierten Proteine dar (Arnison et al., 2013). Für die Synthese der namensgebenden posttranslational eingefügten Thiazol- und/oder Oxazol-Heterozyklen sind die Seitenketten der Aminosäuren Cystein, Glycin und Serin notwendig, deren Anzahl Position und Reihenfolge einen wesentlichen Einfluss auf die Effizienz der Synthetase haben (Melby et al., 2011). Der Sequenzvergleich zwischen dem MccB17-Vorläuferpeptid und Loricrin zeigt Ähnlichkeiten in der Anordnung eben dieser Glycin-Serin-Motive als auch der Glycin-Cystein-Motive. Möglicherweise stellt Loricrin ein Substrat für den MccB17-Synthasecomplex dar. Ziel dieser Arbeit war es, die ersten 88 Aminosäuren des N-Terminus von Loricrin rekombinant zu exprimieren.

3.1.1 Amplifikation der Loricrin₁₋₈₈ Gensequenz mittels PCR

Aufgrund der Beobachtungen vorangegangener Untersuchungen (Gedicke, 2006), ist es bekannt, dass die Amplifikation von Loricrin generell als schwierig gilt. Als DNA-Quelle wurde zunächst versucht cDNA von differenzierten Keratinozyten zu verwenden. Nach Ausbleiben von passenden PCR-Produkten wurde kommerziell verfügbare humane genomische DNA (siehe 2.1.5) verwendet. Es war zudem notwendig, den DNA-Abschnitt in zwei Schritten zu amplifizieren. Zunächst wurde eine Prä-nested-PCR durchgeführt. Durch den Einsatz eines Temperaturgradienten wurde die am besten geeignete Annealing-Temperatur ermittelt. Diese lag mit 56° C deutlich unter der angegebenen Schmelztemperatur der Oligonukleotide (LOR-F-nc: 71,3° C, LOR-R-nc: 71,2° C). Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt.

Ergebnisse

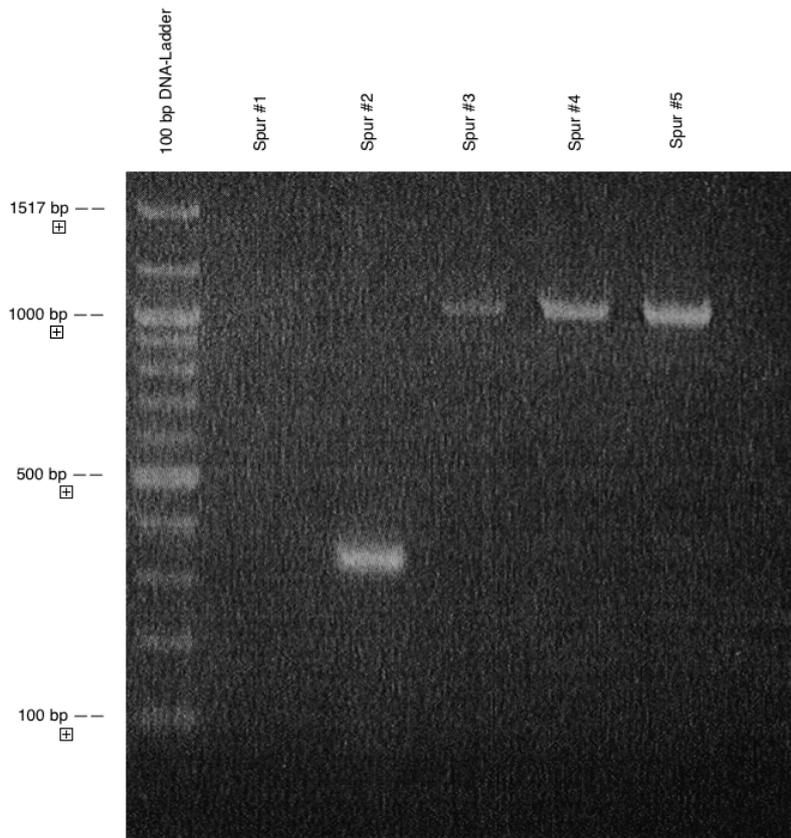


Abbildung 5: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit Produkten der Prä-Nested PCR

Spur 1: Template: cDNA (differenzierte Keratinozyten), Oligonukleotide: LOR-F-nc + LOR-R-nc
Spur 2: Template: cDNA (differenzierte Keratinozyten), Oligonukleotide: PSO-Pet-32f + PSO-Pet-32-r
Spur 3: Template: genomische DNA (1:100), Oligonukleotide: LOR-F-nc + LOR-R-nc
Spur 4: Template: genomische DNA (1:10), Oligonukleotide: LOR-F-nc + LOR-R-nc
Spur 5: Template: genomische DNA (unverdünnt), Oligonukleotide: LOR-F-nc + LOR-R-nc

Spur 1 zeigt, dass es nicht möglich gewesen ist, ein PCR-Produkt für Loricrin auf cDNA-Ebene differenzierter Keratinozyten zu generieren. Im Sinne einer Positivkontrolle wurde ein etabliertes Oligonukleotidpaar zu der cDNA gegeben, was zu einem entsprechenden PCR Produkt in Spur 2 geführt hat.

Die Spuren 3 bis 5 zeigen je eine Bande, die der gewünschten Fragmentlänge (998 bp) entspricht. Wie man deutlich erkennt, steigt die Menge des PCR-Produktes mit der Konzentration des Templates an. In dem gewählten Verdünnungsbereich gab es keinen Anhalt für eine sogenannte Template-Inhibierung. Die Banden wurden anschließend aus dem Gel extrahiert (siehe 2.2.3).

Im Anschluss an die Elution wurde mit dem Extraktionsprodukt die Nested-PCR durchgeführt (siehe 2.2.1.2). Das Ergebnis des durch Temperaturgradienten-PCR optimierten PCR-Protokolls ist in Abbildung 6 dargestellt.

Ergebnisse

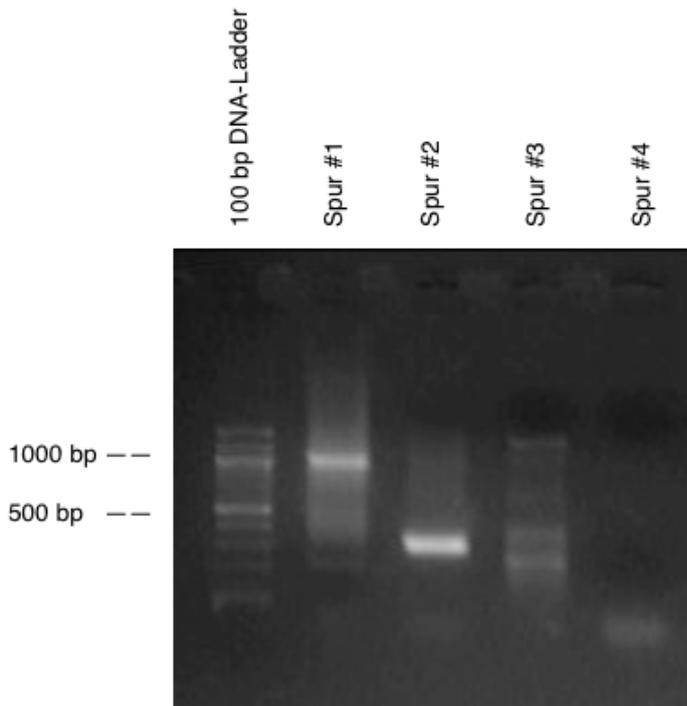


Abbildung 6: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit Produkten der Nested PCR.

Spur 1: Template: Prä-Nested PCR-Produkt, Oligonukleotide: pPal7-LOR-forward + pPal7-LOR-reverse
Spur 2: Template: Prä-Nested PCR-Produkt, Oligonukleotide: pPal7-LOR-forward + pPal7-LOR88-reverse
Spur 3: Template: Prä-Nested PCR-Produkt, Oligonukleotide: PSO-Pet-32f + PSO-Pet-32-r
Spur 4: Template: TKA-Wasser, Oligonukleotide: pPal7-LOR-forward + pPal7-LOR-reverse

Man erkennt zunächst, dass die Nested-PCR neben zwei deutlichen Banden sehr viele unspezifische PCR-Produkte geschaffen hat, die in Form von diffus verteilten gefärbten DNA-Fragmenten im Agarosegel zu erkennen sind. Eine Anhebung der Annealing-Temperatur brachte keine Verbesserung, sondern führte zum Ausbleiben der erwarteten Banden. Die in Abbildung 6 sichtbaren Banden scheinen vom Laufverhalten zu groß für die gewünschten Fragmente (LOR₁₋₈₈: 287 bp, LOR₁₋₃₁₂: 959 bp). Nach dem Ausschneiden der Banden erfolgte die Gelextraktion wie unter 2.2.3 beschrieben.

3.1.2 Klonierung in das pPal7-System

Die Klonierung in das pPal7-System diente zwei Zwecken, der Vervielfältigung der PCR-Fragmente und anschließend der Expression des Zielproteins.

Zunächst wurden *E. coli* Top10 transformiert. Hierfür wurde zunächst der zirkuläre pPal7-Vektor mit den Restriktionsenzymen NotI und HindIII geschnitten (siehe 2.2.4) und damit linearisiert. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese (siehe 2.2.2) durchgeführt, um die entstandenen Fragmente vom Vektor zu entfernen. Abbildung 7 zeigt das unterschiedliche

Ergebnisse

Laufverhalten des zirkulären Vektors in Spur 1 im Gegensatz zu dem linearisierten Vektor Spuren 2,3,4.

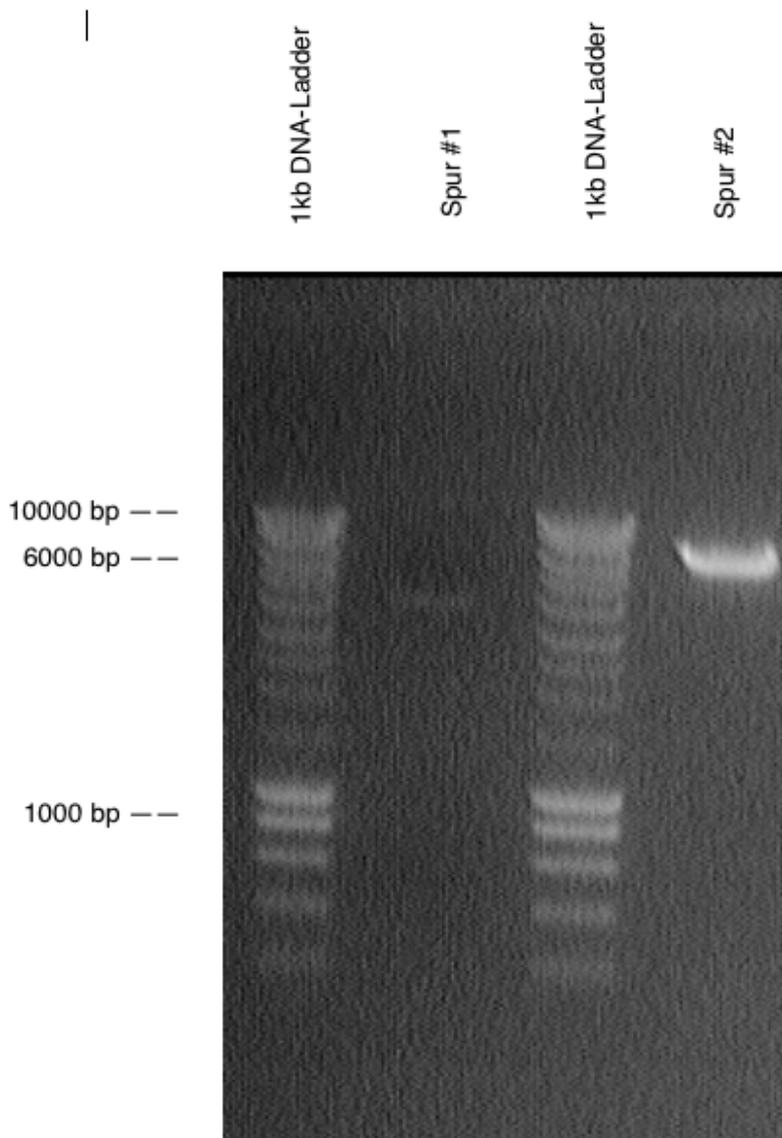


Abbildung 7: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit dem pPal7 Vektor zirkulär und linearisiert

Spur 1: pPal7-Vektor zirkulär

Spur 2: pPal7-Vektor linearisiert nach Restriktionshydrolyse mit NotI und HindIII

Die Eluate der Nested-PCR wurden ebenfalls mit den Restriktionsenzymen NotI und HindIII geschnitten und über eine Agarosegel-Elektrophorese von den entstandenen Fragmenten bereinigt.

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

Für die Ligation wurde das zu ligierende Insert in neunfachem molaren Überschuss zum Vektor gegeben. Die Durchführung der Ligation erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben. Anschließend wurde zeitnah eine Transformation mittels Elektroporation (siehe 2.2.7) durchgeführt und die transformierten Bakterienzellen auf LB-Agarplatten aufgetragen und inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden daraufhin mittels Colony-Check-PCR (siehe 2.2.1.3) untersucht. Auch bei der Colony-Check-PCR wurden diverse PCR-Kits ausprobiert. Es zeigte sich, dass nur das Long-PCR Kit geeignet war PCR-Produkte zu generieren. Der Nachweis einer LOR₁₋₈₈ enthaltenden Kolonie ist in Abbildung 8 dargestellt.

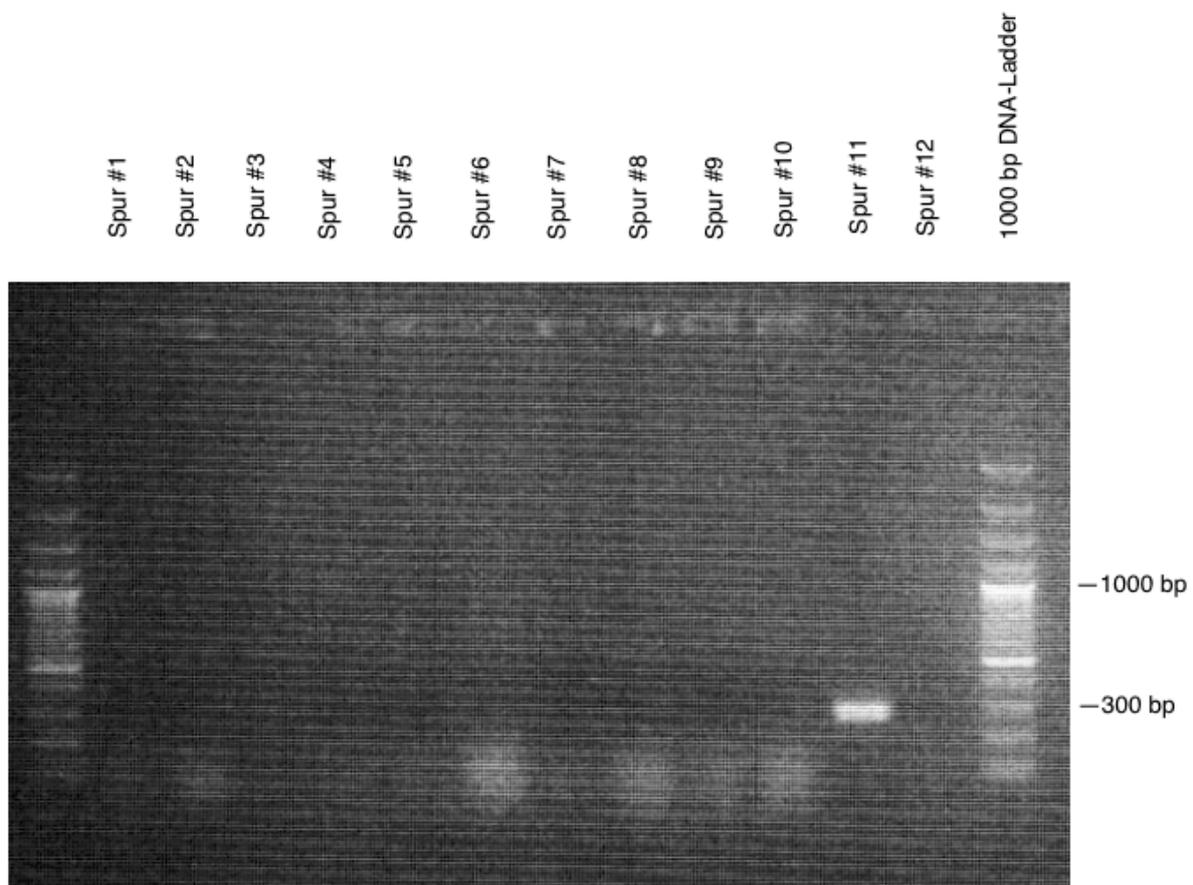


Abbildung 8: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Colony Check PCR

Spuren 1-11: Proben verschiedener Bakterienkolonien, Spur 12: Negativkontrolle, Oligonukleotide: pPal7-LOR-forward + pPal7-LOR88-reverse. Spur 11 zeigt eine Bande in passender Laufhöhe (287 bp)

Man erkennt deutlich eine Bande, die einer Fragmentlänge von ungefähr 287 bp entspricht. Die Bakterien der Kolonie mit positivem PCR-Nachweis wurden kultiviert und die Plasmid - DNA der Sequenzierung zugeführt (siehe 2.2.9).

Ergebnisse

3.1.2.2 DNA-Sequenzierung Loricrin₁₋₈₈

Die Sequenzierung ergab eine fehlerfreie Sequenz mit einem bekannten Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) der zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin (Ser29Gly) an Stelle 29 der Aminosäuresequenz führt (siehe Abbildung 9).

```
ATGTCTTATCAGAAAAAGCAGCCCACCCCTCAGCCCCCAGTGGACTGCGTGAAGACCTCTGGCGGCGGTGGCGGT
atgtctttatcagaaaaagcagccccaccctcagccccagtggaactgCGTgaagacctctggcggcggtggcggt
GGCGGCGGCGGCGGCGGTGGTGGCTGCGGCTTCTTCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGTAGCAGCGGTTCTGGC
ggcgggcggaagcgggcggtggtggctgCGGcttcttcggcgggcgcggtcagggggcggttagcagcggttctggc
TTCGGCTACTCCGGCGGCGGTGGCTACTCTGGCGGCGGCTGCGGCGGGGGCTCCTCCGGCGGCGGGGGCGGGGC
tgcggctactccggcggcggtggctactctggcgggcggtgCGGcgggggctcctccggcgggcgggggcgggggc
GGCATTGGAGGCTGCGGAGGGGGCTCCGGTGGGAGCGTCTAA
ggcattggaggctgCGGagggggctccggtgggagcgcttaa
```

Abbildung 9: DNA-Sequenzierung Loricrin₁₋₈₈ (Ser29Gly)

Grün hinterlegt: Start-Codon, rot hinterlegt: Stop-Codon, grau hinterlegt: bekannter SNP, der zu dem Aminosäureaustausch Ser29Gly führt.

3.1.2.3 Transformation und Expression in *E. coli* Rosetta-Gami™ 2 Zellen

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Korrektheit des Loricrin₁₋₈₈-Inserts wurden mit der Plasmid-DNA *E. coli* Rosetta-Gami™-2 Zellen transformiert und auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden einer Colony-Check PCR unterzogen und eine Kolonie für die weiterführende Expression ausgewählt. Für die Expression wurde LB-Medium mit Ampicillin [50 mg/ml], Tetrazyklin [6,25 mg/ml] und Chloramphenicol [34 mg/ml] versetzt und mit einer isolierten Kolonie angeimpft. Die Expression wurde dann durch Zugabe von IPTG wie unter 2.3.5.3 beschrieben induziert. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Aufreinigung.

3.2 Aufreinigung von Loricrin₁₋₈₈

Für die weiteren Analyseschritte musste das Loricrin₁₋₈₈ aus dem zuvor hergestellten Bakterienlysat aufgereinigt werden. Hierfür wurde zunächst das Gesamtylat über eine Profinity eXact-Säule gegeben, um das Fusionsprotein vom Zelldetritus zu separieren und

gleichzeitig den Profinity eXact-Tag vom Zielprotein zu entfernen. Anschließend erfolgte eine zweistufige HPLC über eine C8-Säule gefolgt von einer C2/C18-Säule (siehe 2.4.2.2)

3.2.1 „On-Column Digest“ des pPal7-Loricrin₁₋₈₈-Fusionsproteins

Für den ersten Aufreinigungsschritt wurde das Zelllysat zentrifugiert und der Überstand auf die Profinity eXact-Säule des pPal7-Systems aufgetragen, nachdem diese zunächst mit dem Profinity-Waschpuffer gespült worden ist. Das Fusionsprotein bindet an der Säulenmatrix. Durch Zugabe weiteren Waschpuffers wurden die nicht gebundenen Bestandteile aus der Säule entfernt. Im Anschluss erfolgte durch Zugabe des Fluoridionen-haltigen Elutionspuffers (siehe 2.1.5) die Aktivierung der proteolytischen Aktivität des Subtilisins. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde die Säule weiter gespült. Anschließend wurde die Säule mit der Profinity Reinigungslösung für die erneute Verwendung gesäubert. Abbildung 10 zeigt das typische Chromatogramm eines solchen Aufreinigungsschrittes. Auf der Abszisse des Diagrammes ist der Volumen-Verlauf in Millilitern aufgetragen. Auf der Ordinate ist zum einen die Absorption bei 280 nm (grüne Linie), zum anderen die elektrische Leitfähigkeit (gelbe Linie) aufgetragen. Man erkennt zunächst einen Absorptionspeak, der durch das Auftragen der Probe bedingt ist. Mit Verwendung des Elutions-Puffers deutet sich nach insgesamt 18 ml aufgetragenem Volumen ein erneuter Peak an, der nach einer Inkubationszeit von 60 min gesammelt wurde. Nach dem Auftragen der Profinity-Reinigungslösung erschien ein weiterer Peak, der ebenfalls gesammelt wurde.

Ergebnisse

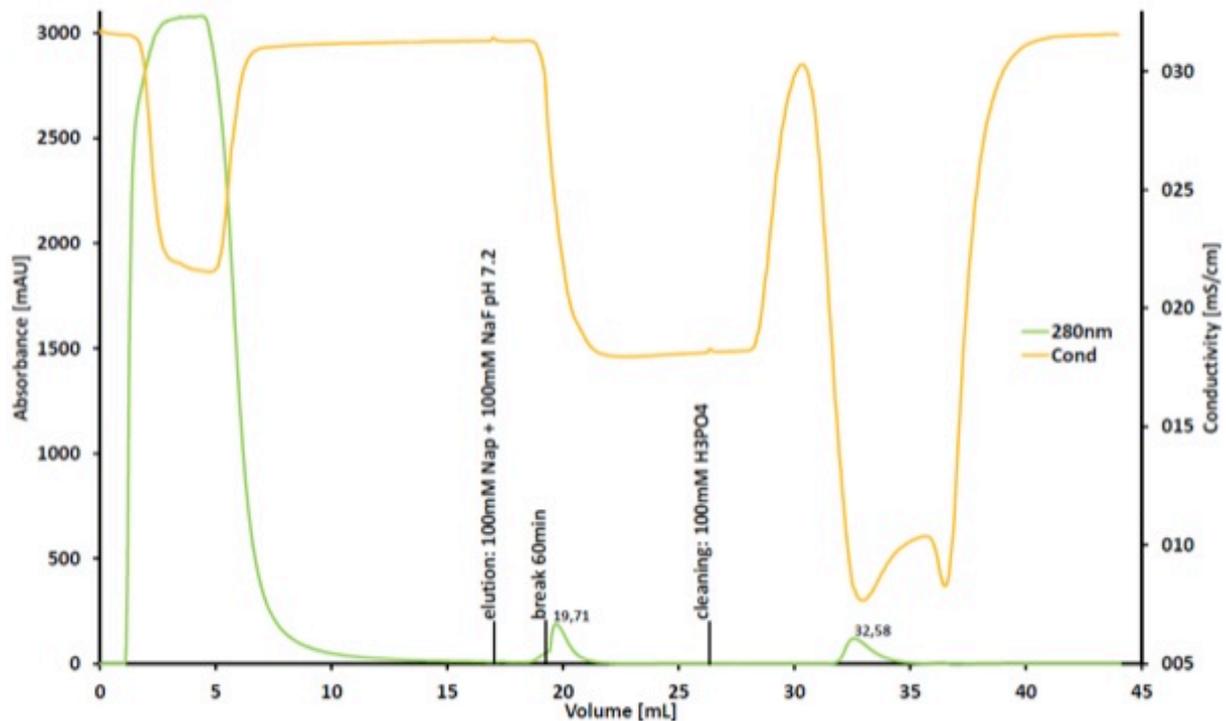


Abbildung 10: Chromatogramm der Aufreinigung und Spaltung des Loricrin₁₋₈₈-Fusionsproteins über das Profinity eXact Purification System

Abszisse: Volumen-Verlauf in ml (1 CV = 1ml); Ordinate: Grüne Linie: Absorption bei 280 nm, gelbe Linie: elektrische Leitfähigkeit in mS/cm; Elution: Zugabe Fluorid-Ionen haltigen Puffers zur Aktivierung der Proteaseaktivität; Break 60 min: Einleitung einer 60 minütigen Inkubationszeit; Cleaning: Zugabe der Profinity Reinigungslösung; Protein-Peaks: 1-5 ml: „Einspritz-Peak“, 19-21 ml: LOR₁₋₈₈, 32-35 ml: Profinity eXact Tag

3.2.2 C8 und C2/C18-HPLC

Die gesammelte Proteinfraction wurde zunächst einer C8-*Reversed Phase* (RP)-HPLC zugeführt. Die hierbei gesammelten Fraktionen wurden im Anschluss einer C2/C18-RP-HPLC unterzogen. Abbildung 11 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm eines C2/C18-RP-HPLC-Laufes. Dargestellt ist ein zeitlicher Ausschnitt von Minute 12,5 bis 17,5 mit einem linearen Acetonitril-Gradienten von circa 28 % bis etwa 52 %. Man erkennt einen singulären Peak nach einer Retentionszeit von 16,12 min, gefolgt von mehreren zusammenhängend erscheinenden Peaks nach einer Retentionszeit von 16,96 min, 17,45 min, 18,17 min und 18,74 min, die massenspektrometrisch analysiert wurden.

Ergebnisse

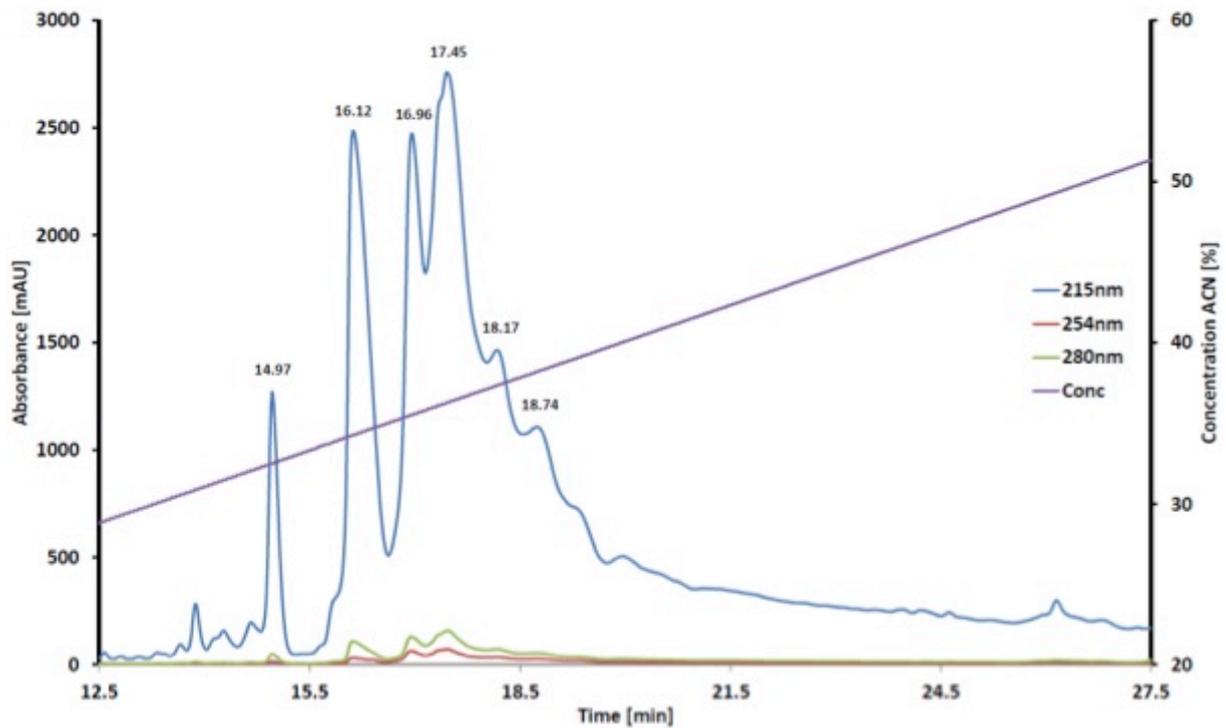


Abbildung 11: Chromatogramm eines C2/C18-HPLC-Laufes zur Aufreinigung von LOR₁₋₈₈

Abszisse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; Ordinate: Blaue Linie: Absorption bei 215 nm, rote Linie: Absorption bei 254 nm, grüne Linie: Absorption bei 280 nm, violette Linie: Konzentrationsverlauf des Acetonitril in %.

3.3 Massenspektrometrische Analyse der aufgereinigten Loricrin₁₋₈₈-Fraktionen.

Die massenspektrometrische Untersuchung ergab folgende errechnete Massen für die jeweilige Fraktion gemäß der Retentionszeit: 16,96 min: 7113,7 Da, 17,45 min: 7114,3 Da, 18,17 min: 7114,0 Da und 14228,0 Da, 18,74 min: 7114,6 Da und 14229,4 Da. Die erwartete Masse für das Fragment Loricrin₁₋₈₈ beträgt 7117,5 Da, somit konnte davon ausgegangen werden, dass das Fragment in unterschiedlichen Faltungsformen vorliegt. Abbildung 12 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der Massenspektrometrie der einzelnen Fraktionen. Dargestellt ist die MaxEnt1-Auswertung.

Ergebnisse

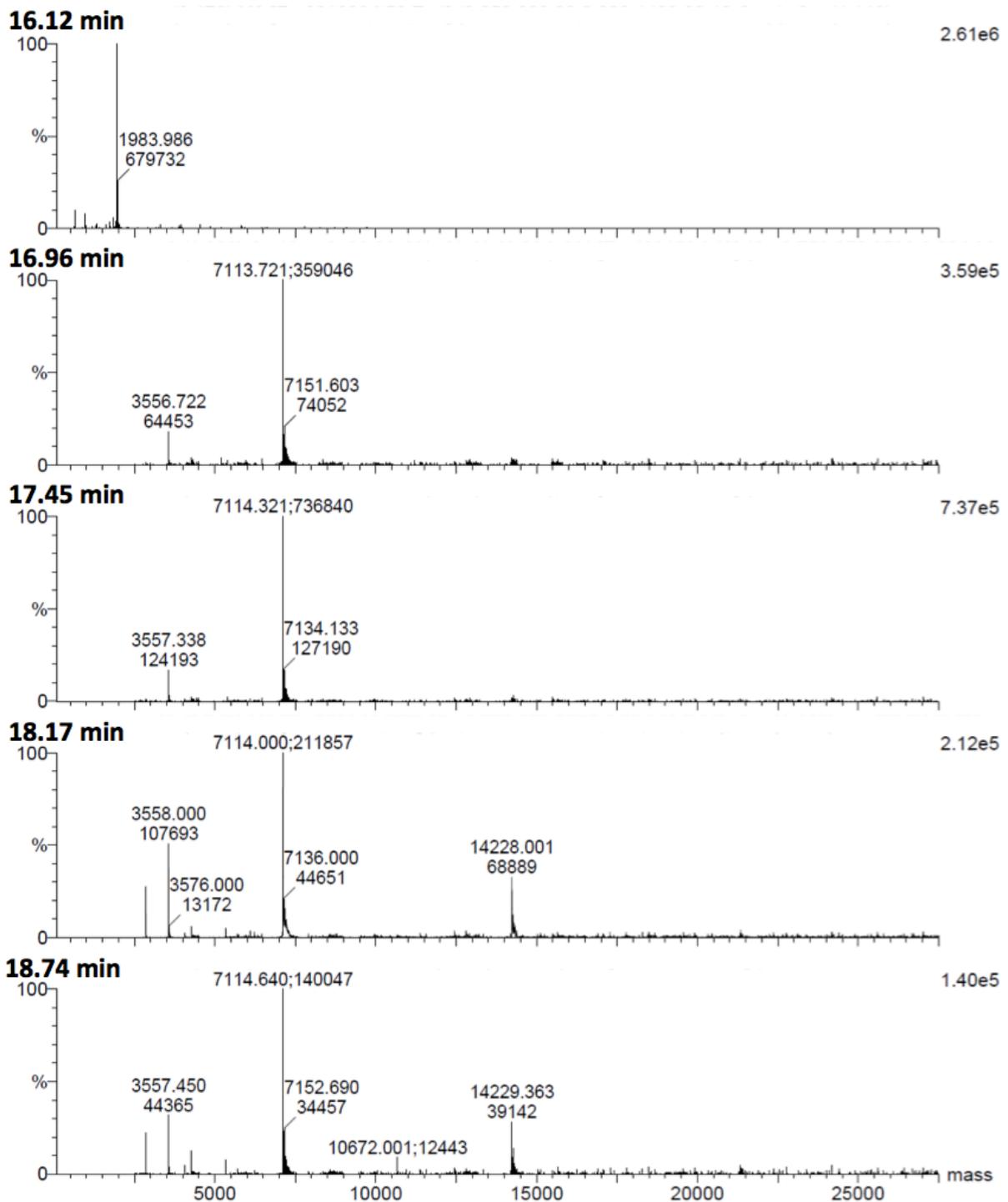


Abbildung 12: Massenbestimmung der Loricrin₁₋₈₈ Fragmente mittels QTOF-Massenspektrometrie.

Dargestellt ist die MaxEnt1-Auswertung der einzelnen Fraktionen der C2/C18-HPLC, unterteilt nach der jeweiligen Retentionszeit. Die Intensität der einzelnen Peaks in % (Ordinate) ist hier gegen die berechnete Masse (Abszisse) aufgetragen. Die erwartete Masse für Loricrin₁₋₈₈: 7117,5 Da sowie für nicht-kovalente Dimere: 14235 Da und für über eine Disulfidbrücke verknüpfte Dimere: 14233 Da.

3.4 Antimikrobielle Aktivität von Loricrin₁₋₈₈ im radialen Plattendiffusionstest

Die zur Expression verwendeten Rosetta-GamiTM2-Zellen sind nicht Träger des pMccB17-Plasmids (siehe 6.2). Aus diesem Grund fehlen die entsprechenden Enzyme, die für die Kondensation der Glycin/Serin- und Glycin/Cystein-Motive und damit für die Bildung der Thiazol/Oxazol-Heterozyklen haltigen Peptide notwendig sind (Davagnino et al., 1986). Loricrin₁₋₈₈ wies erwartungsgemäß im radialen Plattendiffusionstest gegen keinen der ausgewählten Testorganismen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Candida albicans* ATCC 24433, *Bacillus megaterium* ATCC 14581 und *E. coli* ATCC 11775 antimikrobielle Aktivität auf. Dies gilt für alle verwendeten Verdünnungen (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) von Loricrin₁₋₈₈. Die 1:1-Verdünnung entsprach dabei einer Konzentration von 1 µg/µl. Bei dem als Positivkontrolle verwendeten humanen Lysozym [100 ng/µl] ergaben sich bei allen zu testenden Mikroorganismen intensive Hemmhöfe. Tabelle 7 stellt die beschriebenen Ergebnisse der radialen Plattendiffusion für Loricrin₁₋₈₈ im Überblick dar.

Tabelle 7: Antimikrobielle Aktivität von LOR₁₋₈₈ im radialen Plattendiffusionstest

Verdünnungen Loricrin ₁₋₈₈	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	<i>E. coli</i> ATCC 11775
1:1	kH	kH	kH	kH	kH
1:3	kH	kH	kH	kH	kH
1:10	kH	kH	kH	kH	kH
1:30	kH	kH	kH	kH	kH
1:100	kH	kH	kH	kH	kH
Pos. K.	6,5	6	6,5	10	5,5

H: Hemmhof, Durchmesser des Hemmhof in mm; kH: kein Hemmhof vorhanden; Pos. K.: Positivkontrolle: humanes Lysozym 100 ng/µl. Bei keinem der Testorganismen zeigte sich antimikrobielle Aktivität von Loricrin₁₋₈₈. Die 1:1-Verdünnung entspricht dabei einer Konzentration von 1 µg/µl. Alle Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

4 Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass sich im Vergleich der Sequenzen des MccB17-Vorläuferpeptids und des N-terminalen Abschnitts von Loricrin eine Ähnlichkeit in der Anordnung der Glycin-Serin- als auch der Glycin/Cystein-Motive zeigte (siehe Abbildung 2). MccB17 gehört zu den Thiazol/Oxazol-modifizierten Microcinen (TOMMs) (Melby et al., 2011), die sich wiederum den ribosomal synthetisierten, posttranslational modifizierten Peptiden (RiPPs) subsummieren lassen, die in den meisten Fällen antimikrobielle Aktivität aufzeigen (Arnison et al., 2013). Charakteristisch für die TOMMs sind die namensgebenden posttranslational eingefügten Thiazol- und/oder Oxazol-Heterozyklen auf Basis der Seitenketten der Aminosäuren Glycin, Cystein, Serin oder Threonin. MccB17 wird von *E. coli* Stämmen produziert, die das Plasmid pMccB17 beherbergen (Davagnino et al., 1986). Dieses codiert für ein 69 Aminosäuren langes Vorläuferpeptid (McbA) und einen trimeren Synthetasekomplex aus McbB (Cyclodehydratase), McbC (Dehydrogenase) und McbD. Das mature Peptid weist jeweils 4 Oxazol- und 4 Thiazolringen, die von N- nach C-terminal gebildet werden auf (Li et al., 1996). Entscheidend für die posttranslationale Modifikation scheint insbesondere die N-terminale *Linker*-Region, bestehend aus 10 Glycinen zu sein (Jill C. Milne et al., 1999; Oman & van der Donk, 2010). Die antimikrobielle Aktivität des MccB17 beruht auf der Inhibierung der DNA-Gyrase, indem der Komplex aus DNA und Gyrase als sog. *Cleavage Complex* ähnlich wie bei den Fluorchinolonen stabilisiert wird (Heddle et al., 2001; Thompson et al., 2014).

Antimikrobielle Peptide sind Teil des angeborenen Immunsystems und leisten einen wesentlichen Beitrag zur Bewahrung der Homöostase der bakteriellen Besiedelung der Körperoberfläche. Untersuchungen zeigen zunehmend, dass der menschliche Körper als Wirt dazu in der Lage ist, das ihn besiedelnde Mikrobiom gezielt zu beeinflussen (Bevins & Salzman, 2011). Loricrin als Hauptbestandteil des *Cornified envelopes*, also der direkten Kontaktstelle zwischen Haut und Bakterienzelle, könnte ein geeignetes Substrat für die Synthese bakterieller Microcine darstellen.

Für die rekombinante Expression von Loricrin₁₋₈₈ wurden *E. coli* verwendet, die aufgrund der einfachen Kultivierbarkeit und schnellen Verdoppelungszeit von ungefähr 30 min besonders geeignet sind (Sambrook et al., 1989). Über den Einsatz einer Nested-PCR gelang es nach zahlreichen Versuchen ein PCR-Produkt zu generieren, welches vom Laufverhalten lediglich eine Größe ähnlich der zu erwartenden hatte (siehe 3.1.1). Insgesamt gestaltete sich die Etablierung eines PCR-Setups als schwierig, was aufgrund vorangegangener Arbeiten zu erwarten war (Gedicke, 2006). Es wurden zahlreiche unterschiedliche Polymerasen

Diskussion

unterschiedlicher Hersteller ausprobiert. Hierbei kamen neben Verdünnungsreihen zum Ausschluss einer sogenannten Template-Hemmung (Mülhardt, 2009), auch Temperaturgradienten-PCR-Analysen zum Einsatz. Letztere dienen der Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide während der Reaktion. Letztendlich war es nur möglich über ein einziges PCR-Kit die entsprechenden Produkte zu generieren. Dies gilt für alle PCR-Schritte inklusive der Colony-Check-PCR. Da es auch im Nested-PCR Verfahren nicht möglich war mit anderen Polymerasen ein Produkt zu erzeugen sind möglicherweise der hohe GC-Gehalt sowie die zahlreichen repetitiven Sequenzen dafür verantwortlich. Entsprechend wurde DMSO verwendet um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu reduzieren (Jensen et al., 2010) sowie die Anlagerungstemperaturen adaptiert. Welche speziellen Eigenschaften der Polymerase es ermöglichten, eine erfolgreiche PCR durchzuführen kann abschließend nicht geklärt werden, da insbesondere die im Kit enthaltenen Polymerasen nicht explizit genannt werden.

Bei der Sequenzierung des in der Colony-Check-PCR positiv getesteten Zellklons zeigte sich das Vorliegen eines bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismus, der zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin (Ser29Gly) an Stelle 29 der Aminosäuresequenz führt und ohne bekannten Krankheitswert zu sein scheint (Drera et al., 2007; Schmuth et al., 2004; Yoneda et al., 1992). Ob dies einen Einfluss auf die mögliche posttranslationale Modifikation hat, muß Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bleiben. Von der Lokalisation entspricht es der aus 10 Glycin-Resten bestehenden *Linker*-Region des MccB17-Vorläuferpeptids, welche bei der Erkennung durch den Synthetasekomplex von Bedeutung ist (Jill C. Milne et al., 1999; Oman & van der Donk, 2010).

Bei der C2/C18-RP-HPLC-Aufreinigung des rekombinanten Peptids zeigten sich vier sequentiell erscheinende, sich teilweise überlappende Peaks (siehe Abbildung 11), deren Masse sich um 3 bzw. 4 Da von der errechneten Masse unterscheiden (siehe 3.3). Eine Differenz von 1 Da zwischen der errechneten und der gemessenen Masse ist systematisch bedingt, da sich die errechnete Masse auf das nicht protonierte Peptid bezieht, während die gemessene Masse im Positivmodus auf das einfach geladene Ion zurückgerechnet wird. Die unterschiedlichen Retentionszeiten bei nur geringer Differenz der Massen deuten auf das Vorliegen unterschiedlicher Faltungsformen partiell oxidierten Varianten desselben Proteins hin. Ursächlich hierfür sind möglicherweise diverse Disulfidbrücken zwischen den fünf Cystein-Seitenketten des Loricrin₁₋₈₈ (Hohl et al., 1991). Es könnten intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet werden, die zu einer Massendifferenz von -2 Da bei einer Disulfidbrücke oder -4 Da bei zwei Disulfidbrücken führen. Außerdem zeigen sich intermolekulare Disulfidbrücken, die zu einer doppelten Masse abzüglich 2 Da führen. Ob die Disulfidbrücken für die in der HPLC sichtbaren Peaks verantwortlich sind hätte durch eine

Diskussion

Behandlung mit einem Reduktionsmittel vor der HPLC-Trennung überprüft werden können, stand aber nicht im Fokus dieser Arbeit. Eventuell spielt auch die Umwandlung von Cystein oder Serin zu Formylglycin durch Sulfatasen der *E. coli* Bakterien eine Rolle bei der Entstehung der Massendifferenz (Dierks et al., 1998).

Loricrin₁₋₈₈ zeigte im radialen Plattendiffusionstest keine antimikrobielle Aktivität gegenüber den getesteten Mikroorganismen (siehe 3.4). Dieses Ergebnis geht mit der Eingangshypothese konform, da Rosetta-GamiTM2-Zellen nicht Träger des pMccB17-Plasmids sind (siehe 6.2). In weiteren Untersuchungen sollte Loricrin₁₋₈₈ mit *Crude Extracts* von *E. coli*, die zuvor mit pUC19-mccB17 transformiert worden sind, inkubiert werden, um zu sehen, ob es durch die Enzyme zur Prozessierung kommt. Ein weiterer Ansatz wäre die Exposition von Loricrin₁₋₈₈ mit *E. coli* die ein McbA-Knock-out im pMccB17-Plasmid besitzen. Sollte es zu einer Umsetzung zu einem aktiven MccB17-Äquivalent kommen, wäre dies eine Annäherung an die These, dass es sich bei Loricrin₁₋₈₈ um eine Art Suizidpeptid handelt, welches maßgeblich an der Regulation der Hautflora beteiligt ist (Bevins & Salzman, 2011).

5 Zusammenfassung

Die Haut des Menschen ist aufgrund ihrer großen Oberfläche ständig mit einer Vielzahl potentiell pathogener Mikroorganismen konfrontiert. Hierzu zählen neben Pilzen und Viren vor allem bakterielle Spezies. Dennoch entstehen bei gesunden, immunkompetenten Individuen nur sehr selten Hautinfektionen. Es ist also davon auszugehen, dass es natürliche Abwehrmechanismen der Haut gibt. Zu diesen gehören zum einen physikalische bzw. physikochemische Mechanismen wie der sogenannte Säureschutzmantel (pH 5.0) als auch chemische Komponenten. Durch die Produktion von antimikrobiell wirksamen Peptiden besitzt die Haut einen wirksamen Schutzmechanismus gegen das Eindringen von Mikroorganismen.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch Interaktion der Kommensal-Mikroflora mit Proteinen des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ neue antimikrobielle Peptide entstehen können. Dabei könnten die Mikroorganismen Bestandteile der epidermalen Korneozyten internalisieren und durch intrazelluläre Prozessierung bakterizide Substanzen generieren, die strukturell den Bakteriocinen nahestehen. Ein wichtiges antimikrobielles Peptid bakteriellen Ursprungs ist das Bakteriocin MccB17. Der Sequenzvergleich zwischen dem MccB17-Vorläuferpeptid und dem *Stratum corneum*-Protein Loricrin zeigt Ähnlichkeiten in der Anordnung der für eine mögliche Ausbildung von Oxazol- und Thiazol-Heterozyklen erforderlichen Glycin-Serin-Motive als auch der Glycin-Cystein-Motive. Möglicherweise stellt Loricrin, ein Hauptbestandteil des *Cornified Envelopes*, ein Substrat für den MccB17-Synthasecomplex dar. Ziel dieser Arbeit war es, die ersten 88 Aminosäuren des N-Terminus von Loricrin rekombinant zu exprimieren, welches nach Optimierung der Herstellungsbedingungen gelang.

Eine Testung des hergestellten Loricrin-Fragmentes hinsichtlich antimikrobieller Aktivität mittels radialem Plattendiffusionstest zeigte entsprechend der Eingangshypothese keine Aktivität. In zukünftigen Untersuchungen ist es jetzt möglich zu klären, ob dieses Loricrin-Fragment von gramnegativen Bakterien als Precursor zur Synthese modifizierter Bakteriocine genutzt wird.

6 Anhang

6.1 Vektorkarte des pPAL7 Expressionsvektors

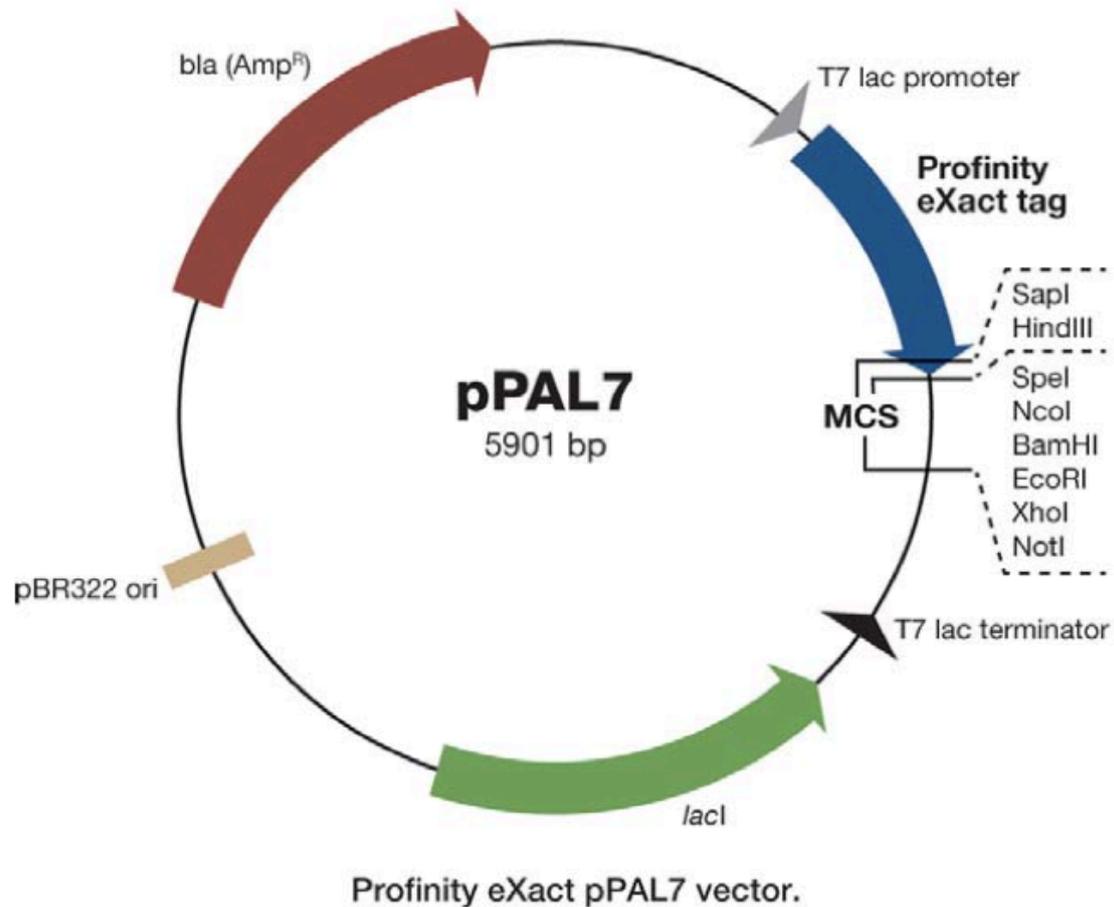


Abbildung 13: Schematische Darstellung des pPAL7-Expressionsvektors

Eingezeichnet sind die möglichen Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme. Die blockförmig farbigen Pfeile stellen wichtige Sequenzabschnitte des Vektors dar. MCS: „Multiple Cloning Site“; LacI: lac repressor; ori: „Origin of replication“; bla: Gen für Ampicillin-Resistenz. (Aus: Profinity eXact™ Protein Purification System – Instruction Manual, BIO RAD)

6.2 Datenblatt Rosetta-gami™2

Product:	Rosetta-gami™ 2 (DE3) Competent Cells	
Novagen Material Number:	71351-4	
Kit Batch Number:	D00115367	
Components and Storage Conditions:	5 x 0.2 ml Rosetta-gami™ 2 (DE3) Competent Cells	-70°C Do not allow to thaw until use.
	4 x 2 ml SOC Medium	-70°C
	1 x 10 µl Test Plasmid at 0.2 ng/µl in TE Buffer	-70°C
Antibiotic Resistance:	Chloramphenicol, recommended concentration: 34 µg/ml Streptomycin, recommended concentration: 50 µg/ml Tetracycline, recommended concentration: 12.5 µg/ml	
Genotypes:	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvu II phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac⁺ lacF⁺ pro] gor522::Tn 10 trxB pRARE2(Cam^R, Str^R, Tet^R)</i>	
Test Conditions:	A 20 µl sample of cells was transformed with 0.2 ng (1 µl) of test plasmid according to the accompanying protocol. When plated in the presence of 50 µg/ml carbenicillin and 12.5 µg/ml tetracycline, the mixture produced >2.0 x 10 ⁶ colonies/µg plasmid.	
Certified By:	E. Uribe, Quality Systems Manager	
Date:	14-Jun-2011	

Abbildung 14: Certificate of Analysis, Rosetta-gami™2, Novagene 06/2011

6.3 Sequenzen

6.3.1 cDNA und Proteinsequenz des humanen Loricrin

Die cDNA-Sequenz umfasst 1229 bp, die Proteinsequenz 312 Aminosäuren. Sowohl die cDNA- als auch die Aminosäuresequenz des humanen Loricrin sind auf der NCBI-Seite unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> über die Zugangsnummer NM_000427 verfügbar.

6.3.2 Nukleotidsequenz von Loricrin₁₋₈₈

```
atgtcttatcagaaaagcagcccaccctcagccccagtgactgctgtaagacctctggcggcggtggcgggtggcggcgg
cacggggcggtggctgctgctcggcgggcggtcagggggcggtagcagcgggtctggctggtgctactccggcgg
cggtggtactctggcggcggtgctcggcggggctcctccggcggcgggggcgggggcggcattggaggctgagggggg
ctccgggtgggagcgtc
```

6.3.3 Aminosäuresequenz von Loricrin₁₋₈₈

```
MSYQKKQPTPQPPVDCVKTSGGGGGGGSGGGGCGFFGGGGSGGGSSGSGCGYSGG
GGYSGGGCGGGSSGGGGGGGIGGCGGGSGGSV
```

7 Literatur

- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., ... van der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, *30*(1), 108–60. doi:10.1039/c2np20085f
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, *45*(4), 493–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707>
- Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). The potter's wheel: the host's role in sculpting its microbiota. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(22), 3675–3685. doi:10.1007/s00018-011-0830-3
- Boyer, H. W. (1971). DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *25*, 153–76. doi:10.1146/annurev.mi.25.100171.001101
- Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *6*(4), 328–40. doi:10.1038/nrm1619
- Davagnino, J., Herrero, M., Furlong, D., Moreno, F., & Kolter, R. (1986a). The DNA replication inhibitor microcin B17 is a forty-three-amino-acid protein containing sixty percent glycine. *Proteins*, *1*(3), 230–8. doi:10.1002/prot.340010305
- Davagnino, J., Herrero, M., Furlong, D., Moreno, F., & Kolter, R. (1986b). The DNA replication inhibitor microcin B17 is a forty-three-amino-acid protein containing sixty percent glycine. *Proteins*, *1*(3), 230–8. doi:10.1002/prot.340010305
- Dierks, T., Miech, C., Hummerjohann, J., Schmidt, B., Kertesz, M. A., & von Figura, K. (1998). Posttranslational Formation of Formylglycine in Prokaryotic Sulfatases by Modification of Either Cysteine or Serine. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(40), 25560–25564. doi:10.1074/jbc.273.40.25560
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, *16*(13), 6127–6145. doi:10.1093/nar/16.13.6127
- Drera, B., Tadini, G., Balbo, F., Marchese, L., Barlati, S., & Colombi, M. (2007). De novo occurrence of the 730insG recurrent mutation in an Italian family with the ichthyotic variant of Vohwinkel syndrome, loricrin keratoderma. *Clinical Genetics*, *73*(1), 85–88. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00914.x
- Du BOIS, D., & Du BOIS, E. F. (1916). CLINICAL CALORIMETRY: TENTH PAPER A FORMULA TO ESTIMATE THE APPROXIMATE SURFACE AREA IF HEIGHT AND WEIGHT BE KNOWN. *Archives of Internal Medicine*, *XVII*(6_2), 863–871. doi:10.1001/archinte.1916.00080130010002
- Elias, P. M. (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *The Journal of Investigative Dermatology*, *125*(2), 183–200. doi:10.1111/j.0022-

202X.2005.23668.x

- Elias, P. M. (2008). Skin barrier function. *Current Allergy and Asthma Reports*, 8(4), 299–305. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2843412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gedicke, M. (2006). Loricrin-Keratoderma – klinische und molekulargenetische Charakterisierung. Retrieved April 20, 2015, from <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/gedicke-malenka-mona-2006-02-28/HTML/front.html>
- Harding, C. R. (2004). The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologic Therapy*, 17 Suppl 1, 6–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14728694>
- Heddle, J. G., Blance, S. J., Zamble, D. B., Hollfelder, F., Miller, D. A., Wentzell, L. M., ... Maxwell, A. (2001). The Antibiotic Microcin B17 is a DNA Gyrase Poison: Characterisation of the Mode of Inhibition. doi:10.1006/jmbi.2001.4562
- Hohl, D. (1990). Cornified cell envelope. *Dermatologica*, 180(4), 201–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2192924>
- Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M. L., Roop, D. R., & Steinert, P. M. (1991). Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(10), 6626–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007607>
- Ishida-Yamamoto, A. (2003). Loricrin keratoderma: a novel disease entity characterized by nuclear accumulation of mutant loricrin. *Journal of Dermatological Science*, 31(1), 3–8. doi:10.1016/S0923-1811(02)00143-3
- Ishida-Yamamoto, A., McGrath, J. A., Lam, H., Iizuka, H., Friedman, R. A., Christiano, A. M., ... Steinert, P. (1997). The molecular pathology of progressive symmetric erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene and perturbations in the cornified cell envelope. *American Journal of Human Genetics*, 61(3), 581–9. doi:10.1086/515518
- Jensen, M. A., Fukushima, M., & Davis, R. W. (2010). DMSO and Betaine Greatly Improve Amplification of GC-Rich Constructs in De Novo Synthesis. *PLoS ONE*, 5(6), e11024. doi:10.1371/journal.pone.0011024
- Jill C. Milne, ‡, Ranabir Sinha Roy, ‡, Andrew C. Eliot, Neil L. Kelleher, Anita Wokhlu, Bryce Nickels, and, & Walsh*, C. T. (1999). Cofactor Requirements and Reconstitution Of Microcin B17 Synthetase: A Multienzyme Complex that Catalyzes the Formation of Oxazoles and Thiazoles in the Antibiotic Microcin B17†.
- Kalinin, A. E., Kajava, A. V, & Steinert, P. M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(9), 789–800. doi:10.1002/bies.10144
- Krieg, P., Schuppler, M., Koesters, R., Mincheva, A., Lichter, P., & Marks, F. (1997). Repetin (Rptn), a New Member of the “Fused Gene” Subgroup within the S100 Gene Family Encoding a Murine Epidermal Differentiation Protein. *Genomics*, 43(3), 339–348. doi:10.1006/geno.1997.4818

- Kunkel, T. a. (2004). DNA replication fidelity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 16895–8. doi:10.1074/jbc.R400006200
- Li, Y. M., Milne, J. C., Madison, L. L., Kolter, R., Walsh, C. T., Lewis, J. R., ... Xu, M.-Q. (1996). From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5290), 1188–93. doi:10.1126/science.274.5290.1188
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). *Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen / Renate Lüllmann-Rauch. [Zeichn.: Stephanie Gay & Bert Sender]*.
- Lumpkin, O. J., Déjardin, P., & Zimm, B. H. (1985). Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers*, 24(8), 1573–93. doi:10.1002/bip.360240812
- Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, 53(1), 159–162. doi:10.1016/0022-2836(70)90051-3
- Marekov, L. N., & Marekov, L. N. (1995). The Proteins Elafin, Filaggrin, Keratin Intermediate Filaments, Loricrin, and Small Proline-rich Proteins 1 and 2 Are Isodi-peptide Cross-linked Components of the Human Epidermal Cornified Cell Envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 270(30), 17702–17711. doi:10.1074/jbc.270.30.17702
- Marenholz, I., Volz, A., Ziegler, A., Davies, A., Ragoussis, I., Korge, B. P., & Mischke, D. (1996). Genetic Analysis of the Epidermal Differentiation Complex (EDC) on Human Chromosome 1q21: Chromosomal Orientation, New Markers, and a 6-Mb YAC Contig. *Genomics*, 37(3), 295–302. doi:10.1006/geno.1996.0563
- Melby, J. O., Nard, N. J., & Mitchell, D. A. (2011). Thiazole/oxazole-modified microcins: Complex natural products from ribosomal templates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(3), 369–378. doi:10.1016/j.cbpa.2011.02.027
- Mischke, D., Korge, B. P., Marenholz, I., Volz, A., & Ziegler, A. (1996). Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex (“epidermal differentiation complex”) on human chromosome 1q21. *The Journal of Investigative Dermatology*, 106(5), 989–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8618063>
- Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 263–73.
- Nemes, Z., & Steinert, P. M. (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental & Molecular Medicine*, 31(1), 5–19. doi:10.1038/emm.1999.2
- O’Driscoll, J., Muston, G. C., McGrath, J. A., Lam, H. M., Ashworth, J., & Christiano, A. M. A recurrent mutation in the loricrin gene underlies the ichthyotic variant of Vohwinkel syndrome. , 27 *Clinical and Experimental Dermatology* 243–246 (2002).
- Olson, B. J. S. C., & Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 3, Unit 3.4. doi:10.1002/0471140864.ps0304s48

- Oman, T. J., & van der Donk, W. A. (2010). Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 6(1), 9–18. doi:10.1038/nchembio.286
- Ruan, B., Fisher, K. E., Alexander, P. A., Doroshko, V., & Bryan, P. N. (2004). Engineering subtilisin into a fluoride-triggered processing protease useful for one-step protein purification. *Biochemistry*, 43(46), 14539–14546. doi:10.1021/bi048177j
- Sadler, T. (2008). *Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Schmuth, M., Fluhr, J. W., Crumrine, D. C., Uchida, Y., Hachem, J.-P., Behne, M., ... Steinert, P. M. (2004). Structural and functional consequences of loricrin mutations in human loricrin keratoderma (Vohwinkel syndrome with ichthyosis). *The Journal of Investigative Dermatology*, 122(4), 909–22. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22431.x
- Shah, Y. T., Pandit, A. B., & Moholkar, V. S. (1999). *Cavitation Reaction Engineering*. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4615-4787-7
- Smith, H. O., & Nathans, D. (1973). A Suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 81(3), 419–423. doi:10.1016/0022-2836(73)90152-6
- Steinberg, D. A., & Lehrer, R. I. (1997). Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the “one-size-fits-all” theory. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 78, 169–86. doi:10.1385/0-89603-408-9:169
- Thompson, R. E., Collin, F., Maxwell, A., Jolliffe, K. A., Payne, R. J., Asensio, C., ... Maxwell, A. (2014). Synthesis of full length and truncated microcin B17 analogues as DNA gyrase poisons. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(10), 1570. doi:10.1039/c3ob42516a
- Volz, A., Korge, B. P., Compton, J. G., Ziegler, A., Steinert, P. M., & Mischke, D. (1993). Physical Mapping of a Functional Cluster of Epidermal Differentiation Genes on Chromosome 1q21. *Genomics*, 18(1), 92–99. doi:10.1006/geno.1993.1430
- Yoneda, K., Hohl, D., McBride, O. W., Wang, M., Cehrs, K. U., Idler, W. W., & Steinert, P. M. (1992). The human loricrin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 18060–18066.
- Zhang, S., Zubay, G., & Goldman, E. (1991). Low-usage codons in Escherichia coli, yeast, fruit fly and primates. *Gene*, 105(1), 61–72. doi:10.1016/0378-1119(91)90514-C

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Jens-Michael Schröder, für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, seines Labors und seiner ausgesprochen hilfsbereiten Mitarbeiter bedanken. Die Formulierung des völlig Ergebnis offenen Themas hat in mir sowohl die Abenteuerlust an der experimentellen Forschung geweckt, als auch meine Frustrationstoleranz stark erweitert. Professor Schröder stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr, wenn ich das Gefühl hatte, in einer Sackgasse zu stecken.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors, auch über die Arbeitsgruppe von Prof. Schröder hinaus, für die stets gute Stimmung, die bemerkenswert große Hilfsbereitschaft und die Zahlreichen Tipps und Tricks für die tägliche Laborarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen: Anke, Bente, Britta, Claudia M., Claudia N. Elvira, Heilwig, Jan, Joachim, Jutta, Kerstin, Uli und Zhihong.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den HPLC-Läufen gilt mein besonderer Dank Jutta, Anke, Claudia und Britta.

Mein ganz Besonderer Dank gilt Ties Latendorf, der mich in die Arbeitsgruppe geholt und mich über den gesamten Zeitraum meiner Doktorarbeit stets tatkräftig unterstützt hat.

Lieber Ties, Du hast mir im Labor *das Laufen* beigebracht und mir eine spannende und faszinierende Welt nahegebracht. Durch Deine akkurate und zuverlässige Art habe ich zum einen sehr präzises Arbeiten gelernt, zum anderen hast Du mir gezeigt, wie man sich kollegial zum Besten aller im Labor verhält. Durch unsere vielen gemeinsamen Radtouren und die Verkostung leckerer Backwerke hast Du mir über so manche Motivationslücke hinweg geholfen. Lieber Ties, Du bist mir stets ein guter Freund gewesen und so ist es auch gar nicht schlimm, dass ich im Butterkuchen-Backwettbewerb gegen Dich verloren habe.

Meiner Freundin Julia danke ich für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Liebe Julia, Du hast Dich immer um mein leibliches und seelisches Wohl gekümmert und mir stets den Rücken frei gehalten, indem Du mir die Aufgaben des Alltäglichen abgenommen und mir so Zeit für diese Arbeit verschafft hast. Insbesondere seitdem die kleine Lotti unser Leben bereichert. Dafür möchte ich mich herzlich bei Dir bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Adelheid, Marcel und Thomas Berger bedanken. Ein herzlicher Gruß geht an dieser Stelle noch an Gisela und Günter Ulbricht, meinem *Stachelbeerbruder* im Geiste.

Danksagung

Meinem Freund Niels Persil möchte ich von Herzen danken, dass er mich durch sein akribisches Nachfragen stets in dem Maße unter Druck gesetzt hat, dass ich mich trotz Vollzeitarbeit aufgerafft habe, diese Arbeit fertig zu stellen und obendrauf noch regelmäßig Sport zu machen. Da während der Erstellung dieser Arbeit doch einige Jahre vergangen sind, freut es mich umso mehr, dass Dein kleiner Sohn Jonne das Licht der Welt erblickt hat.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für die emotionale und finanzielle Unterstützung bedanken. Ihr habt es mir ermöglicht an meinem Traum des Arztberufes festzuhalten und mit mir die lange Wartezeit und das langjährige Studium durchgestanden. Damit habt auch ihr einen wesentlichen Beitrag zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Unsere gemeinsamen Höhen und Tiefen haben mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Und ich bin sehr zufrieden.

Ein besonderes Wort des Dankes geht an Herrn Dr. med. Axel Froesewitte, lieber Großvater, wie versprochen widme ich Dir einen eigenen Absatz in der Danksagung. Du warst mir stets ein Vorbild, hast mich finanziell aber vor allem auch durch Deinen wertvollen Erfahrungsschatz unterstützt und motiviert diese Arbeit fertigzustellen. Dafür spreche ich Dir meinen herzlichen Dank aus.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname: Froesewitte
Vorname: Louis
geboren am/in: 11. September 1982, in Preetz

Bildungsweg

1989 – 1993 Theodor Storm Grundschule, Hohn
1993 – 2002 Jungmann Gymnasium, Eckernförde
Schulabschluss: Hochschulreife

Ersatzdienst

09/2002 – 06/2003 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Eckernförde
Bereich: Pflegedienst / Qualitätssicherung

Beruflicher Werdegang

11/2003 – 10/2004 Ausbildung zum Rettungsassistent an der
Med-École Kiel
10/2004 – 09/2005 Anerkennungsjahr als Rettungsassistent
Kreis Plön, Rettungswache Lütjenburg
10/2005 – 09/2007 Vollzeitbeschäftigung als Rettungsassistent
Kreis Plön, Rettungswache Probsteierhagen
Oktober 2007 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der CAU Kiel
August 2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2012 – 07/2013 Praktisches Jahr
1. Tertial: Chirurgie Diako Flensburg

Lebenslauf

2. Terial: Gynäkologie FEK Neumünster

3. Terial: Innere Medizin 2.Medizin UKSH im Städt. KH Kiel

November 2013

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/2014 – 04/2015

Assistenzarzt in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie,
2. Medizin, UKSH, Campus Kiel

Seit 01/2016

Leiter der Herstellung nach AMWHV

Seit 05/2016

Weiterbildung Allgemeinmedizin in der ÜBAG Dres. Tesch,
Bromisch und Kollegen, Schönberg (Holst.)

Promotionsverfahren

10/2011

Beginn einer experimentellen Doktorarbeit

„Untersuchung der Rolle von Loricrin als Precursor eines
Bacteriocin-Analogons“, bei Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder,
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UKSH
Campus Kiel

03/2012

Auszeichnung mit dem Posterpreis der Arbeitsgemeinschaft
Dermatologische Forschung

10 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Kiel, den 18.10.2016

Louis Froesewitte

Bisher erfolgte Teilpublikation:

Froesewitte, L., Latendorf, T., Hansmann, B., Gerstel, U., Schröder, J-M. (2012), Is Loricrin a Trojan Horse Antimicrobial Peptide, Posterpräsentation im Rahmen der Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologischer Forschung (ADF), Abstract Nr. P054