

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 Bedeutung von antimikrobiellen Peptiden bei
der Infektionsabwehr der Haut: Induzierbarkeit der RNase 7 und
Identifizierung von Promotorregionen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät der

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

GIULIANA VIAL

aus Bremen

Kiel 2017

1. Berichtstatter **Prof. Dr. Jürgen Harder**
2. Berichtstatter **Priv.-Doz. Dr. Martin Laudien**
Tag der mündlichen Prüfung **19.02.2018**
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 19.02.2018

gez. (Prüfungsvorsitzender Prof. Dr. Jochen Brasch):

Inhalt

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1 Chemikalien	4
2.2 Enzyme	5
2.3 Oligonukleotide (Primer)	5
2.4 Plasmide & Mikroorganismen	6
2.5 Kultivierung eukaryotischer Zellen	6
2.5.1 HaCaT-Zellen	7
2.5.2 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Keratinozyten.....	7
2.6 Subkultivierung der Zellen.....	8
2.7 Einfrieren und Auftauen der primären Keratinozyten	9
2.8 Kollagenisieren der Kulturflaschen und Arbeits-Lochplatten.....	9
2.9 Klonieren.....	10
2.9.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	10
2.9.2 Agarosegel	10
2.9.3 Qiaex II - DNA Eluierung	11
2.9.4 Restriktionshydrolyse (Verdau)	11
2.9.5 Isolierung des PCR-Produktes	12
2.9.6 Ligation.....	12
2.9.7 Transformation	12
2.9.8 PCR/ Kolonie PCR	13
2.9.9 Animpfen	13
2.9.10 „Miniprep“	14
2.9.11 DNA-Sequenzierung.....	14
2.9.12 Aufreinigung der Luziferase-Plasmide zur Transfektion	14
2.10 Transfektion von Zellen.....	14
2.11 Luziferasemessung.....	15
2.12 Stimulation	16

2.13 RNase 7-ELISA.....	16
3. Ergebnisse.....	18
3.1 Ergebnisse der Luziferasemessung.....	22
3.2 Stimulation	25
4. Diskussion.....	27
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis	34
7. Anhang.....	37
8. Danksagung.....	39
9. Lebenslauf.....	40

1. Einleitung

Unsere Haut ist ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen und Viren ausgesetzt. Unabhängig von der Häufigkeit der Reinigung der Haut und trotz guter Wachstumsbedingungen, wie Wärme und Feuchtigkeit, vor allem in den Hautfalten und auf Schleimhäuten, kommt es bei gesunden Menschen erstaunlicherweise nur relativ selten zu starkem Bakterienwachstum oder Entzündungen der Haut (Fitzpatrick *et al.* 1993). Das beruht zum einen auf der natürlichen passiven Schutzbarriere der Haut. Diese wird durch den Aufbau des Epithels ermöglicht, bei dem zuoberst eine Schicht aus Hornzellen liegt, die mit dem mechanisch und chemisch widerstandsfähigen Keratin gefüllt ist, darunterliegende Desmosomen und „tight junctions“ bewirken eine feste Haftung der Zellen aneinander und die zwischen den Zellen eingelagerte Fettschicht aus polaren Lipiden, verhindert das Eindringen von Wasser und Mikroorganismen (Elias 2005, Marks 2004). Zum anderen besitzt die Haut einen Säureschutzmantel, der durch einen relativ niedrigen pH-Wert verursacht wird. Ein weiteres Abwehrsystem des Körpers gegen Mikroorganismen besteht in der zellulären Abwehr, die durch eosinophile Granulozyten zur Abwehr von Parasiten und durch neutrophile Granulozyten zur Abwehr von Bakterien und Pilzen sowie durch Makrophagen, T- und B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen ausgeführt wird.

Da jedoch nur Wirbeltiere über ein solch hoch entwickeltes Immunsystem verfügen, aber auch wirbellose Tiere und Pflanzen trotz permanenter Konfrontation mit Mikroorganismen überleben, ist zu vermuten, dass noch weitere Abwehrsysteme existieren. In Studien hat man herausgefunden, dass die Schutzfunktion der Epithelien zusätzlich noch durch ein chemisches Abwehrsystem unterstützt wird (Boman 2000). Es konnte gezeigt werden, dass das Epithel von Pflanzen, Vertebraten und Nicht-Vertebraten die Fähigkeit besitzt, antimikrobielle Peptide freizusetzen, die die eindringenden Mikroorganismen abtöten (Boman 1998). Antimikrobielle Peptide sind niedermolekulare, überwiegend kationische Peptide, die eine schnelle Abtötung mikrobieller Zellen herbeiführen können. Sie wirken außerdem als Entzündungsmediatoren und aktivieren Mechanismen der zellulären und adaptiven Immunität (Braff *et al.* 2005).

In Darmepithelien der Maus wurde die Genexpression von α -Defensinen entdeckt, die ein erstes Indiz dafür gaben, dass bei Vertebraten tatsächlich die Produktion von antimikrobiellen Peptiden zur körpereigenen, angeborenen Abwehr beiträgt (Ouellette *et al.* 1989). Diese Hypothese konnte kurz danach durch die Entdeckung der Expression eines neuen β -Defensins TAP (Tracheales antimikrobielles Peptid) in den Epithelien der Rinderluftröhre bestätigt werden (Diamond *et al.* 1991). α - und β -Defensine sind kleine, kationische antimikrobielle Peptide von ca. 4-5 kDa Größe, die sich durch die Anordnung ihrer Cysteine und den daraus resultierenden Disulfidbrücken unterscheiden (Harder *et al.* 2007). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das TAP durch bakterielle Bestandteile und TNF (Tumor Nekrose Faktor)- α in Kulturen aus bovinen Trachealzellen induzierbar ist (Diamond *et al.* 1991, Schonwetter *et al.* 1995). Diese Tatsache legte den Verdacht nahe, dass auch beim Menschen induzierbare antimikrobielle Peptide produziert werden, deren Expression direkt durch Bakterien oder indirekt durch proinflammatorische Zytokine reguliert werden kann (Bando *et al.* 2007). 1995 gelang es, aus dem Blutplasma des Menschen das erste humane β -Defensin (hBD-1) zu isolieren (Bensch *et al.* 1995). Nachfolgend konnten zwei weitere humane β -Defensine, hBD-2 und hBD-3, von unserer Arbeitsgruppe aus läsionalen Hautschuppen von Psoriasis-Patienten isoliert werden (Harder *et al.* 1997, Harder *et al.* 2001). Die Expression dieser beiden antimikrobiellen Peptide in Keratinozyten kann durch Kontakt mit Bakterien und proinflammatorischen Zytokinen induziert werden. Dies zeigte, dass auch die menschliche Haut in der Lage ist, induzierbare antimikrobielle Peptide zu produzieren.

Da die Expression von hBD-2 und hBD-3 zwar in entzündeter Haut, wie zum Beispiel der psoriatischen Haut, induziert ist, aber diese beiden antimikrobiellen Peptide in gesunder Haut kaum zu finden sind, stellte sich die Frage, ob sich auch die gesunde Haut durch die Expression von antimikrobiellen Peptiden zu schützen vermag. Auf der Suche nach solchen antimikrobiellen Peptiden gelang es Harder und Schröder (2002) aus Hautextrakten gesunder Probanden ein neues antimikrobielles Peptid mit dem Namen RNase 7 zu isolieren. RNase 7 ist ein 14,5-kDa großes Protein, das das siebte Mitglied der humanen Ribonuklease-A-Familie (RNase-A-Superfamilie) ist. Zu dieser gehören 8 katalytisch aktive Ribonukleasen (RNase 1-8). Sie besitzen 6-8 Cysteine die über Disulfidbrücken verbunden sind, sowie 2 katalysierende Histidine und ein einzelnes Lysin. Im Menschen sind die Mitglieder der RNase A-Familie auf

Chromosom 14 kodiert (Rosenberg 2008). RNase 7 besitzt neben seiner Ribonuklease-Aktivität eine hohe antimikrobielle Aktivität, sowohl gegen gramnegative und grampositive Bakterien als auch gegen die Hefe *Candida albicans*. RNase 7 wirkt auch gegen multi-resistente Bakterien wie Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* und Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Harder und Schröder 2002). Interessanterweise scheint die enzymatische Aktivität nicht für die antibakterielle Aktivität von RNase 7 verantwortlich zu sein. So konnte z.B. in einem Experiment gezeigt werden, dass *Enterococcus faecium* sowohl von RNase 7 mit Ribonukleaseaktivität, als auch von rekombinanter RNase 7 mit mutierten Aminosäuren im katalytischen Zentrum und somit ohne enzymatische Aktivität im gleichem Maße abgetötet werden kann. Ähnliche Ergebnisse konnten mit *E. coli* erzielt werden (Köten *et al.* 2009). Huang *et al.* (2007) fanden heraus, dass für die antimikrobielle Wirkung der RNase 7 das Vorhandensein einer amphipathischen Struktur, bestehend aus einem kationischen Teil, der für die Interaktion mit den negativ geladenen Komponenten der Bakterienmembran zuständig ist und einem hydrophoben Teil, der das Eindringen in die Bakterienmembran und somit die Ruptur dieser ermöglicht. RNase 7 wird nicht nur von der Haut, sondern auch von Schleimhäuten des Respirationstrakts, des gastrointestinalen und urogenitalen Trakts exprimiert (Harder und Schröder 2002, Spencer *et al.* 2011). In weiteren Versuchen hat sich herausgestellt, dass die hohe Grundexpression von RNase 7 in Keratinozyten durch Stimulation mit Zytokinen oder mit abgetöteten Bakterien noch weiter induziert werden kann (Harder und Schröder 2002, Köten *et al.* 2009, Simanski *et al.* 2013, Firat *et al.* 2014).

Fragestellung der Arbeit:

Das antimikrobielle Peptid RNase 7 zeigt eine hohe basale Genexpression in unstimulierten primären Keratinozyten. Zusätzlich kann die Genexpression von RNase 7 in Keratinozyten durch Kontakt mit Bakterien oder durch proinflammatorische Zytokine induziert werden. Insbesondere das Bakterium *Staphylococcus sciuri* sowie die Kombination von Interleukin-(IL)-17 und Interferon (IFN)- γ konnten in Vorarbeiten als potente Induktoren der RNase 7 Expression identifiziert werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Aspekte untersucht werden:

- 1.) Es sollten die Teile der Promotorregion des RNase 7 Gens identifiziert werden, die für die hohe basale Genexpression dieses antimikrobiellen Peptids verantwortlich sind.
- 2.) Es sollte untersucht werden, ob und welche Promotorelemente die Induktion der RNase 7 Genexpression nach Exposition mit Kulturüberständen von *Staphylococcus sciuri* sowie der Zytokin-Kombination IL-17/IFN- γ vermitteln.

Hierzu war es nötig, Sequenzen aus der Promotorregion des RNase 7 Gens in Luziferase-Genreporter-Plasmide einzubringen und in *E. coli* zu vervielfältigen um diese dann später in Keratinozyten zu transfizieren. Die Keratinozyten wurden aus humanen Präputien extrahiert und in einem Nährmedium herangezogen. Bei ausreichender Konfluenz wurden die entsprechenden Plasmide in die Keratinozyten transfiziert und anschließend wurde mit einem Luminometer die Luziferase-Aktivität gemessen, die ein Maß für die Aktivierung des entsprechenden Promotorabschnitts darstellt. Zweitens wurde zur Interpretation der Induzierbarkeit die transfizierten Keratinozyten mit Zytokinen stimuliert und die Luziferase Aktivität bestimmt sowie als Vergleich hierzu ein ELISA der stimulierten Zellen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose	Biozym Hess, Oldendorf
Amphotericin B/Penicillin G/Streptomycin-Lsg.	Gibco, Eggenstein
AmpliTaq Gold	Roche Diagnostics Mannheim
Bovines Kollagen, Typ I	BD Biosciences, Bedford, MA,
BSA; bovines Serum-Albumin	Sigma, Deisenhofen
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
DMEM; Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Cellconcepts, Umkirch
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
EDTA (Ethylen-diamin-tetraacetat-Lösung)	Gibco, Eggenstein
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
EpiLife®	Cascade, Biologics, Portland, USA

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz
Fugene	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerin	USB, Cleveland, USA
H ₂ O (aqua dest.)	Delta Select, Dreieich
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Methanol	Promochem GmbH, Wesel
Magnesiumchlorid	Roche Diagnostics Mannheim
NucleoSpin Plasmid Quick pure	Macherey-Nagel, Düren
Passiv Lysispuffer	Promega, Mannheim
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin
phRG-TK <i>Renilla</i> Luziferase-Plasmid	Promega, Mannheim
Qiaex Gel Extraction Kit II	Qiagen, Hilden
Smart Ladder	Eurogentec, Köln
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden über Sigma-Chemie (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen

2.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen: MLU I, Xho I	NEB, Schwalbach
Reverse Transkriptase (Superskript II)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster

2.3 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA-GENOSYS bezogen. Sie binden alle an der Promotorregion des RNase 7 Gens und wurden für die Klonierung und Transfektion in humane Keratinozyten verwendet.

<u>Oligoname:</u>	<u>Sequenz (5'-3'):</u>
R7-pTAL-f6	GTCGAGAGCAGCAACAGCA
R7-pTAL-f7	GTGGAATGGCTTCGCTATTG
R7-pTAL-f8	GAAGCAACCCTTAACACCACA

R7-pTAL-f9	TTTAGGCAGGTACAGGCATC
R7-pTAL-f10	AGGATCAAGGGCCAGAAGTG
R7-pTAL-f11	ATCATGTGGCCAGGGAACAAA
R7-pTAL-f12	CGATTCAAGCTTCCTCATTGC
R7-pTAL-f13	TCCTCATTGCTGAACATGTTTA
R7-pTAL-f14	AACATGTTTAGGCAGGTACAG
R7-pTAL-f15	CTCTTCCCAGGATCAAGGG
R7-pTAL-f16	AACACCACAGTGATTGACTCT
R7-pTAL-f17	CAGGCCTCGTGACAGTGATG
R7-pTAL-f18	CTCCTCCGAAAGATAACCAG
R7-pTAL-f19	TCCAGATGACAAGGAACCAG
R7-pTAL-f20	GGCTGTCCTATCTGTGCCT
R7-p6C3-r3	CCCCAAACAGACACAGCGT
GL2	CTTTATTGTTTTTGGCGTCTTCC
RV3	AGCAAAATAGGCTGTCCCC

2.4 Plasmide & Mikroorganismen

Folgende Mikroorganismen wurden in der Arbeit verwendet:

<i>E. coli</i> TOP10F'	Invitrogen
<i>Staphylococcus sciuri</i>	(klinisches Isolat)

2.5 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte unter einer sterilen Arbeitsbank in Zellkulturflaschen bzw. Arbeitslochplatten. Hierfür wurden folgende Nährmedien verwendet:

Medien:

EpiLife–Medium [+ + + APS] auf 500 ml Medium :

5 ml Antibiotika-Mix (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Amphotericin 0,25 µg/ml) beigefügtes Kalzium, 5 ml beigefügtes Supplement (EDGS)

DMEM–[+ + + APS] –Medium auf 500 ml Medium:

5 ml Antibiotika-Mix (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin), 5 ml L-Glutamin, 50 ml FCS

DMEM–[+ + – APS]–Medium auf 500 ml Medium:

5 ml Antibiotika-Mix (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin) 5 ml L-Glutamin

Sonstiges:

Trypsin/EDTA: 10 x Trypsin/EDTA-Lösung 1:10 wurde mit PBS verdünnt und in 10 ml Aliquots eingefroren.

2.5.1 HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen sind eine humane, immortalisierte, nicht maligne Zelllinie, die spontan durch Kultivierung humaner Keratinozyten bei erhöhter Temperatur und geringer Kalziumkonzentration entstehen (Boukamp *et al.* 1988). Die Kultivierung der HaCaT-Zellen erfolgte ähnlich der der primären Keratinozyten. Die Zellen können jedoch bis zu hundert Mal passagiert werden und sie sind unempfindlicher als die primären Keratinozyten. Als Nährmedium wurden 10 ml DMEM-Medium (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) mit 10% fetalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin verwendet. Die Kultivierung der HaCaT-Zelllinie erfolgte bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre in 75-cm²-Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht).

2.5.2 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Keratinozyten

Die primären Keratinozyten wurden aus humanen infantilen Präputien isoliert, die bei Circumcisionen, zum Beispiel bei Phimosen anfielen. Die Präputien wurden freundlicherweise von Fr. Dr. med. A. K. Eckstein und C. Maaß (Praxisklinik Kronshagen, Kinderchirurgie) zur Verfügung gestellt. Die Präputien wurden direkt

nach Entnahme in 50 ml Falcon-Gefäß mit 20 ml DMEM-[+ + – APS]-Medium gegeben und gekühlt bei <7°C transportiert. Die Präparation lief über drei Tage in der sterilen Arbeitsbank:

1. Tag:

Zunächst wurde der Präputium-Ring von distal nach proximal der Länge nach aufgeschnitten, die Subcutis mit Blutgefäßen von der Dermis und Epidermis abpräpariert und das verbleibende Präputium (Epidermis und Dermis) mit dem Skalpell in Streifen geschnitten. Die Streifen wurden in ein 50 ml Falcon-Gefäß mit 35 ml PBS und 1 ml 2,5%-Trypsin geben und im Kühlschrank über Nacht gelagert, so dass die Präputien 12–24h trypsinisiert wurden.

2. Tag:

Am zweiten Tag wurde die Trypsinisierung durch Zufügen von bei 37°C vorgewärmten 20ml DMEM- [+ + +]-Medium gestoppt. Von den angedauten Präputiumsstreifen konnte dann mithilfe einer Pinzette das Stratum corneum in das Medium abgelöst werden. Die zellreiche Flüssigkeit wurde 5 min bei 800 x g zentrifugiert, wobei sich die Zellen als Pellet am Boden des Falcon-Gefäßes absetzten und anschließend in auf 37°C vorgeheiztem EpiLife [+ + + APS] resuspendiert werden konnten. Die Zellen konnten dann, mit zusätzlichen 20 ml EpiLife [+ + + APS], in einer Zellkulturflasche (200ml, 75cm³, Sarstedt), die zuvor kollagenisiert wurde, ausgesät werden. Sie wurden im Inkubator bei 37°C und wasserdampfgesättigter 5% CO₂-Atmosphäre gelagert.

3. Tag:

Am dritten Tag wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgegossen und durch 10 ml bei 37°C vorgewärmtem EpiLife-[+ + + APS]-Medium ersetzt. Das Nährmedium der primären Keratinozyten wurde direkt einen Tag nach dem Passagieren bzw. erstem Aussäen, sonst alle 2 Tage mit 10 ml auf 37°C vorgewärmten EpiLife-[+ + + APS]-Medium je Zellkulturflasche erneuert.

2.6 Subkultivierung der Zellen

Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche abgegossen und die am Boden der Flasche haftenden Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 5 ml Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche gegeben und die Zellen wurden für 5 – 7 min im Inkubator bei 37°C und wasserdampfgesättigter 5% CO₂-Atmosphäre trypsinisiert. Die Trypsinreaktion wurde dann durch Zufügen von 10 ml DMEM-[+ + +]-Medium

abgestoppt, die Suspension in ein 50 ml Falcon-Gefäß gegeben und bei 800 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in 3 ml EpiLife–[+ + + APS]–Medium resuspendiert und mit ca. 10ml EpiLife [+ + + APS], pro neu entstehender Flasche, aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde dann in 2 bis 4 neue kollagenisierte Zellkulturflaschen ausgesät und zurück in den Inkubator gestellt. Primäre Keratinozyten ließen sich ca. 3-4 Mal subkultivieren, danach waren die Zellen zu weit ausdifferenziert.

2.7 Einfrieren und Auftauen der primären Keratinozyten

Zum Einfrieren der Zellen wurde zunächst das Medium abgegossen, die Zellen mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und die Reaktion mit DMEM abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 200 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in zuvor gekühltem Medium, bestehend aus 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) als Frostschutzmittel resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in speziellen Gefriererörchen („Kryocaps“) sofort bei –80°C eingefroren und nach 24 h in Flüssigstickstoff überführt und dort dauerhaft gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden zunächst 10 ml EpiLife [+ + + APS] im Wasserbad erwärmt. Die gefrorene Zellsuspension wurde vorsichtig in dem vorgewärmten Medium aufgetaut, durch Schwenken verteilt und anschließend in den Inkubator bei 37°C und wasserdampfgesättigter 5% CO₂-Atmosphäre gestellt.

2.8 Kollagenisieren der Kulturflaschen und Arbeits-Lochplatten

Die Kulturflaschen und Lochplatten wurden für die bessere Adhärenz der primären Keratinozyten mit Kollagen Typ1 beschichtet. Hierfür wurden auf die Zellkulturflasche bzw. auf eine Lochplatte eine Lösung aus 50 µl bovinem Kollagen und 5ml 0,01 M HCl gegeben und diese für 30 min bis 3 h in den Inkubator bei 37°C und wasserdampfgesättigter 5% CO₂-Atmosphäre gestellt. Anschließend wurden die Flaschen bzw. Lochplatten zweimal mit PBS gewaschen und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert. In die Zellkulturflaschen wurden 5 ml der kollagenen Lösung gegeben, auf eine 12-Lochplatte 400 – 500 µl / Vertiefung und auf eine 6-Lochplatte 700 µl / Vertiefung.

2.9 Klonieren

Die Klonierung diente der Integration eines DNA-Fragmentes in einen Vektor (Plasmid), der in *E. coli* nach Transformation vervielfältigt wurde.

2.9.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als ersten Schritt wird eine PCR zur Amplifikation der DNA-Fragmente durchgeführt. Die PCR besteht aus den drei Phasen Denaturierung, Primeranlagerung und Kettenverlängerung.

Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl	dNTP (2mM)
5 µl	10x Puffer
20 µl	H ₂ O
2,5 µl	Forward-Primer
2,5 µl	Reverse-Primer
5 µl	cDNA
1µl	pfx50 Polymerase

Programm:	95°C	2 min		
	85°C -	Pause		
	94°C	1 min	(*)	
	60°C	20 sek.	(*)	
	72°C	3 min	(*)	(*) diese 3 Schritte 30 mal
	72°C	3 min		
	4°C -	unendlich		

2.9.2 Agarosegel

Mithilfe einer horizontalen Elektrophorese in einem 1,5% Agarosegel konnte der Erfolg der PCR überprüft werden. Für das Gießen des Gels wurden 1,5 g Agarose auf 100 ml TAE-Puffer einmal aufgekocht. Nach Abkühlen der Gelmasse wurden 7 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in eine horizontale Kammer gegossen. Nach dem Auskühlen wurden die Proben aus der PCR komplett aufgetragen. Die Proben wurden mit einem 6-fach-Puffer auf 1x verdünnt, um diese farbig zu

markieren. Zusätzlich wurden noch 5 µl 100 bp Molekulargewichts-Standard (Smart Ladder) aufgetragen. Das Gel wurde dann ca. 30 min bei 120 V laufen gelassen. Die entsprechenden Banden konnten anschließend unter UV-Licht bei 266 nm mit Hilfe einer BioDoc-Fotodokumentationsanlage (Biometra, Göttingen) beurteilt und ausgeschnitten werden, um dann im nächsten Schritt die DNA mithilfe eines Extraktions-Kits (Qiaex II) aus dem Gel herauszureinigen.

2.9.3 Qiaex II - DNA Eluierung

Die entsprechenden PCR-Produkte für die Klonierung wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aus dem Gel mit Hilfe des Qiaex II-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers in 20 µl 10 mM Elutions-Puffer eluiert. Als Endprodukt erhielt man die gereinigte DNA.

2.9.4 Restriktionshydrolyse (Verdau)

Die Restriktionshydrolyse diente dem Schneiden des PCR-Produktes, wobei überstehende Enden ("sticky ends") entstanden und die Integration der DNA-Fragmente in komplementär geschnittene Vektoren ermöglicht wurde.

Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

17 µl	der PCR-Fragmente, die in der Qiaex II Extraktion gewonnen wurden
1 µl	Mlu I
1 µl	Xho I
3 µl	10xPuffer H
8 µl	H ₂ O
Programm:	37°C 8 h
	65°C 20 min
	4°C unendlich

2.9.5 Isolierung des PCR-Produktes

Im nächsten Schritt wurde eine horizontale Gel-Elektrophorese durchgeführt, um die geschnittenen Fragmente zu isolieren (siehe 2.9.2.), die anschließend wieder mit Qiaex II aus dem Gel herausgereinigt wurden (siehe 2.9.3.).

2.9.6 Ligation

Bei der Ligation wurde das PCR-Produkt in den Vektor eingebracht.

Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

0,5 µl	Vektor pTAL (Mlu I, Xho I geschnitten)
1,5 µl	Qiaex II (PCR-Produkte, Mlu I, Xho I geschnitten)
2,5 µl	2x Ligase Puffer
0,5 µl	DNA-Ligase Enzym
Programm:	8h 16°C

2.9.7 Transformation

Bei der Transformation wurde die Plasmid-DNA in *E. coli* eingebracht. Für die Transformation wurden kompetente „TOP 10“-*E. coli* (Invitrogen) verwendet.

Nach vorsichtigem Auftauen der *E. coli* wurde 1 µl des Ligationsansatzes der entsprechenden Plasmide zu den Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Hitzeschockbehandlung des Ansatzes für 30 s bei 42°C und wieder eine Inkubation auf Eis für 2 min. Es wurden 250µl (auf 37°C vorgewärmtes) SOC-Medium (0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM D-Glucose) hinzugegeben und der Transformationsansatz bei 37°C für 1 h inkubiert und geschüttelt.

Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten, die mit Antibiotika (100 µg/ml Carbenicillin) vorbehandelt wurden, ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch die Behandlung der Platten mit Antibiotika konnte gewährleistet werden, dass nur *E. coli* wachsen, die das Plasmid integriert haben, da dieses eine Antibiotikaresistenz enthielt. Die Bakterien ohne Plasmid und somit ohne Antibiotikaresistenz wurden abgetötet. Die erfolgreiche Transformation konnte dann durch eine Kolonie-PCR nachgewiesen und die Plasmide für die weitere Arbeit mithilfe einer „Mini-Prep“ aufgereinigt werden.

2.9.8 PCR/ Kolonie PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion diente sowohl der Amplifikation von DNA-Fragmenten, als auch der Überprüfung, ob eine Klonierung erfolgreich war und der entsprechende Vektor sich tatsächlich im Plasmid befand (Kolonie-PCR). Hierbei versucht man, das gesuchte Fragment mithilfe geeigneter Primer zu amplifizieren. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde Material aus der Kolonie von der Agarplatte oder direkt der 1:100 verdünnte Vektor in den PCR Ansatz gegeben.

Es wurde folgender Ansatz für die Kolonie-PCR nach Transformation verwendet:

2µl	Puffer
1,6µl	MgCl ₂
2µl	dNTPs (2mM)
0,4 µl	Primer RV3
0,4 µl	Primer GL2
0,1 µl	AmpliTaq
13,5 µl	Wasser
=> Kolonie	

PCR-Programm

95°C	9 min	
94°C	1 min (*)	
58°C	20 sek (*)	
72°C	2 min (*)	(*) diese Schritte 32 Mal
72°C	3 min	
4°C	endlos	

Anschließend wurde ein Agarosegel gegossen und die PCR-Produkte aufgetragen.

2.9.9 Animpfen

Beim Animpfen wurde eine flüssige Kultur der Bakterien erstellt, indem mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte eine Kolonie entnommen wurde und in 7 ml TSB Medium + 50 µg/ml Carbenicillin gelöst wurde. Die Kultur wurde für 24 h bei 37°C im Schüttler inkubiert.

2.9.10 „Miniprep“

Die „Miniprep“ diente der Isolierung der DNA aus den *E. coli*. Zunächst wurden 2 x 2 ml Bakterienüberstand bei 7500 x g für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit dem „Miniprep“-Kit (z.B. Nucleo Spin Macherey/Nagel) nach Angaben des Herstellers bearbeitet und am Ende die gereinigte Plasmid-DNA in 50µl Elutionspuffer gelöst.

2.9.11 DNA-Sequenzierung

Bei einer DNA-Sequenzierung handelt es sich um eine Bestimmung der Nukleotidabfolge in einem DNA-Molekül. Hierzu wurden die Proben eingeschickt, um in Göttingen (Firma SeqLab) sequenziert zu werden.

2.9.12 Aufreinigung der Luziferase-Plasmide zur Transfektion

Für die Aufreinigung der entsprechenden Luziferase-Plasmide aus *E. coli*, die dann zum Transfizieren verwendet wurden, wurden unterschiedliche Kits verwendet. Die Aufreinigung erfolgte z. B. mit Hilfe des Charge Switch Plasmid Mini Kits (Invitrogen) oder mit dem Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) nach Angaben der Hersteller. Die isolierten Plasmide wurden dann für eine Transfektion in primäre Keratinozyten verwendet.

2.10 Transfektion von Zellen

Bei der Transfektion wurden die *Firefly*-Luziferase-Plasmide, die die jeweilige RNase-7-Promotorregion enthielten, zusammen mit einem *Renilla*-Luziferase-Kontrollplasmid in primäre Keratinozyten transfiziert. Die Aktivität des *Renilla*-Luziferase-Kontrollplasmids stellt ein Maß für die Transfektionseffizienz dar, anhand dessen nachvollzogen werden konnte, ob die Transfektion erfolgreich war. In den Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gingen ausschließlich effiziente Transfektionen ein, die eine Lumineszenz >5 im Luminometer (TD-20/20 Turner Design) aufwiesen.

Für die Transfektion wurden die primären Keratinozyten ein bis zwei Tage zuvor auf 6 oder 12 Lochplatten ausgesät und die Transfektion bei 60-80%iger Konfluenz

durchgeführt. Die Konfluenz sollte nicht höher sein, da die Zellen dann nicht mehr die Möglichkeit haben sich erneut zu teilen

Transfektionsansatz: 100 µl Epilife pur
 1 µl Fugene HD (Transfektionsreagenz)
 0,5µg R7-pTAL-Vektor (RNase 7 Promotor-Luziferase
 Plasmid)
 0,025µg phRG-TK *Renilla*-Luziferase Kontrollplasmid

Der Transfektionsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen geträufelt und die Platte geschwenkt, um den Ansatz gleichmäßig über den Zellen zu verteilen. Als Kontrolle wurden bei jeder Transfektion zwei Löcher mit Zellen nicht transfiziert und diese als Kontrolle genutzt.

Der Transfektionansatz wurde 6-7 h auf den Keratinozyten belassen und dann das Medium gewechselt. Nach 24 h konnten die Zellen stimuliert oder lysiert werden. Hierfür wurde zunächst der Überstand abgenommen und 300 µl pro Vertiefung „Passiv Lysispuffer“ (Promega, Mannheim) zugegeben. Die Zellen wurden 15 min lang bei Raumtemperatur unter Schütteln lysiert.

2.11 Luziferasemessung

Luziferasen sind Enzyme, bei denen es durch unterschiedliche Reaktionen zu einer Biolumineszenz kommen kann, die mithilfe eines Luminometers gemessen wurde. Die Luziferaseaktivität der lysierten Keratinozyten konnte mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega, Mannheim) gemessen werden. Es wurden immer jeweils die Aktivität der *Firefly*-Luziferase und der *Renilla*-Luziferase gemessen und dann das Verhältnis der beiden zueinander ermittelt, wobei die Aktivität der *Renilla*-Luziferase als Maß für die Transfektions-Effizienz gewertet werden konnte.

2.12 Stimulation

Die Stimulation der primären Keratinozyten erfolgte an transfizierten und zur Kontrolle an nicht transfizierten Zellen in 24-Lochboden Platten. Die Zellen, die optimalerweise eine Konfluenz von 80-90 % haben sollten, wurden zunächst mit PBS gewaschen und der Stimulus wurde in 0,1%igem BSA und Epilife aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Das BSA sollte hierbei die Bindung des Stimulus an die Gefäßwand verhindern. Für die Stimulation wurden den transfizierten Zellen 1:10 verdünnte sterilfiltrierte Kulturüberstände von in 24 h in TSB-Medium gewachsenen *Staphylococcus sciuri* oder die Kombination IL-17 + IFN- γ (je 20 ng/ml) zugefügt. Zusätzlich wurden Proben ausschließlich mit Epilife-Medium und TSB-Medium versetzt und als Kontrolle genutzt. Als zusätzlichen Vergleich wurden jeweils eine Vertiefung nicht transfizierter Zellen mit *Staphylococcus scurii*-Kulturüberständen bzw. TSB-Medium versetzt. Der Stimulationsansatz wurde 24 h auf den Zellen belassen und dann wurde die RNase-7-Expression mithilfe der Luziferase-Messung und mit einem RNase 7-spezifischen ELISA gemessen.

2.13 RNase 7-ELISA

Der ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung eines bestimmten Proteins in einer Probe. Für die Detektion und Bestimmung von RNase 7 in Überständen und Zelllysaten wurde ein selbst entwickelter „Sandwich“-ELISA verwendet. Der ELISA wurde in 96 Loch-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno PlateMaxisorp, Nunc GMBH, Wiesbaden) in Anlehnung an die Original-Publikation durchgeführt (Köten *et al.* 2009). Jede Vertiefung wurde mit 415 ng anti-RNase 7-Antikörper in 50 μ l 0,05 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,6 beschichtet und schüttelnd (300 Upm) bei 37 °C für 1 h inkubiert.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Folgende Ansätze wurden nacheinander in die 96 Loch-Mikrotiterplatten gegeben:

200 μ l	1%iges BSA	10 min. Inkubation
200 μ l	Waschpuffer	2 x waschen
100 μ l	Überstände	

+ RNase 7-Konzentrationsreihe als Standard		30 min. Inkubation
200µl	Waschpuffer	3 x waschen
480 ng	biotinylierter RNase 7-Antikörper	30 min. Inkubation
200µl	Waschpuffer	3 x waschen
50 µl	Peroxidase-konjugierter Avidin-Komplex	30min. bei 37°
Inkubation		
200µl	Waschpuffer	6 x waschen

Die gebundene Peroxidase wurde dann mit 2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonsäure (ABTS, Roche Diagnostics, Mannheim) als Substrat quantifiziert. Die einsetzende Färbereaktion wurde mit einem MultikanalPhotometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) bei einer Extinktion von 405 nm bestimmt. Die Ergebnisse wurden dann mit Eichkurven verglichen, die aus nativer sowie rekombinanter RNase 7 hergestellt wurden.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden welche Teile der Promotorregion des RNase 7-Gens für die hohe Grundexpression sowie für die Induzierbarkeit dieses antimikrobiellen Peptids eine Bedeutung haben. Hierzu wurden mehrere Fragmente aus der Promotorregion des Gens der RNase 7 amplifiziert und in ein Luziferase-Plasmid kloniert. Für die vorliegende Arbeit wurden 15 Fragmente in Luziferase-Plasmide kloniert, R7-pTAL-f3 bis R7-pTAL-f20 (genannt f3-f20), wobei 15 verschiedene "forward"-Primer und immer derselbe "reverse"-Primer verwendet wurden (Abb. 1). Die Fragmente liegen im gleichen Teil der Promotorregion, sind aber in ihrer genetischen Sequenz verschieden (Abb. 1). Zudem haben alle unterschiedliche Längen (Abb. 2). Die einzelnen "forward"-Primer sind von der Lage auf dem Gen entweder deutlich von einander entfernt, nahe beieinander liegend oder auch teilweise ineinander verschachtelt (Abb. 1), so dass sich verschieden lange Fragmente mit teilweise überlappender Basensequenz ergeben (f3-f20). Es wurden zunächst nur einzelne Fragmente gewählt, um grob orientierend die Aktivitäten der einzelnen Promotorabschnitte zu erfassen. Den Ergebnissen folgend wurden dann weitere Fragmente, überlappend mit den bereits untersuchten Fragmenten, hergestellt, um potentielle Aktivitätsabschnitte genauer einzugrenzen. Zusätzlich wurde teilweise ein „Leer-Vektor“ mit transfiziert, der als Kontrolle für die Vektoren diente, die die o.g. Abschnitte der Promotorregion enthielten.

<u>AAGCTCACAAGAGCTTGGAGTAGCACTGACCCAGATGCTCCACACAGCTGTAACCACCACAAGGA</u>	f3
ACAGGACATACAAGGTGAAGGAAGCACTAAGGCAGGAT <u>GTCGAGAGCAGCAACAGCATT</u> TTAAAC	f6
ACAAACATTTGGGCAGTATTAATTTTTGCAATTTTCAATAAAAAAGGGAGGGAACAAGTAAAATTG	
AGAGGTGTTGGCTGCCTTCTCCAGCTAAAGCCATGTGGCCTTGTTGGTACCTGGAAGTGGAGAG	
GCCTGTGAATCATT <u>GTGGAATGGCTTCGCTATTGGGGATGGTGCCAGGCCTCGTGACAGTGATGA</u>	f7 f17
TTCATTCACCCACTTCCCTCGTGTCTGTTCCATCTCCTCCGAAAGATAACCAGTATCTCCAGATGA	f18 f19
<u>CAAGGAACCAGACAAAGCATCTTCTAGGCTGTCTATCTGTGCCTCAGGTCAGAGAAGAAGCAA</u>	f20 f8
<u>CCCTTAACACCACAGTGATTGACTCTTCCCAGGATCAAGGGCCAGAAGTGTATATGAGAGGATAT</u>	f16 f15 f10
GAATGACAACCTTCTCTGAAATTGATTTCAAGTTGACACCTGGGTCAGGTGCTCTATTAAGAGTCA	
TTAAAATCATGTGGCCAGGGAACAAAATACAGTCTTCCAATGTGACGATTCAAGCT <u>TCCTCATTGCT</u>	f11 f12 f13
<u>GAACATGTTAGGCAGGTACAGGCATCCTTAGGTGTCCACGTATTTGGGACATGTAAGTGGAGAG</u>	f14 f9.
GCATGAACCTGATTCAATTTCTGATCCAGTGATGCTCCCAGCCCACCCCAAACAGACACAGCGT	r3
AGCCCCGGCCAGCTCTTAAGGAGTTCAGGAGTGAGAAGAGGCCCTCAGAGATCTGACAGCCTA	

Abb. 1: Basensequenz aus dem RNase 7-Gen: Abschnitt aus der Promotorregion. Dargestellt sind die einzelnen Fragmente (R7-pTAL-f3r3 bis R7-pTAL-f20r3, abgekürzt genannt: f3 bis f20), markiert durch den jeweiligen variablen "forward"-Primer an ihrem Beginn und den "reverse"-Primer r3 am Ende.

Die jeweiligen Fragmente wurden dann jeweils mithilfe einer PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann in einer horizontalen Elektrophorese auf ein Agarosegel aufgetragen, um das PCR-Produkt zu überprüfen. Durch Abgleich mit einem Molekulargewichtsstandard (Smart Ladder) konnte nachgewiesen werden, dass die entsprechenden Segmente amplifiziert wurden (Abb. 3).

Die Banden im Agarosegel wurden ausgeschnitten und mit dem Qiaex-II-Kit aufgereinigt. Bei der dann folgenden Restriktionshydrolyse wurden mittels Restriktionsenzymen "sticky ends" geschnitten, die es ermöglichten, die Fragmente durch eine Ligation in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pTAL-Vektor einzubringen. *E. coli* wurde mit den jeweiligen Vektoren transformiert, um diese nach Vervielfältigung zu isolieren. Eine anschließende PCR mit vektorspezifischen Primern diente zur Überprüfung der korrekten Klonierung des jeweiligen Promotorfragments (siehe Abb. 4). Vektoren mit korrekt klonierten Fragmenten wurden sequenziert und zur Transfektion von primären Keratinozyten verwendet. Die Aktivität der Fragmente konnte dann mittels einer Luziferase-Reaktion gemessen werden.

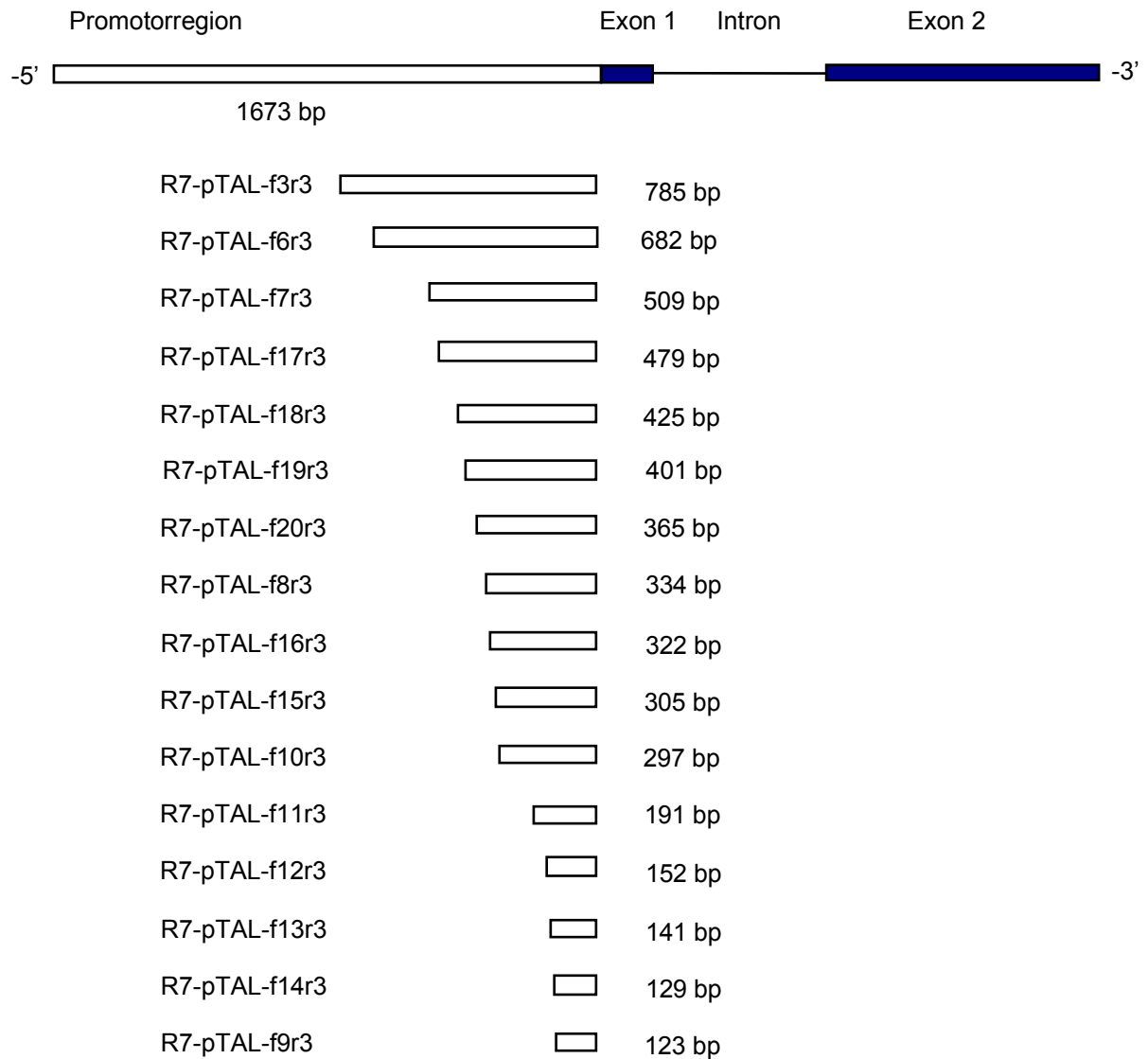


Abb. 2: Struktur des RNase 7 Gens, wobei das Exon 2 hierbei nur angedeutet ist und nicht in voller Länge dargestellt wurde. Übersicht über die verwendeten geschnittenen Fragmente aus der Promotorregion (R7-pTAL-f3r3 bis R7-pTAL-f20r3, abgekürzt genannt: f3 bis f20), nach der Länge sortiert. Die Balkenlänge verhält sich proportional zu der Länge der Fragmente in Basenpaaren.

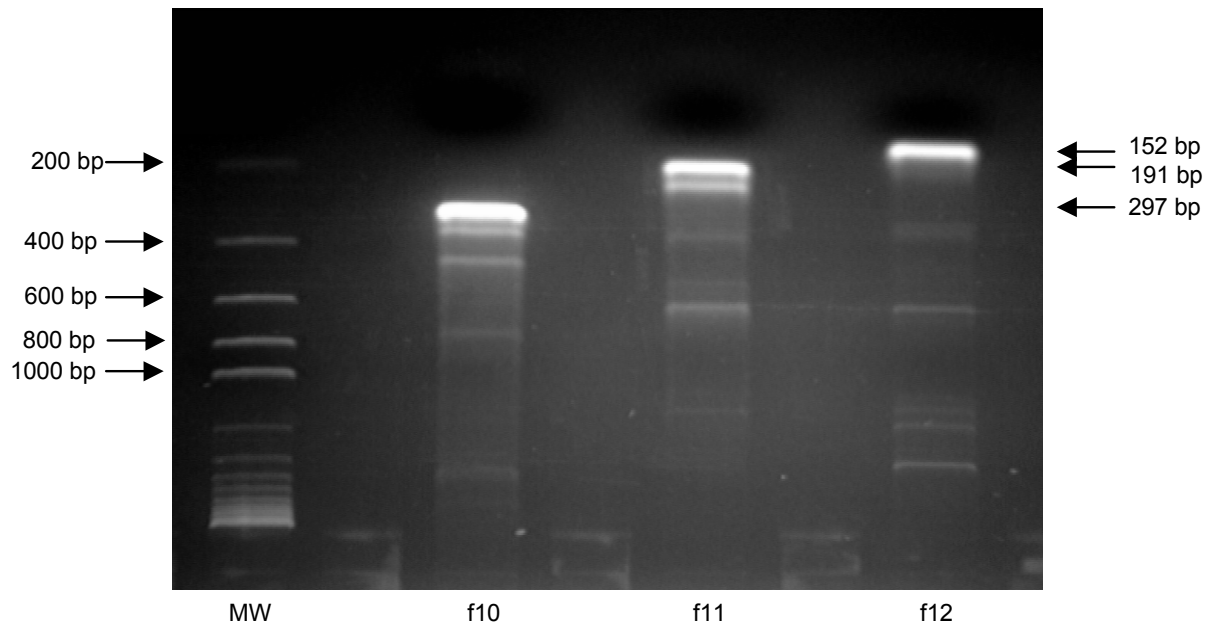


Abb. 3: Ergebnis der Gelelektrophorese nach der PCR zur Kontrolle der Amplifizierung der Fragmente f10, f11 und f12. MW bezeichnet den Molekulargewichtsstandard mit den angegebenen Längen an Basenpaaren (bp).

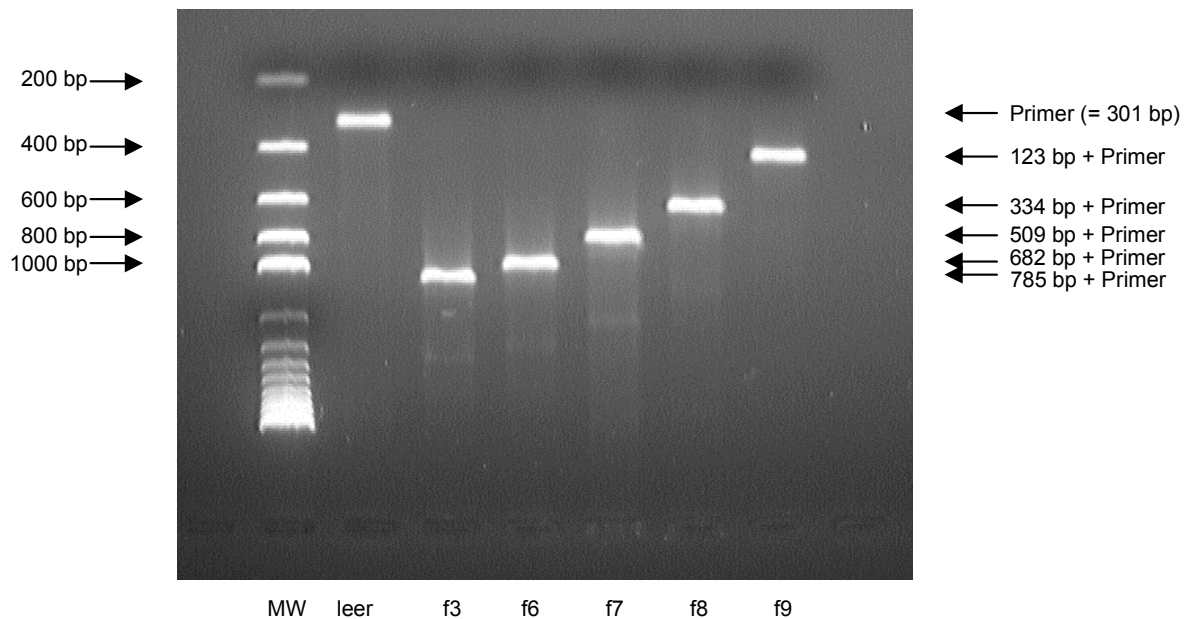


Abb. 4: Ergebnis der Gelelektrophorese nach der PCR mit pTAL-vektorspezifischen Primern zur Kontrolle der Einklonierung der Fragmente R7-PTAL-leer (o.g. leer), f3, f6, f7, f8, f9. MW bezeichnet den Molekulargewichtsstandard mit den angegebenen Längen an Basenpaaren (bp). Die Amplifizierung des Leervektors ergibt eine Größe von 301 bp.

3.1 Ergebnisse der Luziferasemessung

In der folgenden Ergebnisdarstellung sind die Ergebnisse der *Firefly*-Luziferasemessung nach Transfektion der unterschiedlichen Fragmente in primäre Keratinozyten dargestellt. Die Größe und Lage der Fragmente, die für die jeweiligen Luziferasemessungen benutzt worden sind, ist in Abb. 2 dargestellt. Die Messergebnisse sind als Säulendiagramme dargestellt. Für diese Arbeit wurde eine Vielzahl von Transfektionen und Luziferasemessungen durchgeführt, wobei immer je Fragment Zwei- oder Dreifachwerte angesetzt wurden. Die einzelnen Balken innerhalb der Diagramme entsprechen also immer einem Mittelwert aus einer 2- oder 3-fach-Messung derselben Transfektion eines Fragments (Mittelwerte und Standardabweichung). Da die Ergebnisse der Luziferasemessungen aufgrund großer Schwankungen der absoluten Werte aus den unterschiedlichen Transfektionen nicht mittelbar waren, wurde jeweils eine repräsentative Messung für die Ergebnisdarstellung dieser Arbeit ausgewählt, die eine Vielzahl von Messungen und Messergebnissen repräsentiert. In die Ergebnisse sind nur Messungen eingegangen, die einen ausreichend hohen *Renilla*-Wert, also eine verwertbare Transfektionseffizienz, zeigten. Die Fragmente wurden zunächst sowohl in HaCaT Zellen, als auch in primäre Keratinozyten transfiziert. Hierbei ergab sich, dass die Transfektion in die HaCaT Zellen weniger effizient war und schlechtere Ergebnisse lieferte. In den Ergebnisteil der Arbeit gingen ausschließlich Ergebnisse aus Messungen mit primären Keratinozyten ein. Es hat sich außerdem gezeigt, dass auch die Aufreinigung der Fragmente eine Rolle für die Qualität der Messergebnisse spielte. So wurden nicht reproduzierbare und nicht nachvollziehbare Ergebnisse mit einem Teil der Fragmente erzielt, bei denen sich die Qualität der Ergebnisse nach wiederholter Transformation und Aufreinigung der Plasmide relevant verbesserte.

Der R7-pTAL-leer Vektor wurde zusätzlich transfiziert und konnte als Kontrolle zum Vergleich mit den anderen Plasmiden genutzt werden. Er zeigte stets eine sehr geringe Luziferase-Aktivität. In allen durchgeführten Luziferasemessungen konnte ausnahmslos gezeigt werden, dass das f9-Fragment die kleinste Luziferaseaktivität von allen gemessenen Fragmenten aufwies (s. Abb. 5, Abb. 6 und Abb. 8). Es konnte in weiteren Versuchsreihen gezeigt werden, dass die Fragmente f11, f12 und f13 eine sehr viel höhere Luziferaseaktivität zeigten, als das f9-Fragment, obwohl diese unmittelbar vor dem f9-Fragment im Gen beginnen und das f13-Fragment

sogar bis in das f9-Fragment hineinreicht. Zur weiteren Eingrenzung dieses Promotorabschnittes wurde das f14-Fragment hergestellt, das nur wenige Basenpaare vor dem f9-Fragment beginnt, in dieses jedoch weit hineinreicht und von der Länge her relativ ähnlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass das f14-Fragment auch regelmäßig eine geringe Luziferaseaktivität aufwies, jedoch stets höher, als die des f9-Fragmentes. (s. Abb. 5)

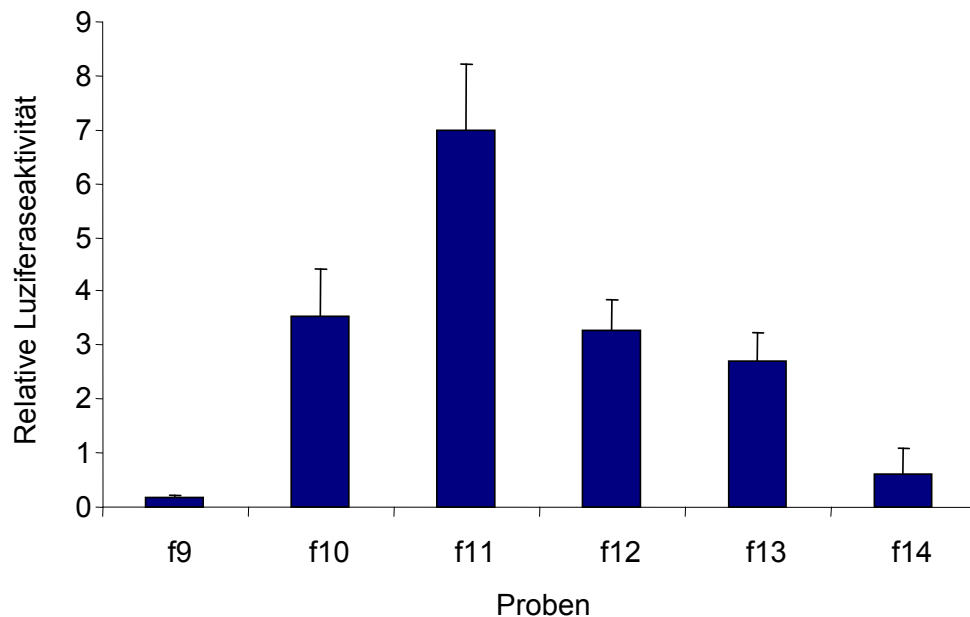


Abb. 5: Relative Luziferaseaktivität der Fragmente f9, f10, f11, f12, f13 und f14 im Vergleich nach Transfektion in Keratinozyten (Mittelwert + Standardabweichung). Die Fragmentlängen sowie deren Lage auf dem Gen können in Abb. 2 und 1 nachvollzogen werden

Die Vektoren f6 und f7, die innerhalb der Promotorregion relativ dicht beieinander liegen, zeigten zumeist eine ähnliche Aktivität, der f7-Vektor hierbei ein wenig geringer (s. Abb. 6).

Ebenso zeigten die Vektoren f10, f11 und f12 stets eine ziemlich ähnliche Aktivität, sodass hier keine Eingrenzung der Region durch Herstellung neuer Fragmente erfolgte (s. Abb. 7). Der f3-Vektor ist der größte von allen und beinhaltet alle anderen Fragmente. Er zeigte in den Luziferasemessungen erwartungsgemäß immer eine hohe Luziferaseaktivität (s. Abb. 6 und Abb. 8).

Das f8-Fragment zeigte mehrmals eine verhältnismäßig niedrige Luziferaseaktivität (s. Abb. 6, Abb. 7 und Abb. 8). Ein weiteres Eingrenzen dieser Region mithilfe der Vektoren f15 und f16 wurde versucht, die entsprechenden Versuche erzielten jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse.

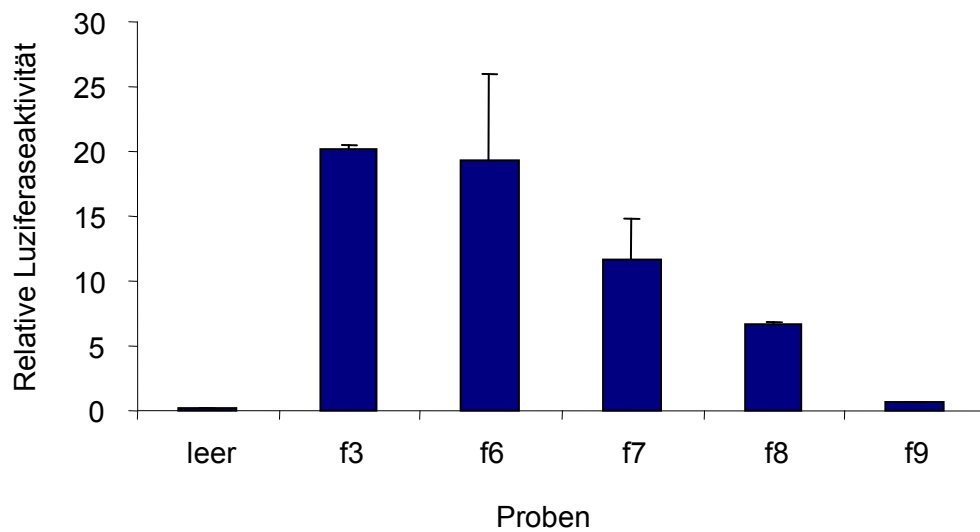


Abb. 6: Relative Luziferaseaktivität des Leervektors und der Fragmente f3, f6, f7, f8 und f9 im Vergleich nach Transfektion in Keratinozyten (Mittelwert + Standardabweichung). Die Fragmentlängen sowie deren Lage auf dem Gen können in Abb. 2 und Abb. 1 nachvollzogen werden.

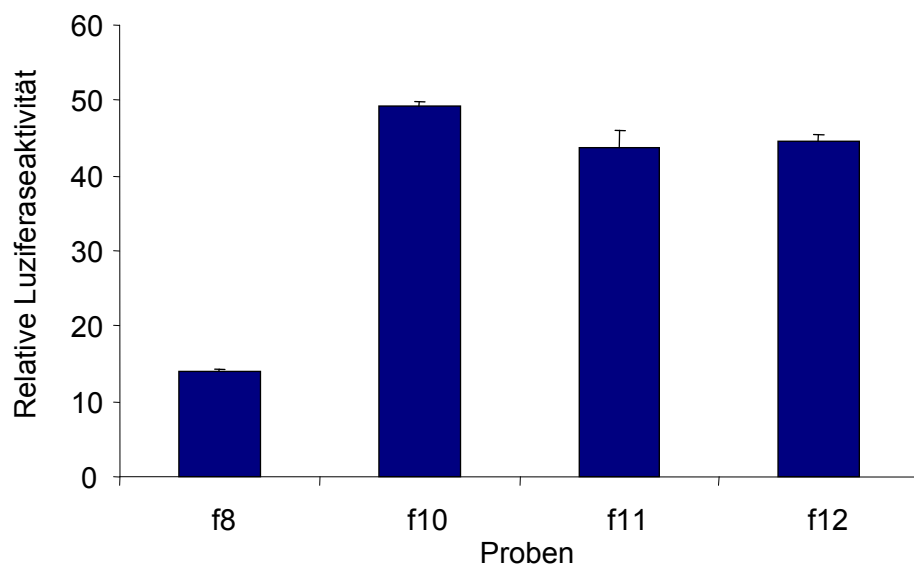


Abb. 7: Relative Luziferaseaktivität der Fragmente f8, f10, f11 und f12 im Vergleich nach Transfektion in Keratinozyten (Mittelwert + Standardabweichung). Die Fragmentlängen sowie deren Lage auf dem Gen können in Abb. 2 und Abb. 1 nachvollzogen werden.

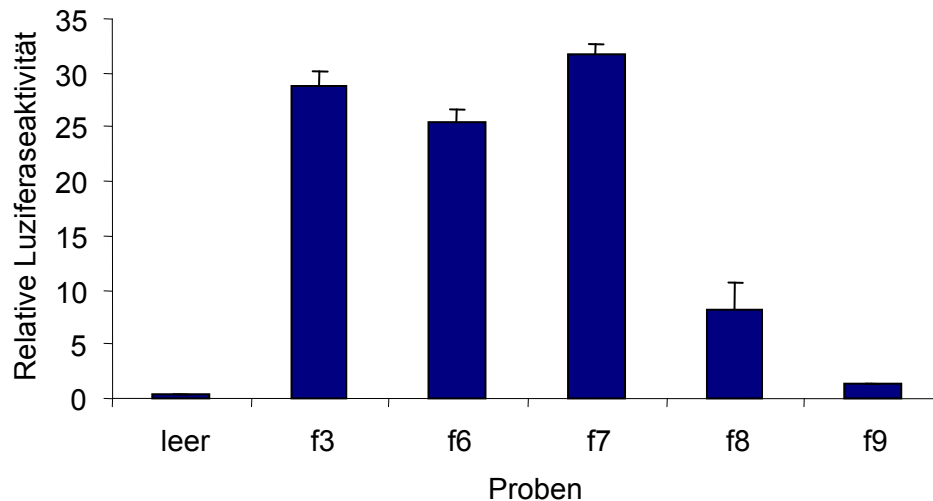


Abb. 8: Relative Luziferaseaktivität des Leervektors und der Fragmente f3, f6, f7, f8 und f9 im Vergleich nach Transfektion in Keratinozyten (Mittelwert + Standardabweichung). Die Fragmentlängen sowie deren Lage auf dem Gen können in Abb. 2 und Abb. 1 nachvollzogen werden. Der Leer-Vektor wurde als Kontrolle mit transfiziert.

3.2 Stimulation

In einem nächsten Schritt erfolgte die Transfektion von primären Keratinozyten mit dem f3-Vektor. Der f3 Vektor stellt den größten Vektor der Versuchsreihe dar und er enthält alle anderen Fragmente (s. Abb. 1). Auch in diesen Versuchen wurden, so wie in den restlichen Versuchen, jeweils in zwei bis drei Löchern der 12-Loch-Kulturplatten die Keratinozyten transfiziert, so dass die Ergebnisse als Mittelwert (mit Standardabweichung) einer 2- oder 3-fach Messung dargestellt werden. Die transfizierten Keratinozyten wurden mit 1:10 verdünnten Kulturüberständen von *Staphylococcus sciuri* (im Nachfolgenden *S. sciuri* genannt) und mit IL-17 + IFN- γ (je 20 ng/ml) für 24 h stimuliert. Die Kontrolle erfolgte mit transfizierten Keratinozyten, denen nur Epilife, bzw. nur TSB, jedoch kein Stimulus zugegeben wurde. Zur Bestimmung der Induktion von RNase 7 nach Stimulation erfolgten zwei unterschiedliche Messmethoden. Zum einen wurde die Luziferaseaktivität mithilfe des Luminometers gemessen, zum anderen wurde die Konzentration an RNase 7 im Zellkulturüberstand mithilfe eines RNase 7-spezifischen ELISAs gemessen.

Bei der Stimulation der mit dem f3-Vektor transfizierten Keratinozyten mit IL-17 und IFN- γ zeigte sich zwar im ELISA ein deutlicher Anstieg der Konzentration der RNase 7 (Abb. 9), in der Luziferasemessung fand sich jedoch ein nicht signifikanter Anstieg der Luziferaseaktivität (Abb. 10).

Die Stimulation mit *S. sciuri* ergab sowohl im ELISA als auch in der Luziferasemessung einen signifikanten Anstieg (Abb. 11 und Abb. 12).

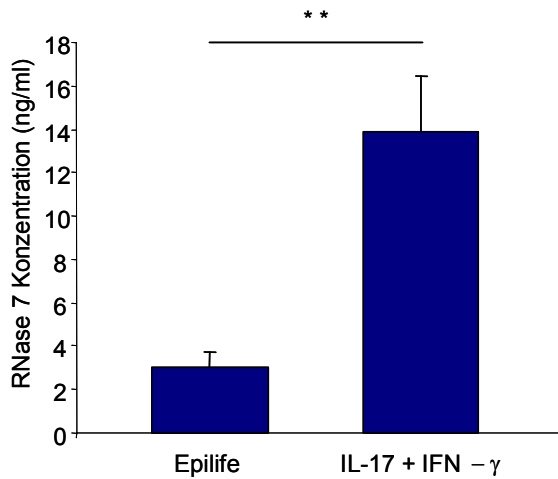


Abb. 9: RNase 7 Konzentration der Probe mit Epilife und nach Stimulation mit IL-17 und IFN- γ gemessen mithilfe des RNase 7-spezifischen ELISAs (Mittelwert und Standardabweichung, * $p < 0,01$, t-Test)

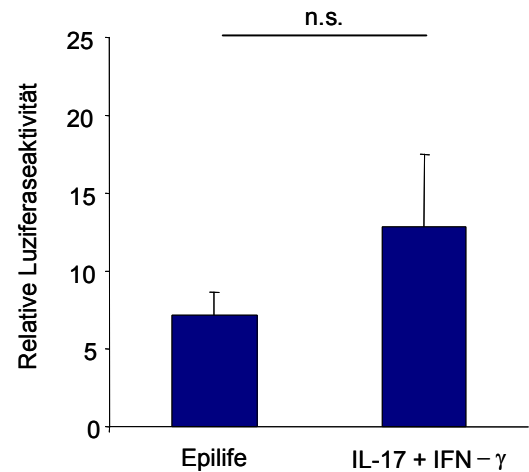


Abb. 10: Luziferasemessung nach Trans-fektion des f3-Vektors und Stimulation mit IL-17 und IFN- γ (Mittelwert und Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant, t-Test).

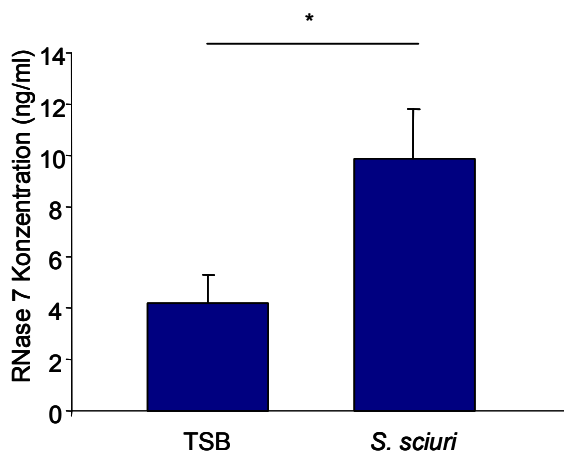


Abb. 11: RNase 7 Konzentration der Probe mit TSB und nach Stimulation mit *S. sciuri* gemessen mithilfe des RNase 7-spezifischen ELISAs (Mittelwert und Standardabweichung, * $p < 0,05$, t-Test)

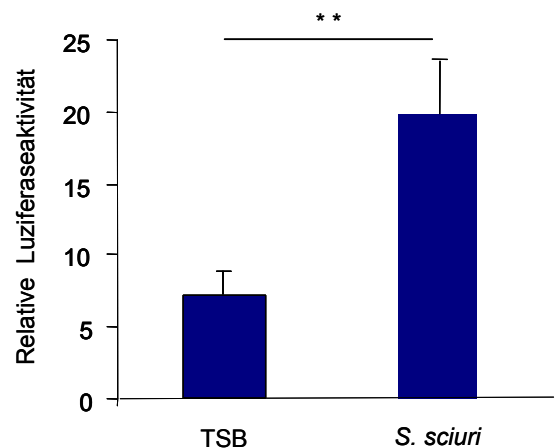


Abb. 12: Luziferasekonzentration der Probe mit TSB und nach Transfektion des f3-Vektors und Stimulation mit *S. sciuri* (Mittelwert + Standardabweichung, ** $p < 0.01$, t-Test).

4. Diskussion

Die Haut ist ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt, trotzdem ist sie nur relativ selten von Infektionen betroffen. Die menschliche Haut wird nicht nur durch eine physikalische Barriere geschützt, sondern es existiert auch eine chemische Barriere in Form von antimikrobiellen Peptiden (Schröder und Harder 2006, Wiesner und Vilcinskas 2010). Antimikrobielle Peptide werden in der Haut, vor allem von Keratinozyten, Sebozyten und Schweißdrüsen sezerniert (Schittek *et al.* 2008). Besonders bei bestimmten Hauterkrankungen, wie z.B. Acne vulgaris, sowie in entzündlichen Bereichen der Haut findet man eine Überexpression an antimikrobiellen Peptiden, die der Entzündungsabwehr dienen (Schittek *et al.* 2008, Marcinkiewicz und Majewski 2016).

Ein wichtiges antimikrobielles Peptid der Haut ist RNase 7, welche aus dem *Stratum corneum* hautgesunder Patienten isoliert werden konnte. RNase 7 hat ihren Namen aufgrund der Strukturähnlichkeit zu anderen Mitgliedern der RNase A Superfamilie (Harder und Schröder 2002).

Die Fragestellung dieser Arbeit war, welche Teile der Promotorregion für die hohe Grundexpression von RNase 7 in Keratinozyten verantwortlich sind und ob die Induzierbarkeit der RNase 7 nach Stimulation mit Zytokinen und Bakterien sich auch auf der Promotor-Ebene widerspiegelt. Hierzu wurden Promotorfragmente des RNase 7 Gens mithilfe von Primern hergestellt, in Luziferase-Plasmide kloniert und damit primäre Keratinozyten transfiziert. Anhand von Luziferasemessungen wurde die Aktivität der einzelnen Abschnitte ermittelt. Auffälligstes Ergebnis war hierbei, dass das Fragment f9 immer die niedrigste Luziferaseaktivität aufwies, wobei direkt benachbarte, d.h. eingrenzende, Fragmente (f11, f12, f13) eine deutlich höhere Luziferaseaktivität aufwiesen. Zudem wurden Keratinozyten, die zuvor mit einem Promotorfragment transfiziert wurden, mit IL-17 + IFN- γ , sowie mit *S. sciuri* stimuliert. Anschließend wurden die Luziferaseaktivität und die RNase 7-Proteinkonzentration mithilfe eines RNase 7-spezifischen ELISAs gemessen. Während beide Stimulationen zu einer deutlichen Erhöhung der RNase 7-Sekretion führten (ELISA-Daten), zeigte nur die Stimulation mit *S. sciuri* auch in der Luziferasemessung einen signifikanten Anstieg der Promotoraktivität.

Nachdem innerhalb unserer Arbeitsgruppe schon nachgewiesen werden konnte, dass das Konstrukt aus Promotor, Exon 1 und Intron (Abb. 2) die höchste relative Luziferaseaktivität aufweist und sich nach Deletion des Introns die Luziferaseaktivität verminderte (Rudolph 2005), man also davon ausgehen kann, dass sich im Intron regulatorische Sequenzen für die Transkription befinden, sollte in dieser Arbeit die Promotorregion ohne Berücksichtigung des Introns oder Exons untersucht werden. So konnte die Promotorregion ohne Manipulation durch die regulatorischen Sequenzen des Introns beurteilt werden. Hierfür wurde ein "reverse"-Primer benutzt (r3), der direkt vor Beginn des Exon 1 bindet, da innerhalb unserer Arbeitsgruppe auch gezeigt werden konnte, dass das Exon 1 eine inhibierende Wirkung ausübt (Rudolph 2005). Da sich die für die Initiierung der Transkription wichtige TATA-Box im Intron des RNase 7 Gens befindet, wurde für die Untersuchungen der Promotor-Aktivierung der pTAL-Vektor verwendet, da dieser eine interne TATA-Box aufweist (www.clontech.com).

Zunächst wurden in dieser Arbeit die Fragmente f6 bis f9 und f3 hergestellt und untersucht. Den Ergebnissen folgend wurden dann unterschiedliche Regionen durch Herstellen weiterer Promotorabschnitte enger eingegrenzt. Hierdurch sollten aktive und inaktive Regionen und somit potentielle Bindungsstellen für aktivierende oder inhibierende Transkriptionsfaktoren gefunden werden. Transkriptionsfaktoren sind regulatorische DNA-bindende Peptide, die wichtig für die Initiation der RNA-Polymerase sind. Spezifische Transkriptionsfaktoren vermitteln der Polymerase, welche Genabschnitte aktiviert oder reprimiert werden sollen. Transkriptionsfaktoren verfügen in der Regel über unterschiedliche Funktionseinheiten. Sie besitzen eine Einheit für die Bindung an die DNA und eine Einheit für die Transkriptionsregulation (Kadonaga *et al.* 1988). Transkriptionsfaktoren erkennen und binden immer an eine bestimmte Konsensus-Sequenz an der DNA. Sobald der Transkriptionsfaktor an der passenden Stelle gebunden hat, wird die Transkriptionsregulationseinheit aktiviert und reguliert die Transkription (Jackson *et al.* 1990). Man unterscheidet "Silencer", DNA-Sequenzen, die eine Reduktion der Transkriptionsrate vermitteln und "Enhancer", die die Transkriptionsrate erhöhen (Eckert *et al.* 1997). Nach erfolgter Transkription wird der Transkriptionsfaktor dann wieder freigesetzt.

Das "Enhancer Binding Protein" (EBP) bindet an eine bestimmte Stelle am Promotor, immer an einer CCAAT-Sequenz, und verstärkt die Transkriptionsaktivität des Gens. Hierbei kann das EBP auch an den Promotor binden, wenn es mehrere tausend

Basen entfernt liegt, da der Transkriptionsfaktor durch die Supercoil-Struktur der DNA in räumliche Nähe zur Promotorsequenz gebracht werden kann. Somit kann EBP seine Wirkung auch weit entfernt von der Lage des zu regulierenden Gens entfalten. Zu der Familie der C/EBPs (CCAAT/Enhancer Binding Protein) gehören sechs unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP- γ , CRP1 und dCEBP (Oh und Smart 1998), die in den unterschiedlichen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden, hierbei auch in primären Keratinozyten. Es konnte herausgefunden werden, dass die C/EBP z.B. bei der Differenzierung von Hautzellen eine bedeutende Rolle spielen (Maytin und Habener 1998, Rozenberg *et al.* 2013).

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Transfektionen und Luziferase-messungen konnte gezeigt werden, dass das kürzeste Fragment, das f9-Fragment, durchgehend eine sehr niedrige Luziferaseaktivität aufwies (Abb. 5, Abb. 6 und Abb. 8). Um diesen Abschnitt der Promotorregion näher untersuchen und eingrenzen zu können, wurden zusätzlich die Fragmente f11, f12, f13 und f14 hergestellt (Abb. 1). In den folgenden Experimenten zeigte sich, dass alle vier neu hergestellten Fragmente eine höhere Luziferaseaktivität als das f9-Fragment aufwiesen, wobei das f13-Fragment, welches ein Stück vor dem f9-Fragment beginnt, noch eine deutlich höhere Luziferaseaktivität zeigte, das f14-Fragment, welches nur sechs Basenpaare vor dem f9-Fragment beginnt, jedoch bereits eine deutlich geminderte Luziferaseaktivität aufweist, wenn auch stets geringfügig höher als die des f9-Fragments. Diese Tatsache könnte unter anderem damit erklärt werden, dass eine Promotor-Analyse („Matinspector“, Genomatix Software GmbH, München) ergab, dass genau zwischen diesen Fragmenten eine Bindungsstelle für C/EBP liegt und dieser Bereich deshalb für eine vollständige konstitutive Aktivierung des RNase 7-Promotors essentiell sein könnte. Das f14-Fragment liegt nur noch zum Teil in der potentiellen Bindungsstelle für C/EBP und das f9-Fragment liegt außerhalb der Bindungsstelle, so dass dies die in allen Messungen mit dem f9-Fragment einhergehende Reduktion der RNase 7 Promotor-Aktivität erklären könnte. Zusammenfassend deuten diese Untersuchungen darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor C/EBP von wichtiger Bedeutung für die hohe konstitutive RNase 7 Expression in Keratinozyten sein könnte. Diese Hypothese muss in weiterführenden Untersuchungen, z.B. mittels Expressionshemmung von C/EBP durch RNA-Interferenz oder durch zielgerichtete Mutationen der C/EBP-

Bindungsstelle, überprüft werden.

Auch das f8-Fragment zeigte eine, im Gegensatz zu den restlichen Fragmenten, verhältnismäßig niedrige Luziferaseaktivität (Abb. 6-8). Diese Tatsache ließ vermuten, dass sich in diesem Bereich der Promotorregion eine inhibierende Sequenz, bzw. außerhalb eine Sequenz zur Erhöhung der Transkription befinden könnte. Durch weiteres Eingrenzen dieser Region mithilfe der Vektoren f15 und f16 wurde versucht, diese Hypothese zu verifizieren, was jedoch leider nicht gelang, da die entsprechenden Versuche keine reproduzierbaren Ergebnisse ergaben. Man könnte durch erneute Aufreinigung der Fragmente und erneute Klonierung versuchen, eine Verbesserung der Ergebnisqualität zu erzielen. Die Luziferasemessungen der Fragmente f6 und f7 zeigten eine ähnliche relativ durchschnittliche Luziferaseaktivität, so dass sich in diesem Bereich der Promotorregion keine Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu vermuten waren und auch keine weitere Eingrenzung dieser Region erfolgte.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Stimulation primärer Keratinozyten mit Kulturüberständen von *P. aeruginosa* sowie von *Staphylococcus aureus*, die mRNA- und Proteinexpression von RNase 7 induzieren kann (Rudolph 2005).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Stimulation mit IL-17 + IFN- γ , sowie mit Kulturüberständen von *Staphylococcus sciuri* (*S. sciuri*), da in Vorversuchen in unserer Arbeitsgruppe herausgefunden werden konnte, dass durch diese Stimuli die Expression von RNase 7 in Keratinozyten sehr hoch induziert werden kann. Vor der Stimulation wurde zunächst ein großes RNase 7 Promotorelement, welches alle in dieser Arbeit untersuchten Fragmente beinhaltet, nämlich das f3-Fragment, in einen Luziferase-Vektor kloniert und dieser dann in primäre Keratinozyten transfiziert. Nach erfolgter Stimulation wurde anschließend zum einen die Luziferaseaktivität bestimmt, zum anderen wurden die Überstände mithilfe eines RNase 7-spezifischen ELISAs untersucht. Die ELISA-Untersuchungen dienten zur Feststellung einer korrekt erfolgten Stimulation von RNase 7. Es zeigte sich nach Stimulation mit IL-17 + IFN- γ eine nicht signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität im Vergleich zur unstimulierten Probe. Die Untersuchung der Überstände mithilfe des ELISAs ergab einen Anstieg der RNase 7 Konzentration um das Vierfache nach Stimulation mit IL-

17 + IFN- γ . Diese Messergebnisse lassen vermuten, dass sich innerhalb des Fragmentes f3 keine wichtigen regulativen Bereiche befinden, die für die Induktion von RNase 7 durch IL-17 + IFN- γ von wichtiger Bedeutung sind. Man kann spekulieren, dass für diese Stimulation wichtige Promoterelemente noch weiter aufwärts, außerhalb der untersuchten Promoterregion des f3 Fragmentes, liegen könnten. Des Weiteren kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass in der Promoterregion des f3-Fragmentes zwar für die Induktion wichtige Bereiche liegen, diese aber in unseren Analysen nicht detektiert werden konnten, da diese Bereiche ein Zusammenspiel mit anderen außerhalb des f3-Fragmentes gelegenen Genabschnitten erfordern.

Die Stimulation mit *S. sciuri*, zeigte in der Luziferasemessung einen signifikanten Anstieg auf mehr als das Doppelte und auch im ELISA konnte ein signifikanter Anstieg der RNase 7 auf das Dreifache nachgewiesen werden. Somit kann angenommen werden, dass sich in diesem Promotorbereich tatsächlich entscheidende Bindungsstellen für die Induktion von RNase 7 durch *S. sciuri* befinden.

Weiterführende Forschung sollte versuchen, durch die Verwendung kleinerer Promotor-Fragmente die genaue Lage der Bindungsstellen für die *S. sciuri*-vermittelte Induktion von RNase 7 einzugrenzen und zu identifizieren. Zusätzlich könnte man durch die Verwendung vom f3-Fragment aufwärts gelegener Promotorfragmente versuchen zu ermitteln, ob sich dort potentielle regulative Bereiche für die Induktion von RNase 7 durch IL-17 + IFN- γ befinden.

5. Zusammenfassung

Die Haut besitzt unterschiedliche Abwehrsysteme, um die verschiedenen eindringenden Mikroorganismen zu bekämpfen. Es bestehen eine physikalische Barriere und eine chemische Barriere in Form von antimikrobiellen Peptiden. Ein wichtiges antimikrobielles Peptid der Haut ist RNase 7. RNase 7 zeigt in der Haut und in kultivierten primären Keratinozyten eine sehr hohe Grundexpression.

In dieser Arbeit wurde der Promotor von RNase 7 analysiert, um Erkenntnisse über die Regulation der hohen konstitutiven Genexpression von RNase 7 in Keratinozyten zu erlangen. Hierzu wurden unterschiedlich große Fragmente aus einem Teil der Promotorregion des RNase 7 Gens amplifiziert und in ein Luziferase-Reporterplasmid kloniert. Nach Transfektion dieser Plasmide in primäre Keratinozyten wurde die Aktivität der jeweiligen Promotorabschnitte anhand einer Luziferasemessung mit dem Luminometer bestimmt. Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden dann mit Hilfe neu hergestellter Fragmente näher eingegrenzt. Durch schrittweise Verkürzung der Promotorfragmente konnte ein Fragment identifiziert werden, das nur noch eine sehr niedrige Luziferaseaktivität aufwies. Nach näherer Eingrenzung durch weitere Fragmente, konnte ein Bereich identifiziert werden, der eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor C/EBP enthält. Da das Fehlen dieser potentiellen C/EBP-Bindungsstelle mit einer sehr niedrigen Promotoraktivität korreliert, lässt sich vermuten, dass C/EBP eine wichtige Bedeutung für die hohe Grundexpression von RNase 7 besitzt, eine Hypothese, die in weiteren Studien untersucht werden muss.

Die Kombination von IL-17 und IFN- γ sowie das Bakterium *Staphylococcus sciuri* wurden in unserer Arbeitsgruppe als potente Induktoren der RNase 7 Expression in Keratinozyten identifiziert. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die Aktivierung des RNase 7 Promotors durch diese Stimuli untersucht werden. Hierzu wurden primäre Keratinozyten nach Transfektion mit dem größten RNase 7 Promotor-Luziferase-Fragment (785 bp) mit IL-17 + IFN- γ sowie mit *S. sciuri* stimuliert und die Promotor-Aktivierung mittels Luziferase-Messung bestimmt. Zusätzlich wurde als Kontrolle der Stimulation die Sekretion von RNase 7 in den Zellüberstand anhand eines RNase 7-spezifischen ELISAs gemessen. Die Luziferasemessungen der transfizierten Keratinozyten ergaben eine signifikante

Aktivierung des RNase 7-Promotors nach Stimulierung mit *S. sciuri*, nicht aber mit IL-17 + IFN- γ , während die Messungen der Zellüberstände mit Hilfe des ELISAs in beiden Fällen eine signifikante RNase 7 Induktion ergaben. Diese Tatsache lässt vermuten, dass Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der untersuchten Promotorregion vorhanden sind, die für die Induktion durch *S. sciuri* eine wichtige Rolle spielen könnten. Für die Induktion von RNase 7 durch IL-17 + IFN- γ scheinen keine entscheidenden Bindungsstellen innerhalb des untersuchten Promotor-Fragmentes vorhanden zu sein. In weiterführenden Versuchsreihen könnten weitere Fragmente der Promotorregion untersucht werden, sowie weitere Stimulationen und Aktivitätsbestimmungen mittels Luziferasemessungen und ELISA erfolgen, um die aktiven Regionen der Promotorregion und die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren nach Stimulierung mit *S. sciuri* weiter einzugrenzen. Des Weiteren bleibt zu untersuchen, ob die Verwendung eines längeren Promotorbereiches zu einer Promotoraktivierung nach Stimulierung mit IL-17 + IFN- γ führt.

6. Literaturverzeichnis

- Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG (1995). hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368: 331-335.
- Boman HG (1998). Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol* 48: 15-25.
- Boman HG (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173: 5-16.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A & Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771.
- Braff MH, Bardan A, Nizet V & Gallo RL (2005). Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125: 9-13.
- Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL & Bevins CL (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3952-3956.
- Eckert RL, Crish JF, Banks EB & Welter JF (1997). The Epidermis: Genes On – Genes Off. *J Invest Dermatol* 109 (4): 501-9.
- Elias PM (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 125: 183-200.
- Firat YH, Simanski M, Rademacher F, Schröder L, Brasch J & Harder J (2014). Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression. *PLoS One* 9 (4): e93941.
- Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM & Austen KF (1993). *Dermatology in general medicine*. Fourth Edition. McGraw-Hill, New York.
- Harder J, Bartels J, Christophers E & Schröder JM. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387 (6636): 861.
- Harder J, Bartels J, Christophers E & Schröder JM (2001). Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276 (8): 5707-13.
- Harder J & Schröder JM (2002). RNase 7: a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277: 46779-46784.

- Harder J, Gläser R & Schröder JM (2007). Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity *J Endotoxin Res* 13 (6): 317-38.
- Huang YC, Lin YM, Chang TW, Wu SJ, Lee YS, Chang MD, Chen C, Wu SH & Liao YD (2007). The Flexible and Clustered Lysin Residues of Human Ribonuclease 7 are Critical for Membrane Permeability and Antimicrobial Activity. *J Biol Chem* 282 (7): 4626-33.
- Jackson SP, McDonald JJ, Lees Miller S & Tjian R (1990). GC Box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *J Cell Biochem* 63: 155-165.
- Kadonaga JT, Couray AJ, Ladika J & Tjian R (1988). Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 242: 1566-1570.
- Köten B, Simanski M, Gläser R, Podschun R, Schröder JM, Harder J (2009). RNase 7 contributes to the cutaneous defense against *Enterococcus faecium* *PLoS One* 4 (7): e6424.
- Marcinkiewicz M & Majewski S (2016). The role of antimicrobial peptides in chronic inflammatory skin diseases. *Postepy Dermatol Alergol* 33 (1): 6-12.
- Marks R (2004). The stratum corneum barrier: the final frontier. *J Nutr* 134: 2017S-2021S.
- Maytin EV & Habener JF. (1998). Transcription factors C/EBP α , C/EBP β and CHOP (Gadd 153) Expressed During the Differentiation Program of Keratinocytes In Vitro and In Vivo. *J Invest Dermatol* 110: 238-246.
- Oh HS & Smart R (1998). Expression of CCAAT/ Enhancer Binding Proteins (C/EBP) is Associated with Squamous Differentiation in Epidermis and Isolated Primary Keratinocytes and is Altered in Skin Neoplasm. *J Invest Dermatol* 110: 939-945.
- Ouellette AJ, Greco RM, James M, Frederick D, Naftilan J & Fallon JT (1989). Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. *J Cell Biol* 108: 1687-1695.
- Rosenberg HF (2008): RNase A Ribonucleases and host defense: an evolving story *Journal of leucozyte Biology* 83: 1079-1087.
- Rozenberg JM, Bhattacharya P, Chatterjee R, Glass K & Vinson C (2013). Combinatorial recruitment of CREB, C/EBP β and c-Jun determines activation of promoters upon keratinocyte differentiation. *PLoS One* 8 (11): e78179.
- Rudolph, Bente (2005). Untersuchung zur Bedeutung antimikrobieller Ribonukleasen für die epitheliale Infektionsabwehr. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

- Schittek B, Paulmann M, Senyürek I & Steffen H (2008). The role of antimicrobial peptides in human skin and in infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets* 8 (3): 135-43.
- Schonwetter BS, Stolzenberg ED & Zasloff MA (1995). Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267: 1645-1648.
- Schröder JH & Harder J (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* 63 (4): 469-86.
- Simanski M, Rademacher F, Schröder L, Schumacher HM, Gläser R & Harder J (2013). IL-17A and IFN- γ synergistically induce RNase 7 expression via STAT3 in primary keratinocytes. *PLoS One* 8 (3): e59531.
- Spencer JD, Schwaderer AL, Dirosario JD, McHugh KM, McGillivray G, Justice SS, Carpenter AR, Baker PB, Harder J & Hains DS (2011). Ribonuclease 7 is a potent antimicrobial peptide within the human urinary tract. *Kidney Int* 80 (2): 174-80.
- Wiesner J & Vilcinskas A (2010). Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1 (5):440-64.

7. Anhang

Liste der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AP	Antimikrobielle Peptide
APS	Amphotericin, Penicillin und Streptomycin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	„mRNA complementary DNA“ = komplementäre DNA
CaCl	Calciumchlorid
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (DNS)	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EBP	Enhancer Binding Protein
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> = und andere
FCS	(hitzeinaktiviertes) fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
HaCaT	“Human adult low calcium high temperature keratinocytes”
h	Stunden
hBD	humanes beta-Defensin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	kilo-Dalton

MgCl	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
TNF	Tumor Nekrose Faktor
RNA	“Ribonucleic acid” = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Staph.	Staphylococcus
TAP	Tracheales antimikrobielles Peptid
TEA	Tris-Azetat-EDTA
TSB	Tryptic soy broth

Basen der DNA:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

8. Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Harder für die Vergabe des Themas bedanken. Außerdem für die unendliche Geduld, das unaufhörliche Mutmachen während der experimentellen Phase und die stete Bereitschaft mir mit Rat und Tat während der gesamten Arbeit zur Seite zu stehen.

Weiterhin danke ich dem gesamten Team des Forschungsbereiches der Hautklinik für die liebe Hilfe und Unterstützung im Labor.

Liebe Sarah, ohne Dich wären die vielen Stunden an der Bench nur halb so lustig gewesen. Vielen Dank für das Hand-in-Hand arbeiten und die gegenseitige Unterstützung.

Vielen Dank an Toni, der mich immer wieder ermutigt hat weiter zu machen und mir mit viel Verständnis zur Seite stand.

Ein besonders lieber Dank gilt meiner Schwägerin Christina Sommer, die mich bei dem schriftlichen Teil dieser Arbeit unendlich viel unterstützt hat.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mir all dies ermöglicht haben. Ohne Euch wäre ich hier nicht angekommen, ihr seid mein ständiger Fels in der Brandung.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Giuliana Donata Vial

Geboren 1981 in Bremen

Schulische Laufbahn:

1988-1992 Grundschule: Oslebshäuser Heerstraße, Bremen

1992-1994 Orientierungsstufe: Schulzentrum Pestalozzistraße Bremen

1994-1998 Gymnasium: Hermann-Böse-Gymnasium Bremen

1998-2001 Oberstufe: Schulzentrum Lange Reihe Bremen

2001 Abitur

Studium:

2001-2002 Studium Politikwissenschaften an der Universität Bremen

2002-2008 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

8/2004 Ärztliche Vorprüfung/Physikum

2008 zweite Ärztliche Prüfung / Staatsexamen, Approbation

Praktisches Jahr:

08.-12.2007: 1. Tertial: Chirurgie Azienda Ospedaliera Padova in Italien

12.-4.2008: 2. Tertial: Innere Medizin an der CAU Kiel

4.-7.2008: 3. Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe Diako in Flensburg

Dissertation:

2018 Doktorarbeit in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der CAU (anteilig als studentische Hilfskraft im Labor der Klinik für Dermatologie CAU)

Berufliche Laufbahn:

2009-2018 Facharztausbildung in der Chirurgischen Klinik des Diako Krankenhauses Bremen, Prof. Dr. S.M. Freys

2012 u. 2016 jeweils einjährige Unterbrechung der Facharztausbildung aufgrund zweimaliger Elternzeit