

**Untersuchungen zur Bedeutung des humanen  
Ribonuklease-Inhibitors und der  
antimikrobiellen Ribonuklease RNase 7 für die  
kutane Abwehr**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

LENA SCHRÖDER  
Kiel, 2018

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Harder

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juni 2019

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 03. Juni 2019

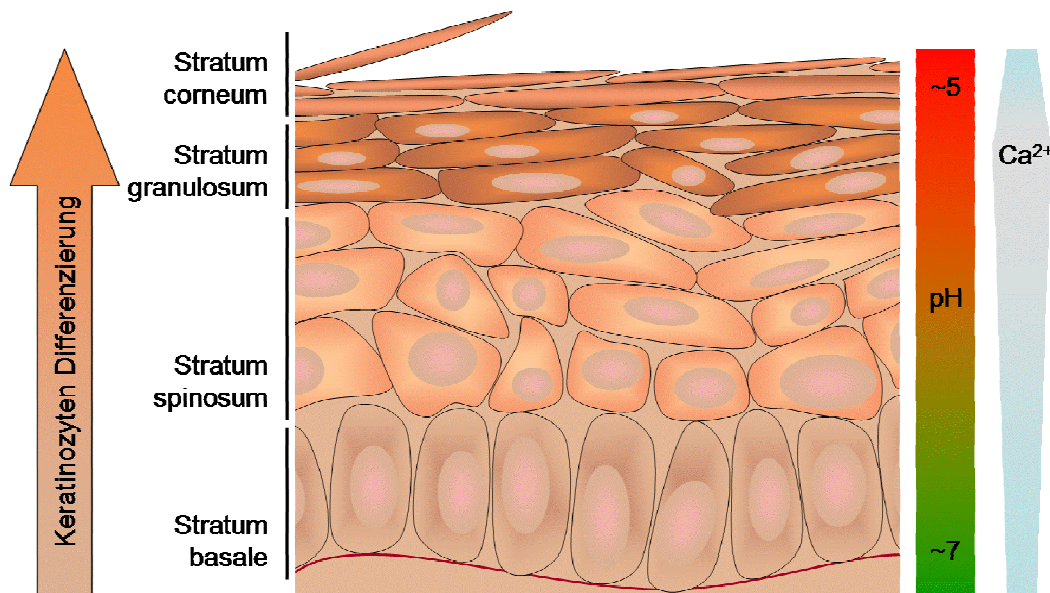
## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>5</b>
2.1	Chemikalien und Reagenzien	5
2.1.1	Chemikalien	5
2.1.2	Enzyme	8
2.1.3	Oligonukleotide	9
2.1.4	Kits	10
2.1.5	Mikroorganismen und Plasmide	10
2.1.6	Herstellung von Bakterienüberständen	11
2.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen	11
2.2.1	HaCaT-Zelllinie	12
2.2.2	Keratinocyten	12
2.2.3	Subkultivierung der HaCaT-Zellen und der Keratinocyten	12
2.2.4	Stimulation der Zellen	13
2.2.5	Transiente Transfektion von Keratinocyten	14
2.2.6	Transfektion von small interfering RNA	14
2.2.7	Gewinnung von Überständen Keratinocyten-Kulturen	15
2.2.8	Scratch-Assay	15
2.3	Molekularbiologische Methoden	16
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.3.3	Restriktionshydrolysen von DNA	20
2.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.3.5	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	22
2.3.6	Transformation	22
2.3.7	DNA-Sequenzierung	23
2.4	Rekombinante Expression von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor in <i>E.coli</i>	23
2.4.1	Vektor und Expression	23
2.4.2	Reinigung rekombinanter RNase 7 aus <i>E.coli</i>	25
2.4.3	Reinigung des rekombinanten Ribonuklease-Inhibitors	27
2.5	Proteinanalytik	29
2.5.1	Aufschluss eukaryotischer Zellen	29
2.5.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.5.3	Westernblot	31
2.5.4	RNase 7-ELISA	32
2.5.5	Immunhistochemie	33
2.5.6	Massenspektrometrie	35
2.5.7	Antimikrobieller Test	35
2.5.8	RNase Assay mit fluoreszierendem Substrat	36
2.5.9	Gelfiltration	37
2.5.10	Zellviabilität Tests	37
2.6	Kallikrein Aktivierung	37
2.7	Stratum corneum Extrakt Herstellung	38
2.7.1	Umkehrphasenchromatographie von Stratum corneum Extrakt	39
2.8	Genexpression in Keratinocyten	39
2.8.1	Real-time quantitative PCR	39
2.9	Darstellung der Ergebnisse	41

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
3.1	Rekombinante RNase 7 und rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor .....	42
3.1.1	Rekombinante Herstellung von RNase 7 .....	42
3.1.2	Rekombinante Herstellung vom Ribonuklease-Inhibitor .....	43
3.2	Komplexbildung von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor .....	46
3.2.1	Rekombinante RNase 7 und Ribonuklease-Inhibitor binden <i>in vitro</i> aneinander .....	47
3.2.2	Immunhistologie von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor .....	49
3.2.3	Der Ribonuklease-Inhibitor wird im Stratum corneum degradiert .....	50
3.2.4	Der Ribonuklease-Inhibitor und <i>Stratum corneum</i> Extrakt .....	50
3.2.5	Der Ribonuklease-Inhibitor und Kallikreine .....	53
3.3	Der Ribonuklease-Inhibitor inhibiert die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 .....	57
3.3.1	Keine Dimerisation von rekombinanter RNase 7 .....	59
3.3.2	RNase 7 und der Ribonuklease-Inhibitor in Keratinozyten .....	60
3.4	Einfluss des RHN1-Gens auf RNase 7 .....	66
3.4.1	Untersuchungen zur möglichen potenzierten RNase 7 Proteinexpression durch Caspase-1 .....	69
3.5	Untersuchungen zur Inhibierung einer potentiell zytotoxischen Aktivität von RNase 7 durch den Ribonuklease-Inhibitor .....	74
3.6	Der Ribonuklease-Inhibitor und Hauterkrankungen .....	76
3.6.1	Ribonuklease-Inhibitor und Psoriasis .....	76
3.6.2	Ribonuklease-Inhibitor und Atopische Dermatitis .....	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>81</b>
4.1	Rekombinante Expression von RNase 7 und dem RI .....	84
4.2	Der RI-RNase 7-Komplex .....	85
4.3	RI und RNase 7 in Keratinozyten .....	87
4.3.1	Untersuchungen zur Beeinflussung des RI durch Caspase-1 .....	89
4.3.2	Untersuchungen zur RI-regulierten und durch UV-B Strahlung induzierten RNase 7-Sezernierung .....	90
4.4	Untersuchungen zu einer möglichen zytotoxischen Aktivität von RNase 7 .	91
4.5	Degradation des RI durch Stratum corneum Extrakt .....	92
4.5.1	Serinproteasen degradieren den RI .....	93
4.6	Der RI hemmt die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 .....	94
4.7	Der RI in Zusammenhang mit Hauterkrankungen .....	95
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	106
	Danksagung .....	109
	Lebenslauf .....	110
	Erklärung .....	111

## 1 Einleitung

Die Haut ist ein großes Organ des Menschen, grenzt den Körper von der Umwelt ab und verfügt über Sinnes-, Kontakt- und Schutzfunktionen. Sie schützt vor von außen einwirkenden physikalischen und chemischen Einflüssen und sorgt für den Kälte- und Wärmeaustausch, schützt vor mechanischen Schäden, Austrocknung, Ultraviolett-Strahlen (UV) und bildet eine Barriere gegen pathogene Mikroorganismen. Außerdem ist die Haut ein wesentlicher Bestandteil des Immun-, Nerven- und Hormonsystems <sup>[1,2]</sup>. Die Haut besteht aus drei zusammenhängenden Schichten: der oberen Epidermis, der darunterliegenden Dermis und der untersten Subcutis. In der Subcutis befinden sich vor allem Fett- und Bindegewebe, welches vor Kälte schützt und als Energiespeicher dient. Die Dermis besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und den feinen Blutkapillaren. Hier entspringen die Talg- und Schweißdrüsen. Die Oberhaut, die Epidermis, erneuert sich immer wieder selbst, indem epitheliale Stammzellen aus der Basalschicht eine Entwicklung als differenzierende Keratinozyten durch alle Schichten der Epidermis durchlaufen, um schließlich als verhornte, tote Korneozyten, den Hornschuppen, an der Oberfläche der Haut, dem *Stratum corneum* (S.c.), abgestoßen zu werden <sup>[3]</sup>. Diese Schicht wird durch die Abgabe von Fett und Wasser aus Talg- und Schweißdrüsen geschmeidig gehalten und bildet einen Säureschutzmantel mit einem leicht sauren pH Wert, der mit jeder tiefergehenden Schicht neutraler wird und ebenso wie die ständige Erneuerung der Zellen als eine Barriere für Pathogene wirkt. Hauptsächlich setzt sich die Epidermis aus Keratinozyten zusammen, allerdings machen Melanozyten, Merkel Zellen und Langerhans Zellen ebenfalls einen kleinen Anteil der Epidermis aus. Abbildung (Abb. 1 zeigt ein vereinfachtes Modell der Epidermis, in der lediglich Keratinozyten dargestellt sind. Das einlagige *Stratum basale* sitzt der Basalmembran auf, die die Dermis von der Epidermis abgrenzt. Keratinozyten erneuern sich hier durch eine mitotische Zellteilung. In der angrenzenden Schicht, dem *Stratum spinosum*, verändert sich die Zellform bereits. Keratinozyten wachsen mehrlagig, werden flacher und kleiner. Die Verhornung der Zellen beginnt bereits. Noch stärker lässt sich das im *Stratum granulosum* beobachten. Ein Maximum des Calcium-Ionen Gradienten lässt die ein- bis fünflagigen Zellen dort besonders stark differenzieren und Keratingranula bilden. Die veränderten Formen der Zellschichten gehen mit unterschiedlichen Lipid- und Proteingehalten einher. Keratin 1 und 10 sind Indikatoren für einen hohen Differenzierungslevel der Keratinozyten, wohingegen Keratin 14 vornehmlich im *Stratum basale* exprimiert wird <sup>[3]</sup>.



**Abb. 1: Die Epidermis.**

Die Haut wird von zahlreichen Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilzen und Viren besiedelt. Einen großen Anteil der Hautflora machen die symbiotischen Kommensalen aus, die von den Nährstoffen und dem Platz der Haut profitieren und im Gegenzug vor Pathogenen schützen. Typische kommensale Bakterien der Haut sind *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) und andere koagulase-negative Staphylokokken, Corynebakterien und Propionibakterien [4]. Gram-negative Bakterien, insbesondere aus der Gruppe der Beta-Proteobakterien, findet man auch auf der Haut, aber im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien in geringerer Anzahl [4]. Die mikrobielle Diversität der Haut hängt zum Teil von exogenen Faktoren wie dem Klima und der geographischen Lage ab, aber auch von endogenen Faktoren wie zum Beispiel dem Alter, dem Geschlecht oder Krankheiten. Trotz unzähliger exogener Faktoren, die permanent auf die kutane Mikrobiota einwirken, ist diese im jeweiligen Individuum über die Zeit gesehen aber überraschend stabil [5]. Dem gegenüber stellt sich eine große lokalisationsabhängige Variabilität. Die höchste Diversität befindet sich auf trockenen Hautarealen, wohingegen fettige und feuchte Hautareale eine geringere Diversität aufweisen [4]. Obwohl *S. epidermidis* überwiegend als Kommensale auftritt, ist dieser Keim oft der Auslöser für nosokomiale Infektionen, die oftmals ihren Ausgangspunkt in besiedelten Kathetern und Implantaten haben [6]. Im Gegensatz zu *S. epidermidis* kommt *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) auf der gesunden Haut meist nur transient vor, er kann aber sehr häufig in der Nase persistieren [7]. *S. aureus* ist einer der bedeutendsten

pathogenen Hautkeime <sup>[8]</sup>. Dieser Keim kommt gehäuft bei Patienten mit atopischer Dermatitis vor, bei läsionaler Haut bis zu 90% Prävalenz, wohingegen *S. aureus* auf der Haut von gesunden Menschen deutlich seltener vorkommt <sup>[9]</sup>. Es ist erstaunlich, dass Epithelien dem Kontakt vieler pathogener und kommensaler Mikroorganismen ausgesetzt sind und es nur zu wenigen Infektionen kommt. Ein weiterer Schutzmechanismus der Haut sind antimikrobielle Peptide (AMPs), die auch im Tierreich weit verbreitet sind. Michael Zasloff zeigte bereits 1987, dass antimikrobielle Proteine auf der Froschhaut vor der Kolonisation durch Mikroorganismen schützen <sup>[10]</sup>. Auf der menschlichen Haut befinden sich konstitutiv exprimierte und induziert exprimierte AMPs <sup>[11]</sup>. Humanes Beta-Defensin 2 (hBD-2) und humanes Beta-Defensin 3 (hBD-3) sind besonders stark in verletzter oder entzündeter Haut nachzuweisen, wohingegen Psoriasin und Ribonuklease 7 (RNase 7) auch in gesunder Haut in hohen Mengen, insbesondere im *S.c.* nachweisbar sind <sup>[11, 12]</sup>. RNase 7 ist eines der dominantesten AMPs auf der menschlichen Haut und nimmt eine wichtige Rolle in der kutanen Abwehr ein <sup>[13, 83]</sup>. Sie gehört zur RNase A-Familie und besitzt als typisches Merkmal dieser Familie Ribonuklease-Aktivität. Insgesamt wurden acht katalytisch aktive humane RNasen aus dieser Familie beschrieben, allerdings ist deren physiologische Relevanz teilweise unklar <sup>[37]</sup>. RNase 7 ist antimikrobiell aktiv gegen grampositive Bakterien, wie *S.aureus* und gram-negative Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) sowie gegen den Pilz *Candida albicans* <sup>[34]</sup>. *In vitro* exprimieren primäre Keratinozyten konstitutiv relative hohe Mengen an RNase 7. Diese Grundexpression lässt sich durch diverse Faktoren weiter induzieren, wie z.B. durch Zytokine, UV-Strahlung und Mikroorganismen <sup>[14]</sup>. Aufgrund der breitgefächerten antimikrobiellen Aktivität gegen eine ganze Reihe von Mikroorganismen und abundanten Expression ist es wahrscheinlich, dass RNase 7 eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunabwehr der Haut haben könnte. In einer Reihe von Studien wurde mittels RNase 7-neutralisierender Antikörper bereits gezeigt, dass die antimikrobielle Wirkung der Haut gegen diverse Bakterien (z.B. *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *Enterococcus faecium*) zum Teil von der Wirkung von RNase 7 abhängt <sup>[14, 47, 46]</sup>. Ribonukleasen der RNase A Superfamilie können durch den 50 Kilodalton (kDa) großen, zytosolischen Ribonuklease-Inhibitor (RI) gehemmt werden <sup>[53, 54, 55]</sup>. Dieser ist hufeisenförmig durch  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter aufgebaut und ist ein typisches Beispiel für Proteine mit sich wiederholenden leucinreichen Aminosäuresequenzen („Leucine-rich repeats“ LRRs) <sup>[56, 57]</sup>. Im Zytosol liegt der RI im reduzierenden Milieu vor, was er benötigt, da er durch seine 32 Cysteinreste extrem anfällig für Oxidation ist <sup>[62, 61]</sup>. Der RI macht 0,01 % des Gesamtproteins im Zytosol aus und ist dort demzufolge reichlich vorhanden <sup>[64]</sup>. Dem RI und Ribonukleasen ist es möglich einen Komplex zu bilden. Ihre Interaktion gehört zu den stärksten in der Molekularbiologie bekannten Bindungen mit einer femtomolaren Affinität <sup>[64]</sup>.

Abtin *et al.* konnten vor kurzem demonstrieren, dass der RI auch in der Lage ist, RNase 7 an sich zu binden <sup>[30]</sup>. Die Strukturen der Komplexe zwischen dem RI und zum Beispiel RNase A oder Angiogenin (RNase 5) sind bereits bekannt. Der größere RI schließt die kleineren Ribonukleasen in seine Hufeisenform ein <sup>[64]</sup>. Studien zeigten bereits, dass die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 durch Bindung des RI blockiert werden kann <sup>[30, 67]</sup>. Im Gegensatz zu RNase 7 ist der RI nahezu abwesend im *S.c.* Abtin *et al.* konnten bereits zeigen, dass der RI von *S.c.* Extrakt abgebaut wird <sup>[30]</sup>. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass der RI möglicherweise die RNase 7 Sezernierung steuert <sup>[33]</sup>. Michael Zasloff stellte sich dabei ein Modell vor, in dem der RI und RNase 7 in tieferen Hautschichten einen Komplex bilden, womöglich um die Zellen vor einer zytotoxischen Wirkung von RNase 7 zu schützen. In *S.c.* würden dann Proteasen den RI degradieren, so dass RNase 7 seine volle antimikrobielle Aktivität an der Hautoberfläche entfalten könnte <sup>[33]</sup>. Das Ziel, der hier vorliegenden Arbeit war es, dieser Hypothese nachzugehen und die Interaktion zwischen RNase 7 und dem RI weiter aufzuklären, um einen Einblick in die daraus resultierende potentielle Rolle von RNase 7 und dem RI für die kutane Abwehr zu entschlüsseln.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tab. 1: Verwendete Chemikalien.**

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
6-FAM-dArUdAdA-TAMRA	Integrated DNA Technologies, Coralville, USA
ABTS Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Acetonitril ≥ 99,9 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ac-YVAD-CMK	PeptaNova, Sandhausen, Deutschland
Advansta WesternBright™ Sirius HRP Substrat Kit	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Albumin Fraktion V, biotinfrei ≥ 98 % (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aluminiumsulfat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure ≥ 98 %	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Anti-RNH1 antibody produced in rabbit (HPA039223)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
APS	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Argon 5.0	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Blasticidin S Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Blutagar-Platten	BioMérieux, Nürtingen, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Carbenicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CASO Broth for microbiology	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Chicken anti-goat IgG Alexa Fluor® 488	Invitrogen, Carlsbad, USA
Chloramphenicol ≥ 98,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Citronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Collagen I Rat Tail Protein	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Coomassie-Brillant-Blau G-250	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Crystal RNAmagic	Biolabproducts, Bebensee, Deutschland
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D(+)-Glucose	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
DMEM Low Glucose	BioWest, Nuaille, Frankreich
DMSO $\geq 99,9$ %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP Mix	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	Invitrogen, Carlsbad, USA
DPBS	BioWest, Nuaille, Frankreich
DTT solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ELUGENT <sup>™</sup> Detergent, 50% Solution	Calbiochem, San Diego, USA
EpiLife <sup>®</sup> Definid Growth Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EpiLife <sup>®</sup> Medium (kalziumfrei)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Essigsäure 100%	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8$ %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS, South America origin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Fluoroprep	BioMérieux, Nürtingen, Deutschland
Fugene <sup>®</sup> 6 und HD Transfektionsreagenz	Promega, Mannheim, Deutschland
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycergel <sup>®</sup> Mounting Medium, Aqueous	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Glycerin $\geq 86$ %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin $\geq 99$ %	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HiPerFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Human HB-EGF	Peptidech, Rocky Hill, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
IPTG $\geq 99$ %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat $\geq 99$ %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid $\geq 99$ %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
KGM 2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamine 100x, 200mM Lösung	BioWest, Nuaille, Frankreich
Magnesiumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	USB Corporation, Cleveland, USA
Mangandichlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Melittin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

MES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol ≥ 99,9 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumacetat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
NHEK	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Oxoid™ Hefeextrakt Pulver	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd ≥ 95 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin 5.000 U/ml	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Pepton aus Soja	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (111-035-144)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Peroxidase-AffiniPure Mouse Anti-Goat IgG (205-035-108)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Pferdeherz Myoglobin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
PFR-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Phosphorsäure (ortho-) 85 %	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
PMSF ≥ 98,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Ig Biotinylated (E0466)	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Ig Biotinylated (E0353)	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Protease Inhibitor Cocktail Tablet cOmplete Mini EDTA-free	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Rabbit-serum	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roti® -ImmunoBlock	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1) 40 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure 37 %	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
SDS ≥ 98,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Select agar	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Streptavidin-POD	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Swine-Serum	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TFA ≥ 99,9 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tricin ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TRIS	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Universal Agarose	Bio&SELL, Feucht/Nürnberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 2.1.2 Enzyme

**Tab. 2: Verwendete Enzyme.**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Bovines Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Enterokinase EKMax™	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kallikreine	R&D Systems, Minneapolis, USA
Lysozym	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Maxima™ Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Nde</i> I	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase A, DNase and protease-free	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SYBR® Premix Ex Taq™ II	Takara Bio, Otsu, Japan
(10x) T/E-Lösung 0,5%/0,2% (w/v)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermolysin	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>Xho</i> I	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

### 2.1.3 Oligonukleotide

**Tab. 3: Verwendete siRNAs.**

siRNA	Hersteller
ON-TARGETplus siRNA SMARTpool RHN1	GE Healthcare Dharmacon, Freiburg, Deutschland
ON-TARGETplus siRNA SMARTpool CASP-1	GE Healthcare Dharmacon, Freiburg, Deutschland
ON-TARGETplus siRNA Non-targeting	GE Healthcare Dharmacon, Freiburg, Deutschland
Ambion® <i>Silencer</i> ® Select siRNA RNH1 s12083	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ambion® <i>Silencer</i> ® Select siRNA RNH1 s12084	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ambion® <i>Silencer</i> ® Neg. Control No. 1 siRNA	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Hs_RNH1_2 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hs_RNH1_3 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden, Deutschland

Oligonukleotide wurden über die Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Die für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass sie an ihrem 5'-Ende jeweils eine Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in die verschiedenen Vektoren aufwiesen.

**Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide.** Die Restriktionsschnittstellen der Restriktionsendonukleasen (RE) sind fett gekennzeichnet.

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	RE
<b>rekombinante Expression:</b>		
RI-pET22b-r1 neu	AAA <b>ACTCGAGT</b> TCAGGAGATGACCCTCAGGG	<i>XhoI</i>
RI-pET22b-f1	AAA <b>CATATG</b> AGCCTGGACATCCAGAG	<i>NdeI</i>
<b>Überexpression:</b>		
RI-pEF6-f1	AGGCCACTCTTCACCTCCA	-
RI-pET22b-r1 neu	AAA <b>ACTCGAGT</b> TCAGGAGATGACCCTCAGGG	-
<b>Sequenzierung und Kolonie-PCR:</b>		
pJET1.2 Forward Sequencing Primer	C <b>GA</b> CTCACTATAGGGAGAGCGGC	-
pJET1.2 Reverse Sequencing Primer	AAGAA <b>C</b> ATCGATTTTCCATGGCAG	-
T7-Promotor long	TAATAC <b>G</b> ACTCACTATAGGGG	-
T7-Terminator	TAGTTATT <b>G</b> CTCAGCGGTGG	-
Rev-pEF6	AGGGATAG <b>G</b> CTTACCTTCGA	-
T7-pEF6	AC <b>G</b> ACTCACTATAGGGAGAC	-
<b>RT-PCR:</b>		
Oligo(dt)	(T) <sub>18</sub>	-
<b>q-PCR:</b>		
R7 S2-31	GGAGTCACAG <b>C</b> ACGAAGACCA	-

Bezeichnung	Primersequenz (5´-3´)	RE
R7 S2-33rev	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA	-
RP38	TCAAGGACTTCCTGCTCACA	-
RP38	AAAGGTATCTGCTGCATCGAA	-
RI-f1	GAGCGACGCTAGATGGGCCG	-
RI-r1	GCAATGCACGCCGACATCGC	-

### 2.1.4 Kits

**Tab. 5: Verwendete Kits**

Kit	Hersteller
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cytotoxicity Detction Kit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pEF6/V5-His TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Peroxidase-Substratkit DAB	BioLogo, Kronshagen, Deutschland
Quantum Prep® Plasmid Midiprep Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
VECTASTAIN® ABC Kit PK-6100	Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 2.1.5 Mikroorganismen und Plasmide

**Tab. 6: Verwendete Mikroorganismen**

Stamm	Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Novagen
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pLysS	Novagen
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> Rosetta Blue (DE3)	Novagen
<i>Escherichia coli</i> TOP10F´	Invitrogen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Stamm K (PAK)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	ATCC 29974

**Tab. 7: PCR-Produkte und zugehörige Zielpasmide.** Aufgeführt sind die jeweiligen PCR-Produkte und die zugehörigen Plasmide, in die die PCR-Produkte kloniert wurden. Die zur Generierung der PCR-Produkte verwendeten Primer sind in **Tab. 4** aufgeführt.

PCR-Produkt	Größe	Plasmid	Referenz
pEF6 Leervektor	0 bp	pEF6/V5-His TOPO®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pJET-RI	1386 bp	pJET 1.2/blunt Cloning Vector	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
R7-pET-32a	387 bp	pET-32a	Novagen, Madison, USA
RI-pEF6	1386 bp	pEF6/V5-His TOPO®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RI-pET-22b	1386 bp	pET-22b	Novagen, Madison, USA
RNase 7-pEF6	540 bp	pEF6/V5-His TOPO®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.6 Herstellung von Bakterienüberständen

Aus *Pseudomonas aeruginosa* Stamm K (PAK) wurden sterile Bakterienüberstände hergestellt, um Keratinozyten zu stimulieren. Dafür wurden 8 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) (Casein-Soja-Pepton-Bouillon (CASO) Broth for microbiology; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit einer PAK Glycerin Stammkultur durch eine sterile Pipettenspitze angeimpft und zusätzlich zur Reinheitskontrolle auf Blutagar Nährplatten ausgestrichen. Nach über Nacht (ÜN) Inkubation der Flüssigkultur bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute (UpM) wurden 100 µl in 8 ml neues TSB (50 ml Zentrifugenröhrchen; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und weiter kultiviert, bis die Bakterien eine optische Dichte (OD) bei 600 nm von  $\geq 1$  hatten. Das Zentrifugenröhrchen war dabei nicht zugeschraubt, sodass Sauerstoff das Bakterienwachstum unterstützen konnte. 3,6 ml EpiLife® (mit EpiLife® Defined Growth Supplement und 0,03 mM CaCl<sub>2</sub>) wurden in einer Petrischale (92 x 16 mm mit Nocken; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vorgelegt und mit 400 µl der Bakterienkultur vermischt. Die Petrischale wurde für 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Der Inhalt der Petrischale wurde für 5 min bei 8.000 g abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

## 2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Es wurden ausschließlich Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes (HaCaT) und Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) für Experimente verwendet.

### 2.2.1 HaCaT-Zelllinie

Die verwendete HaCaT Zelllinie ist eine humane, immortalisierte Zelllinie, die spontan durch Kultivierung humaner Keratinozyten bei erhöhter Temperatur und geringer Kalziumkonzentration entstand. Durch ihre Fähigkeit, auch nach mehrfachem Passagieren normal zu differenzieren, stellen sie eine gute Alternative zu primären Keratinozyten dar <sup>[15]</sup>. Die HaCaT Zellen (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) adhärent in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) ergänzt mit 10 % fötalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum (FBS), 2 mM L-Glutamin und 50 U/ml Penicillin-Streptomycin bei wasserdampfgesättigter 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 37 °C kultiviert.

### 2.2.2 Keratinozyten

NHEKs sind primäre Zellen, die aus juvenilen Präputien isoliert und vereinigt wurden (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und in Kertinocyte Growth Medium 2 (KGM2) in Kollagen beschichteten 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen adhärent gezüchtet wurden bei 37 °C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Für das Kollagenisieren der Zellkulturflaschen wurde eine sterile 1 %ige Rattenschwanz Kollagen Typ I Lösung in 0,02 M Chlorwasserstoff hergestellt, für mindestens eine Stunde bei 37 °C in die Zellkulturflaschen gegeben und danach entfernt. Die Flaschen wurden noch zweimal mit Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) gespült und bis zur Benutzung bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Zum KGM2 wurden nach Bedarf 0,06 mM CaCl<sub>2</sub> (KGM2 --), definierter SupplementMix (KGM2 ++-) (SupplementMix; PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und 50 U/ml Penicillin-Streptomycin (KGM2 ++++) hinzugefügt. Die NHEKs wurden hauptsächlich während Passage vier und fünf verwendet.

### 2.2.3 Subkultivierung der HaCaT-Zellen und der Keratinozyten

Die Subkultivierung adhärent wachsender Zellen erfolgte bei 80-90 % Konfluenz. Zur Subkultivierung der HaCaTs und NHEKs aus Flaschen in Flaschen oder 6-, bzw. 12-Loch-Zellkulturplatten (Becton Dickinson, Heidelberg oder Sarstedt, Nümbrecht, beides Deutschland) wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml auf 37 °C vorgewärmter 0,05 % Trypsin 0,02 % Ethylendiamintetraessigsäure (T/E) Lösung für ca. 5-10 min bei 37 °C inkubiert, um die adhärenenten Zellen zu lösen. Die Reaktion wurde unter einem Mikroskop kontrolliert und mit 10 ml DMEM 10 % FBS gestoppt, wenn genug Zellen



abgelöst waren. Durch Zugabe des FBS-haltigem Mediums wurde die Trypsin-bedingte enzymatische Proteolyse unterbrochen. Dem Ablösen der Zellen wurde zum Teil durch leichtes Klopfen an die Zellkulturflasche nachgeholfen. Der Zellkulturflascheninhalt wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 5 min bei 1.000 UpM und RT abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in frischem Medium (DMEM oder KGM2) resuspendiert und auf sterile Zellkulturflaschen und Platten verteilt.

### **2.2.4 Stimulation der Zellen**

Die zu stimulierenden NHEK wurden vor Beginn eines Experimentes in 6- oder 12-Loch-Zellkulturplatten als 1 ml bzw. 0,5 ml Zellsuspension pro Vertiefung überführt. Um die Stimulation der Zellen nicht durch undefinierte Faktoren zu beeinflussen, wurde das KGM2 während der Versuchsdauer nur noch mit  $\text{CaCl}_2$ , nicht aber mit dem SupplementMix oder Penicillin-Streptomycin versetzt. HaCaTs wurden während der Versuche nur noch mit DMEM versorgt, das ausschließlich mit L-Glutamin versetzt war. Die Konfluenz der Keratinozyten betrug ca. 90 % bis postkonfluent. Die Konfluenz wurde ausschließlich mikroskopisch bestimmt.

#### **2.2.4.1 Stimulation mit PAK Überstand**

Die Keratinozyten wurden mit 1:10 verdünntem PAK Überstand (siehe Abschnitt 2.1.6) stimuliert. Hierfür wurde der Bakterienüberstand im entsprechenden Medium verdünnt und auf die Keratinozyten gegeben und ÜN inkubiert.

#### **2.2.4.2 Stimulation mit Ultraviolettstrahlung**

Keratinozyten wurden mit UV-Strahlung stimuliert, produziert von einer TL 20W/12 Lampe (Phillips, Eindhoven, Niederlande), welche die meiste Energie im UV-B Bereich (290-320 nm) emittierte. Hierfür wurden die zu stimulierenden Zellen mit 0-500  $\text{J/m}^2$  bestrahlt und dann für unterschiedlich lange Zeit im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.4.3 Stimulation mit dem Caspase 1-Inhibitor

Die Keratinozyten wurden mit 16 µg/ml Caspase 1-Inhibitor Acetyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-alanyl-L-aspart-1-yl-Chloromethan (Ac-YVAD-CMK) stimuliert. Je nach Versuch wurden die Keratinozyten für 6 h mit dem Inhibitor vorinkubiert und dann ein frisches Caspase 1-Inhibitor Aliquot, zusammen mit einem weiteren Stimulans, hinzugegeben.

#### 2.2.4.4 Stimulation mit rekombinatem RI und RNase 7

Für die Stimulation von Keratinozyten während eines Scratch-Assays wurden 1 µg/ml rekombinanter RI, bzw. 10 µg/ml rekombinante RNase 7 in einem Scratch-Assay eingesetzt. In einem Zytotoxizitätsassay wurden 6,25 µg RNase 7 für 72 h zu den Keratinozyten gegeben.

### 2.2.5 Transiente Transfektion von Keratinozyten

Um RNase 7 und RI in Keratinozyten transient zu überexprimieren, wurde das in Absatz 2.3.4 beschriebene RI-pEF6 Plasmid und das bereits im Labor vorhandene RNase 7-pEF6 Plasmid mit Fugene® 6 (oder Fugene® HD) in Keratinozyten transfiziert. Die Zellen wurden nach dem Passagieren in 12-Loch-Zellkulturplatten pro Zellkulturplattenloch mit 0,5 µg Vektor Desoxyribonukleinsäure (DNA) und 1,5 µl, bzw. 2 µl Fugene nach Anleitung des Transfektionsreagenzherstellers transfiziert. Für eine bessere Transfektionseffizienz wurden hier die Zellkulturplattenlöcher nicht mit 0,5 ml, sondern mit 1 ml Medium Gesamtvolumen befüllt. Aufgrund der möglicherweise toxischen Transfektionsreagenz wurde das Medium der Zellen nach 6 h erneuert. Nach ein, bzw. zwei Tagen wurde der Versuch beendet.

### 2.2.6 Transfektion von small interfering RNA

Für die Transfektion von small interfering RNA (siRNA) wurden 12-Loch-Zellkulturplatten verwendet. In jedes Zellkulturplattenloch wurden 0,5 ml Medium vorgelegt. Je 100 µl Transfektionsmix wurde hinzugegeben. Dieser bestand aus 97,7 µl antibiotika- und zusatzfreiem Medium, 0,3 µl siRNA und 1,5 µl bzw. 2 µl HiPerFect und wurde 15 min bei RT vorinkubiert. Die Keratinozyten wurden bei einer Konfluenz von 30 % - 60 % transfiziert.

Nach ÜN, bzw. 24 h Inkubation wurde das Medium erneuert. Nach mindestens zwei weiteren Tagen wurden die Zellen stimuliert.

### **2.2.7 Gewinnung von Überständen Keratinozyten-Kulturen**

Nach Transfektionen und Stimulationen wurden die Zellkulturüberstände einzeln in Mikroreaktionsgefäßen gesammelt und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.8 Scratch-Assay**

Scratch Assay beschreibt Versuche, in denen durch das Zellkulturplattenloch der postkonfluenten Keratinozyten, ausgesät auf 6- oder 12-Lochzellkulturplatten, mithilfe einer Pipettenspitze eine Linie durch die adhärenen Zellen gezogen wurde, der die Zellen in dieser Fläche entfernte. Die Fläche dieser Linie wurde an einem Punkt zum Zeitpunkt null bestimmt und dann nochmals zu anderen Zeitpunkten. Die Differenz der Flächen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sagte etwas über die Effektivität des Stimulus aus. Diese Methode soll einen Wundverschluß nachahmen. Zellproliferation und Zellmigration lassen sich so gut beobachten. Hierfür wurde vor der Zellausaat auf jeder Unterseite eines Zellkulturplattenlochs ein bunter Strich mit einem Stift gezeichnet (ggf. auch mehrere). Die Linie in dem Plattenloch wurde dann im 90 ° Winkel zu dem bunten Strich am Boden mithilfe einer sterilen 10 µl Filterpipettenspitze, angelehnt an einem Lineal, gleichmäßig gezogen. Zum Zeitpunkt null wurde die Linie mit den entfernten Zellen so unter einem 10fach Objekt am inversen Mikroskop (Olympus IX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) mikroskopiert und fotografiert, dass die Seitenränder gut erkennbar waren und dass der gezeichnete Strich unter dem Plattenloch weit am Rand rechts oder links sichtbar war. Dieser diente als Orientierung für spätere Zeitpunkte, damit genau derselbe Punkt wieder fotografiert wurde. Hinterher wurden die Flächen durch die Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) bestimmt und verglichen.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine PCR ermöglichte es, spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmente zu amplifizieren <sup>[16]</sup>. Es wurde das Ribonuklease-Inhibitor 1 (RNH1)-Gen vervielfältigt, um es anschließend in Vektoren zu klonieren, die geeignet waren für eine Transformation in Prokaryoten, bzw. für eine Transfektion in Eukaryoten. Nachfolgend wurde die PCR angewandt, um zu überprüfen, ob das RNH1 PCR Produkt in den Vektor korrekt eingesetzt wurde. Eine PCR setzte sich aus der Denaturierung des vorhandenen DNA Materials, der spezifischen Primer Anlagerung an den DNA-Einzelstrang und schließlich aus der Kettenverlängerung zusammen. Diese Schritte wurden mit einem peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Das Programm des Thermocyclers wurde jeweils an die Größe des zu erwartenden PCR Produkts als auch an die spezifischen Schmelzpunkte der applizierten Oligonukleotide angepasst. Die Programme wurden in den folgenden Abschnitten erläutert und Tab. 4 beinhaltet alle verwendeten Primer dieser Arbeit.

#### 2.3.1.1 PCR zur Amplifikation des zu klonierenden RNH1 Gens

Das Ribonuklease-Inhibitor 1 (RNH1) PCR Produkt wurde mittels der Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert. Die Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase arbeitet wie *Pyrococcus*-ähnliche Polymerasen mit einem Korrekturlese-System der 3`-5` Exonuklease. Sie erzeugt jedoch noch weniger Fehler, als es die Polymerasen aus *Thermus aquaticus* und *Pyrococcus furiosus* tun, und zusammen mit ihrer Hot Start-Aktivität macht es sie sehr prozessiv, akkurat und schnell <sup>[17]</sup>. Tab. 8 und Tab. 9 zeigen den Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen für die Amplifizierung der RNH1 DNA, um diese anschließend in einen Vektor zu klonieren, geeignet für die rekombinante Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*).

**Tab. 8: Folgender Reaktionsansatz wurde für die PCR der zu amplifizierenden RNH1 DNA pipettiert.** Später wurde mit Hilfe dieses PCR Produkts die rekombinante Expression des RI in *E. coli* durchgeführt.

Gesamtansatz	50 µl
H <sub>2</sub> O	24,5 µl
5x Phusion GC Buffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
RI-pET22b-r1 neu (10 µM)	2,5 µl
RI-pET22b-f1 (10 µM)	2,5 µl
Keratinocyten cDNA (Versuch FR-21 Nr. 24)	7,5 µl
DMSO	1,5 µl
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl

**Tab. 9: Reaktionsbedingungen der PCR aus Tab. 8.**

Temperatur	Dauer	
98°C	3 min	
98°C	15 s	} 28x
56°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	10 min	
8°C	∞	

Des Weiteren wurde die RNH1 DNA vervielfältigt, um sie in den Überexpressionsvektor pEF6/V5-His TOPO® einzubauen, geeignet für die Zellkultur. Tab. 10 und Tab. 11 zeigen den Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen für die Amplifizierung der RNH1 DNA.

**Tab. 10: Folgender Reaktionsansatz wurde für die PCR der zu amplifizierenden RNH1 DNA pipettiert.** Später wurden mit Hilfe dieses PCR Produkts die Überexpressionen des RI in Keratinozyten durchgeführt.

Gesamtansatz	60 µl
H <sub>2</sub> O	29,4 µl
5x Phusion GC Buffer	12 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
RI-pEF6-f1	3 µl
RI-pET22b-r1 neu (10 µM)	3 µl
Keratinozyten cDNA (Versuch FR-21 Nr. 23)	9 µl
DMSO	1,8 µl
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	0,6 µl

**Tab. 11: Reaktionsbedingungen der PCR aus Tab. 10.**

Temperatur	Dauer	
98°C	3 min	
98°C	15 s	} 28x
64°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	10 min	
8°C	∞	

Nach der PCR wurden 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl DreamTaq DNA Polymerase zum Reaktionsansatz gegeben und bei 72°C für 30 min erhitzt, um Adenine am 3' Ende der PCR Fragmente anzubauen, damit 3'-A-Überhänge entstehen. Diese werden von der Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase aufgrund ihres Korrekturlese-Systems nicht während der PCR (Tab. 10) gebildet, aber werden für eine bessere Klonierungseffizienz des RNH1 PCR Fragments in den pEF6/V5-His TOPO® Vektor benötigt.

### 2.3.1.2 PCR zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR)

Nach der Transformation von Vektoren in *E. coli* Bakterien wurde durch Kolonie-PCRs überprüft, ob das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut wurde, da es zu Transformanten ohne inseriertes PCR-Produkt kommen kann. Es wurden Zellen aus einer Bakterienkolonie vom Nähragar der Nährplatte mit einer sterilen 10 µl Volumen Pipettenspitze entnommen und direkt in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß mit 10 µl PCR-Mix überführt. Insgesamt wurden

jeweils zehn Kolonien überprüft. Die Kolonie-PCR wurde für verschiedene Vektoren mit der möglicherweise korrekt inseriertem RNH1 DNA durchgeführt. Tab. 12 zeigt den immer gleichen Reaktionsansatz der Kolonie-PCRs mit den jeweilig eingesetzten Primer Paaren. Im Falle eines Transformanten mit korrekt inserierten PCR Produkt entstand während der Kolonie-PCR ein PCR Produkt, was etwas größer ist als das in 2.3.1.1 generierte PCR Produkt. Ein negativer Transformant generierte lediglich ein PCR Produkt mit der Größe der Klonierungsstelle. Tab. 13 demonstriert die angewandten Reaktionsbedingungen der Kolonie-PCR mit den individuellen Schmelztemperaturen der verschiedenen Primer Paare.

**Tab. 12: Für die Kolonie-PCR wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert.**

Gesamtansatz			10 µl
H <sub>2</sub> O			6,7 µl
10x DreamTaq Buffer			1 µl
dNTPs (2 mM)			0,2 µl
pJET1.2 Forward Sequencing Primer	T7-Promotor long	T7-pEF6	1 µl
pJET1.2 Reverse Sequencing Primer	T7-Terminator	Rev-pEF6	1 µl
DreamTaq DNA Polymerase			0,1 µl

**Tab. 13: Reaktionsbedingungen der Kolonie-PCR.**

Temperatur	Dauer	
95°C	5 min	
95°C	1 min	} 35x
60°C    50°C    51°C	30 s	
72°C	1 min 30 s	
72°C	10 min	
8°C	∞	

### 2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte in 1-2 %igen (w/v) Agarose-Gelen. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in 100 ml TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (40 mM TRIS, 40 mM Essigsäure, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C und Zugabe von 15 µl Ethidiumbromid (1 %ige Lösung) wurde die Lösung in eine horizontale Gießvorrichtung (Horizon 11-14, Life Technologies, Karlsruhe) gegossen. Die amplifizierte DNA wurde mit 6xDNA-Auftragspuffer

versetzt (0,03 % Bromphenolblau (w/v), 0,03 % Xylencyanol (w/v), 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (w/v), 60% Glycerin (v/v)). Die Elektrophorese erfolgte über 30-45 min bei konstant 120 V (ca. 60 mA) im TAE-Puffer. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die DNA-Banden mit dem interkalierten Ethidiumbromid durch einen (UVP, Cambridge, UK) bei 266 nm detektiert und mit Hilfe einer BioDoc-Fotodokumentationsanlage (Biometra, Göttingen, Deutschland) digital dokumentiert. Die Reinigung von DNA Fragmenten aus einer PCR oder aus Restriktionshydrolysen für Ligationen erfolgte ebenfalls durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Nachdem die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf dem Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator TM-20 sichtbar gemacht wurde, wurde sie aus dem Agarose Gel herausgeschnitten. Die Elution der DNA geschah durch das GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll.

### **2.3.3 Restriktionshydrolysen von DNA**

Für die Restriktionshydrolysen wurden die Restriktionsenzyme *Nde I* und *Xho I* eingesetzt. Die Enzyme wurden jeweils auf 5 U/μl eingestellt und zerschnitten damit bei 37 °C ca. 5 μg Plasmid oder PCR-Fragment pro Stunde im SuRE/cut Puffer H in einem 25 μl Ansatz. Die Enzyme werden bei 65 °C über 15 min inaktiviert.

### **2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation zwischen pJET1.2/blunt Cloning Vector und RNH1 PCR Produkt (Tab. 8) geschah mithilfe der Chemikalien und Reagenzien des CloneJET™ PCR Cloning Kits. Es wurde der in Tab. 14 beschriebene Reaktionsansatz auf Eis pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert, bevor der Reaktionsansatz direkt für eine Transformation verwendet wurde.



**Tab. 14: Reaktionsansatz für die Ligation von pJET1.2/blunt Cloning Vector und RNH1 PCR Produkt.**

<b>Gesamtansatz</b>	<b>20 µl</b>
2x Reaction buffer	10 µl
ungereinigtes RNH1 PCR Produkt	1 µl
pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	7 µl
T4 DNA Ligase (5 U/µL)	1 µl

Des Weiteren wurden das RNH1 DNA Fragment und der pET-22b nach einer Restriktionshydrolyse ligiert. Sowohl der Vektor als auch das PCR-Produkt wurden nach der Restriktionshydrolyse mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit aufgereinigt und danach über Nacht bei 4°C ligiert wie Tab. 15 zeigt.

**Tab. 15: Reaktionsansatz für die Ligation von pET-22b und RNH1 PCR Produkt.**

<b>Gesamtansatz</b>	<b>20 µl</b>
H <sub>2</sub> O	2,6 µl
10x T4 DNA Ligase buffer	2 µl
RNH1 PCR Produkt (6 ng/µl)	13 µl
pET-22b (21 ng/µl)	1,4 µl
T4 DNA Ligase 5 U/µl	1 µl

Außerdem wurde das RNH1 PCR Produkt (Tab. 10) mit dem pEF6/V5-His TOPO® Vektor bei RT für 15 min ligiert (Tab. 16). Dafür wurden die Chemikalien und Reagenzien des pEF6/V5-His TOPO® TA Expression Kit benutzt. Die Ligation benötigte in diesem Fall keine T4 DNA Ligase, da der Vektor bereits einen 3'-T-Überhang besaß und sich deshalb mit dem 3'-A-Überhang des DNA Fragments verbinden konnte.

**Tab. 16: Reaktionsansatz für die Ligation von pEF6/V5-His TOPO® Vektor und dem RNH1 PCR Produkt.**

<b>Gesamtansatz</b>	<b>5 µl</b>
RNH1 PCR Produkt (8 ng/µl)	0,5 µl
Salt Solution	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
pEF6/V5-His TOPO® Vektor (10 ng/µl)	0,5 µl

Das Verhältnis von Vektor zu Insert wurde so eingestellt, dass das Insert im Überschuss vorlag. Als Kontrolle wurde geschnittener Vektor ohne Fragment verwendet, um abschätzen zu können, inwieweit der Vektor mit sich selbst religiert.

### 2.3.5 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden *E. coli* TOP10F' (bzw. *E. coli* DH5 $\alpha$ ) Übernachtskulturen (ÜNK) 1:100 in Luria-Bertani(LB)-Medium (0,5 % Hefeextrakt (w/v), 1 % Natriumchlorid (NaCl) (w/v), 1 % Pepton (w/v), pH 7,4) verdünnt und bei 37 °C und 200 UpM Gerät bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,48-0,5 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden auf Eis bis ca. 4 °C herabgekühlt und dann 5 min bei 3.000 UpM (Eppendorf 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienkulturpellet, das aus 50 ml Bakterienflüssigkultur entstand, wurde in 15 ml eiskaltem, sterilfiltriertem Standard transformation buffer (TfB) I (30 mM Kaliumacetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>), 100 mM Kaliumchlorid (KCl), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, 50 mM Mangandichlorid (MnCl<sub>2</sub>), pH 5,8 mit Essigsäure (HAc)) aufgenommen und auf Eis für 15 min inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension erneut für 5 min bei 3.000 UpM und 4 °C abzentrifugiert und je in 4 ml eiskaltem, sterilfiltriertem TfB II (10 mM 3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MOPS), 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15 % Glycerin, pH 7 mit Natriumhydroxid (NaOH)) aufgenommen und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. 100  $\mu$ l Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert <sup>[18]</sup>.

### 2.3.6 Transformation

Transformationen von Plasmid DNA oder Ligationsansatz in *E. coli* TOP10F' (bzw. *E. coli* DH5 $\alpha$ ) wurden modifiziert nach der Methode von Tang *et al.*<sup>19</sup> durchgeführt. Hierfür wurden 100  $\mu$ l Aliquots von chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1-3  $\mu$ l Plasmid DNA oder Ligationsansatz vorsichtig zu den kompetenten Zellen pipettiert, die dann weitere 15 min auf Eis inkubiert wurden. Danach folgte ein Hitzeschock für 60 s bei 42 °C und eine erneute 1-2 minütige Inkubation auf Eis. 250-900  $\mu$ l vorgewärmtes Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) Medium ((0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 10 mM Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>), 20 mM D-Glucose) wurde zu den Bakterien pipettiert und dann für mindestens 40 min schüttelnd bei 200 UpM und 37 °C inkubiert, bevor verschiedene Mengen des Transformationsansatzes auf mit selektiven Antibiotika (zum Beispiel mit 50  $\mu$ g/ml

Carbenicillin oder 34 µg/ml Chloramphenicol) versetzten LB-Nähragarplatten ausplattiert wurden und bei 37°C im Brutschrank standen. Sobald Bakterienkolonien deutlich sichtbar waren (meistens nach ÜN Inkubation), wurden einzelne Klone mit einer Kolonie-PCR getestet (siehe Kapitel 2.3.1.2) und zur Separation auf eine neue LB-Nähragarplatte mit selektivem Antibiotikum überimpft. Hiervon wurden Übernachtkulturen (ÜNK) gemacht und die Plasmid DNA mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) oder mit dem Quantum Prep® Plasmid Midiprep Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Aus den ÜNKs wurden meistens zusätzlich Stammkulturen angelegt, indem 150 µl Glycerin (86 %) mit 850 µl ÜNK vermischt wurden und bei -80 °C gelagert wurden.

### **2.3.7 DNA-Sequenzierung**

Um die in die Vektoren klonierte RNH1 DNA auf mögliche ungewollte Mutationen zu prüfen, wurden die aufgereinigten Plasmide vom Institut für Klinische Molekularbiologie Kiel sequenziert. Dafür wurde die Plasmidkonzentration mit einem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt, eingestellt und mit den entsprechenden Sequenzierprimern Tab. 4 zusammenpipettiert nach Anleitung des Instituts für Klinische Molekularbiologie Kiel. Das Sequenzierergebnis wurde dann mit der bereits bekannten DNA Sequenz des RI abgeglichen.

## **2.4 Rekombinante Expression von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor in *E.coli***

### **2.4.1 Vektor und Expression**

#### **2.4.1.1 RNase 7**

Die rekombinante Expression ist eine biotechnische Methode, um Proteine mithilfe eines Expressionssystems zu produzieren. Um RNase 7 zu exprimieren, wurde das Expressionssystem mit *E.coli* BI 21 (DE3) pLyS benutzt, das im Labor bereits etabliert war. Dieses beinhaltet einen pET-32a Vektor, in den das RNase 7 Gen eingebaut war. Während der Expression wird RNase 7 als Fusionsprotein exprimiert mit einer N-terminalen Polyhistidine-Tag Sequenz. In einem ersten Aufreinigungsschritt mit einer Nickel-Affinitätschromatographie ist es durch den Polyhistidine-Tag möglich, das Protein zu separieren. Selektive Antibiotika für dieses Expressionssystem sind Carbenicillin, eingesetzt mit 50 µg/ml, und Chloramphenicol mit 34 µg/ml. Mit einem Glycerin-Stamm wurden 6 ml

antibiotikahaltiges LB-Medium für eine ÜNK angeimpft. Am nächsten Tag wurde die ÜNK zu 200 ml antibiotikahaltigem LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben gegeben und mit 200 UpM bei 37 °C inkubiert. Als die Kultur eine OD<sub>600</sub> von  $\geq 1$  erreichte, wurde 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt, um die Expression zu induzieren. Die Bakterien wurden für weitere 3 h kultiviert, bevor sie bei 6.000 UpM für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert wurden und das Pellet bei -80 °C vorübergehend gelagert wurde. Das Pellet wurde in 5 ml Binding-Puffer (20 mM Natriumphosphatpuffer (NAPP), 0,5 M NaCl, pH 7,4), der gemischt war mit 4 % Elutionspuffer (20 mM NAPP, 0,5 M NaCl, 0,5 M Imidazol, pH 7,4), durch Mixen resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien durch 10 x 12 Ultraschall Stöße (60 % Leistung, 10 Impulse; Sonoplus GM70, Bandelin Elektronik, Berlin, Deutschland) auf Eis lysiert. In einem letzten Vorbereitungsschritt wurde das Lysat bei 13.900 rcf für 45 min zentrifugiert und der Überstand (ÜS) sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter 0,22  $\mu$ m; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

#### 2.4.1.2 Ribonuklease-Inhibitor

Um RI zu exprimieren, wurde zunächst das Expressionssystem *E. coli* BL21(DE3) benutzt, in den der RI-pET-22b transformiert wurde. Die Transformation und die Herstellung des RI-pET-22b wurden in Kapitel 2.3 erläutert. Anfangs wurde die Expression nach Arnold *et al.*<sup>[21]</sup> durchgeführt. Es wurde eine 5 ml ÜNK angesetzt mit 50  $\mu$ g/ml Carbenicillin und RI-pET-22b. Nach 16 h wurde die ÜNK zu 100 ml Terrific-Broth(TB)-Medium (1,2 % Pepton (w/v), 2,4 % Hefeextrakt (w/v), 0,4 % Glycerin (v/v), 72 mM Dikaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 17 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)) mit 50  $\mu$ g/ml Carbenicillin gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub>  $\geq 3$  bei 37 °C und UpM wachsen gelassen. Dann wurde die Temperatur auf 15 °C gesenkt und mit 1 mM IPTG induziert. Auch die Umdrehungszahl wurde auf 120 UpM geändert und die Expression wurde für 24 h fortgeführt. Schließlich wurden die Bakterien bei 4 °C und 6.000 g für 5 min abzentrifugiert und das Bakterienpellet bei -80 °C aufbewahrt. Vor der RNase A Affinitätschromatographie wurde das Pellet in 10 ml Lysispuffer (20 mM TRIS pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 10 mM EDTA, 0,04 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) durch Mixen resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien behandelt, wie bereits in 2.4.1.1 erklärt. Anlässlich der Schwierigkeiten, die bei der weiteren Reinigung des RI entstanden, wurde der RI-pET-22b in das Expressionssystem *E. coli* RosettaBlue(DE3) und auch in *E. coli* BL21(DE3) pLys transformiert und dieses getestet. Auch wurden mit dem *E. coli* BL21(DE3) System statt des TB-Mediums, LB-Medium getestet. Auch unterschiedliche Induktionszeitpunkte (z.B. OD<sub>600</sub>  $\geq 1$ ), unterschiedliche Expressionstemperaturen (z.B. 37 °C) und Expressionsdauern (z.B. 3 h) wurden

ausprobiert. Ebenfalls wurden 10 mM DTT während der Expression zum Medium gegeben, wie es Siurkus und Neubauer raten <sup>[20]</sup>.

#### 2.4.2 Reinigung rekombinanter RNase 7 aus *E.coli*

Im ersten Reinigungsschritt der rekombinanten Expression wurde eine Metallchelatchromatographie benutzt, die sich die Affinität von Aminosäure Seitenketten zu Metall Ionen zu nutze macht. Eine Nickel Chelat Säule (HisTrap HP 5 ml; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) mit Sepahrose Säulen Matrix wurde in ein ÄKTApurifier UPC-900 System (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) eingebaut als stationäre Phase. Die Probe wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min auf die Säule gegeben und der Polyhistidine-Tag des Fusionsproteins von den Nickel-Ionen adsorbiert. Durch den geringen Imidazolanteil im Binding-Puffer werden alle weiteren histidinhaltigen Proteine vorzeitig von den Nickelionen gelöst und aus der Säule gespült. Das Imidazol wurde durch das Einsetzen eines Gradienten mit Elutionspuffer nach und nach konzentrierter eingesetzt und verdrängte den Polyhistidine-Tag von der Nickel Chelat Bindung. Das Fusionsprotein wird eluiert und als Chromatogramm durch UV Absorption  $A_{280}$  detektiert. Automatisch wurden die Fraktionen in Reaktionsgefäßen gesammelt (Fraktionssammler Frac-950 für ÄKTA; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Alle Prozesse und Parameter wurden durch die Software Unicorn 5.20 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gesteuert und dokumentiert. Für die massenspektroskopische Analyse wurden Proben von den Fraktionen genommen und mit Argon überzogen, um sie vor Oxidation zu schützen, und bei -20 °C vorübergehend gelagert. Nach der Affinitätschromatographie wurde eine Umkehrphasenchromatographie durchgeführt, um das Fusionsprotein vom Imidazol zu säubern. Dafür wurde ein Flüssigkeitschromatograph LC-10AT VP (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) benutzt und Gerät und Säule wurden in 65 % Acetonitril (ACN) gelagert. Es wurde eine NUCLEOSIL<sup>®</sup> C8 Säule (NUCLEOSIL<sup>®</sup> 300-7 C8 7µm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit Silica Matrix und einer Porengröße von 300 Å und einer Partikelgröße von 7 µm verwendet. Zunächst wurde die Probe auf einen pH von 2-3 mit Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert, bevor sie 10 min bei RT und 6.000 UpM zentrifugiert und durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert wurde. 2,5 - 5 ml wurden mit dem Äquilibriumspuffer (0,05 % TFA) aufgetragen und das Programm mit einem Fluss von 3 ml/min gestartet. Die Elution erfolgte dann durch ein Gradientenprogramm (Tab. 17) mit 80 % Isopropanol und 0,05 % TFA.

**Tab. 17: Gradientenprogramm für die NUCLEOSIL® C8 Säule.**

t in min	Elutionspuffer in %
0,01	10
5	10
25	70
30	100
35	100

Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und bei -20 °C gelagert. Kleine Aliquots wurden erneut für eine massenspektrometrische Analyse abgenommen. Vor der Enterokinasespaltung wurden die Fraktionen durch Massenspektrometrie kontrolliert. Die Fraktionen mit dem Fusionsprotein wurden in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) konzentriert, vereinigt, gefriergetrocknet (Alpha 2-4 LSC, Christ, Osterode am Harz, Deutschland angeschlossen an Chemistry-HYBRID™ pump RC 6, Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) und bei -80 °C zwischengelagert. Die Serinprotease Enterokinase schneidet spezifisch Peptidbindungen mitten in der Polypeptidkette an der Sequenz (Asparaginsäure)<sub>4</sub> Lysin am C-terminalen Ende des Lysins. Deswegen wurde es für die Separation vom Fusionsprotein in rekombinante RNase 7 und in den Polyhistidin-Tag verwendet. Die µg RNase 7, die sich in den lyophilisierten, vereinigten Proben befanden, konnten anhand der Chromatogramme kalkuliert werden. Die getrocknete RNase 7 wurde in EKMax™ Reaktionspuffer resuspendiert. Hierfür wurde dieselbe µl Anzahl an Puffer eingesetzt, wie µg RNase 7 vorhanden waren. Die Enterokinase EKMax™ wurde mit einer Unit pro 1000 µl zum Reaktionspuffer hinzugegeben und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurde bei -80 °C zwischengelagert. Nach der Spaltung durch die Enterokinase wurden rekombinante RNase 7 und der Polyhistidin-Tag durch Umkehrphasenchromatographie (Jupiter® 5 µm C4 300 Å, LC Säule 250 x 4.6 mm, Ea, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) voneinander getrennt. Die Proben wurden genauso vorbereitet wie die vor der ersten Umkehrphasenchromatographie. Es wurden 250 - 750 µl Probe aufgetragen und das Programm mit einem Fluss von 0,5 ml/min und einem Maximaldruck von 250 Bar gestartet. Die Elution erfolgte mit dem Gradientenprogramm aus Tab. 18.

**Tab. 18: Gradientenprogramm für die Jupiter® C4 Säule.**

t in min	Elutionspuffer in %
0,01	10
5	10
25	40
40	60
50	100

Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und, wie zuvor beschrieben, für eine massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Die Fraktionen mit der rekombinanten RNase 7 wurden vereinigt und ebenfalls, wie bereits beschrieben, getrocknet, bevor sie in 0,01 % Essigsäure gelöst, aliquotiert und mit Argon überzogen bei -80 °C gelagert wurden.

### 2.4.3 Reinigung des rekombinanten Ribonuklease-Inhibitors

#### 2.4.3.1 Herstellung einer RNase A Affinitätssäule

Für die Reinigung des RI nach Arnold *et al.* [21] wurde eine RNase A Affinitätssäule hergestellt, indem 2,5 mg RNase A zunächst mit einer Amicon Ultra-15 3 kDa Zentrifugens-Filtereinheit nach Anweisung des Herstellers in 1 ml Coupling Puffer (500 mM NaCl, 200 mM Natriumhydrogencarbonat, pH 8) umgepuffert wurde. Die RNase A Konzentration wurde mit dem Nanodrop kontrolliert. Durch die 1 ml HiTrap Säule, vorgepackt mit NHS-aktivierter Sepharose, wurden 3 x 2 ml 1 mM eiskalter Salzsäure mit einem maximalen Fluss von 1 ml/min manuell mit einer Spritze getropft. Danach wurde die RNase auf die Säule getropft und die Säule verschlossen, für 4 h bei RT gelagert, und danach bei 4 °C weitergelagert. Am nächsten Tag wurde RNase A mit 3 ml Coupling Puffer herausgewaschen. Die Auswaschung wurde erneut im Nanodrop gemessen; folglich hat die RNase A auf der Säule gebunden. Die Säule wurde dreimal mit 2 ml Puffer A (500 mM NaCl, 500 mM Ethanolamin, pH 8,3), dreimal mit Puffer B (500 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 4) und dreimal mit Puffer A gespült, bevor sie nach einer zweiminütigen Pause erneut dreimal mit 2 ml Puffer B, dreimal mit 2 ml Puffer A und dreimal mit 2 ml Puffer B gewaschen wurde.

### 2.4.3.2 RNase A Affinitätschromatographie

Der Flüssigkeitschromatograph LC-10AT VP (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) mit der eingebauten RNase A Affinitätssäule, der an einen Entgaser und an einen Integrator angeschlossen war, wurde mit Äquilibriumspuffer (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 6,4) äquilibriumiert und die Probe (1-10 ml) in die vor die Säule eingebaute Schleife gespritzt. Nun wurde die Probe mit dem Äquilibriumspuffer auf die Säule gegeben. Als anhand des Integrators ersichtlich war, dass die gesamte Probe durch die Säule geflossen war, wurde die Säule mit Waschpuffer (1 M NaCl, 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 6,4) intensiv gespült, bis der Integrator erneut eine gleichmäßige, niedrige Absorption bei  $A_{280}$  zeigte. Eluiert wurde mit 3 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 5. Aufgrund kaum vorhandener Elutionsmengen wurde auch ein mit NaCl gesättigter Elutionspuffer getestet. Außerdem wurden, um die Säule zu testen, 1,5 mg rekombinanter RI aufgetragen.

### 2.4.3.3 Reinigung des RI nach Lewis und Schultz <sup>[22]</sup>

Angesichts der Probleme mit der Reinigung des RI nach Arnold *et al.* wurde nach einem US Patent eine weitere Methode angewandt. Zu diesem Zweck wurde die Expression mit RI-pET-22b in *E. coli* BL21(DE3) in 400 ml TB-Medium bei einer  $\text{OD}_{600} \geq 1$  mit 1 mM IPTG und 5 mM DTT induziert und nach 4 h bei 37 °C und 200 UpM durch Zentrifugation für 5 min bei 6.000 g und 4 °C beendet. In Kürze erklärt wurde zunächst das Pellet in einem 1:20 Verhältnis in TE5DTT Puffer (50 mM TRIS, pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM DTT) resuspendiert und auf Eis für 10 min stark gerührt. Nach der Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurde weiter stark gerührt für 30 min. Danach wurde 10 %iges Natriumlaurylsulfat (SDS) im Verhältnis 1:100 hinzugefügt und die Suspension für weitere 30 min gerührt, bevor sie bei 17.000 g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert wurde und ein zweiphasiges Pellet entstand. Die untere Schicht war grau und hart und die darüber transparent und schleimig. Der ÜS wurde vorsichtig entfernt. Nun begann die Reinigung des RI, indem das Pellet erneut im Verhältnis 1:20 in TE5DTT Puffer für 10 min resuspendiert wurde und abermals bei 17.000 g, 4 °C und für 20 min abzentrifugiert wurde. Der ÜS wurde erneut entfernt und die schleimige Schicht des Pellets war geringer. Diesen Schritt nochmal wiederholen und im Anschluss das Pellet mit einer Ratio von 1:10 in TE5DTT lösen und für mindestens 2 h auf Eis rühren lassen, bis es eine milchige Suspension ist. Die Suspension wurde dann 1:5 mit Urea rührend bei RT verdünnt, sodass die Endkonzentration mindestens 4 M betrug. Nach ca. 5 min wurden



Zelltrümmer sichtbar und die Suspension klarer. Nach einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 6.000 g und 4 °C wurde mit dem klaren, farblosen ÜS weitergearbeitet, der den RI enthielt. Der ÜS wurde 1:100 mit 10 %igen Glycerin in TE5DTT verdünnt und wurde für 18 h stehen gelassen, um den RI zu aktivieren. Danach wurde die Probe in einem ersten Schritt durch Anionenaustauschchromatographie über eine HiTrap DEAE Sepharose FF 1 ml (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gereinigt, die an ein ÄKTApurifier UPC-900 System angeschlossen war. Äquibriert wurde mit TE5DTT und eluiert mit TE5DTT mit 0,5 M NaCl. Es wurde angefangen zu eluieren, nachdem die UV Absorption wieder den Wert vor dem Probenauftrag erreicht hatte. Maximal wurden 30 ml Probe eingesetzt. Die Eluate wurden vereinigt und für die RNase A Affinitätssäule weiter benutzt. Äquibriert wurde mit TE5DTT und 0,5 M NaCl und eluiert mit 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5, 3 M NaCl und 5 mM DTT.

## **2.5 Proteinanalytik**

### **2.5.1 Aufschluss eukaryotischer Zellen**

Für verschiedene Versuche war es wichtig, den RI Gehalt von Keratinozytenproben zu vergleichen. Deshalb wurden Lysate hergestellt, indem von den mit adhärenent gewachsenen Keratinozyten bestückten 12 (bzw. 6)-Lochzellkulturplatten der Überstand abgenommen wurde und die Keratinozyten mit phosphatgepufferter Sazlösung (PBS) gewaschen wurden. Danach wurde 100 µl eiskalter Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA Puffer) (0,14 M NaCl (w/v), 0,01 M TRIS (w/v) pH 8,0, 1 mM EDTA (w/v), 1 % Triton X-100 (v/v), 0,1 % Natriumdeoxycholat (w/v), 0,1 % SDS (w/v), 1 mM PMSF (w/v), eine Protease Inhibitor Cocktail cOmplete Mini EDTA-free Tablette pro 10 ml) pro Loch hinzugegeben und für 1 h auf Eis leicht schüttelnd inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden hinterher die lysierten Zellen gelöst und in 1 ml Mikroreaktionsgefäß ultrageschallt (6 Zyklen, 60 % Leistung, 10 Impulse; Sonoplus GM70, Bandelin Elektronik, Berlin, Deutschland). Der Inhalt wurde danach bei 12.000 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde im NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Die Lysate für eine native Gelelektrophorese wurden mit einem weniger konzentrierten Puffer lysiert (5 mM TRIS (w/v), 1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) (w/v), 250 mM Saccharose (w/v), 1 % Triton X-100 (v/v), 0,04% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (eine cOmplete Mini EDTA-free Tablette wurde zuvor in 2 ml H<sub>2</sub>O gelöst)).

## 2.5.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde angewandt, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Diese Methode wurde benutzt, um zu prüfen, ob und wieviel RI während der rekombinanten Expression exprimiert wurde. Ebenfalls fand diese Methode Anwendung für die RI Abbau Versuche mit Kallus Extrakt und Kallikreinen (KLK). Hierfür wurde ein 12 %iges SDS-Elektrophoreseigel gegossen nach Schägger und Jagow wie Tab. 19 zeigt <sup>[23]</sup>.

**Tab. 19: Pipettierschema für eine SDS-PAGE nach Schägger und Jagow <sup>[23]</sup>.**

SDS-Page	Laufgel 12% 5 ml	Sammelgel 4 % 2 ml
Acrylamide/Bisacrylamide 40 % (37,5:1)	1,5 ml	0,2 ml
Gel Puffer (3 M TRIS pH 8,45, 0,3 % SDS)	1,67 ml	0,775 ml
H <sub>2</sub> O	1,03 ml	0,983 ml
87 %Glycerin	0,77 ml	-
10 % APS	25 µl	38 µl
TEMED	2,5 µl	3,8 µl

Dann wurden die Proben mit 4fach SDS-PAGE Probenpuffer versetzt (4 % SDS (w/v), 0,3 M TRIS pH 8 (w/v), 60 % Glycerin (v/v), 0,01 % Coomassie-Brillant-Blau G-250 (w/v)) und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Gegebenenfalls wurde den Proben noch 10 mM Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt. Danach wurden die Proben auf das SDS Gel geladen und bei 90-100 V im Kathodenpuffer (0,1 M TRIS (w/v), 0,1 M Tricin (w/v), 0,1 % SDS (w/v)) separiert. Zusätzlich zu den Proben wurde auch die Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder pro Gel einmal aufgetragen.

### 2.5.2.1 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Komplexbildung von RNase 7 und dem RI darzustellen, wurde auf die Methode der nativen Gelelektrophorese zurückgegriffen. Hierbei werden Proteine nicht denaturiert und nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Größe aufgetrennt <sup>[24]</sup>. Bei dieser Methode wurde zunächst ein Gel wie in Tab. 19 hergestellt, allerdings ohne SDS. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel auch nicht aufgeköcht und dem 4fach Probenpuffer ebenfalls kein SDS zugesetzt (0,125 M TRIS pH 6,8 (w/v), 60 % Glycerin (v/v), 0,08 %

Bromphenolblau (w/v)). Die Separation der Proteine erfolgte im 2.5.2 beschriebenen Kathodenpuffer (ohne SDS) und Anodenpuffer (0,2 M TRIS pH 8,9 (w/v)).

#### 2.5.2.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Durch die kolloidale Coomassie-Färbung wurden Proteine im Gel fixiert und gefärbt. Hierfür wurde das Gel zweimal für 10 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann in einer Coomassie-Lösung (0,02 % Coomassie-Brillant-Blau G250 (w/v), 5 % Aluminiumsulfat (w/v), 10 % Ethanol (v/v), 2 % Phosphorsäure (v/v)) ÜN gefärbt. Danach wurde das Gel erneut zweimal für 10 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen, mit der Entfärbelösung (10 % Ethanol (v/v), 2 % Phosphorsäure (v/v)) für 10-60 min entfärbt und nochmals mit H<sub>2</sub>O gewaschen <sup>[25]</sup>.

#### 2.5.3 Westernblot

Nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteine elektrophoretisch vom Gel auf eine Nitrocellulose (0,2 µm) oder auf eine Polyvenylenidfluorid (PVDF)-Transfermembran (äquilibriert in Methanol) übertragen für 1 h mit 150 mA im Transferpuffer (48 mM TRIS (w/v), 39 mM Glycin (w/v), 0,0375 % SDS (w/v), 20 % Methanol (v/v)). Um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren, wurde die Membran für mindestens 1 h mit 5 % Milchpulver (w/v) in PBS -Tween 20 0,1 % (v/v) (PBS-T) leicht schüttelnd inkubiert. Um das gewünschte Protein zu detektieren, wurde die Membran mit Anti-RNH1 Antikörper (HPA039223) 1:250 verdünnt in PBS-T ÜN bei 4° C im Rotationsmischer in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils mindestens 5 min wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (111-035-144) 1:10.000 in PBS-T für mindestens 1 h bei RT auf einem Labormischer inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift mit PBS-T wurde der RI mit dem Advansta WesternBright Sirius HRP Substrat nach Herstelleranleitung mithilfe von Chemilumineszenz im Fusion-FX7 Imaging-system (Peglab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) detektiert. Für die Detektion von RNase 7 wurde als Primärantikörper der im Labor bereits hergestellte RNase 7 Antikörper 1:1.000 eingesetzt und der Sekundärantikörper Peroxidase-AffiniPure Mouse Anti-Goat IgG (205-035-108) mit einer 1:10.000 Verdünnung.

### 2.5.3.1 Dotblot

Ähnlich dem Westernblot ging es beim Dotblot um die Detektion vom RI Protein. 1 µl Probenaliquots aus chromatischen Aufreinigungsschritten einer rekombinanten Expression wurden dafür auf Nitrocellulosetransfermembran (0,2 µm) pipettiert. Ab diesem Schritt wurde wie in 2.5.3 verfahren. Bei dieser Methode kann man ausschließlich eine Aussage über das Vorhandensein des Proteins in der Probe treffen.

### 2.5.4 RNase 7-ELISA

Die Methode des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde angewandt, um die Konzentration von RNase 7 in Zellkulturüberständen zu bestimmen mithilfe spezifischer Antikörper und eines Farbumschlags. Der Sandwich ELISA begann mit dem Beschichten einer 96 Loch-Mikrotiterplatte (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plate Maxisorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durch den spezifischen 1:3.000 in 0,05 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 verdünnten RNase 7 Antikörper der mit 50 µl pro Loch ÜN bei 4 °C inkubiert wurde. Unspezifische Proteinbindestellen wurden mit 200 µl pro Loch 1 %iger boviner Serumalbumin Lösung (BSA) in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) bei 37 °C für eine Stunde abgesättigt. Danach wurden alle Löcher dreimal mit Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) durch einen Elx50 Streifenwascher (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) gewaschen. Je 50 µl der zu testenden Überstände sowie eine RNase 7 Konzentrationsreihe (0,3 bis 40 ng/ml) als Standard in 1 %iger BSA Lösung in 10 mM Natriumphosphatpuffer wurden in die Mikrotiterplatten gegeben und 30 min bei 37° C inkubiert. Nachdem der Inhalt verworfen wurde, wurde die Platte erneut dreimal gewaschen und anschließend mit im Waschpuffer 1:7500 verdünnten biotinyliertem RNase 7 Antikörper für 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 50 µl Peroxidase-konjugierter Avidin-Komplex 1:10.000 in Waschpuffer verdünnt für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde nochmals dreimal gewaschen und die gebundene Peroxidase mit Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) als Substrat quantifiziert. Die Färbereaktion wurde durch Messung der Extinktion bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten Photometer Sunrise™ (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bestimmt. Durch die Standardkurve konnte die RNase 7 Konzentration der Überstände bestimmt werden.

## 2.5.5 Immunhistochemie

### 2.5.5.1 Immunhistologie von in Paraffin-eingebetteten Hautschnitten

Aus in Paraffin eingebetteten Biopsien wurden 3-5 µm dicke Hautschnitte mit einem Mikrotom angefertigt und auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost Plus®, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) gezogen. Die Hautschnitte stammen aus dem Archiv der Kieler Hautklinik und wurden für eine Stunde bei 68 °C getrocknet. Um die Präparate zu entparaffinieren und zu rehydrieren, wurden diese für 2 x 10 min in Roti®- Histol eingetaucht und danach in eine absteigende Alkoholreihe gegeben (2 x 2 min 100 %iger Alkohol, 2 x 2 min 96 %iger Alkohol, 2 x 2 min 70 %iger Alkohol) und schließlich für 2 x 10 min mit H<sub>2</sub>O gespült. Dann wurden die Präparate für 20 min in 10 mM Citratpuffer pH 6 (18 ml 0,1 M Citronensäure, 82 ml 0,1 M Natriumcitrat, 900 ml H<sub>2</sub>O, pH 6) gekocht. Danach kühlten sich die Präparate für 1 h im Citratpuffer ab. Peroxidasen wurden geblockt, indem die Präparate mit 3 % Wasserstoffperoxid (v/v) für 10 min inkubiert und danach kurz mit H<sub>2</sub>O gespült wurden. Danach wurden sie für 5 min in TBS (150 mM NaCl (w/v), 50 mM TRIS (w/v), 1 M NaOH (w/v), pH 7,5) gestellt. Nun wurde der nicht spezifische Hintergrund durch 30 min Inkubation mit 1:20 verdünntem Schweineserum für die Färbung des RI und mit 1:5 verdünntem Kaninchenserum für die Färbung von RNase 7 in TBS blockiert. Das Serum wurde entfernt und die Hautschnitte wurden für 60 min bei RT mit 1:800 verdünntem Anti-RNH1 Antikörper (HPA039223) und mit 1:400 verdünntem RNase 7 Antikörper in Dako REAL™ Antikörper Verdünnungsmittel inkubiert. Nach einem 3 x 5 min Waschschrift mit TBS wurden die Hautschnitte mit 1:600 in TBS verdünnten Zweitantikörpern Polyclonal Rabbit Anti-Goat Ig Biotinylated (E0466) und Polyclonal Swine Anti-Rabbit Ig Biotinylated (E0353) für 30 min behandelt. Nach einem erneuten 3 x 5 min Waschschrift mit TBS wurde das VECTASTAIN® ABC Kit PK-6100 nach der Anleitung des Herstellers angesetzt und für 30 min auf die Hautschnitte gegeben. Bevor das für die Färbung verantwortliche Peroxidasesubstrat-Lösung DAB nach Anweisung des Herstellers für 5-15 min auf die Präparate gegeben wurde, wurden diese nochmals 3 x 5 min mit TBS gespült. Das Peroxidasesubstrat wurde mit H<sub>2</sub>O kurz abgespült und die Hautschnitte mit Mayers Hämalaun für 5-10 s gegengefärbt. Die Präparate wurden für 10 min mit H<sub>2</sub>O gespült und mit Glycergel® Mounting Medium und Deckgläsern eingebettet.

### 2.5.5.2 Immunfluoreszenz von in Paraffin-eingebetteten Hautschnitten

Immunofluoreszenz wurde bis nach dem Blocken der Peroxidasen genauso wie die Immunhistochemie, die in 2.5.5.1 beschrieben wurde, durchgeführt. Danach wurde in Färbekästen die Objektträger mit den Hautschnitten für 5 min mit TBS-T (150 mM NaCl (w/v), 50 mM TRIS (w/v), 1 M NaOH (w/v), 0,5 ml Tween 20, pH 7,5) inkubiert. Die Objektträger wurden vorsichtig trocken getupft und in eine feuchte Kammer gelegt. Dort wurden die Hautschnitte mit einem PAP Stift eingekreist und mit TBS (150 mM NaCl (w/v), 50 mM TRIS (w/v), 1 M NaOH (w/v), pH 7,5), 12 % BSA (w/v)) für 20 min blockiert. Zusätzlich wurden die Hautschnitte für 20 min mit 1:10 verdünntem Roti®-ImmunoBlock blockiert. Anti-RNH1 Antikörper (HPA039223) wurden in TBS 12 % BSA (w/v) 1:400 verdünnt und ÜN in einer feuchten Kammer auf die Präparate gegeben. Der RNase 7 Antikörper wurde 1:300 verdünnt eingesetzt. Die Hautschnitte wurden, separat von den Kontrollen, die mit TBS 12 % BSA überbeschichtet waren, schüttelnd 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Zweit-Antikörper wurden 1:1.000 in TBS 12 % BSA für eine Stunde bei RT auf die Hautschnitte gegeben. Für den RI wurde Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 594 und für RNase 7 Chicken anti-goat IgG Alexa Fluor® 488 eingesetzt. Außerdem wurde Hoechst 33342 zur Zellkernfärbung mit eingesetzt. Die Hautschnitte wurden dreimal 5 min mit TBS-T, dreimal 5 min mit TBS und schließlich dreimal 5 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Am Schluß wurden die Präparate mit Fluoroprep und Deckgläsern eingebettet und am inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) mikroskopiert und fotografiert.

### 2.5.5.3 Immunfluoreszenz von Monoschicht Keratinozyten

Monoschicht Keratinozyten wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern behandelt, um die Verteilung von RNase 7 und RI in den Zellen zu untersuchen. Dazu wurden kleine, runde, abgeflamnte Deckgläschen in je ein Loch einer 12 Lochzellkulturplatten gelegt und Keratinozyten darauf kultiviert (siehe Absatz 2.2.2) Die dadurch entstandene Monoschicht Keratinozyten wurde mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd pH 7 15 min bei RT und mit 250 µl pro Zellkulturplattenloch fixiert. Im Anschluß wurden die Zellen dreimal mit PBS für 5 min gespült. Um intrazelluläre Proteine mit Antikörpern detektieren zu können, wurden die Zellen für 3 min mit 0,1 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Erneut wurden die Keratinozyten fünfmal für je 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 % BSA und 1:10 verdünntem Roti®-ImmunoBlock für mindestens 45 min blockiert. Während eines einmaligen Waschschriffs mit PBS für 5 min wurde eine Petrischale mit Parafilm ausgelegt.

Auf das Parafilm wurden kleine Tropfen 1:400 in 0,1 % BSA (w/v) in PBS-T (v/v) verdünnter Anti-RNH1 Antikörper (HPA039223) und RNase 7 Antikörper pipettiert. Die kleinen runden Deckgläschen wurden vorsichtig mit einer Pinzette aus der Zellkulturplatte herausgehoben und mit der Keratinozyten-Seite auf die Antikörper-Tropfen der mit Parafilm ausgelegten Petrischale gelegt. Die Petrischale wurde geschlossen und ÜN bei 4 °C inkubiert. Die Präparate wurden dreimal 5 min mit 0,1 % BSA (w/v) in PBS-T gewaschen. Die Zweit-Antikörper wurden 1:1.000 in 0,1 % BSA in PBS-T für eine Stunde bei RT auf die Keratinozyten gegeben. Für den RI wurde Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 594 und für RNase 7 Chicken anti-goat IgG Alexa Fluor® 488 eingesetzt. Außerdem wurde Hoechst 33342 zur Zellkernfärbung mit eingesetzt. Die Präparate wurden dreimal 5 min mit 0,1 % BSA PBS-T, dreimal 5 min mit PBS und schließlich dreimal 5 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Am Schluß wurden die Deckgläschenpräparate mit Fluoroprep auf Objektträgern eingebettet. Im Dunklen und bei 4 °C gelagert, wurden die Präparate später mit einer 63fachen Vergrößerung am Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland) mikroskopiert und fotografiert.

### 2.5.6 Massenspektrometrie

Massenspektrometrie wurde als Kontrolle zwischen verschiedenen Aufreinigungsschritten rekombinanter Expressionen angewandt, um zu prüfen, ob die Fraktionen die richtige Masse und wie rein diese waren. Die Massenbestimmung wurde durchgeführt mit Elektrospray-Ionisierungs-Massen-spektrometrie an einem Quadropol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (Micromass QTOF II, Waters, Eschborn, Deutschland) im Positiv-Ionen-Modus. Das Gerät wurde über eine Masse von 50-2500 Da mit Natriumiodidlösung kalibriert. Als Laufmittel wurde 50 %iges Acetonitril (ACN) mit 0,2 % Ameisensäure benutzt. Desweiteren wurde Pferdeherzmyoglobin als Standard wegen seiner validierten Massen gemessen. Rohdaten kombinierter Spektren wurden Hintergrund-korrigiert und Durchschnittsproteinmassen mittels Maximum Entropy 1 Dekonvolution ermittelt (MassLynx-Software, Micromass, UK).

### 2.5.7 Antimikrobieller Test

Antimikrobielle Tests wurden durchgeführt gegen *Staphylococcus cohnii* (*S. cohnii*) mit RNase 7. Durch die Zugabe vom RI sollte herausgefunden werden, ob der RI die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 aufhebt. Zu diesem Zweck wurde zunächst *S. cohnii*

auf einer Blutagar-Nährplatte ausgestrichen und im Inkubator ÜN bei 37 °C kultiviert. Mit einer Kolonie der Blutagar-Nährplatte wurden bei 37°C im Schüttelinkubator 8 ml TSB ÜNK angelegt. Diese wurde am nächsten Morgen erneut mit 25-250 µl auf 8 ml TSB überimpft. Bei einer OD<sub>600</sub> (Ultrospec 10 cell density meter, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) von 0,2 wurden 50 µl der Bakterienkultur in sterilfiltriertem Natriumphosphatpuffer (NAPP) (10 mM pH 7,3) versetzt mit 2 % TSB und 0,1 % BSA, auf 10<sup>-3</sup>, bzw. 10<sup>-4</sup> verdünnt. In 0,5 ml Reaktionsgefäßen wurden zunächst 25 µl NAPP bzw. die zu testenden Proben in NAPP vorgelegt und dann mit 25 µl der verdünnten Bakterienkultur gemischt. Für den Startzeitpunkt wurde diese Suspension sofort auf TSB Nähragarplatten ausplattiert. RNase 7 lag in 0,01 % Essigsäure vor und der RI im sogenannten RI Puffer (20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (w/v) pH 7,5, 50 mM NaCl (w/v), 8 mM DTT (w/v), 0,03 % ELUGENT Detergens (v/v), 50% Glycerin (v/v)), wovon entsprechend der Menge von RNase 7 und RI Kontrollen eingesetzt wurden. Alle weiteren Proben wurden für 3 h in einem 37 °C Brutschrank inkubiert, dann 1:5 mit NAPP verdünnt und 50 µl davon ausplattiert. Nach 24-48 h wurden die kolonienbildenden Einheiten (CFU) mit einem Symbiosis ProtoCol SR Zellzähler (Synoptics Ltd., Cambridge, UK) bestimmt<sup>[26]</sup>.

### 2.5.8 RNase Assay mit fluoreszierendem Substrat

Nach Spaltung des Substrats 6-FAM-dArUdAdA-TAMRA durch RNase 7 fluoreszierte das zuvor gequenchte 5' Fluorescein des Substrats (Vorratslösung 10 µM in H<sub>2</sub>O -20 °C)<sup>[27]</sup>. Um zu zeigen, dass der RI die Ribonukleaseaktivität von RNase 7 blockiert, wurde dieser Assay durchgeführt. Zunächst wurden RNase 7 und RI in 20 µl 10 mM NAPP pH 7,3 verdünnt, für wenige Minuten inkubiert und in eine schwarze 96-Loch Mikrotiterplatte überführt. Direkt vor der Messung wurden pro Ansatz 80 µl 10 mM NAPP pH 7,3 mit 0,5 µM Substrat hinzugegeben und eine 5 min Zeitkinetik im Mikroplatten-Lesegerät Twinkle LB 970 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen. Ferner sollte der Abbau des RI durch Kallikrein 14 (KLK14) anhand des RNase Assays demonstriert werden. Dafür wurden die entsprechenden Substanzen in 20 µl TNET Puffer (0,1 M TRIS, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 0,05% Tween 20 pH 8) wenn benötigt bei 37 °C 6 h oder länger vorinkubiert und die Ansätze in die Mikrotiterplatte überführt. Dann wurde, wie bereits beschrieben, weiter vorgegangen.



### 2.5.9 Gelfiltration

Durch Gelfiltration sollte analysiert werden, ob RNase 7 als Monomer oder Dimer vorliegt. Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 75 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in PBS an einem ÄKTAmicro System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) durchgeführt. Verglichen wurden die Retentionszeiten von 20 µg RNase 7 und 20 µg Cytochrom *c*.

### 2.5.10 Zellviabilität Tests

Das Cell Proliferation Reagent WST-1 und das Cytotoxicity Detction Kit (LDH) sollten Auskunft über den Proliferations-, Viabilitäts- und Zytotoxizitätszustand der Zellen geben. Das Prinzip der Tests ist ähnlich. Sie weisen eine intakte Atmungskette in Keratinozyten nach, indem Tetrazoliumsals durch Dehydrogenasen zu Formazan reduziert wird. Dieses ist spektrophotometrisch durch einen Farbumschlag von hell- zu dunkelrot bei 450 nm bzw. 492 nm messbar. Das Cell Proliferation Reagent WST-1 arbeitet mit WST-1 (2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) und das Cytotoxicity Detction Kit (LDH) mit Iodnitrotetrazoliumchlorid. Für das Cell Proliferation Reagent WST-1 Test wurden Keratinozyten auf 96 Loch-Zellkulturplatten ausgesät und mit RNH1 siRNA behandelt. Drei Tage später wurden die Zellen ÜN mit 6,25 µg/ml RNase 7 stimuliert. Pro Loch wurden 10 µl Cell Proliferation Reagent WST-1 hinzupipettiert und nach 4 h im Inkubationsschrank im Sunrise™ Photometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) analysiert. Für die Analyse mit dem Cytotoxicity Detction Kit (LDH) wurde eine stabile HaCaT-Keratinozyten-Zelllinie, die RNase 7 überexprimiert und bereits im Labor vorhanden war, auf 12 Loch-Zellkulturplatten ausgesät und mit RNH1 siRNA transfiziert. Nach 3-4 Tagen wurde der Zellüberstand abgenommen und 5 min bei 12.000 g abzentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden in eine 96 Loch-Mikrotiterplatte überführt und mit 100 µl nach dem Protokoll des Herstellers Katalyse-Farbstoffmix vermischt. Es wurde mehrmals die Absorption gemessen bei 492 nm, das letzte Mal nach 30 min.

## 2.6 Kallikrein Aktivierung

Kallikrein 14 (KLK14) wurde mit Thermolysin aktiviert. Zunächst wurden 0,5 mg/ml KLK14 mit dem Aktivierungspuffer (0,1 M TRIS (w/v), 250 mM NaCl (w/v), 20 mM CaCl<sub>2</sub> (w/v), 0,05 % Tween 20 (v/v), pH 7,5) auf 0,1 mg/ml verdünnt. 10 µl 0,1 mg/ml KLK14 wurden 1 µl

0,1 mg/ml Thermolysin hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Aktivierung mit 10 mM EDTA beendet. Es ergab sich eine KLK14 Konzentration von 0,08 mg/ml, was 3,3 µM bei einem Molekulargewicht von 25.506,2 Da entspricht. Die Aktivierung wurde durch das Fluoreszenzsubstrat L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine 7-amido-4-methylcoumarin (PFR-AMC) verifiziert. Zu diesem Zweck wurden schwarze 96-Loch-Mikrotiterplatten mit 400 µM des Substrats und 0,5 nM KLK14 in einem Gesamtvolumen von 200 µl im TNET Puffer (0,1 M TRIS (w/v), 150 mM NaCl (w/v), 0,05 % Tween 20 (v/v), 5 mM EDTA (w/v), pH 8) angesetzt und im Mikroplatten-Lesegerät Twinkle LB 970 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm in 10 min Intervallen über ca. 16 h gemessen. Als Kontrolle diente das Substrat. Weitere KLK und Enzyme wie aus dem Versuch aus Absatz 3.2.5 wurden aktiviert und kontrolliert übernommen.

## 2.7 Stratum corneum Extrakt Herstellung

*Stratum corneum* Extrakt wurde hergestellt, indem 2,5 g Kallusstücke (*Stratum corneum*) mit einer Dicke von ca. 0,2-0,4 mm von Fußsohlen in 20 ml 100 mM 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) pH 7,5 gegeben wurden und mit einem Scherkraftdesintegrators (Ultra-Turrax T25®, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) für 20 min auf Eis zerkleinert wurden. Danach wurde die Suspension 1 h auf Eis mit einem Magnetrührer gerührt und bei 15.000 g für 50 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Außerdem wurden 500 µl auf Blutagar-Nährplatten ausplattiert, um sicherzugehen, dass der Extrakt steril ist. Die Proteinkonzentration wurde durch den NanoDrop 1000 bestimmt. Es wurde noch eine weitere Methode angewandt, um Kallus Extrakt herzustellen nach Steffanson *et al.* für eine Umkehrphasen-Chromatographie [28]. 10 g Kallusstücke (*Stratum corneum*) mit einer Dicke von ca. 0,2-0,4 mm von Fußsohlen wurden trocken mit dem Scherkraftdesintegrators bis zur Pulverform zerkleinert. Dann wurden 100 ml 0,1 M Essigsäure hinzugegeben und der pH-Wert mit Eisessig auf 2,5 (pH 720 WTW, inoLab, Weilheim, Deutschland) gestellt und ÜN bei 4 °C gelagert. Die Suspension wurde 15 min bei 4.000 g abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (0,45 µm Spritzenvorsatzfilter).

## **2.7.1 Umkehrphasenchromatographie von Stratum corneum Extrakt**

Eine Umkehrphasenchromatographie mit einer NUCLEOSIL® C8 Säule, deren Eigenschaften bereits in Absatz 2.4.2 beschrieben sind, wurde durchgeführt. Zunächst wurde die Probe Kallus Extrakt, wie in Absatz 2.4.2 beschrieben, vorbereitet und 50 ml davon durch die Chromatographie in einem Lauf aufgetrennt. Äquiliert wurde mit 0,1 % TFA, und eluiert durch ein Gradientenprogramm, was 45 min lief und am Ende 60 % Elutionspuffer (100 % ACN, 0,1 % TFA) enthielt.

### 2.7.1.1 Ultrafiltration

Es wurde Kallus Extrakt durch Amicon Ultra-15 10 kDa Zentrifugation (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) in verschiedene Molekulargewichtsklassen (< 10 kDa, 10-50 kDa und > 50 kDa) aufgeteilt.

## **2.8 Genexpression in Keratinozyten**

### **2.8.1 Real-time quantitative PCR**

#### 2.8.1.1 RNA-Isolierung

Aus den Keratinozyten wurde RNA mit dem Reagenz Crystal RNAmagic unter einer Abzugshaube isoliert. Es wurde nach des Herstellers Anleitung benutzt und direkt zu den Keratinozyten gegeben, nachdem der ÜS abgenommen worden war oder nachdem die bei -80 °C gelagerte Zellkulturplatte aufgetaut war. Crystal RNAmagic funktioniert nach der Methode von Chomczynski und Sacchi und enthält Guanidiniumthiocyanat, was Zellen lysiert und RNasen inaktiviert. Mit im Crystal RNAmagic enthaltenen Phenol wurde die RNA extrahiert, und durch Zugabe von Chloroform wurden drei Phasen gebildet. Die wässrige Phase mit der RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Ausfällen der RNA wurde Isopropanol hinzugegeben, inkubiert und die RNA abzentrifugiert. Die Zentrifugationsschritte wurden mit 12.000 g durchgeführt. Diese wurde dann zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und in 15 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80 °C gelagert <sup>[29]</sup>.

### 2.8.1.2 Reverse Transkription von RNA

Vor der kompletären DNA (cDNA) Synthese wurden die Konzentration und die Reinheit aller RNA Proben mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer bei einer Absorption von 260 nm gemessen. Zu 1 µg RNA wurden 1 µl 20 µM Oligo (dt) Primer und 1 µl 10 mM dNTPs gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 15,75 µl aufgefüllt. In einem Thermocycler T3 (Biometra, Göttingen, Deutschland) in 0,5 ml Reaktionsgefäßen wurde die RNA für 5 min bei 65 °C inkubiert, auf 4 °C herabgekühlt, und es wurde 0,25 µl Maxima™ Reverse Transcriptase verdünnt in 4 µl 5x RT-Puffer zu jeder Probe hinzugegeben. Die cDNA Synthese wurde bei 60 °C für 30 min ausgeführt und durch 5 min Inkubation bei 85 °C beendet. Nach dem Abkühlen der cDNA Proben wurden diese mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 ng/µl aufgefüllt und konnten bei -20 °C gelagert werden.

### 2.8.1.3 Real-time PCR

Real-time quantitative PCR (q-PCR) quantifiziert die Expression spezifischer Gene durch eine PCR mit cDNA (siehe 2.8.1.2). Während der q-PCR mit genspezifischen Primern werden Fluoreszenzmarkierungen in die PCR Produkte eingebaut und in Echtzeit detektiert. Während der exponentiellen Phase ist es dadurch möglich, auf die Menge der vorhandenen PCR-Produkte eines Gens in einer Probe zu schließen und diese mit einem anderen Gen zu vergleichen. Q-PCRs wurden in 96-Loch-PCR-Platten (Crystal PCR 96 Lochplatten, Biolab products, Bebensee, Deutschland) durchgeführt und mit selbstklebender Folie (MicroAmp optical adhesive film, Applied Biosystems, Carlsbad, USA) abgedeckt. Alternativ wurden auch PCR Streifen (MicroAmp fast reaction tubes mit MicroAmp optical 8-cap strip, Applied Biosystems, Carlsbad, USA) benutzt. Das Gesamtvolumen für jede PCR betrug 10 µl, die aus 1 µl cDNA (10 ng), 3 µl H<sub>2</sub>O, 5,2 µl SYBR® Premix Ex Taq™ II und aus jeweils 0,4 µl der genspezifischen Primer (10 µM) bestand. Im StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) wurde eine touch-down PCR mit folgendem Zweischnittprogramm durchgeführt:

1. 30 s 95 °C Anfangsdenaturierung
2. 30 s 66 °C Elongation
3. Abfall der Elongationstemperatur um 1 °C pro Zyklus (5 s 95 °C + 30 s Elongation) von 66 °C to 60 °C
4. 40 Zyklen mit 5 s 95 °C Denaturierung und 30 s 60 °C Elongation

Die PCR Produkte wurden im Anschluss der q-PCR durch schrittweises Erhitzen von 60 °C bis 95 °C und der Aufzeichnung einer Schmelzkurve kontrolliert, um unspezifische PCR-Produkte durch die Primer möglichst auszuschließen. Außerdem wurde für jedes Primerpaar eine Standardkurve erstellt, indem cDNA herabtitriert wurde. Als interner Standard wurde entweder ein spezifisches Fragment des ribosomalen Proteins 38 (RP38) oder der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert, die in Epithelzellen konstant exprimiert wird. Die relative mRNA Expression ergab sich aus dem Quotienten vom Standardtranskriptionslevel und des gemessenen Gens.

### 2.8.1.3.1 Stanzbiopsie und Rasurbiopsie

Die cDNA Proben von Patienten mit atopischer Dermatitis und Psoriasis waren bereits im Labor vorhanden. Die Psoriasis cDNA Proben wurden aus Stanzbiopsien gewonnen, die aus jeweils einem Probanden an läsionaler und nicht läsionaler Haut entnommen wurde. Die atopische Dermatitis cDNA wurde aus Rasurbiopsien gewonnen. Auch hier wurden an jeweils einem Probanden an läsionaler und nicht läsionaler Haut Biopsien entnommen. Zusätzlich wurde mit cDNA aus Rasurbiopsien gesunder Menschen verglichen.

## 2.9 Darstellung der Ergebnisse

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit abgebildeten Diagramme zu den Experimenten mit Keratinozyten und HaCaT-Zellen stellen, soweit nicht anders erwähnt, repräsentative Beispiele für mehrfach durchgeführte unabhängige Versuche dar, die vergleichbare Resultate aufwiesen. Versuche, die in Wiederholungen abweichende bzw. keine eindeutigen Resultate lieferten, fanden in dieser Arbeit keine Berücksichtigung. Die angegebenen Messwerte entsprechen, soweit nicht anders angegeben, den Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. Als Fehlerbalken sind die Standardabweichungen der Messungen eingezeichnet. Signifikanzen sind mit einem (p<0,05), zwei (p<0,01) oder drei Sternen (p<0,001) eingetragen und, soweit nicht anders angegeben, mit dem Unpaired t-Test analysiert worden. Nicht signifikante Ergebnisse sind nicht eingetragen. Diese Arbeit wurde mit dem Microsoft Office Paket (Microsoft Office Software, Redmond, USA) geschrieben. Die Abbildungen wurden sowohl mit GraphPad Prism Software (GraphPad Prism Software, San Diego, USA) als auch mit Microsoft Office Software erstellt.

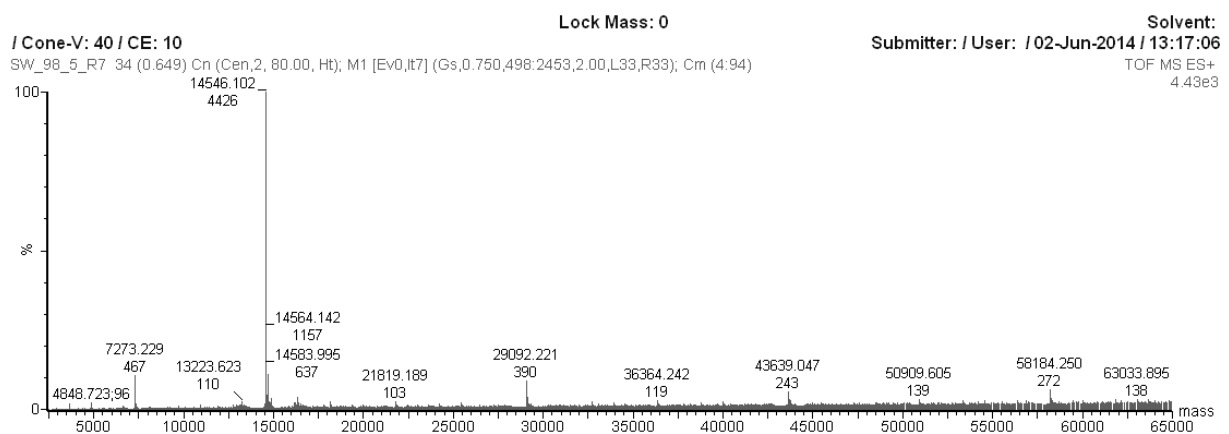
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Rekombinante RNase 7 und rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor

Um die Interaktion von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor näher zu charakterisieren, wurde versucht, diese rekombinant in *E. coli* zu exprimieren.

##### 3.1.1 Rekombinante Herstellung von RNase 7

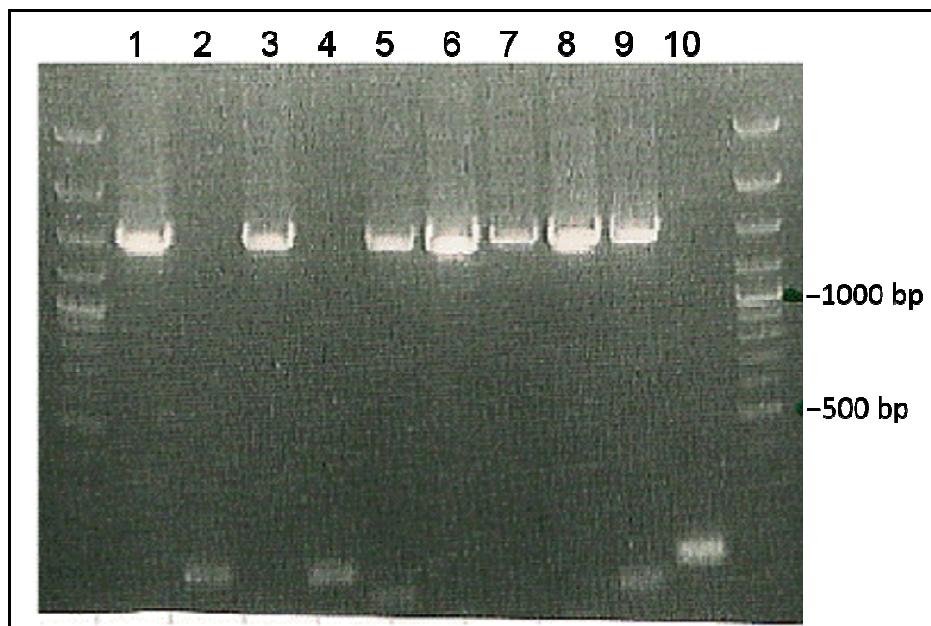
Durch den bereits als Glycerinstock vorhandenen Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS mit dem Vektor R7pET32a wurden die Bakterien in LB-Medium bei 37°C und einer OD<sub>600</sub> von 0,8 mit IPTG induziert und nach dreistündiger Expression geerntet. Das RNase 7-Fusionsprotein mit "His-Tag" konnte in löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden und wurde nach Aufschluss der Bakterien über eine Nickel-Affinitätssäule und C8-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) weiter aufgereinigt. Der N-terminale „His-Tag“ konnte anschließend über Behandlung des Fusionsproteins mit Enterokinase abgespalten werden. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt über C4-Umkehrphasen-HPLC eluierte die aufgereinigte RNase 7 mit Isopropanol. Die massenspektrometrisch bestimmte Masse betrug 14.545 kDa, wie Abb. 2 zeigt. Die molekulare Masse liegt somit 8 Dalton unter der theoretisch errechneten Masse. Dies erklärt sich dadurch, dass RNase 7 acht Cysteine besitzt, die über vier Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Durch die rekombinante Expression von RNase 7 in *E. coli* konnten aus 200 ml *E. coli*-Kultur ca. 250 µg rekombinante RNase 7 aufgereinigt werden.



**Abb. 2: Massenspektrum rekombinanter RNase 7.** Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil der berechneten Massen in der gemessenen Probe. RNase 7 mit 14.545 Dalton (ein Dalton wird aufgrund der Kalibrierung abgezogen) macht den größten Anteil der Probe aus.

### 3.1.2 Rekombinante Herstellung vom Ribonuklease-Inhibitor

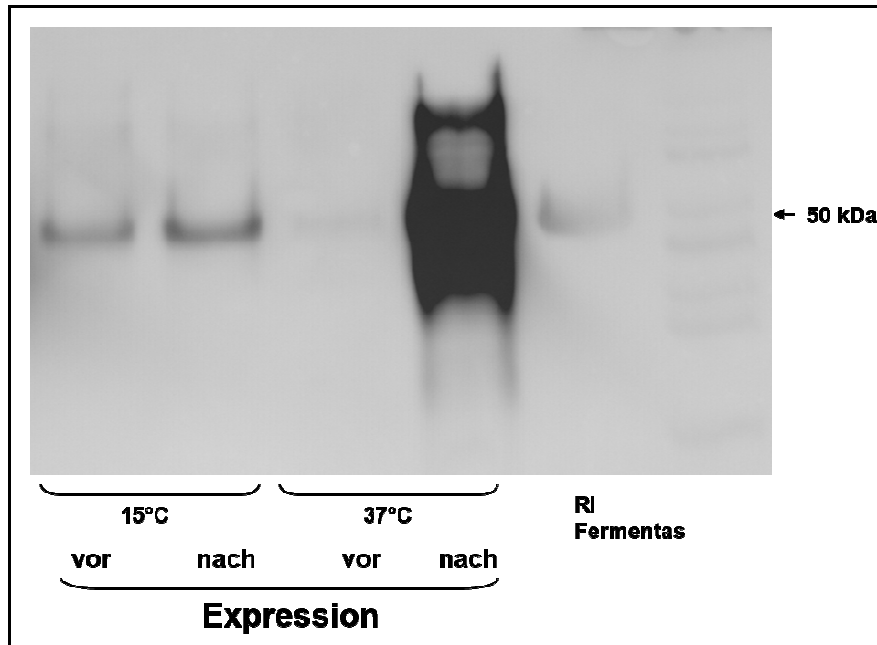
Ribonuklease-Inhibitor-DNA wurde aus Keratinozyten cDNA mit spezifischen Oligonukleotiden vervielfältigt, um mithilfe des Ribonuklease-Inhibitor Gens (RNH1-Gen), Ribonuklease-Inhibitor rekombinant herstellen zu können. Eine Agarose-Gelelektrophorese zeigt eine Größe von ungefähr 1.500 Basenpaaren der Ribonuklease-Inhibitor-DNA an. Das ungereinigte PCR-Produkt wurde in den pJET 1.2/blunt Cloning Vektor ligiert und in *E. coli* DH5  $\alpha$  transformiert. Abb. 3 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese von Kontroll-PCRs.



**Abb. 3: Agarose-Gelelektrophorese zur Selektion von RNH1-Gen enthaltener Vektoren in *E.coli* DH5  $\alpha$ -Kolonien.** Die Banden stellen die durch eine PCR getesteten verschiedenen Klone dar. Klone, die das RNH1-Gen enthalten, zeigen eine Bande bei 1.500 Basenpaaren auf. Die Banden der DNA wurden durch die Interkalation von Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von 266 nm mit Hilfe einer Fotodokumentationsanlage aufgenommen.

Eine positive Kolonie wurde in Kulturmedium vermehrt und das Plasmid mithilfe einer Plasmidpräparation isoliert und sequenziert. Danach wurden pJET-RI und pET-22b mit Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend wurden das RI-Gen in den geschnittenen pET-22b Expressionsvektor ligiert und in *E.coli* TOP10 chemisch kompetente Zellen transformiert. Nach einer Kontroll-PCR, Vermehrung und Isolation des Plasmids, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die rekombinante Expression und Aufreinigung des Ribonuklease-Inhibitors sollte sich an Arnold *et al.* <sup>[21]</sup> Vorgehensweise anlehnen. Ursprünglich wurde das RI-Plasmid in *E. coli* BL21(DE3) transformiert, und aus einer einzelnen Kolonie wurde eine Übernachtskultur angesetzt, mit der am nächsten Tag TB-Medium angeimpft wurde. Bei einer OD<sub>600</sub> von  $\geq 3$  wurde durch Zugabe von IPTG die

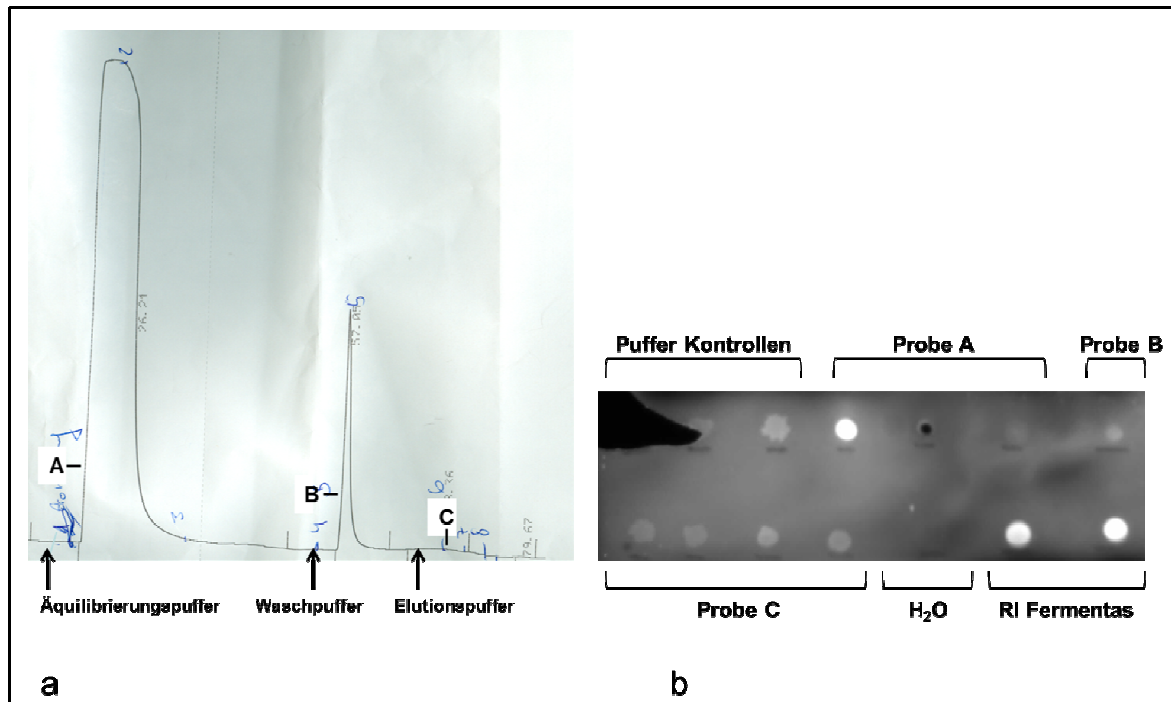
Expression induziert und für 24h bei 15°C schüttelnd der Ribonuklease-Inhibitor exprimiert. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert und im Lysispuffer resuspendiert und aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt.



**Abb. 4: Ribonuklease-Inhibitor Expression bei 15°C und 37°C im Vergleich.** Die Ribonuklease-Inhibitor Expression wurde mit IPTG induziert. Eine Expression wurde bei 15°C für 24 h durchgeführt. Die andere bei 37°C für nur 4 h. Vor und nach der Expression wurden Probenaliquots abgenommen und mit 8 M Harnstoff behandelt. Es wurde von jeder Probe gleich viel Protein eingesetzt. Die Proben wurden dann mittels Western Blot mit RI-Antikörpern untersucht. Die Ribonuklease-Inhibitor Expression war besonders hoch bei 37°C.

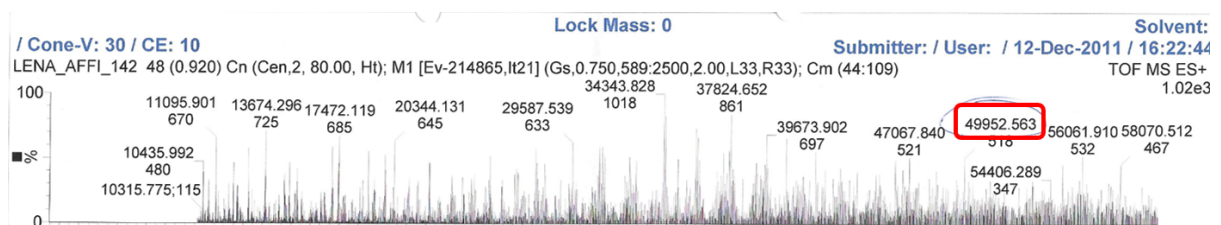
Im ersten Aufreinigungsschritt sollte der in löslicher Form vorhandene Ribonuklease-Inhibitor durch eine RNase A Affinitätssäule von anderen Expressionsbestandteilen getrennt werden. Für die Affinitätssäule wurde RNase A an eine HiTrap Säule, vorgepackt mit NHS-aktivierter Sepharose, gebunden. Die Probe sollte mit dem Äquilibriumspuffer aufgetragen, mit 1 M NaCl gewaschen und mit 3 M NaCl eluiert werden.





**Abb. 5 a und b: Ribonuklease-Inhibitor Aufreinigung mithilfe einer RNase A Affinitätschromatographie.** (a) Das aufgeschlossene und im Äquilibriumspuffer gelöste Bakterienpellet der Ribonuklease-Inhibitor Expression wurde abzentrifugiert und der Überstand auf die Affinitätssäule gegeben. Nach dem Probendurchfluss wurde die Säule mit Waschpuffer, der 1 M NaCl enthält, gewaschen und anschließend mit 3 M NaCl eluiert. Im Äquilibriumspuffer ist ein großer Probendurchfluss erkennbar. Mit dem Waschpuffer wird auch etwas Protein aus der Säule gespült. Beim Elutionspuffer entsteht kein Peak mehr. (b) Proben der Affinitätschromatographie wurden für einen Dotblot mit RI-Antikörpern verwendet. Aus der Laufzeit A (Abb. 5 a) wurden insgesamt drei verschiedene Fraktionen gesammelt. Die erste Fraktion stellt den großen Probendurchflusspeak dar. Dort gibt es genau so ein starkes Signal wie 330 ng Ribonuklease-Inhibitor von Fermentas. In der Laufzeit B (Abb. 5 a) wurde eine Fraktion gesammelt. In der Laufzeit C (Abb. 5 a) wurden vier Fraktionen gesammelt und jeweils auf den Dotblot aufgetragen. Die Pufferkontrollen gaben ein schwaches, falsch-positives Signal. Die Färbung der Dots aus den Fraktionen von Laufzeit B und C (Abb. 5 a) sind ähnlich wie die der Pufferkontrollen, was darauf schließen lässt, dass sich lediglich RI im Probendurchfluss befand und der RI dabei nicht an die Säule gebunden hat.

Eine massenspektroskopische Analyse von Probe A aus Abb. 5 ergab, dass in Probe A Ribonuklease-Inhibitor vorhanden ist. Es wurde eine Masse von 49.953 Dalton gemessen, die jedoch nur in geringen Mengen vorzufinden war, wie Abb. 6 zeigt.



**Abb. 6: Massenspektrum von Probe A aus Abb. 5 zeigt, dass die Masse des Ribonuklease-Inhibitors in der Probe nachweisbar ist.** Es wurde ein Protein mit der Masse 49.953 Dalton gemessen, das jedoch nur einen geringen prozentualen Anteil der Probe ausmachte.

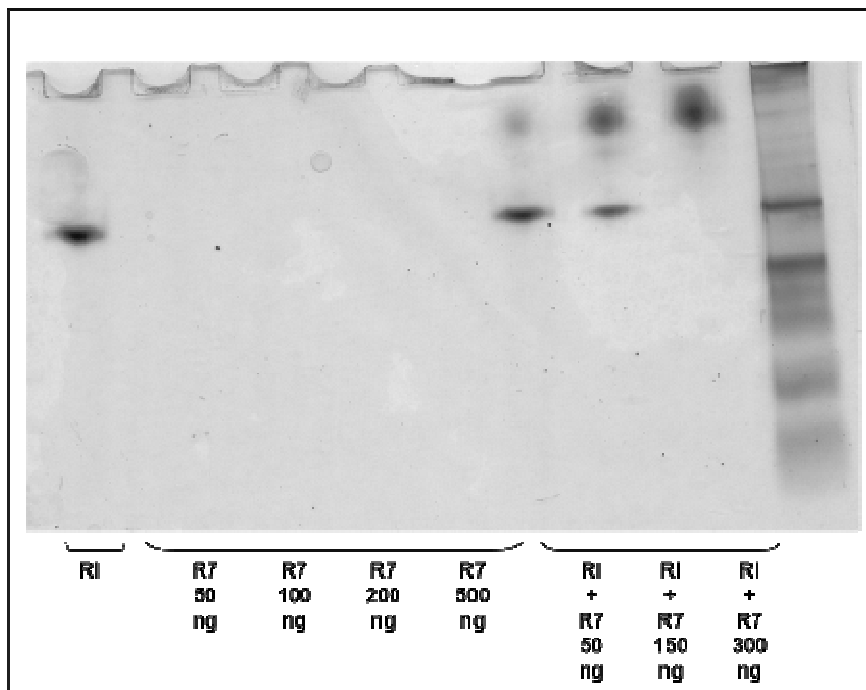
Daraufhin wurden unterschiedliche Expressionsbedingungen getestet, um größere Mengen an Ribonuklease-Inhibitor zu produzieren. Es wurden weitere Expressionssysteme (*E. coli* BL21(DE3) pLysS und RosettaBlue(DE3)), unterschiedliche Expressionstemperaturen, -dauern und -medien getestet (siehe z.B. Abb. 4) sowie mit einer höheren Salzkonzentration auf der RNase A Affinitätssäule eluiert. Auch wurden andere Bakterienaufschlusstechniken getestet. Schlussendlich wurden in den Analysen des Waschpuffereluats keine größeren Mengen vom Ribonuklease-Inhibitor detektiert, und mit dem Elutionspuffer wurde kein weiteres Protein von der Säule gelöst. Eine neue Säule wurde nochmals mit RNase A bestückt. Vorher erfolgte eine einwandfreie massenspektroskopische Analyse der neuen RNase A. Auch hier kam es wieder zum gleichen negativen Ergebnis. Es wurden auch Keratinozytenlysate und 1,5 mg rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor über die Säule gegeben, und es wurde kein Protein eluiert. Daraufhin wurde die rekombinante Herstellung des Ribonuklease-Inhibitors nach Lewis, M.K. und Shultz, J.W. [22] durchgeführt. Diese Methode beinhaltet eine aufwändige Aufbereitung des Bakterienpellets. Das Pellet wird mit Lysozym und SDS behandelt, um die Bakterien aufzuschließen. Danach erfolgt eine Behandlung mit Harnstoff, um den Ribonuklease-Inhibitor in eine lösliche Form zu bringen, worauf dieser mit Glycerin aktiviert wird. Nun sollte der RI mithilfe einer Anionenaustauschchromatographie (HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow 1 ml) aufgereinigt werden, die der zuvor schon verwendeten RNase A Affinitätschromatographie folgte. Auch dieses Mal konnte kein RI durch die Affinitätschromatographie eluiert werden, obwohl während der Anionenaustauschchromatographie noch RI eluiert wurde. Aufgrund dieser zeitintensiven Untersuchungen wurde der rekombinante RI von Fermentas für die Versuche verwendet.

### 3.2 Komplexbildung von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor

RNase 7 ist ein in der Haut stark exprimiertes AMP, welches überdies in der Lage ist, RNA zu degradieren. Sowohl die antimikrobielle als auch die Ribonuklease Aktivität könnten möglicherweise durch den RI blockiert werden. Eine nähere physiologische Rolle des RI in der Haut ist bislang nicht bekannt. Es wurde der Frage nachgegangen, ob der RI in der Haut an RNase 7 bindet.

### 3.2.1 Rekombinante RNase 7 und Ribonuklease-Inhibitor binden *in vitro* aneinander

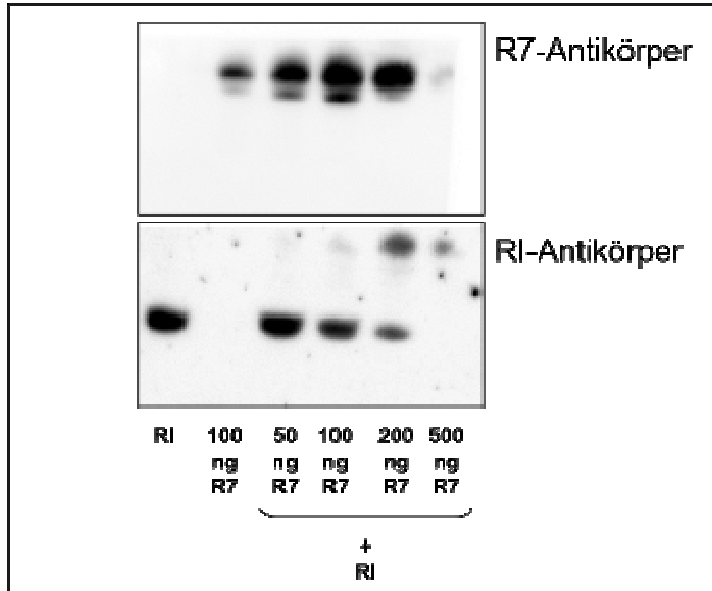
Indem rekombinante RNase 7 und rekombinater RI miteinander inkubiert und danach durch eine native Polyacrylamid-Gelelektrophese separiert und mit anschließender Coomassie-Brillant-Blau sichtbar gemacht wurden, zeigte Abb. 7, dass die Proteine in der Lage sind, aneinander zu binden. Aufgrund eines isoelektrischen Punkts von 10,5 der RNase 7, diffundierte diese nicht zur Anode durch das Polyacrylamid-Gel. Der RI hingegen, mit einem isoelektrischen Punkt von 4,7, zeigte nach der Coomassie-Brillant-Blau Färbung deutliche Banden, die wiederum durch die Zugabe unterschiedlicher RNase 7 Mengen verschoben wurden. Erkennbar ist, dass wenn RNase 7 und RI in nahezu gleichen Mengen vorliegen, diese eine einzige Bande bilden. Die vorhandene Menge RI scheint komplett an RNase 7 zu binden.



**Abb. 7: Komplexbildung von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor.** Der Ribonuklease-Inhibitor (330 ng/Ansatz) wurde mit RNase 7 (50, 150 und 300 ng) inkubiert mit anschließender nativer Polyacrylamid-Gelelektrophese und Coomassie-Brillant-Blau Färbung. Eine Komplexbildung der beiden rekombinanten Proteine ist erkennbar. Die Proteinmarker der Spectra Multicolor Broad Range Protein Leiter der rechten Bande sind durch das native System verschoben und lassen nicht auf die Größe der aufgetragenen Proteine schließen.

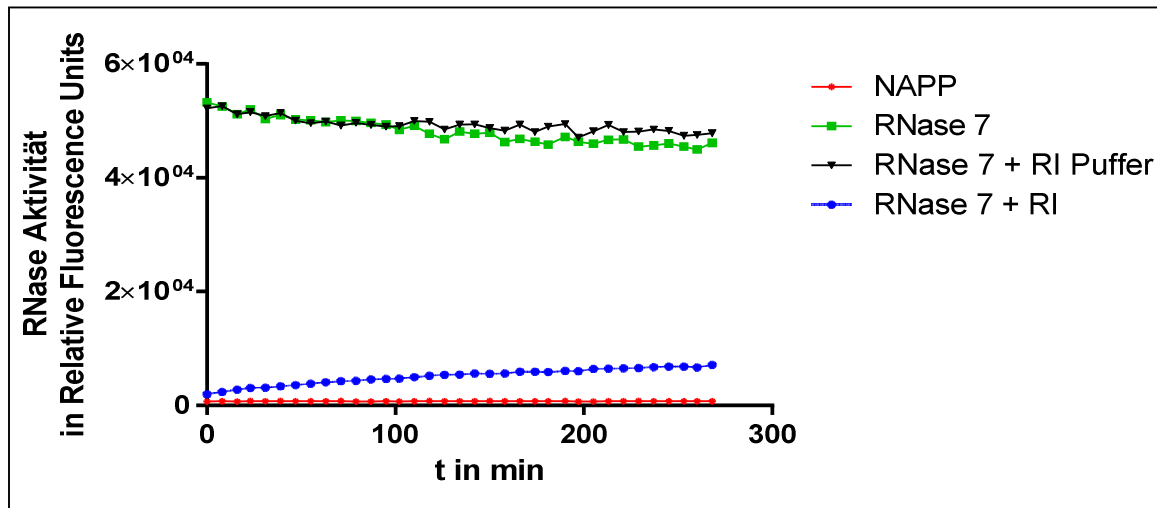
Abb. 8 zeigt native Western Blots, die einmal mit RNase 7- und einmal mit RI-Antikörpern entwickelt wurden. Als Proben wurden rekombinanter RI, rekombinante RNase 7 und RI, der mit unterschiedlichen Mengen RNase 7 titriert wurde, eingesetzt. Dass die Komplexbildung stattfand, wird hier demonstriert durch die verschobenen Banden im RI Western Blot und durch die vorhandenen Banden im RNase 7 Western Blot, in denen beide Proteine

zusammen vorinkubiert wurden. Es lässt sich hieraus auch schließen, dass beide Antikörper in der Lage sind, ihr Zielprotein noch zu detektieren, wenn dieses an RNase 7, bzw. RI gebunden hat.



**Abb. 8: RNase 7 und der Ribonuklease-Inhibitor werden auch im Komplex von den jeweiligen Antikörpern erkannt.** Der Ribonuklease-Inhibitor (330 ng/Ansatz) wurde mit RNase 7 (50, 100, 200 und 500 ng) inkubiert. Die Proben wurden dann mittels nativem Western Blots mit RI- und RNase 7-Antikörpern untersucht.

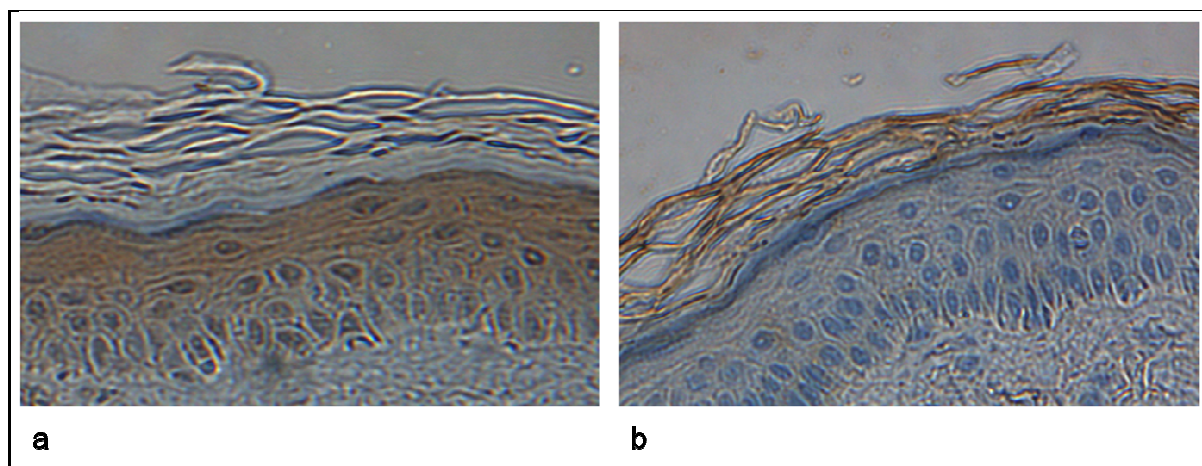
Durch den RNase Assay mit fluoreszierendem Substrat in Abb. 9 wurde gezeigt, dass der RI die ribonuklease Aktivität von RNase 7 unterbindet. RNase 7 alleine spaltet das Substrat 6-FAM-dArUdAdA-TAMRA, welches anfängt zu fluoreszieren. Wenn RNase 7 und RI aneinander binden, ist RNase 7 offensichtlich nicht mehr dazu in der Lage, das Substrat zu spalten.



**Abb. 9: Der Ribonuklease-Inhibitor inhibiert die Ribonuklease Aktivität von RNase 7.** Das Substrat 6-FAM-dArUdAdA-TAMRA wird von Ribonukleasen gespalten und beginnt zu fluoreszieren. Wenn 300 ng RNase 7 und 330 ng Ribonuklease-Inhibitor für 3 min in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) vorinkubiert wurden, ist es RNase 7 nicht mehr möglich, das Substrat 6-FAM-dArUdAdA-TAMRA zu spalten, da es zur Komplexbildung gekommen ist.

### 3.2.2 Immunhistologie von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor

Zunächst wurden immunhistochemische Färbungen von Hautschnitten gesunder Haut mit RNase 7 und RI Antikörpern durchgeführt. Abb. 10 zeigt, dass der RI besonders im *Stratum spinosum* agglomeriert und nach der Differenzierung der Zellen ins *Stratum corneum* nicht mehr vorhanden ist. RNase 7 hingegen befindet sich als aktives AMP im *Stratum corneum* und ist nur in geringen Konzentrationen im *Stratum spinosum* zu finden.



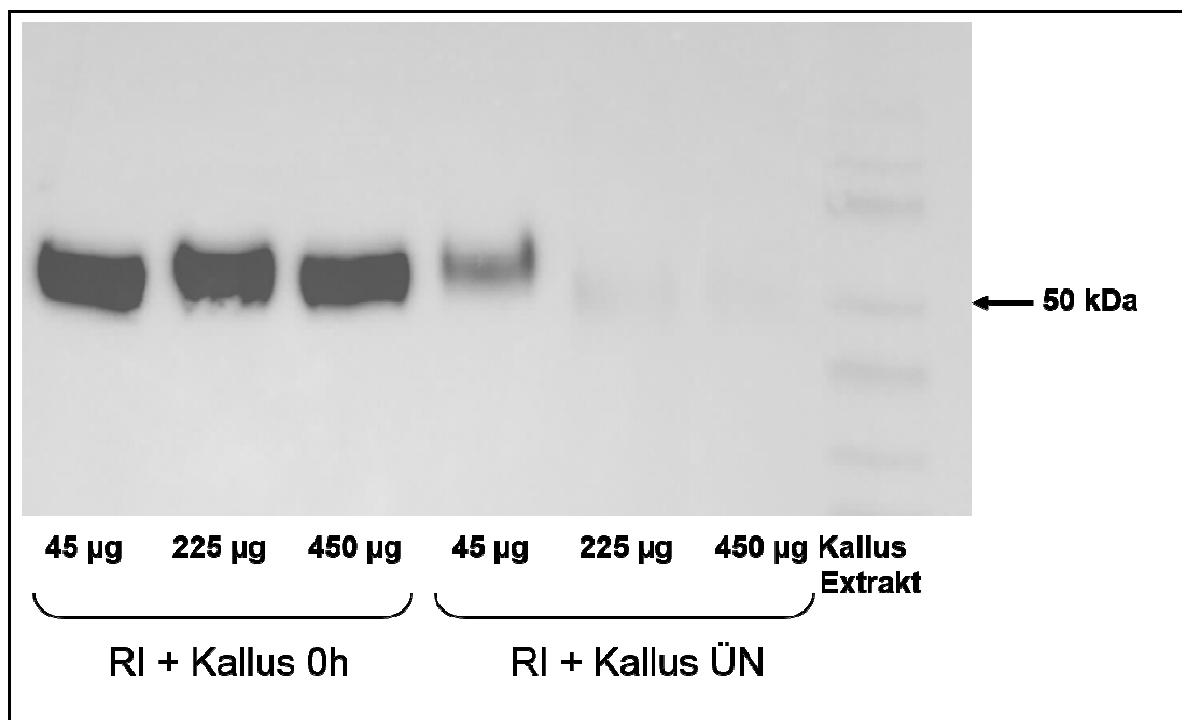
**Abb. 10: Immunreaktivität vom Ribonuklease-Inhibitor (a) und RNase 7 (b) in gesunder Haut.** Gezeigt werden immunhistochemische Färbung von Paraffin-Hautschnitten mit Ribonuklease-Inhibitor-Antikörpern und RNase 7-Antikörpern. Der Ribonuklease-Inhibitor befindet sich im Wesentlichen im *Stratum spinosum* (a), wohingegen RNase 7 im *Stratum corneum* die größte Immunreaktivität zeigt (b). Der Vergrößerungsfaktor beträgt 200.

### 3.2.3 Der Ribonuklease-Inhibitor wird im Stratum corneum degradiert

Zasloff stellte die Hypothese auf, dass der RI, der sich zwar im *Stratum spinosum*, nicht aber im *Stratum corneum* nachweisen lässt, im *Stratum corneum* durch Proteasen degradiert wird [33]. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde *Stratum corneum* Extrakt nach Abtin *et al.* [30] hergestellt, indem Kallus in MES-Puffer gegeben, zerkleinert und der Überstand für Versuche verwendet wurde. Ein weiterer *Stratum corneum* Extrakt wurde nach Steffanson *et al.* [28] hergestellt. Dafür wurde Kallus zunächst trocken stark zerkleinert und dann in Essigsäure aufgenommen.

### 3.2.4 Der Ribonuklease-Inhibitor und *Stratum corneum* Extrakt

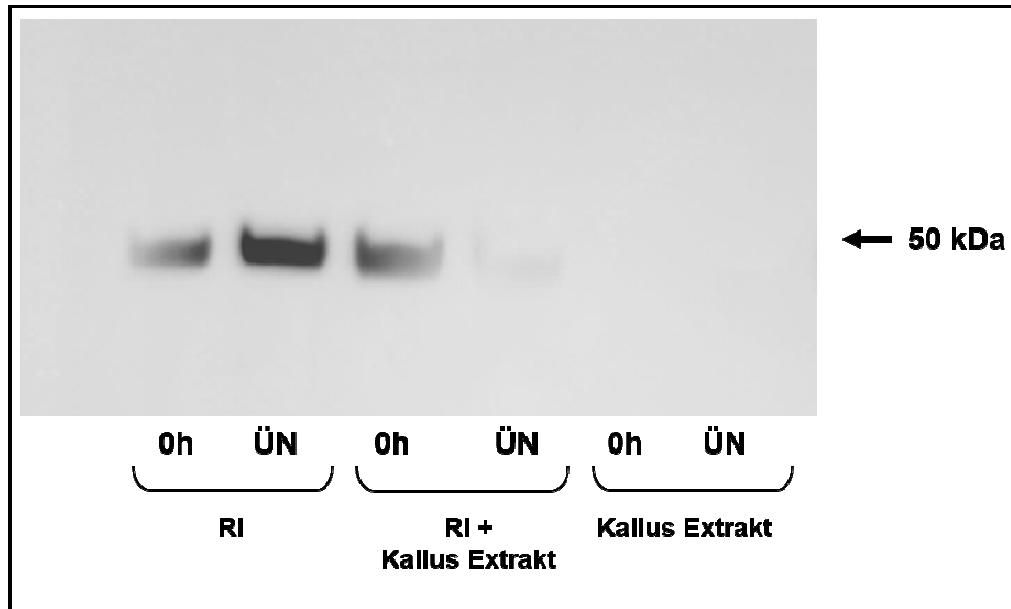
Der RI wurde zusammen mit Kallus Extrakt, der nach Abtin *et al.* hergestellt wurde, über Nacht inkubiert. Ein Western Blot mit RI-Antikörpern in Abb. 11 zeigte, dass der RI dosisabhängig vom Kallus Extrakt bei 37 °C über Nacht degradiert wurde.



**Abb. 11: Der Ribonuklease-Inhibitor wird dosisabhängig vom Kallus Extrakt degradiert.** 330 ng RI wurden je mit 45 µg (225 und 450 µg) Kallus Extrakt in MES Puffer (100 mM pH 7,5) 0h und über Nacht bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden dann mittels Western Blot mit RI-Antikörpern untersucht.

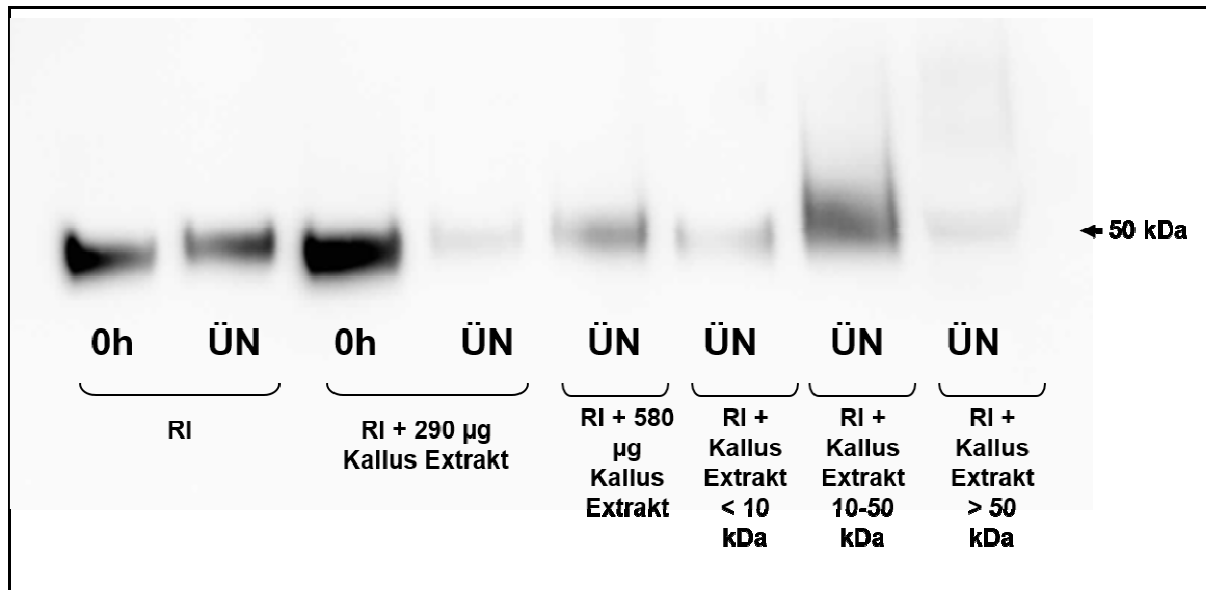
Der Western Blot in Abb. 12 dokumentiert noch einmal, dass sich im Kallus Extrakt selber offensichtlich kein RI mittels Western Blot nachweisen lässt, auch dann nicht, wenn der

Kallus Extrakt direkt ohne weitere Inkubationszeit aufgetragen wurde. Dies ist in Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Untersuchungen in Abb. 10 und bestätigt die Abwesenheit des RI im *Stratum corneum*.



**Abb. 12: Kallus Extrakt enthält keinen nachweisbaren RI.** 290 µg Kallus Extrakt in MES Puffer (100 mM pH 7,5) wurde mit und ohne 330 ng RI für 0h und über Nacht bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden dann mittels Western Blot mit RI-Antikörpern untersucht.

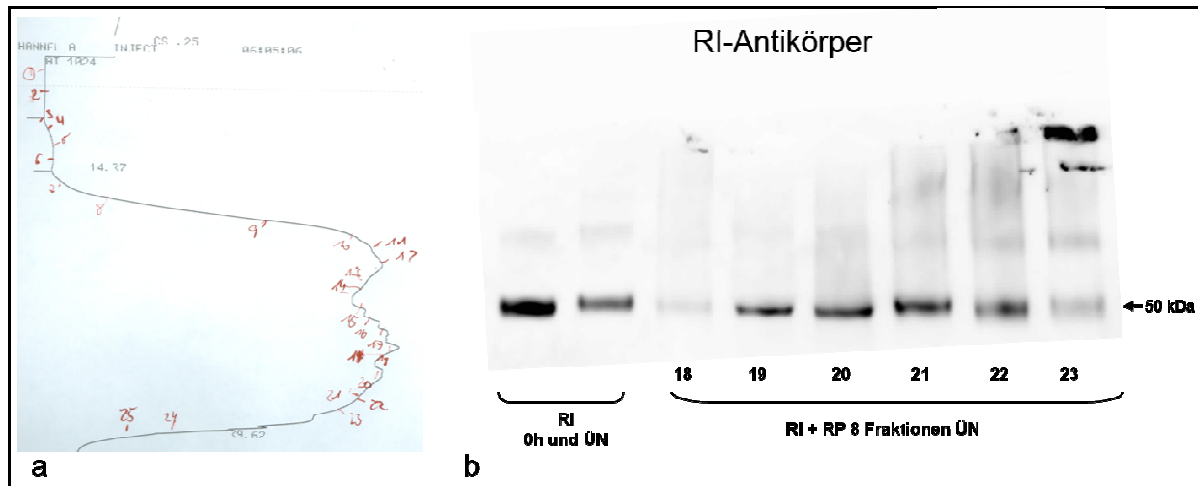
Um nähere Informationen über die molekulare Natur der Protease(n) herauszufinden, die den RI degradieren, sollte zunächst der Kallus Extrakt nach Größe durch Zentrifugationsfilter getrennt werden, um dann den Extrakt gezielter untersuchen zu können. Der Western Blot in Abb. 13 zeigt, dass der RI von Kallus Extrakt < 10 kDa und von Kallus Extrakt > 50 kDa abgebaut wurde. Der Versuch wurde wiederholt und ein weiterer Western Blot sagte aus, dass nur die > 50 kDa Fraktion den RI degradierte (Daten nicht aufgeführt).



**Abb. 13: RI Degradation durch nach Masse separierten Kallus Extrakten.** 330 ng RI wurden mit und ohne 290 µg (580 µg) Kallus Extrakt in MES Puffer (100 mM pH 7,5) 0h und über Nacht bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Zusätzlich wurden der RI mit nach Masse (<10 kDa; 10-50 kDa und >50 kDa) separierten Kallus Extrakten inkubiert. Vom <10 und 10-50 kDa Extrakten wurden insgesamt 280 µg eingesetzt, und vom Extrakt >50 kDa wurden 80 µg eingesetzt. Die Extrakte wurden mithilfe von Zentrifugen-Filtereinheiten separiert. Die Proben wurden dann mittels Western Blot mit RI-Antikörpern untersucht.

Nun wurde ein weiterer Kallus Extrakt in Essigsäure statt in MES-Puffer hergestellt. Dieser wurde durch Umkehrphasen-Chromatographie separiert, wie in Abb. 14 a dargestellt ist. Wie man erkennt, wurde sehr viel Kallus Extrakt auf die Säule gegeben, so dass das Chromatogramm keine klar abgegrenzten Peaks zeigt, was auch nicht gewollt war, da die Fraktionen möglichst viel Material enthalten sollten, um mit diesen weitere Versuche durchführen zu können. Die Fraktionen wurden komplett einkonzentriert, in 0,1 M TRIS, pH 8 resuspendiert und mit dem RI zusammen inkubiert. Hauptsächlich Fraktion 18, aber auch Fraktion 23 haben den RI nach dieser Prozedur noch abgebaut, wie der Western Blot in Abb. 14 b zeigt.

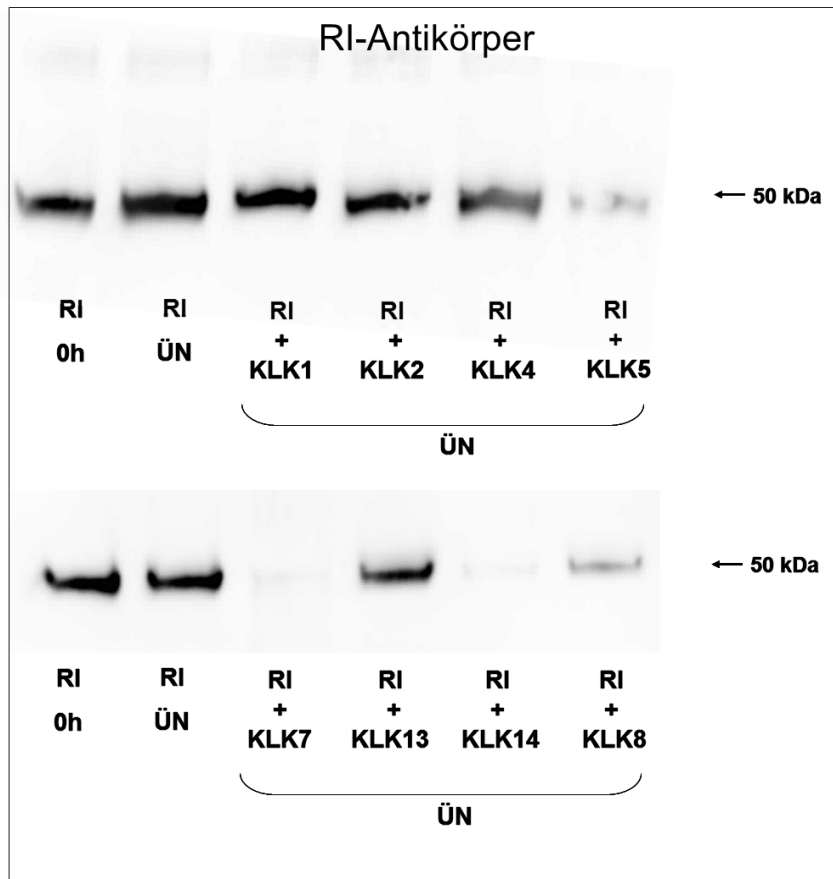




**Abb. 14 a und b: Kallus Extrakt Fraktionierung mittels Umkehrphasen-Chromatographie und Untersuchung der Fraktionen.** (a) Umkehrphasen-Chromatographie von 50 ml Kallus Extrakt. Äquiliibriert wurde mit H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA und eluiert mit einem Gradienten aus Acetonitril, 0,1% TFA. (b) Je 330 ng RI wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, leicht schüttelnd mit den Fraktionen, die vorerst in einer Vakuumzentrifuge einkonzentriert und dann in 0,1 M TRIS, pH 8 resuspendiert wurden. Die Proben wurden dann mittels Western Blot mit RI-Antikörpern untersucht.

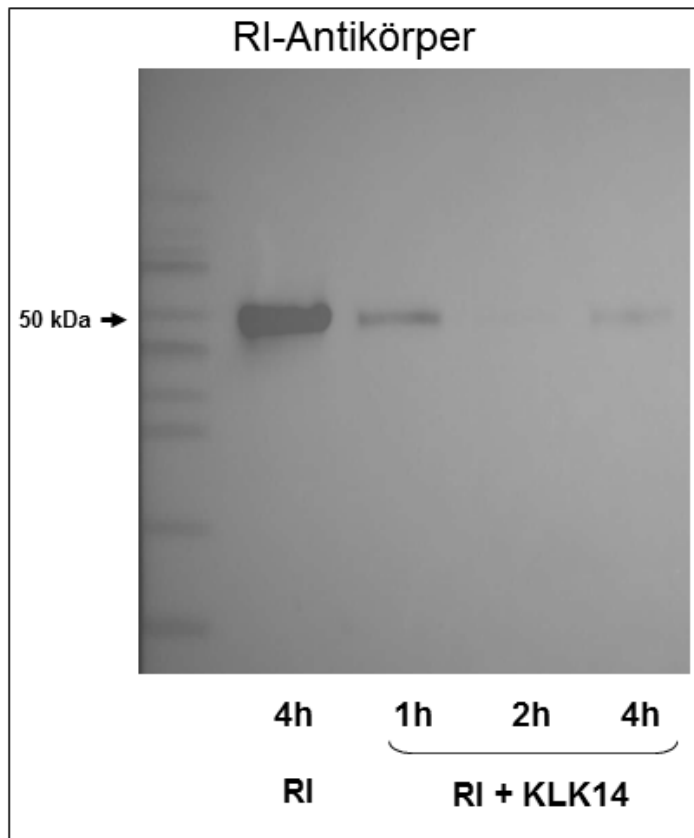
### 3.2.5 Der Ribonuklease-Inhibitor und Kallikreine

Da in Vorarbeiten spekuliert wurde, dass eventuell Serinproteasen aus der Kallikrein-Familie im *Stratum corneum* dazu beitragen könnten, den RI abzubauen<sup>[33]</sup>, wurden verschiedene Kallikreine auf ihre Fähigkeit überprüft, den RI abzubauen zu können. Typische Kallikreine der Haut sind Kallikrein 5, 7 und 14. Es ergab sich, dass hautrelevante Kallikreine (KLK 5, KLK 7 und KLK 14) den RI abbauten. Abb. 15 zeigt die entsprechenden Western Blots.



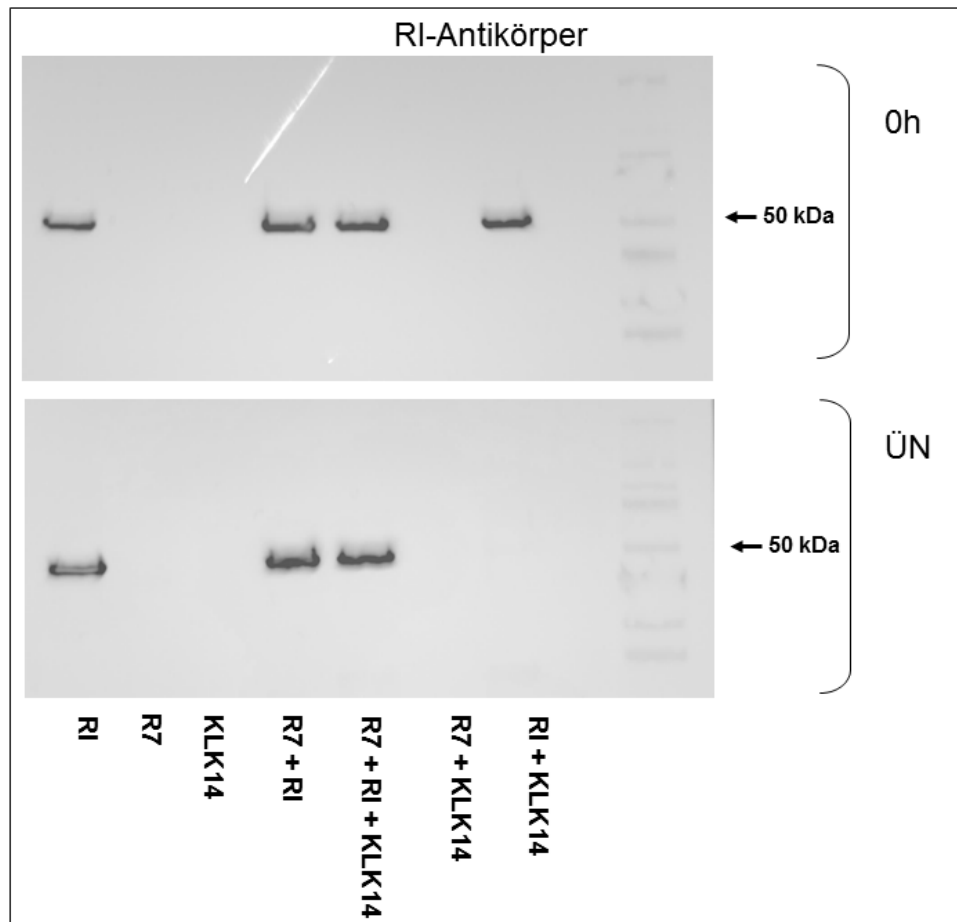
**Abb. 15: Der Ribonuklease-Inhibitor wird von verschiedenen Kallikreinen über Nacht degradiert.** RI (330 ng/Ansatz) wurden zusammen mit verschiedenen Kallikreinen über Nacht bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden dann mittels Western Blot mit RI-Antikörpern untersucht.

Stellvertretend für die hautrelevanten Kallikreine wurde der RI zusammen mit KLK 14 unterschiedlich lange inkubiert und in Abb. 16 sieht man, dass der RI zeitabhängig von KLK 14 degradiert wurde.



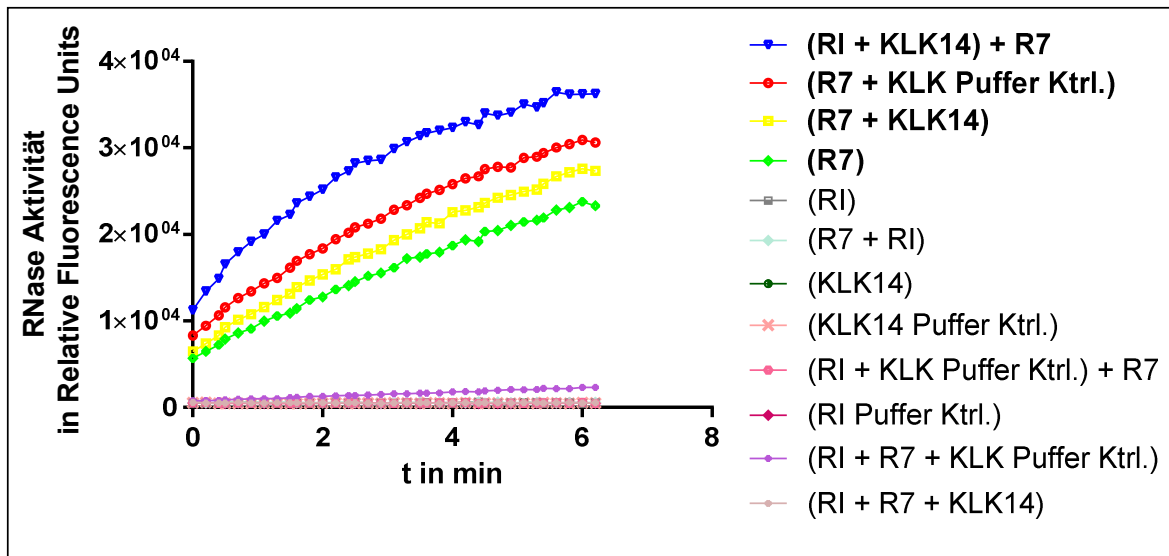
**Abb. 16: Der Ribonuklease-Inhibitor wird von Kallikrein-14 zeitabhängig degradiert.** RI (330 ng/Ansatz) wurde zusammen mit Kallikrein-14 (0,17  $\mu$ M/Ansatz) unterschiedlich lange bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden dann mittels Western Blot mit RI-Antikörpern untersucht.

Es wurde überlegt, ob die Bindung von RNase 7 an den RI einen Einfluss auf die Degradation des RI durch Kallikreine haben könnte. RNase 7 und der RI wurden vorinkubiert, bevor sie über Nacht zusammen mit KLK 14 inkubiert wurden. Im Western Blot in Abb. 17 ist zu erkennen, dass die Bindung zu RNase 7 den RI vor einem Abbau durch KLK 14 geschützt hat.



**Abb. 17: Kallikrein-14 degradiert den Ribonuklease-Inhibitor über Nacht, solange dieser nicht an RNase 7 gebunden ist.** RNase 7 (250 ng/Ansatz), RI (330 ng/Ansatz) wurden zusammen mit Kallikrein-14 (0,17  $\mu$ M/Ansatz) über Nacht bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden dann mittels Western Blot mit RI-Antikörpern untersucht.

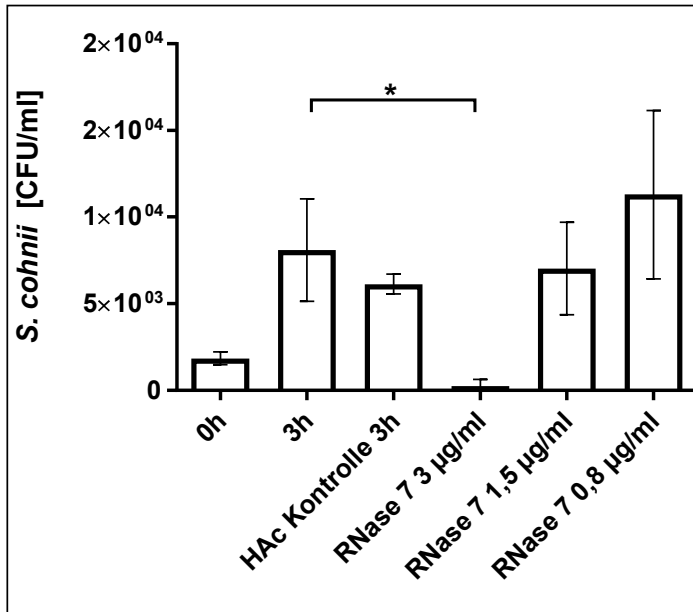
Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere Methode verifiziert. Mit Hilfe des Substrats 6-FAM-dArUdAdA-TAMRA, das von RNase 7 gespalten wird und dann beginnt zu fluoreszieren, war es zunächst möglich zu zeigen, dass, wenn RNase 7 und RI aneinander gebunden sind, das Substrat nicht mehr gespalten wird und nicht mehr fluoresziert, da die ribonuklease Aktivität der RNase 7 blockiert wurde. Als der RI allerdings mit KLK 14 ÜN vorinkubiert wurde und RNase 7 erst kurz vor dem Versuch hinzugegeben wurde, war der RI bereits degradiert und RNase 7 spaltete das Fluoreszenzsubstrat wieder. Wenn aber RI, RNase 7 und KLK 14 zusammen ÜN vorinkubiert wurden, war RNase 7 gebunden und konnte das Fluoreszenzsubstrat nicht spalten, wie Abb. 18 darstellt.



**Abb. 18: Kallikrein-14 degradiert den Ribonuklease-Inhibitor, sodass dieser nicht mehr die Ribonuklease Aktivität von RNase 7 inhibiert.** Das Substrat 6-FAM-dArUdAdA-TAMRA wird von Ribonukleasen gespalten und beginnt zu fluoreszieren. Für RNase 7 wurden 300 ng pro Ansatz eingesetzt, für den Ribonuklease-Inhibitor 330 ng und Kallikrein-14 mit 0,17  $\mu$ M. Die umklammerten Ansätze wurden für 6h bei 37°C inkubiert. Danach wurde zu zwei Proben noch RNase 7 (ausgeklammert) hinzugefügt und dann der RNase-Assay mit dem fluoreszierendem Substrat durchgeführt. Einfachheitshalber ist die Schrift der vier fluoreszierenden Ansätze in der Datenlegende fett aufgeführt.

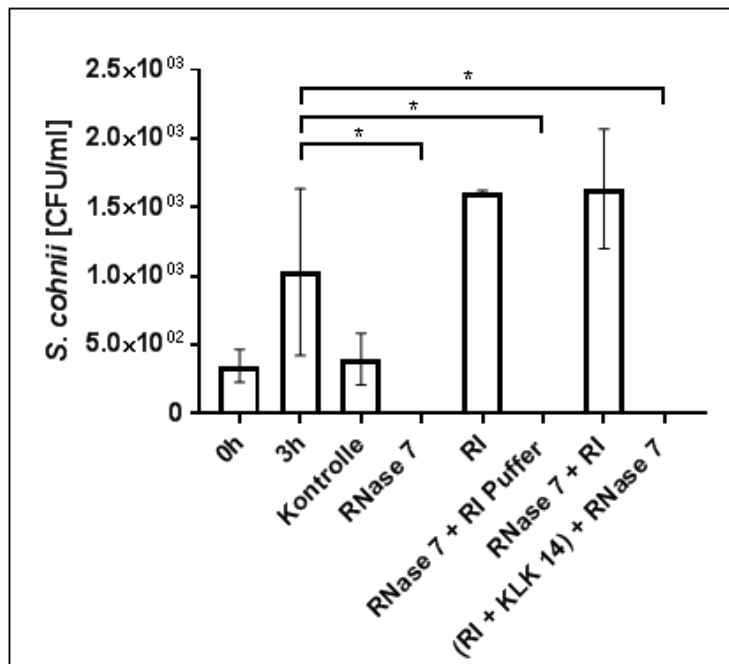
### 3.3 Der Ribonuklease-Inhibitor inhibiert die antimikrobielle Aktivität von RNase 7

RNase 7 besitzt zu ihrer Ribonuklease Aktivität auch eine starke antimikrobielle Aktivität gegen viele Bakterien, die bereits vielfach beschrieben wurde. Der antimikrobielle Test in Abb. 19 zeigt, dass das antimikrobielle Protein RNase 7 das grampositive Bakterium *S. cohnii* dosisabhängig eliminiert.



**Abb. 19: RNase 7 inhibiert das *S. cohnii* Wachstum dosisabhängig.** Verschiedene RNase 7 Konzentrationen (3 µg/ml; 1,5 µg/ml und 0,8 µg/ml) wurden bei 37 °C für 3 h mit  $1,8 \times 10^3$ /ml CFU von *S. cohnii* in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 wurde durch Ausplattieren der jeweiligen Ansätze auf TSB-Platten, Inkubation über Nacht bei 37 °C und Auszählung der CFU am übernächsten Tag bestimmt. Der Unpaired t-Test wurde zwischen dem 3h Wert und allen Proben durchgeführt. Die einzige Signifikanz ergab sich mit RNase 7 3 µg/ml.

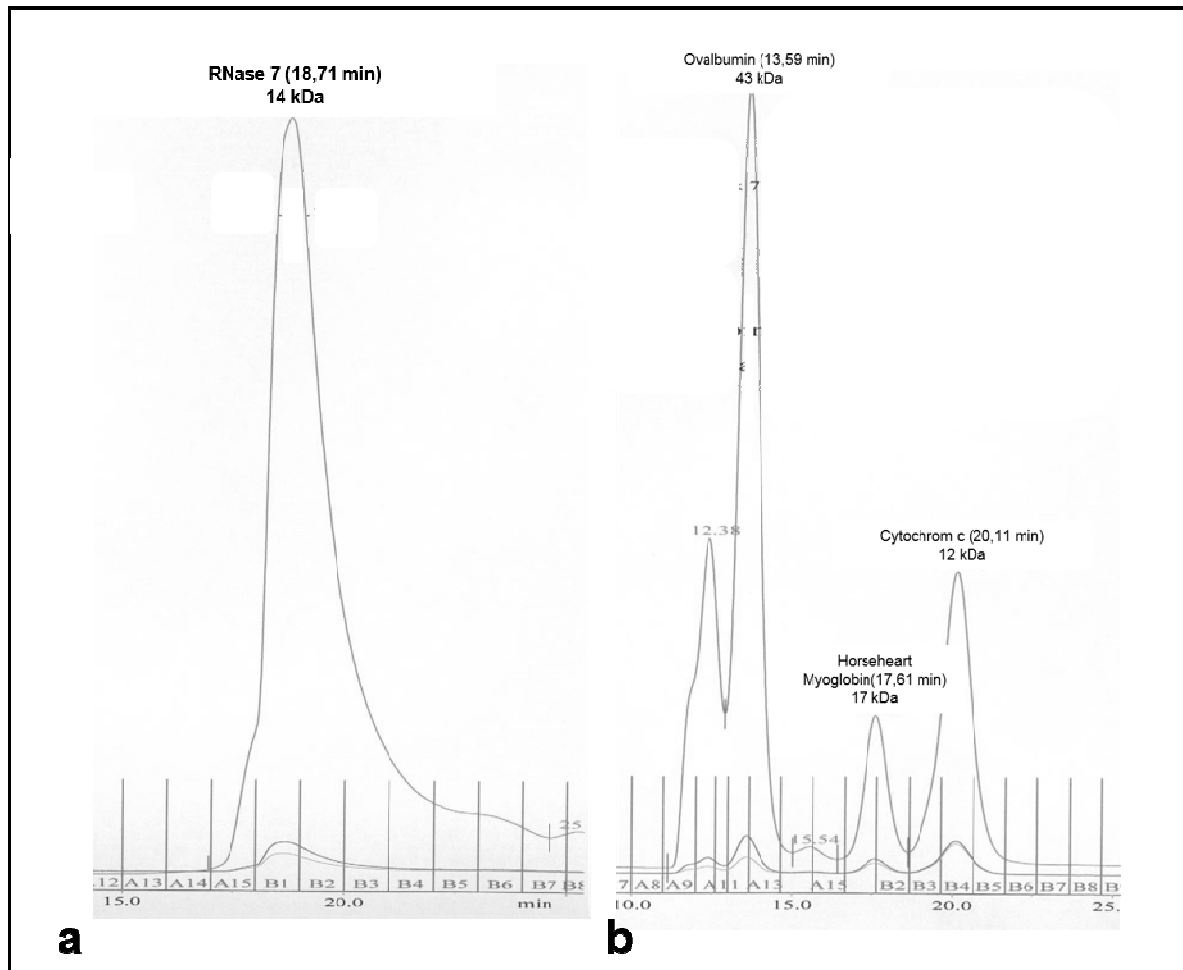
Es wurde bereits gezeigt, dass der RI in der Lage ist, die Ribonuklease Aktivität von RNase 7 zu blockieren. Nun wurde untersucht, ob der RI auch die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 unterbinden konnte. Abb. 20 legt dar, dass RNase 7 *S. cohnii* eliminiert, dieses aber nicht mehr tut, wenn RNase 7 und RI aneinander gebunden sind. Offensichtlich wurde die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 gehemmt. Wenn Kallikrein-14 und RI über Nacht bei 37°C vorinkubiert werden, ist es dem RI durch Degradation danach nicht mehr möglich, die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 zu blockieren.



**Abb. 20:** Nach über Nacht Inkubation vom RI und KLK 14 wird die antimikrobielle Wirkung von RNase 7 auf *S. cohnii* nicht mehr inhibiert. RNase 7 (6 µg/ml) wurde mit und ohne dem RI (6,6 µg/ml) über Nacht bei 37°C leicht schüttelnd vorinkubiert. Ebenfalls wurde Kallikrein-14 mit einer Konzentration von 0,17 µM mit dem RI vorinkubiert, und erst am nächsten Tag wurde RNase 7 zu diesem Ansatz hinzugefügt. Der Kontrollansatz enthielt die verwendeten Mengen 0,01% Essigsäure (HAc) und RI- und Kallikrein-14-Puffer. Alle Ansätze wurden dann bei 37 °C für 3 h mit  $6,9 \times 10^3$ /ml CFU von *S. cohnii* in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 wurde durch Ausplattieren der jeweiligen Ansätze auf TSB-Platten, Inkubation über Nacht bei 37 °C und Auszählung der CFU am übernächsten Tag bestimmt. Nur Kallikrein: Daten nicht gezeigt.

### 3.3.1 Keine Dimerisation von rekombinanter RNase 7

Um Effekte auszuschließen, die möglicherweise aus einer Dimerisation von RNase 7 resultieren, wurde eine Gelfiltration mit RNase 7 durchgeführt und eine Retentionszeit von 18,71 min festgestellt, wie Abb. 21 zeigt. Mit Cytochrom c wurde ebenfalls eine Gelfiltration durchgeführt und eine Retentionszeit von 18,15 min gemessen. Da beide Proteine ähnliche Größen aufweisen und ihre Retentionszeiten kaum voneinander abweichen, scheint RNase 7 als Monomer vorzuliegen.



**Abb. 21: Keine Dimerisation von rekombinanter RNase 7.** Retentionszeiten von (a) 20 µg RNase 7 und (b) 25 µg Ovalbumin, 40 µg Horseheart Myoglobin und 20 µg Cytochrom c. Die Proteine wurden durch eine Superdex 75 PC 3.2/30 Gelfiltrationssäule in PBS an einem ÄKTAMicro System analysiert. Die Retentionszeit von Horseheart Myoglobin mit 17,61 min und Cytochrom c mit 20,11 min lassen darauf schließen, dass RNase 7 als Monomer vorliegt, da die Retentionszeit von RNase 7 18,71 min beträgt und das Molekulargewicht geringer als das von Horseheart Myoglobin, aber größer als das von Cytochrom c ist.

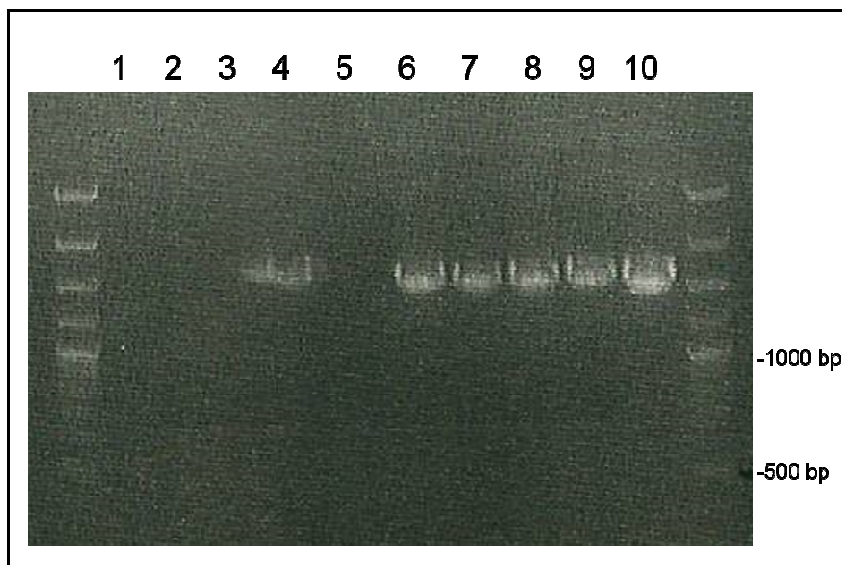
### 3.3.2 RNase 7 und der Ribonuklease-Inhibitor in Keratinozyten

#### 3.3.2.1 Herstellung des RNH1-Überexpressionsplasmids

Um eine mögliche Reaktion zwischen RI und RNase 7 in Keratinozyten feststellen zu können, wurde ein RNH1-Überexpressionsplamid hergestellt. Das RNH1 Gen wurde aus Keratinozyten cDNA mit spezifischen Oligonukleotiden vervielfältigt. Eine Agarose-Gelelektrophorese zeigt eine Größe von ungefähr 1.500 Basenpaaren der RI-DNA an. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in den pEF6/V5-His TOPO® Vektor ligiert und in *E.coli* DH5  $\alpha$  transformiert. Abb. 22 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese von Kontroll-PCRs.



Insgesamt enthalten sechs der zehn getesteten Klone das RNH1-Gen, was durch deren Banden bei 1500 Basenpaaren erkennbar ist.

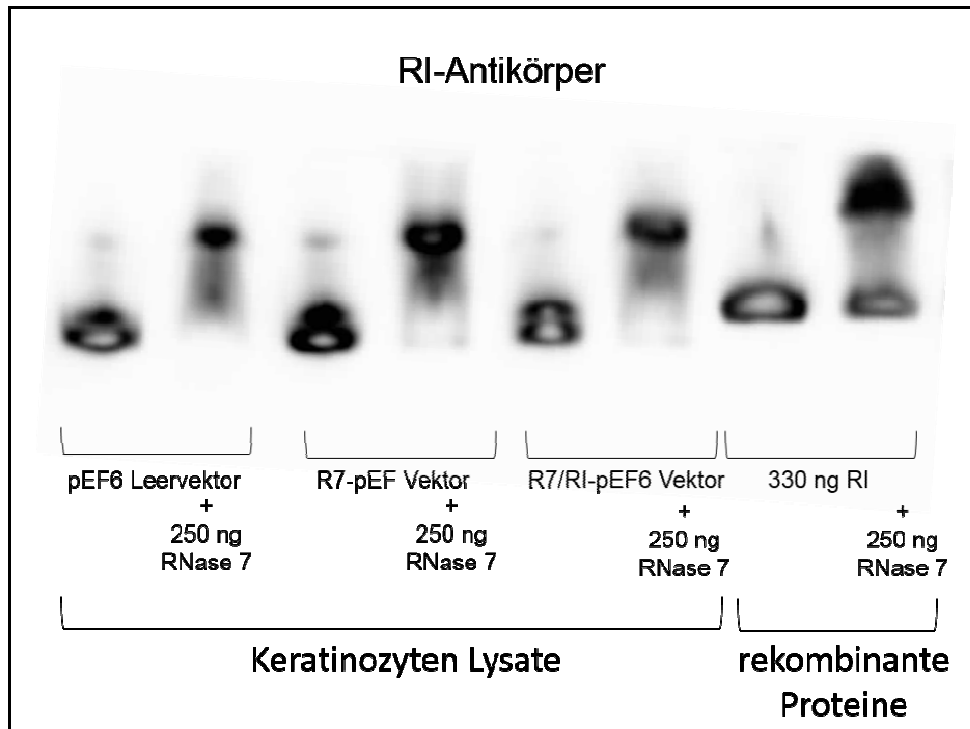


**Abb. 22: Selektion von RNH1-Gen enthaltener pEF6/V5-His TOPO® Vektoren in *E.coli* DH5 $\alpha$ -Kolonien.**

Der Klon aus Bahn 9 wurde in Kulturmedium vermehrt und das Plasmid mithilfe einer Plasmidpräparation isoliert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass das RNH1 Gen korrekt in den pEF6/V5-His TOPO® Vektor eingebaut wurde.

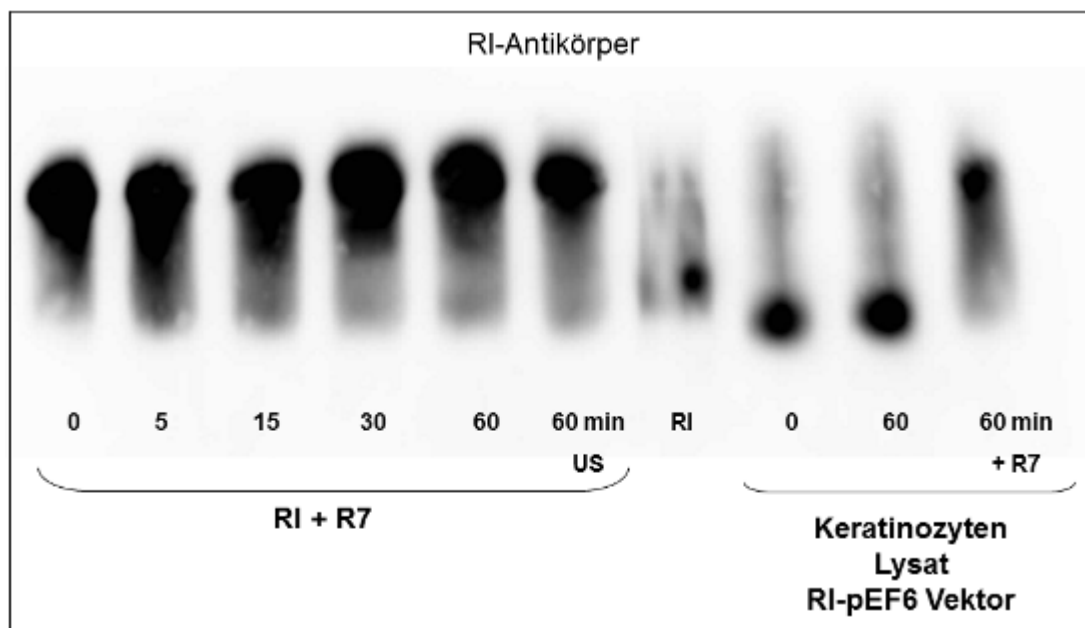
### 3.3.2.2 Untersuchungen zur Bindung von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor in Keratinozyten

Keratinozyten wurden mit R7-pEF6 und R7/RI-pEF 6 Überexpressionsplasmid behandelt. Aus den Keratinozyten wurden Lysate gewonnen, mit denen ein nativer Western Blot mit RI-Antikörpern durchgeführt wurde, wie Abb. 23 darstellt. Um die Lysat Banden besser beurteilen zu können, wurden parallel rekombinater RI und RI/RNase 7 Komplexe eingesetzt. Rekombinanter RI alleine erzeugte eine Bande, und der Komplex zeigte eine deutlich nach oben verschobene Bande. Alle Keratinozyten Lysate zeigten Banden auf Höhe des RI und keine Banden, die auf eine Komplexbildung hinweisen würden.



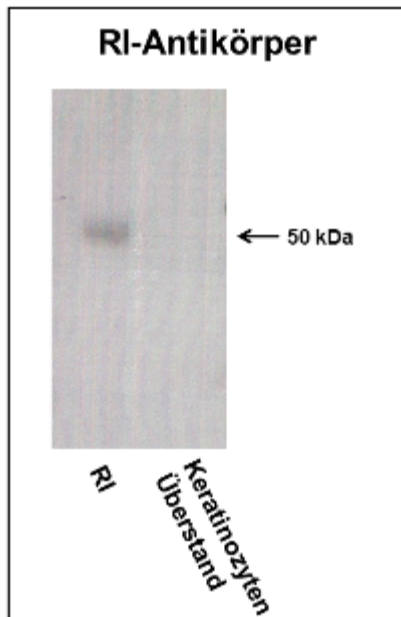
**Abb. 23: Der Ribonuklease-Inhibitor ist in Keratinozyten Lysaten im Gegensatz zu RNase 7 im Überschuss vorhanden.** Aus Keratinozyten, die zuvor mit Überexpressionsplasmiden (pEF6-Leervektor, R7-pEF6 Vektor und R7/RI-pEF6 Vektor) behandelt wurden, wurden Lysate hergestellt. Diese Lysate wurden dann mittels nativem Western Blots mit RI-Antikörpern untersucht. Zu jedem Lysat, wurde ein zweiter Ansatz aufgetragen, zu dem 250 ng rekombinante RNase 7 hinzugefügt wurden. Um die Bandenhöhen vergleichen zu können, wurden parallel rekombinante RNase 7 (250 ng) und Ribonuklease-Inhibitor (330 ng/Ansatz) inkubiert und auch auf dem Western Blot aufgetragen. Die Banden der Keratinozyten Lysate befinden sich auf der Höhe vom Ribonuklease-Inhibitor, solange keine zusätzliche RNase 7 hinzugefügt wurde.

Ferner wurde der Frage nachgegangen, wie lange RI und RNase 7 brauchen, um einen Komplex zu bilden. Hierfür wurde erneut ein nativer RI Western Blot durchgeführt mit rekombinaten RI und RNase 7, die unterschiedlich lange zusammen inkubiert wurden. Der Komplex bildet sich sofort und auch auf Eis. Er lässt sich auch nicht durch Ultraschall auseinanderbringen, wie Abb. 24 demonstriert. Keratinozyten Lysate, die mit RI überexprimiert wurden, wurden 0 und 60 min bei RT inkubiert. Die Banden befinden sich auf der Höhe des RI. Einer Lysat Probe wurde für 60 min rekombinante RNase 7 hinzugefügt, und die Bande zeigt, dass sich ein Komplex gebildet hat.



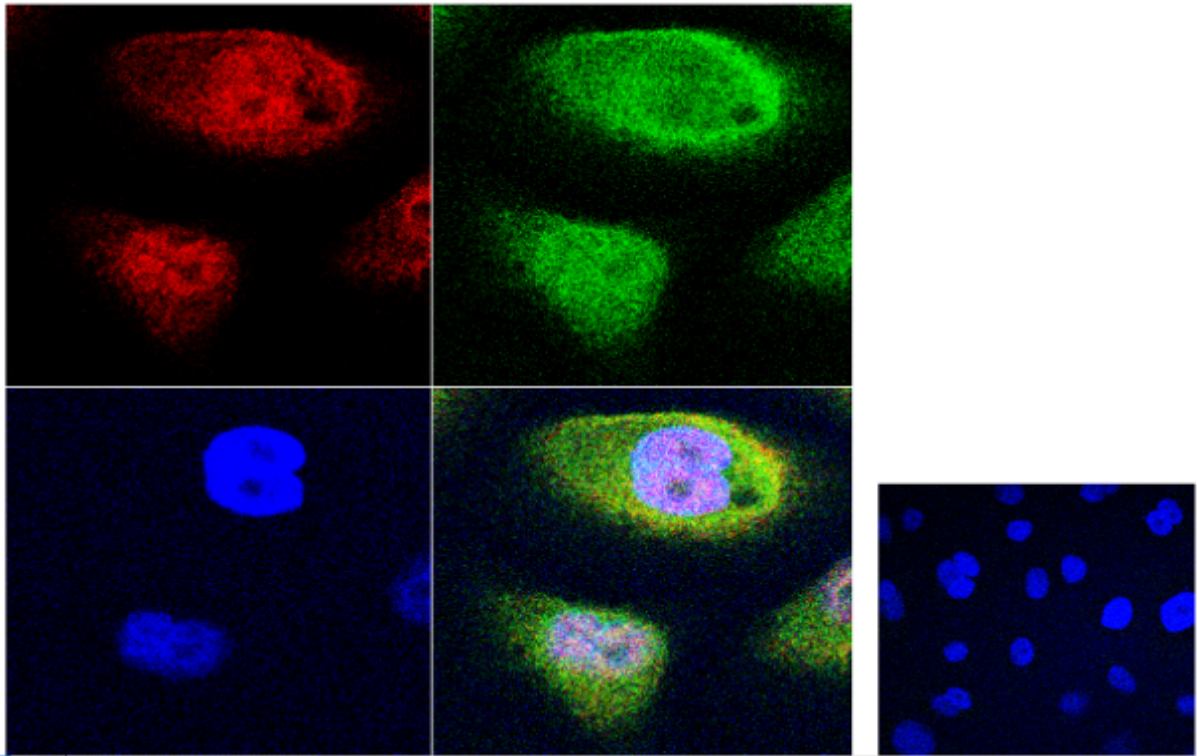
**Abb. 24: Obwohl der Ribonuklease-Inhibitor und RNase 7 sofort aneinander binden würden, ist der Ribonuklease-Inhibitor nicht mit RNase 7 abgesättigt in Keratinozyten Lysaten.** Rekombinante RNase 7 (200 ng/Ansatz) und Ribonuklease-Inhibitor (250 ng/Ansatz) wurden unterschiedlich lange inkubiert und eine Probe nach 60 min Inkubation mit Ultraschall behandelt. Parallel wurden Lysate aus Keratinozyten hergestellt, die zuvor mit RI-pEF6 Vektor behandelt wurden. Das Lysat wurde zum einen sofort eingesetzt und zum anderen für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ebenfalls wurde dem Lysat 200 ng für 60 min rekombinante RNase 7 hinzugegeben, was zu einer Bandenverschiebung führte. Die Proben wurden dann mittels nativem Western Blots mit RI-Antikörpern untersucht.

In den Keratinozyten Lysaten ließ sich der RI sehr gut detektieren. Es stellte sich die Frage, ob der RI auch von Keratinozyten sezerniert wird wie RNase 7. Dafür wurde eine Acrylamid-Gelelektrophorese mit Keratinozyten Überständen durchgeführt und wie Abb. 25 zeigt, befand sich kein detektierbarer RI in den Überständen.



**Abb. 25: Der RI wird von Keratinozyten nicht sezerniert.** Der RI war in Keratinozyten Überständen nicht zu detektieren. In der linken Spur wurden 330 ng rekombinanter RI eingesetzt und in der rechten Spur 20  $\mu$ l Keratinozyten Überstand. In vergleichbaren Mengen an Keratinozyten Lysat wurde der hingegen immer detektiert. Die Proben wurden mittels Acrlamid-Gelelektrophorese mit RI-Antikörpern untersucht.

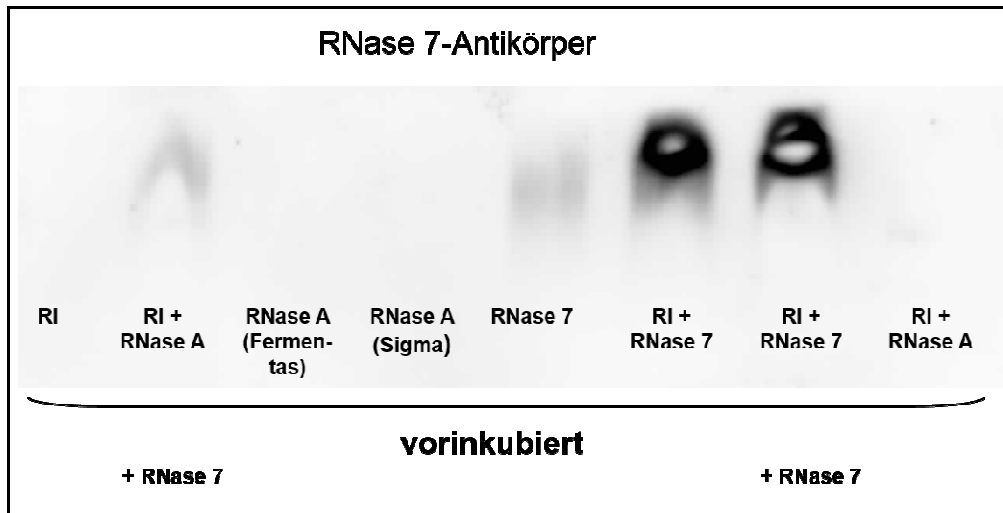
Um sich ein Bild davon machen zu können, wie RNase 7 und RI *in vitro* verteilt sind, wurden die Proteine in Keratinozyten mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. In Abb. 26 wurde der RI mit rotem Farbstoff und RNase 7 mit grünem Farbstoff gekennzeichnet. Der RI befand sich im Zytosol und konzentrierter im Nukleus, wo RNase 7 kaum detektiert wurde. Eine Überlagerung der Bilder von RNase 7 und dem RI zeigte, dass die Proteine sich zum Teil an denselben Bereichen in der Zelle befanden.



**Abb. 26: Keratinozyten markiert mit fluoreszierenden Antikörpern von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor.** Von links nach rechts: Auf dem ersten Bild ist der Ribonuklease-Inhibitor rot markiert. Auf dem zweiten Bild ist RNase 7 grün markiert, und auf dem dritten Bild sind die Zellkerne blau gefärbt. Auf dem vierten Bild sind alle Färbungen überlagert. Das kleine Bild zeigt eine Kontrolle bei der nur die sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor eingesetzt wurden und die Zellkerne gefärbt sind. es handelt sich hierbei um 63fach vergrößerte Aufnahmen eines Konfokalmikroskops (Zeiss LSM 510).

### 3.3.2.3 Nur der freie Ribonuklease-Inhibitor bindet RNase 7

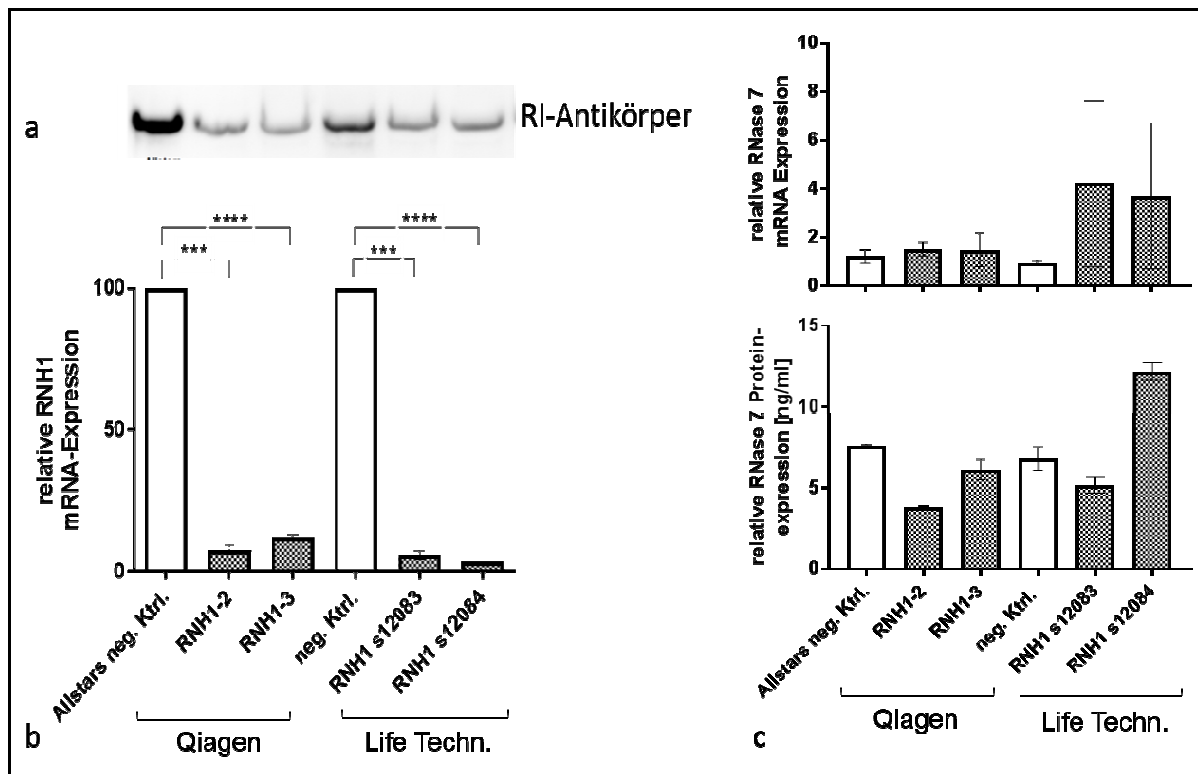
Ein weiterer nativer Western Blot mit RI-Antikörpern klärte, dass RI und RNase 7 nur dann einen Komplex bilden, wenn der RI ungebunden vorliegt. Ist der RI bereits an RNase A gebunden, bindet danach hinzugefügte RNase 7 nicht mehr wie Abb. 27 zeigt.



**Abb. 27: Der Ribonuklease-Inhibitor kann RNase 7 nur binden, wenn dieser noch ungebunden ist.** Es wurde rekombinante RNase 7 (250 ng/Ansatz) und RNase A (500 ng/Ansatz) mit dem Ribonuklease-Inhibitor (330 ng/Ansatz) vorinkubiert für eine Stunde und dann RNase 7 hinzugegeben. Die Proben wurden mittels nativem Western Blots mit RNase 7-Antikörpern untersucht. Ribonuklease-Inhibitor vorinkubiert mit RNase 7 und erneuter RNase 7 Zugabe zeigt eine Bande, wohingegen Ribonuklease-Inhibitor vorinkubiert mit RNase A und RNase 7 Zugabe nur eine sehr schwache Bande zeigt. Der Ribonuklease-Inhibitor war bereits mit RNase A abgesättigt und ist nicht mehr in der Lage noch mehr RNase 7 zu binden.

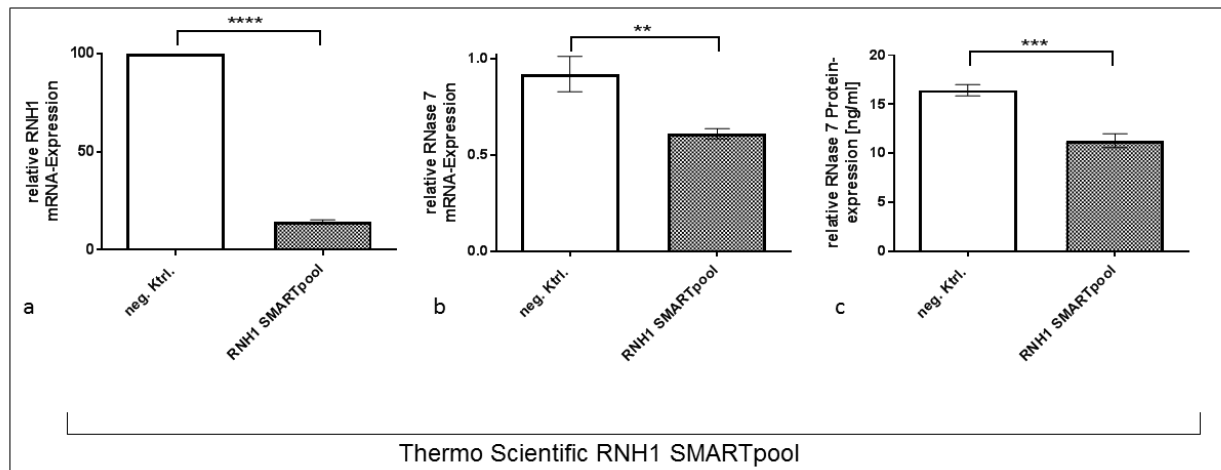
### 3.4 Einfluss des RHN1-Gens auf RNase 7

Die vorherigen Kapitel zeigten, dass der RI und RNase 7 in der Lage sind, einen Komplex zu bilden und in Keratinozyten nachweisbar waren. Ein möglicher Einfluss des RI auf die RNase 7 Genexpression und Proteinseznierung sollte ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein siRNA System etabliert, welches die Ribonuklease-Inhibitor (*RNH1*) mRNA Expression stark herabreguliert. Abb. 28 a und b zeigen, dass der Einsatz je zweier verschiedener *RNH1* siRNAs von zwei verschiedenen Herstellern (Qiagen und Life Technologies) im Gegensatz zur Kontroll siRNA zu einer verminderten *RNH1* mRNA- und Proteinexpression führen. Ebenfalls wurde die RNase 7 mRNA- und Proteinexpression untersucht. Die RNase 7 mRNA Expression steigt bei allen vier *RNH1* siRNAs an (Abb. 28 c). Die RNase 7 Proteinexpression wird für Qiagen *RNH1*-2 und *RNH1*-3 und für Life Technology *RNH1* siRNA s12083 geringer und für die *RNH1* si RNA s12084 von Life Technology mehr, wie Abb. 28 c zeigt.



**Abb. 28 a, b und c:** Der Einsatz von RNH1 siRNA in Keratinozyten führt zu einer geringeren Ribonuklease-Inhibitor (a) Protein- und (b) mRNA-Expression (c) sowie zu einer nicht reproduzierbaren oder herstellerübergreifenden RNase 7 mRNA- und Proteinexpression. Durch spezifische siRNAs wurde das RNH1 Gen in Keratinozyten mindestens um 80% herabreguliert. (a) Aus den Keratinozyten wurden Lysate hergestellt, deren Proteingehalt gemessen und je gleich viel Protein für die Vergleichbarkeit in einem Western Blot mit RI-Antikörpern eingesetzt wurde. Die Banden der mit RNH1 siRNA behandelten Lysate sind sehr viel dünner und zeigen eine geringere Menge an Ribonuklease-Inhibitor auf. (b) Die Grafik zeigt den RNH1 mRNA Knockdown der mit RNH1 siRNA behandelten Keratinozyten. (c) Die RNase 7 mRNA Expression wurde durch den Einsatz der RNH1 siRNA verstärkt, wohingegen die RNase 7 Proteinexpression von Qiagen RNH1-2 und RNH1-3 und für Life Technology RNH1 siRNA s12083 geringer und für die RNH1 siRNA s12084 von Life Technology mehr wurde. Hier wurde ein Experiment mit Doppelwerten ausgewertet.

Wegen nicht reproduzierbarer und nicht einheitlichen Ergebnissen der verschiedenen siRNAs wurde ein dritter Hersteller für siRNA hinzugezogen. Von Thermo Scientific wurde die RNH1 SMARTpool siRNA eingesetzt. Abb. 29 zeigt den hohen „Knockdown“ vom RNH1 Gen durch den Einsatz der spezifischen siRNA. Abb. 29 b und c zeigen eine geringere RNase 7 mRNA- und Proteinexpression durch den Einsatz der RNH1 siRNA.

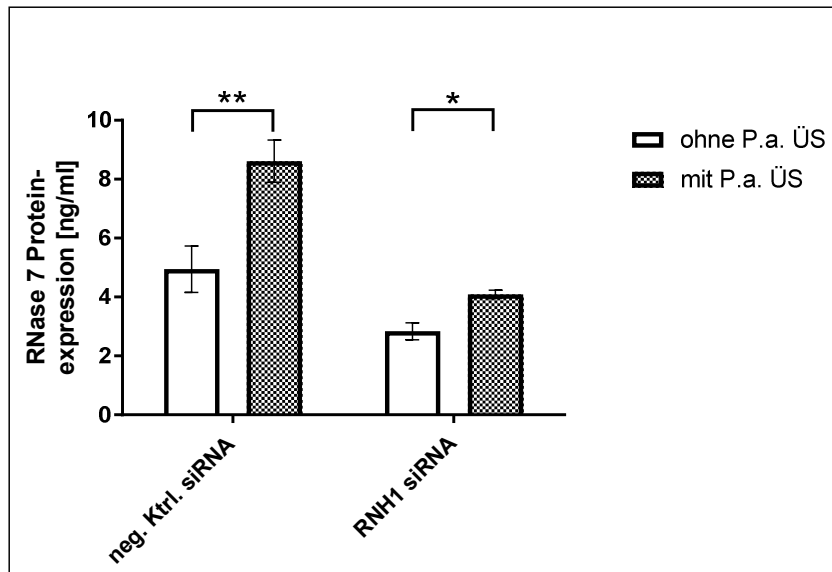


**Abb. 29: Der Einsatz von Thermo Scientific RNH1 SMARTpool siRNA in Keratinozyten führt zu einer geringeren Ribonuklease-Inhibitor (a) mRNA-Expression (b und c) sowie zu einer nicht reproduzierbaren geringeren RNase 7 mRNA- und Proteinexpression.** Durch spezifische siRNA wurde das RNH1 Gen in Keratinozyten um 85% herabreguliert. (a) Die Grafik zeigt den RNH1 mRNA Knockdown der mit RNH1 siRNA behandelten Keratinozyten. (b) Die RNase 7 mRNA Expression wurde durch den Einsatz der RNH1 siRNA verringert (c) genauso wie die RNase 7 Proteinexpression. Hier wurde ein Experiment mit Dreifachwerten ausgewertet und die Statistik durch den ungepaarten t-Test berechnet.

In vielen wiederholten Experimenten wurde RNH1 siRNA von verschiedenen Herstellern eingesetzt und der Einfluss auf die RNase 7 mRNA Expression und Proteinexpression untersucht. Abb. 28 und Abb. 29 zeigen typische Beispiele für unterschiedliche Ergebnisse der RNase 7 mRNA- und Proteinexpression während des Gebrauchs von RNH1 siRNA. Ein signifikanter, herstellerübergreifender Einfluss der RNH1 siRNA war nicht zu ermitteln, wobei es häufig zu einer geringeren RNase 7 Proteinexpression durch die Anwendung der siRNA kam.

Es ist bekannt, dass der Kontakt mit bestimmten Bakterien eine erhöhte RNase 7 Induktion von Keratinozyten auslöst. In Abb. 30 wurden Keratinozyten zunächst mit RNH1 siRNA behandelt und dann mit *Pseudomonas aeruginosa* Überstand (P.a. ÜS) stimuliert. Es wird deutlich, dass die RNase 7 Proteinexpression durch den P.a. ÜS sowohl in Keratinozyten, die mit Kontroll siRNA behandelt wurden, als auch durch Keratinozyten, die mit RNH1 siRNA behandelt wurden, vermehrt wird. Überdies verringert sich die RNase 7 Proteinexpression mit dem Einsatz der RNH1 siRNA im Gegensatz zur Kontrolle. Auch für dieses Experiment wurden die siRNAs aller drei Hersteller getestet mit nicht reproduzierbaren Ergebnissen für die RNH1 siRNAs. Ein spezifischer Einfluss der mit RNH1 siRNA behandelten Keratinozyten ist nicht auszumachen.





**Abb. 30: *P.aeruginosa* Überstand induziert die RNase 7 Proteinexpression in Keratinozyten.** Durch eine spezifische siRNA wurde das RNH1 Gen in Keratinozyten herabreguliert. Die Grafik zeigt eine geringere RNase 7 Proteinexpression der mit RNH1 siRNA behandelten Keratinozyten, abhängig von einer Stimulation mit *P. aeruginosa* (P.a). ÜS. Die verschiedenen RNH1 siRNAs der drei Hersteller lieferten auch für diesen Versuch keine reproduzierbaren und einheitlichen Ergebnisse.

### 3.4.1 Untersuchungen zur möglichen potenzierten RNase 7 Proteinexpression durch Caspase-1

Die Publikation von Keller *et al.* [31] weist darauf hin, dass die RNase 7 Proteinexpression über IL-1 $\beta$ , also möglicherweise indirekt durch Caspase-1 reguliert wird. Dieser Hypothese wurde nachgegangen und es wurde untersucht, ob Caspase-1 somit auch eine Bedeutung für den RI hat. Außerdem ist bekannt, dass die RNase 7 Proteinexpression von Keratinozyten nicht nur durch Bakterien, sondern auch durch UVB induziert wird [32]. Zusammenhänge dieser Publikationen und Hypothesen wurden untersucht.

#### 3.4.1.1 Untersuchung zur potentiellen Spaltung des Ribonuklease-Inhibitors durch Caspase-1

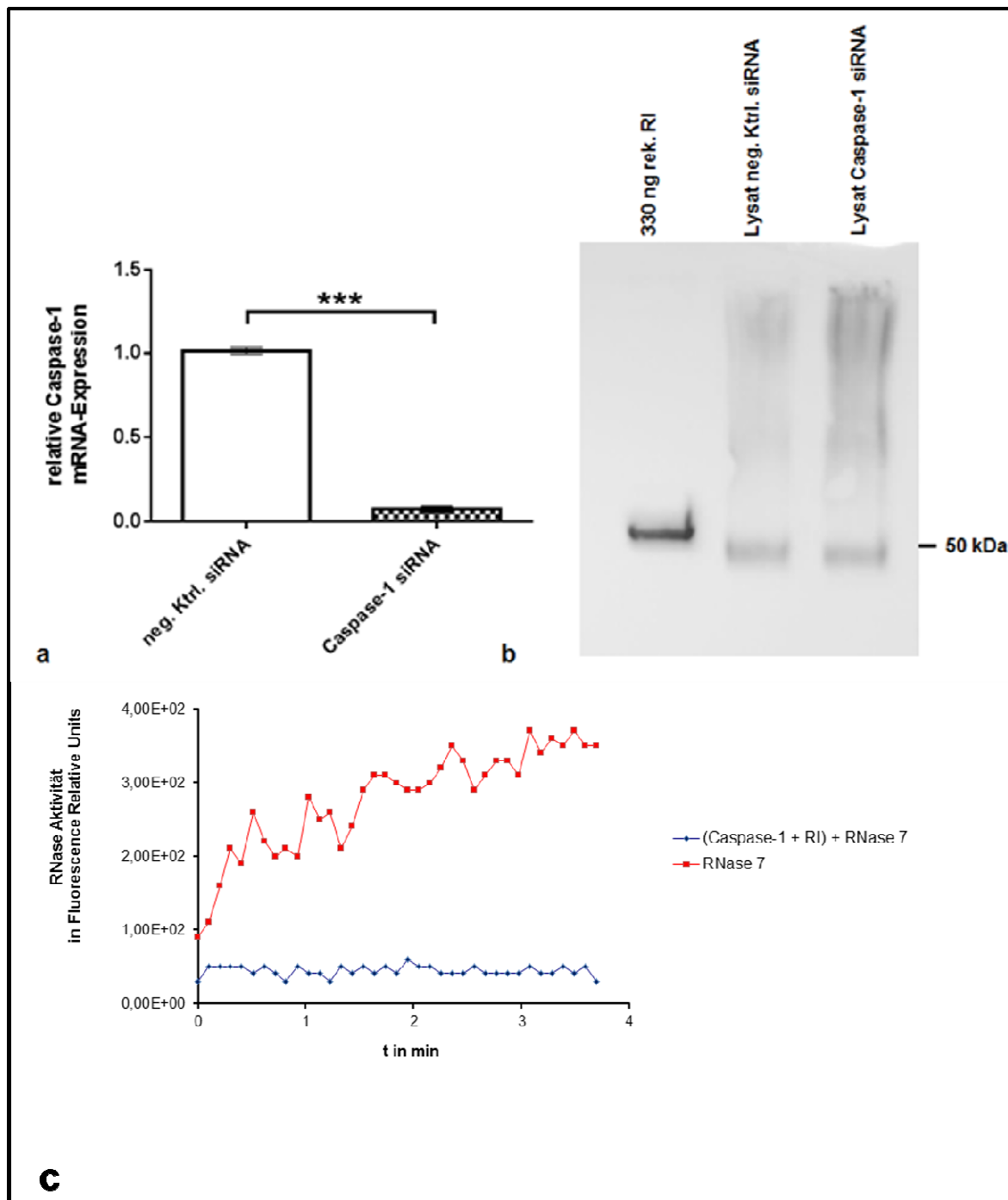
Bereits 2009 erwog Zasloff [33] die Möglichkeit, dass RI und RNase 7 in tieferen Hautschichten als Komplex vorkämen und der RI durch Proteasen im *Stratum corneum* degradiert würde und RNase 7 ungebunden an der Hautoberfläche als aktives AMP gegen Bakterien agieren könne.

Abb. 31 stellt durch eine Schnittstellenanalyse mit PeptideCutter dar, dass der RI eine Schnittstelle für Caspase-1 aufweist, die sich in einer Region befindet, die für die Interaktion zwischen RI und RNasen wichtig ist.



**Abb. 31: Der Ribonuklease-Inhibitor weist eine putative Schnittstelle für Caspase-1 auf.** Diese Proteolyse würde in dem Verlust von 80 C-terminalen Aminosäuren des RI resultieren, eine Region, die für die Interaktion des RI mit RNasen wichtig ist. Die Schnittstellenanalyse wurde mit PeptideCutter, einer Software von Swiss Institute of Bioinformatics, erstellt

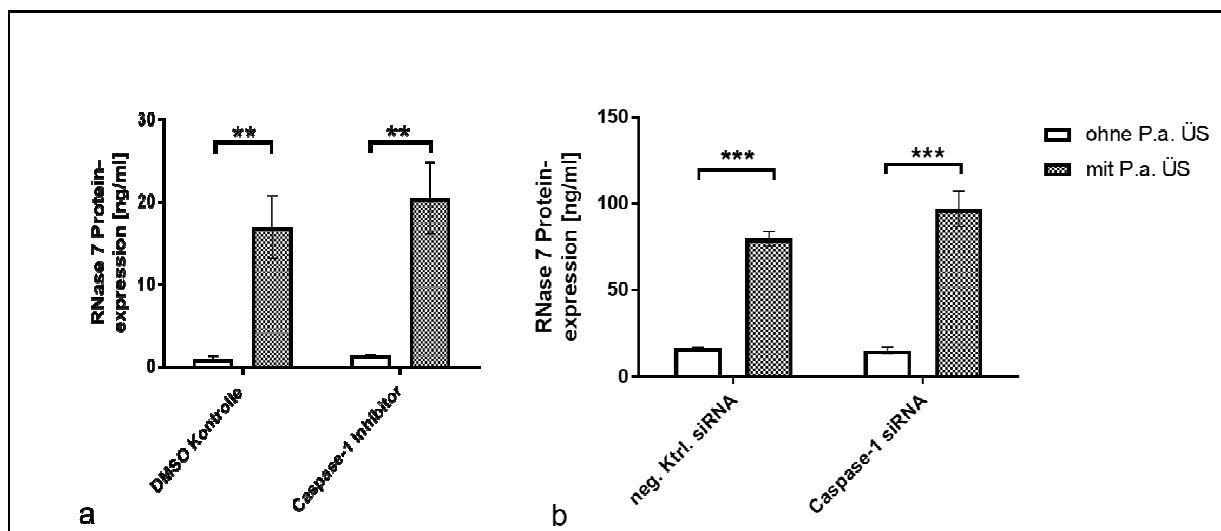
Die Caspase-1 mRNA Expression wurde durch siRNA in Keratinozyten herabreguliert und deren Lysate mit einem Western Blot und RI Antikörpern analysiert. Abb. 32 a demonstriert den Knockdown durch die Caspase-1 siRNA und Abb. 32 b zeigt, dass der RI in den Keratinozyten Lysaten sowohl in der Kontrollen als auch in den mit Caspase-1 siRNA behandelten Proben in seiner 50 kDa Form vorhanden ist und nicht degradiert wurde.



**Abb. 32 a, b und c: Untersuchungen zur Beeinflussung des Ribonuklease-Inhibitors durch Caspase-1.** Keratinozyten wurden für 24 h mit Caspase-1 siRNA behandelt. (a) Die Caspase-1 mRNA Expression wurde mittels "real-time"-PCR-Analyse untersucht. Gezeigt ist die relative Caspase-1 mRNA-Expression im Vergleich zu der mRNA-Expression vom ribosomalen Protein 38 (RP38). Der Einsatz der spezifischen siRNA führte zu einem Knockdown von über 90%. Die Daten repräsentieren Doppelwerte. (b) Lysate der Keratinozyten wurden in einem Western Blot mit Ribonuklease-Inhibitor Antikörpern untersucht. Der Ribonuklease-Inhibitor scheint sowohl in dem mit Kontroll siRNA als auch in dem mit Caspase-1 siRNA behandelten Lysat hauptsächlich in seiner 50 kDa Form vorhanden zu sein. (c) Das Substrat 6-FAM-dArUdAdA-TAMRA wird von Ribonukleasen gespalten und beginnt zu fluoreszieren. Der RI wurde zunächst mit Caspase-1 vorinkubiert, bevor dieser mit RNase 7 inkubiert wurde und ein Fluoreszenz-Assay durchgeführt wurde. Das Ergebnis zeigt, dass RNase 7 noch vom RI gehemmt wird, der demnach nicht zuvor von Caspase-1 zerschnitten wurde.

### 3.4.1.2 Einfluss von Caspase-1 auf die RNase 7 Proteinexpression mittels *Pseudomonas aeruginosa* Überstand

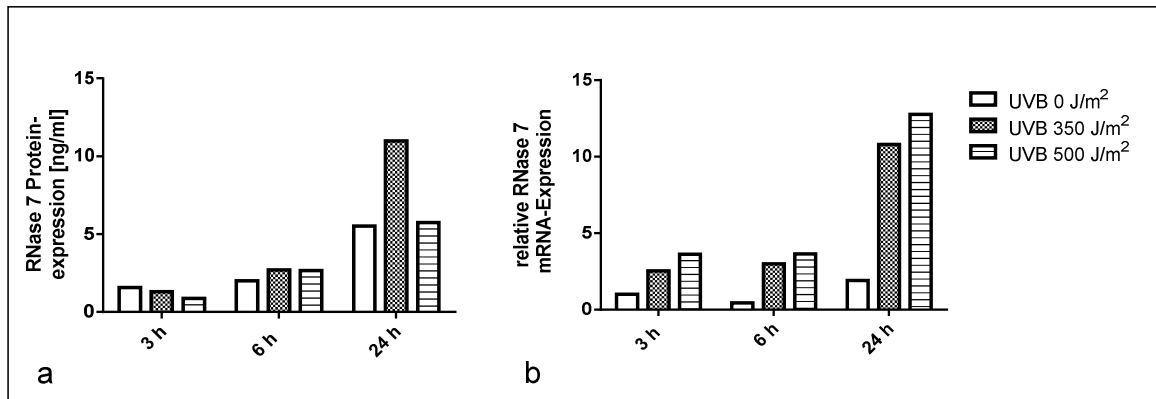
Keratinocyten wurden mit Caspase-1 Inhibitor behandelt und mit P.a. ÜS stimuliert, um einen möglichen Effekt von Caspase-1 auf die RNase 7 Proteinexpression festzustellen. Der Inhibitor ac-YVAD-cmk inhibiert das Caspase-1 Protein irreversibel. In Abb. 33 a wird deutlich, dass der P.a. ÜS die RNase 7 Proteinexpression stark induziert, sich aber keine Signifikanzen zwischen dem Einsatz des Caspase Inhibitors und der Kontrolle ergeben. Abb. 33 b zeigt einen ähnlichen Versuch wie Abb. 33 a, allerdings wurde statt des Caspase-1 Inhibitors Caspase-1 siRNA eingesetzt. Das Caspase-1 Protein wurde nicht inhibiert, sondern die Genexpression herabreguliert. Auch hier ließ sich eine stark induzierte RNase 7 Proteinexpression durch P.a. ÜS detektieren, aber kein signifikanter Unterschied zwischen dem Einsatz von Caspase-1 siRNA oder der Kontroll siRNA ermitteln.



**Abb. 33 a und b: Überstände von *Pseudomonas aeruginosa* induzieren die RNase 7 Proteinproduktion in primären Keratinocyten, die zusätzlich (a) mit einem Caspase-1 Inhibitor oder (b) Caspase-1 siRNA behandelt wurden.** (a) Primäre Keratinocyten wurden für sechs Stunden mit dem Caspase-1 Inhibitor (ac-YVAD-cmk) vorinkubiert und dann weitere 22 h mit dem Inhibitor und Überständen adhären gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen behandelt. (b) Keratinocyten wurden für 20 h mit siRNA behandelt und 72 h später wurden die Keratinocyten über Nacht mit den Überständen adhären gewachsener *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend mittels ELISA in Hinblick auf RNase 7 Proteinexpression analysiert.

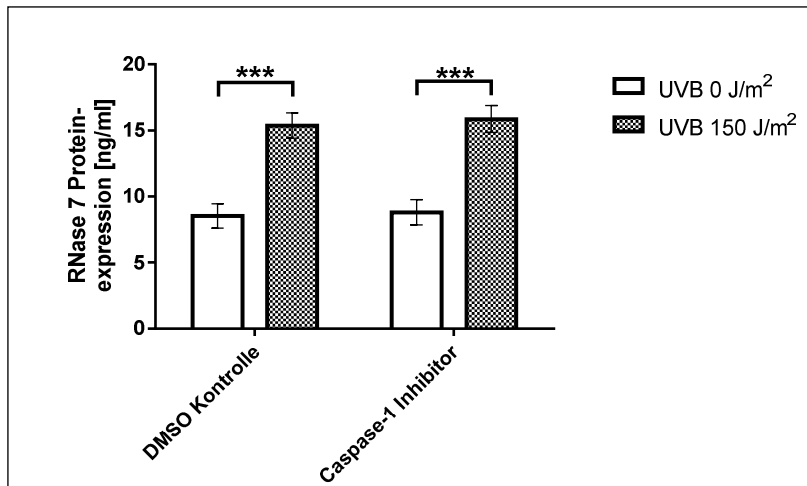
### 3.4.1.3 Einfluss von Caspase-1 auf die RNase 7 Proteinexpression mittels Ultraviolettstrahlung

Zunächst wurde, wie Abb. 34 veranschaulicht, untersucht wieviel UVB benötigt wird, um eine RNase 7 Induktion in Keratinozyten zu erlangen und wie lange es dauert, bis diese erfolgt. Eine UVB von 350-500 J/m<sup>2</sup> reichte bereits aus, um 24 h nach der Bestrahlung eine RNase 7 Induktion sowohl in der Gen- als auch in der Proteinexpression zu erreichen.



**Abb. 34 a und b: UVB Bestrahlung induziert die RNase 7 Protein- und mRNA-Expression in Keratinozyten zeit- und dosisabhängig.** Primäre Keratinozyten wurden mit 0, 350 und 500 J/m<sup>2</sup> Ultraviolettstrahlung behandelt und dann weitere 3, 6 und 24 h inkubiert. (a) Die Zellkulturüberstände wurden im ELISA in Hinblick auf RNase 7 Proteinexpression analysiert. (b) Die RNase 7 mRNA Expression wurde mittels "real-time"-PCR-Analyse untersucht. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression im Vergleich zu der mRNA-Expression vom human acidic ribosomal protein (hARP). Die Daten repräsentieren ein Experiment mit Einzelwerten.

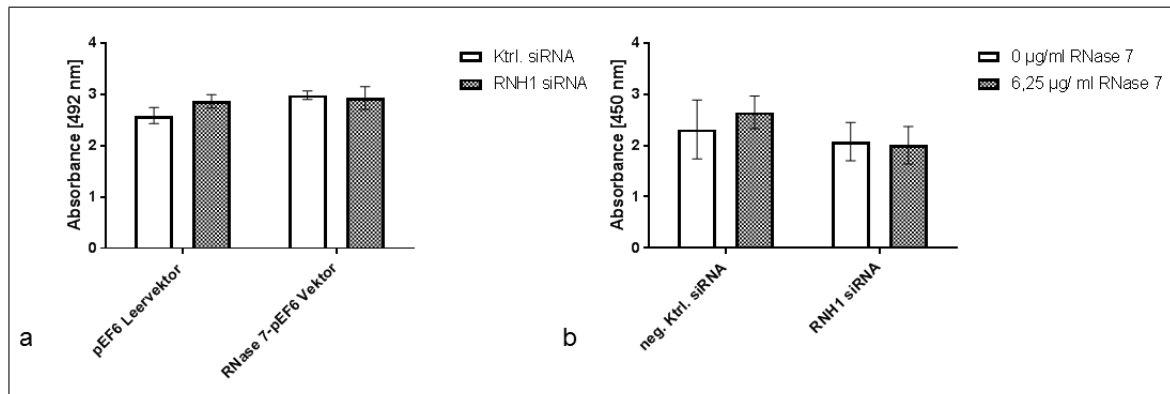
Keratinozyten wurden mit UVB behandelt und gleichzeitig mit dem Caspase-1 Inhibitor inkubiert. Ähnlich wie zuvor im Experiment mit der Stimulation durch P.a. ÜS, wird durch UVB die RNase 7 Proteinexpression induziert, aber es lässt sich kein signifikanter Einfluss des Caspase-1 Inhibitors erkennen (siehe Abb. 35).



**Abb. 35: UVB Bestrahlung induziert die RNase 7 Proteinproduktion in primären Keratinozyten, die zusätzlich mit einem Caspase-1 Inhibitor behandelt wurden.** Primäre Keratinozyten wurden für 6 h mit dem Caspase-1 Inhibitor vorinkubiert und dann mit 150 J/m<sup>2</sup> Ultraviolettstrahlung behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden nach weiteren 17 h Inkubation mit dem Caspase-1 Inhibitor mittels ELISA in Hinblick auf RNase 7 Proteinexpression analysiert.

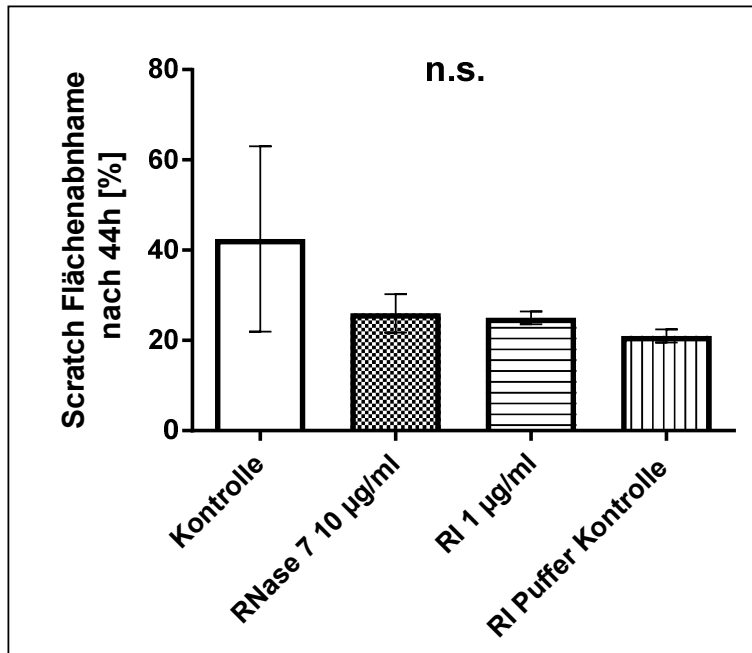
### 3.5 Untersuchungen zur Inhibierung einer potentiell zytotoxischen Aktivität von RNase 7 durch den Ribonuklease-Inhibitor

RNase 7 ist es möglich RNA zu degradieren, und diese Funktion könnte schädigende Wirkungen auf Keratinozyten haben. Da der RI die Ribonuklease Aktivität von RNase 7 blockieren kann, wurde nachgeforscht, ob der RI die Zelle vor einer potentiellen zytotoxischen Aktivität durch RNase 7 schützen kann, indem er einen Komplex mit RNase 7 bildet. Darum wurden in Abb. 36 a HaCaT Zellen mit einem stabil transfizierten RNase 7-pEF6 Vektor zusätzlich mit RNH1 siRNA behandelt und schließlich ein LDH-Test durchgeführt, der Auskunft über die Zellschädigung anhand eines Farbumschlags gab. Die RNase 7 Überexpression zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Zellschädigung. Abb. 36 b zeigt Keratinozyten, die mit RNH1 siRNA transfiziert und mit rekombinater RNase 7 stimuliert wurden. Anschließend wurde ein WST Assay durchgeführt, der durch einen Farbumschlag die Proliferationsaktivität der Zellen beurteilt. Proliferation wird durch eine Absorption bei 450 nm sichtbar gemacht. Auch hier ließ sich kein zytotoxischer Einfluss von RNase 7 festmachen.



**Abb. 36 a und b: Untersuchungen zur potentiell zytotoxischen Aktivität von RNase 7.** (a) HaCaT Zellen mit einem stabil transfizierten RNase 7-pEF6 Vektor wurden zusätzlich mit RNH1 siRNA für 20h behandelt und nach weiteren 96h mit einem LDH Test untersucht. Die RNase 7 Überexpression zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Zellschädigung. Die RNase 7 mRNA-Expression betrug das 2,4fache, die RNase Proteinexpression das 1,4fach und der RNH1 Knockdown betrug 62 %. (b) Zusätzlich wurden Keratinozyten mit RNH1 siRNA für 20h behandelt und weitere 72h später über Nacht mit rekombinanter RNase 7 stimuliert. Dann wurde ein WST-Assay durchgeführt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die Zellviabilität durch die Zugabe von RNase 7.

Ein Scratch Assay wurde durchgeführt und die Keratinozyten mit rekombinanter RNase 7, bzw. RI stimuliert, um daraufhin das Migrations- und Proliferationsverhalten der Keratinozyten zu beobachten. Unterschiede im Migrations- bzw. Proliferationsverhalten der Keratinozyten durch die Stimulation mit RNase 7, RI oder der Kontrolle wurden nicht sichtbar wie Abb. 37 darlegt.



**Abb. 37: Scratch Flächenabnahme nach 44h von Keratinozyten, die mit 10 µg/ml rekombinater RNase 7 und 1 µg/ml RI stimuliert wurden.** Von den Scratches wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht und mit Hilfe von ImageJ wurden die Flächen der Scratches von 0h und 44h verglichen. Daten stellen Doppelwerte aus einem Versuch dar.

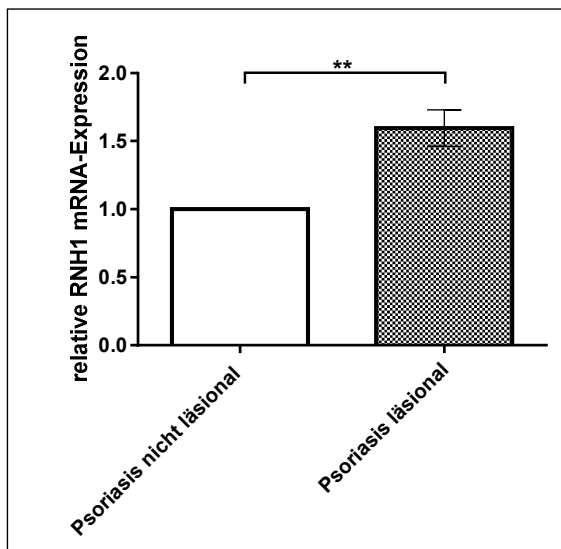
### 3.6 Der Ribonuklease-Inhibitor und Hauterkrankungen

Es gibt Hinweise darauf, dass der RI in einen Zusammenhang mit Krebserkrankungen gebracht werden kann. Zum einen könnte möglicherweise eine auffällig anders regulierte Expression des RI als ein Erkennungsmerkmal für Krebs genutzt werden, zum anderen wurde angenommen, dass der RI einen Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung haben könnte. Daraus ergab sich, dass der RI eventuell im Zusammenhang mit Hauterkrankungen wie Psoriasis und atopischer Dermatitis stehen könnte, deren Krankheitsbilder sich aus einer gestörten Barrierefunktion der Haut ableiten.

#### 3.6.1 Ribonuklease-Inhibitor und Psoriasis

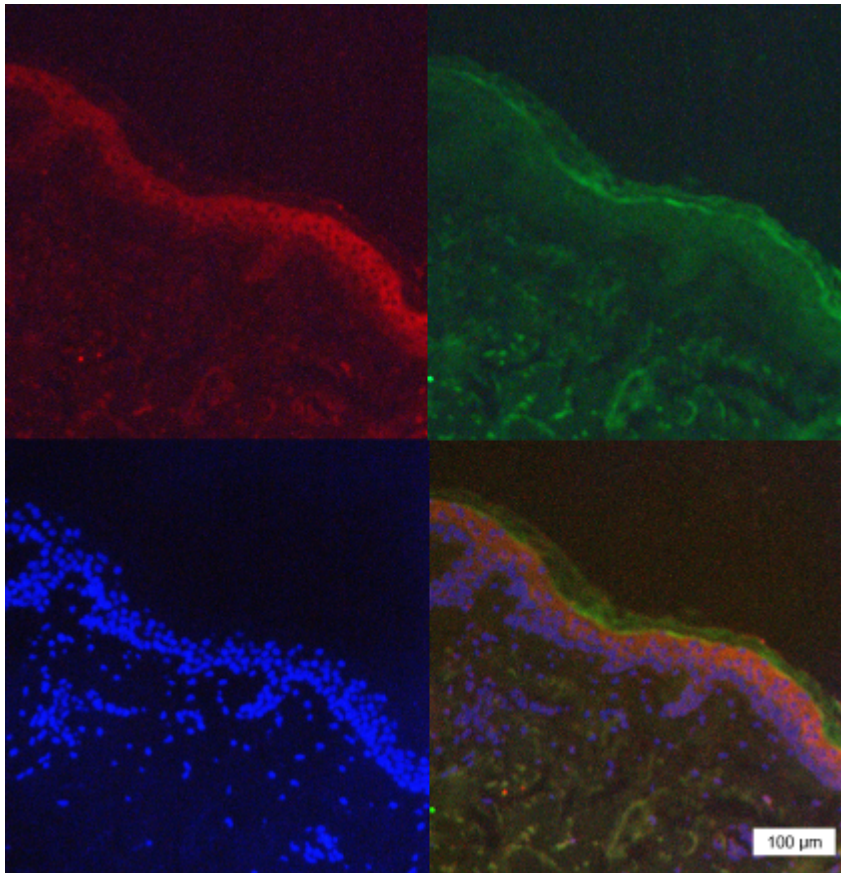
Psoriasis ist eine chronische, nicht ansteckende Entzündung der Haut. Typischerweise bilden sich dabei gerötete, juckende Hautflächen mit silbrigen Schuppen. Biopsien wurden an läsionaler und nicht läsionaler Psoriasis entnommen, RNA isoliert und diese zu cDNA umgeschrieben. Dadurch konnte die relative RNH1 mRNA-Expression ermittelt werden, die in den läsionalen Biopsien höher war als in den nicht läsionalen, wie Abb. 38 zeigt.



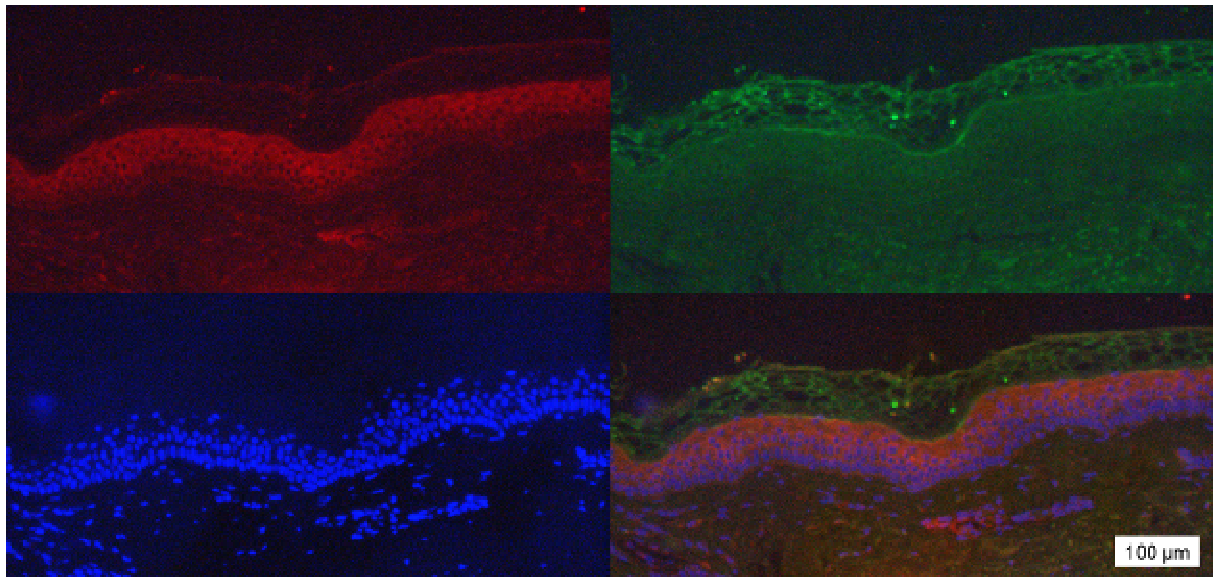


**Abb. 38: Relative RNH1 mRNA-Expression von cDNA Proben aus Biopsien von an Psoriasis erkrankten Probanden.** Die Abbildung vergleicht Biopsien, die jeweils an läSIONALen und nicht läSIONALen Regionen eines Probanden entnommen wurden. Probanden n=7. Anschließend wurde die RNH1 mRNA Expression mittels "real-time"-PCR-Analyse untersucht. Gezeigt ist die relative RNH1 mRNA-Expression im Vergleich zu der mRNA-Expression vom ribosomalen Protein 38 (RP38). Die RNH1 mRNA-Expression ist in der läSIONALen Psoriasis Haut 1,6fach erhöht. Für die statistische Auswertung wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt.

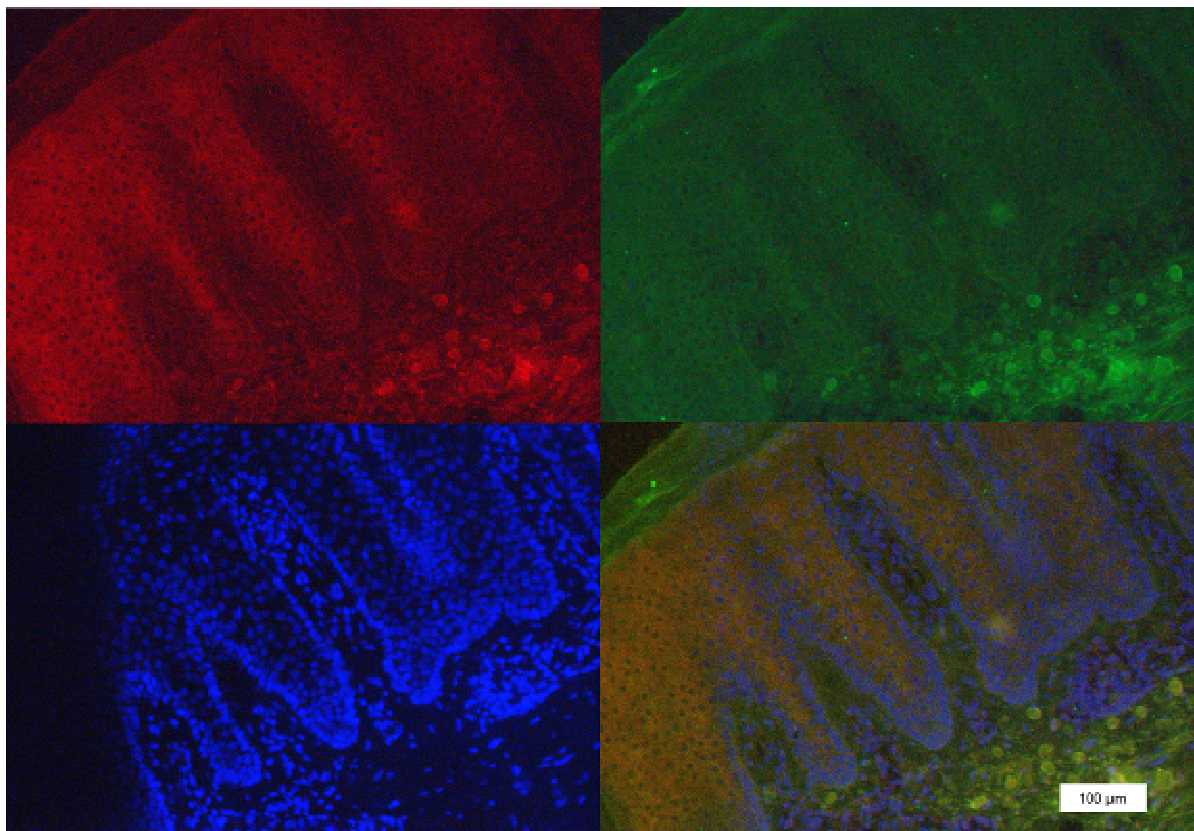
In den folgenden Abbildungen (Abb. 39 - Abb. 41) sind RNase 7 und der RI mit fluoreszierenden Antikörpern in Paraffin-eingebetteten Hautschnitten markiert worden. Als Präparate diente Normalhaut aus Rücken, läSIONALe und nicht läSIONALe Psoriasis Haut aus einem Ellenbogen. Abb. 39 zeigt eine normal aufgebaute Haut, in der RNase 7 grün markiert im *Stratum corneum* vorkommt und der RI rot im *Stratum spinosum* markiert wurde. Eine Kolokalisation der Proteine in den verschiedenen Hautschichten ist hier nicht erkennbar. Abb. 40 präsentiert nicht läSIONALe Psoriasis-Haut, die der Normalhaut sehr ähnlich sieht. Die läSIONALe Psoriasis-Haut Abb. 41 ist wesentlich größer proportioniert als Normalhaut, und sowohl das *Stratum corneum* als auch das *Stratum spinosum* sind viel dicker. In beiden Ellenbogen Hautschnitten ist RNase 7 nicht nur im *Stratum corneum*, sondern auch im *Stratum spinosum* angefärbt.



**Abb. 39: Schnitt einer Normalhaut markiert mit fluoreszierenden Antikörpern.** Von links nach rechts: Auf dem ersten Bild ist der Ribonuklease-Inhibitor rot markiert. Auf dem zweiten Bild ist RNase 7 grün markiert, und das dritte Bild zeigt eine Kontrolle, bei der nur die sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor eingesetzt wurden und die Zellkerne blau gefärbt sind. Auf dem vierten Bild wurden alle Färbungen überlagert und die Zellkerne sind blau gefärbt.



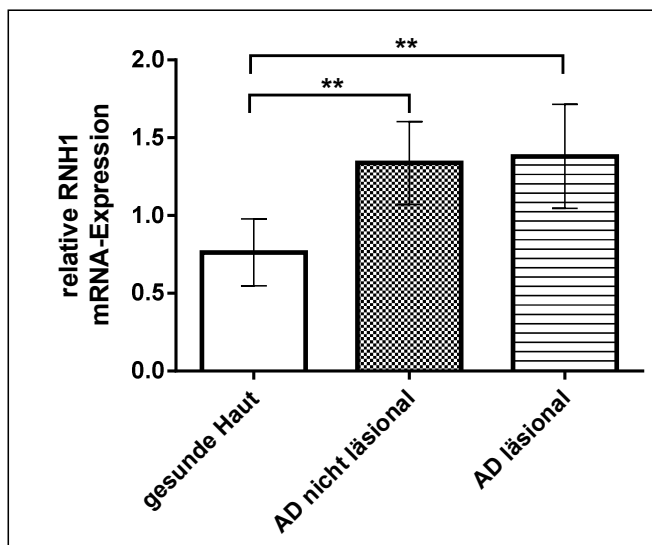
**Abb. 40: Schnitt einer nicht läSIONalen Psoriasis Ellenbogenhaut markiert mit fluoreszierenden Antikörpern.** Von links nach rechts: Auf dem ersten Bild ist der Ribonuklease-Inhibitor rot markiert. Auf dem zweiten Bild ist RNase 7 grün markiert und das dritte Bild zeigt eine Kontrolle bei der nur die sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor eingesetzt wurden und die Zellkerne blau gefärbt sind. Auf dem vierten Bild wurden alle Färbungen überlagert und die Zellkerne sind blau gefärbt.



**Abb. 41: Schnitt einer läSIONalen Psoriasis Ellenbogenhaut markiert mit fluoreszierenden Antikörpern.** Von links nach rechts: Auf dem ersten Bild ist der Ribonuklease-Inhibitor rot markiert. Auf dem zweiten Bild ist RNase 7 grün markiert und das dritte Bild zeigt eine Kontrolle, bei der nur die sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper von RNase 7 und dem Ribonuklease-Inhibitor eingesetzt wurden und die Zellkerne blau gefärbt sind. Auf dem vierten Bild wurden alle Färbungen überlagert und die Zellkerne sind blau gefärbt.

### 3.6.2 Ribonuklease-Inhibitor und Atopische Dermatitis

Atopische Dermatitis ist, ähnlich wie Psoriasis, eine chronische, nicht ansteckende Hauterkrankung. Typischerweise bilden sich dabei gerötete, schuppige und juckende Ekzeme. Die relative RNH1 mRNA Expression von Biospien aus gesunder, läsionaler und nicht läsionaler atopischer Dermatitis Haut wurden in Abb. 42 verglichen und die RNH1 mRNA Expression der atopischen Dermatitis Haut ist signifikant höher als die der gesunden Haut.



**Abb. 42: Relative RNH1 mRNA-Expression von cDNA Proben aus Biopsien von gesunder Haut und AD Haut Probanden.** Es wird eine erhöhte RNH1 mRNA Expression von Probanden mit AD Haut gezeigt. Die Daten repräsentieren die cDNA Proben verschiedener Probanden: gesunde Haut n=12; AD nicht läsional n=8; AD läsional n=8, wobei die AD-Haut Die RNH1 mRNA Expression wurde mittels "real-time"-PCR-Analyse untersucht. Gezeigt ist die relative RNH1 mRNA-Expression im Vergleich zu der mRNA-Expression vom ribosomalen Protein 38 (RP38). Statistik Paired t-Test

## 4 Diskussion

RNase 7 wurde ursprünglich aus *Stratum corneum* Extrakt isoliert, wo es durch seine antimikrobielle Wirkung auf *E. coli*, *S. aureus* und weitere Pathogene auffiel<sup>[34]</sup>. RNase 7 ist Mitglied der RNase A Überfamilie<sup>[35]</sup>, deren Mitglieder durch ihre einzigartigen dreidimensionalen, Disulfidbrücken-Strukturen charakterisiert werden und deren Gene auf dem Chromosom 14 liegen<sup>[36]</sup>. Ihre Mitglieder sind Homologe der bovinen Pankreas Ribonuklease A (RNase A)<sup>[37]</sup>. RNase 1 – RNase 8 verfügen, im Gegensatz zu RNase 9 - 13, über ein katalytisches Zentrum, das für die Ribonukleaseaktivität benötigt wird. Einige der RNasen besitzen, wie RNase 3, RNase 5 (Angiogenin), RNase 7 und RNase 8, antimikrobielle Eigenschaften und spielen dadurch möglicherweise eine wichtige Rolle für die Abwehr von pathogenen Mikroorganismen<sup>[38, 39, 40, 41]</sup>. RNase 2 („eosinophil-derived neurotoxin“ EDN) und RNase 3 („eosinophil cationic protein“ ECP) weisen sogar antivirale Aktivitäten auf<sup>[42, 43]</sup>. *RNASE7* mRNA wird in vielen Epithelien exprimiert wie zum Beispiel in der Haut, in den Tonsillen und dem Pharynx, und im Urogenitaltrakt wird *RNASE7* mRNA exprimiert<sup>[34, 44, 45]</sup>. Die Expression von RNase 7 in den Keratinozyten der Haut exprimiert und ist induzierbar durch proinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel Interferon- $\gamma$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-17A und 17C aber auch durch die Stimulation mit Bakterien wie z.B. *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* und *E. faecium*<sup>[34, 46, 47]</sup>. Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 umfasst nicht nur diverse gram-positive und gram-negative Bakterien, sondern auch Pilze wie *Candida albicans* und *Pichia pastoris* sowie dem Dermatophyt *Trichophyton rubrum*<sup>[48, 49]</sup>.

Überdies wird RNase 7 in großen Mengen in den Harnwegen exprimiert. Spencer *et al.* haben die biologische Relevanz von RNase 7 in den Harnwegen untersucht, indem sie zunächst Urinproben mit Bakterien infiziert haben und dann einen RNase 7-blockierenden Antikörper hinzu gegeben haben. Durch die Antikörper-vermittelte Blockierung von RNase 7 stieg das Bakterienwachstum danach deutlich an. Vermutlich wurde die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 durch den spezifischen Antikörper blockiert. Die Arbeitsgruppe testete Pathogene, die Harnwegsinfektionen auslösen können, wie z.B. *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Klebsiella* oder *Proteus mirabilis*. Offensichtlich spielt RNase 7 eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr des Urothels<sup>[44]</sup>.

Bislang ist der Mechanismus von RNase 7 nicht komplett aufgeklärt. Interessant ist auch die Frage, ob die Ribonukleaseaktivität bedeutsam ist für die antimikrobielle Aktivität des Proteins. *P. aeruginosa* zum Beispiel wurde durch mutierte RNase 7 mit fehlender

Ribonukleaseaktivität weiterhin degradiert, wie Huang *et al.* ermittelten <sup>[49]</sup>. Ebenfalls war eine rekombinante RNase 7-Mutante ohne Ribonukleaseaktivität noch wirksam gegen das Wachstum von *E. faecium* <sup>[46]</sup>. Auf der Oberfläche der Tertiärstruktur von RNase 7 lassen sich drei Gruppen mit kationischen Resten ausmachen. Durch eine Mutation in der ersten kationischen N-terminalen Gruppe wurde die antimikrobielle Aktivität stark reduziert. Die Substituierung der anderen beiden Gruppen zeigte keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität und lässt laut Huang *et al.* darauf schließen, dass die Lysinreste K1, K3, K111 und K112 für die antimikrobielle Wirkung von RNase 7 verantwortlich sind <sup>[49]</sup>. Alle antimikrobiell aktiven Mitglieder der RNase A Superfamilie haben eine N-terminale Domäne gemein, die möglicherweise für die antimikrobiellen Eigenschaften maßgeblich ist <sup>[50]</sup>. Möglicherweise binden die positiven Reste von RNase 7 an negativ geladene Bakterienmembran und zerstört diese durch elektrostatische Interaktionen <sup>[49]</sup>. Durch Versuche mit geladenen im Vergleich zu ungeladenen Liposomen mit RNase 7 wurde bestätigt, dass es sich hierbei um elektrostatische Wechselwirkungen handeln muss, da RNase 7 nur die geladenen Liposomen destabilisierte <sup>[50]</sup>. RNase 7 ist es auch möglich, an Lipopolysaccharide und Peptidoglycan zu binden, die Hauptbestandteile der Bakterienzellwand sind. Außerdem depolarisiert sie die Membran von *E. coli* und *S. aureus*, so dass der Bakterieninhalt freigesetzt wird <sup>[51]</sup>. Auch der pathogene Keim *P. aeruginosa* wird durch RNase 7 unschädlich gemacht. Dafür bindet RNase 7 zunächst an das „outer membrane lipoprotein“ Oprl (outer membrane protein I) und wird dann vermutlich zusammen mit Oprl in das Bakterienzytosol eingeschleust. Versuche zeigten, dass durch den Einsatz von hinzugegebenen anti-Oprl Antikörpern die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 gegenüber *P. aeruginosa* stark reduziert wird <sup>[52]</sup>. Diese Studien lassen vermuten, dass RNase 7 gezielt an Oberflächengebundene bakterielle Lipoproteine bindet.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der RNase A Mitglieder ist ihre Ribonukleaseaktivität, die durch den hufeisenförmigen, zytosolischen Ribonuklease-Inhibitor (RI) in einer 1:1 Ratio inhibiert werden kann <sup>[53, 54, 55]</sup>. Der RI hat eine Größe von 50 kDa und bildet seine Form durch  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge aus. Die sich wiederholenden strukturellen Einheiten bestehen aus repetitiven Aminosäuresequenzen mit leucinreichen Resten („leucine-rich repeats“ LRRs) <sup>[56, 57]</sup>, die die Protein-Protein-Interaktionen fördern <sup>[58, 59, 60]</sup>. Außerdem weist der RI 32 reduzierte Cysteinreste auf <sup>[62]</sup>. Um aktiv zu sein, benötigt der RI eine reduzierende Umgebung wie das Zytosol. Der RI ist durch die Cysteinreste sehr anfällig für Oxidation und wird danach sehr schnell durch Proteasen degradiert <sup>[61]</sup>.

Die biologische Relevanz des RI ist bislang noch nicht völlig geklärt. Der RI befindet sich fast ausschließlich im Zytosol, wo er circa 0.01% des totalen zytosolischen Proteinanteils ausmacht <sup>[62]</sup>. Ribonukleasen hingegen, die der RI erkennt, sind meistens sezernierte Proteine <sup>[64, 62]</sup>. Allerdings wurde bereits berichtet, dass eine Translokation von pankreatischen RNasen in das Zytosol erfolgen kann. Zytotoxische RNase A Varianten, die sich, eingeschlossen in Endosomen, im Zytosol befinden, verlassen beim Erreichen des Golgi-Apparates das Endosom und werden in einem ineffizienten Prozess, bei dem mehr als 95% der Ribonukleasen von lysosomalen Kompartementen degradiert werden, in das Zytosol geschleust <sup>[63]</sup>. Es ist durchaus denkbar, dass RI und RNasen auf diesem Wege aneinander binden und man kann sich unterschiedliche Funktionen des RI vorstellen, wie z.B. Zellen vor eindringenden Ribonukleasen zu schützen, intrazelluläre Ribonukleaseaktivitäten zu regulieren oder zu terminieren oder auch die Überwachung und Kontrolle des Oxidationsstatus der Zelle zum Schutz vor oxidativen Stress und Zellalterung <sup>[64]</sup>.

Die Bindung zwischen dem RI und RNasen gehört zu den stärksten biologischen Interaktionen und ist nichtkovalent <sup>[64]</sup>. Diese Gegebenheit lässt die Frage nach einem Einfluss des RI auf die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 aufkommen. Abtin *et al.* zeigten, dass in differenzierten Keratinozyten sowohl die RI als auch die RNase 7 mRNA-Expression und Proteinexpression erhöht war <sup>[65]</sup>. Außerdem wurde sowohl die Ribonukleaseaktivität als auch die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 durch den Komplex gehemmt. Immunhistochemische Hautanalysen zeigten, dass RNase 7 hauptsächlich im *Stratum corneum* exprimiert wird, wohingegen der RI dort nahezu abwesend ist und vor allem in der darunterliegenden Schicht, dem *Stratum spinosum* zu finden ist <sup>[65]</sup>. Zasloff vermutet, dass RNase 7 und der RI in den tieferen Hautschichten als Komplex vorhanden sind. Möglicherweise, um eine zytotoxische Wirkung durch RNase 7 auf die Hautzellen zu vermeiden. Der Komplex gelangt durch die Differenzierung der Hautzellen laut Zasloffs Hypothese bis zur Oberfläche der Haut, wo der Komplex unter Umständen durch die Degradation des RI durch Proteasen getrennt wird und RNase 7 ihre antimikrobielle Aktivität entfalten kann. Gegebenenfalls wird so die Ribonukleaseaktivität und die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 in der Epidermis durch den RI reguliert <sup>[66]</sup>. Allerdings konnte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt werden, dass der RI im Komplex mit RNase 7 nicht mehr durch Kallikreine degradiert werden kann. Dies lässt Zweifel an der Hypothese aufkommen, dass der RI-RNase 7-Komplex durch Protease-vermittelte Degradation des RI getrennt werden könnte. In einer weiteren Publikation zeigten Spencer *et al.*, dass die differenzierten, oberflächlichen Zellen des Urothel, ähnlich wie die in der Haut, eine höhere Expression des RI aufwiesen als die dortigen basalen Stammzellen <sup>[67]</sup>. Außerdem stellten

sie fest, dass die RI mRNA-Expression bei einer akuten Pyelonephritis sank und entdeckten im Urin neben intaktem sogar degradierten RI, der vermutlich von Proteasen, die durch die Rekrutierung von Neutrophilen anwesend waren, degradiert wurde und die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 somit nicht so stark inhibieren konnte. Somit scheint der RI einen Einfluss auf die Aktivität von RNase 7 in den Urothelien zu haben <sup>[67]</sup>.

#### 4.1 Rekombinante Expression von RNase 7 und dem RI

In dieser vorliegenden Arbeit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem RI und RNase 7 erforscht werden. Dafür wurden beide Proteine in ausreichenden Mengen für *in vitro* Versuche benötigt. Wie bereits erwähnt, wurde RNase 7 zunächst nativ aus *Stratum corneum* Extrakt isoliert. Da diese Methode sehr aufwändig ist, wurde RNase 7 durch die im Labor etablierte Methode der rekombinanten Expression in *E. coli* hergestellt <sup>[46]</sup>. Rekombinante Expressionen sind eine schnelle, effektive Methode, um größere Mengen prokaryotischer und eukaryotischer Proteine herzustellen, und besonders *E. coli* hat sich als Wirt mit seiner schnellen Verdopplungsrate für die Expression bewährt <sup>[68]</sup>. Wegen der antimikrobiellen Aktivität von RNase 7 wurde es als Fusionsprotein im pET 32a System mit einer „His-Tag“-Sequenz (sechs hintereinander gereichte Histidine) exprimiert mit dem Vorteil, dass das Protein eine verringerte antimikrobielle Wirkung auf *E. coli* hat und mittels einer Nickel-Affinitätssäule aufgereinigt werden kann, bevor die „His-Tag“-Sequenz durch einen Enterokinaseverdau entfernt wurde. Frühere Studien zeigten, dass rekombinante RNase 7 dieselben Eigenschaften wie native RNase 7 zeigen <sup>[46]</sup>. Die Primärstruktur vom humanen RI wurde erstmals 1988 von Lee *et al.* beschrieben <sup>[69]</sup>, dessen Arbeitsgruppe im darauffolgenden Jahr auch erstmals die rekombinante Herstellung vom RI beschrieb, die *E. coli* als Wirt wählte und aus vier Litern Bakteriensuspension ungefähr ein Milligramm RI gewann <sup>[70]</sup>. Seitdem wurden mehrfach neue Expressionssysteme beschrieben. Besonders häufig wurde der RI in *E. coli* BL21(DE3) oder mit Hilfe eines pET-Vektors exprimiert <sup>[20, 54, 71, 72, 20]</sup>. Der *E. coli* BL21(DE3) Stamm besitzt den Vorteil eines Gendefekts, der die Degradation wirtsfremder Proteine unterbindet, und die T7 RNA-Polymerase lässt sich durch IPTG induzieren und erkennt den T7-Promotor der pET-Vektoren <sup>[73]</sup>. Es ist bekannt, dass die Expression des RI Schwierigkeiten birgt <sup>[64, 20]</sup>. Zum Beispiel wird der RI in inaktiver Form in Einschlusskörperchen exprimiert oder oxidiert, wenn nicht das Reduktionsmittel DTT dem Medium beigefügt sowie eine niedrige Expressionstemperatur gewählt wird <sup>[20]</sup>. Oft wurde für die Aufreinigung des RI eine RNase A Affinitätschromatographie benutzt, die sich die femtomolare Affinität vom RI und RNase A zu Nutze macht und bereits 1979 für eine Aufreinigung vom RI aus Plazenta genutzt wurde <sup>[64, 74]</sup>.

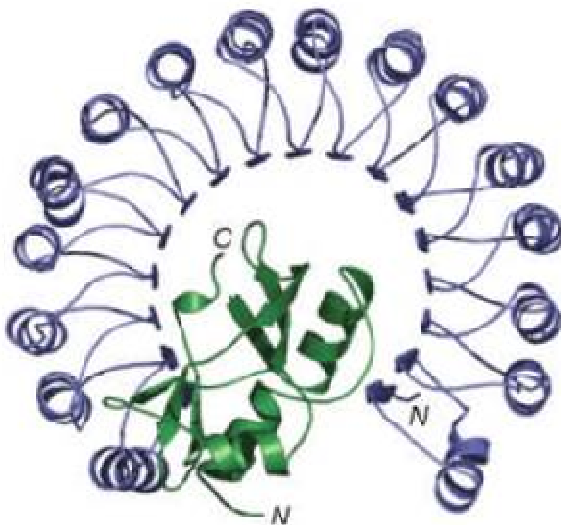


Während nach der Expression der RI noch eindeutig in Western Blots detektierbar war, ließ er sich zwar noch in der massenspektroskopischen Analyse nachweisen, allerdings nur zu einem sehr kleinen Prozentanteil. Zur Kontrolle wurde die RNase A-Affinitätssäule mit 1,5 mg gekauften RI getestet. Auch hier band der RI kaum an die RNase A-Affinitätssäule. Es lässt sich spekulieren, dass der RI bereits vor oder während der Chromatographie oxidierte oder, ob es womöglich während der Expression zu einer Fehlfaltung kam, so dass eine Konformitätsänderung das Binden an RNase A einschränkte und der RI nicht mehr in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden konnte. Um eine Inaktivierung und Unlöslichkeit des RI auszuschließen, wurde der RI nach der Expression nach einem U.S. Patent behandelt, der den RI durch eine Behandlung mit Harnstoff löst und entfaltet und danach durch starkes Verdünnen ungefähr 7% des anwesenden RIs wieder in seine aktive Form zusammenfallen lässt [22, 75]. Auch hier ließ sich in der anschließenden Affinitätschromatographie sehr wenig RI nachweisen, weswegen für weitere Versuche auf käuflichen RI (Fermentas) zurückgegriffen wurde, der in einem ihn stabilisierenden Puffer vorlag, der wegen seiner vielen Bestandteile immer als Kontrolle eingesetzt wurde.

## 4.2 Der RI-RNase 7-Komplex

*In vitro* ließ sich eine Bindung von RNase 7 und RI in einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Brillant-Blau Färbung nachweisen. Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode, bei der Proteine während der Gelelektrophorese nicht denaturiert werden, indem kein SDS im Gel oder in den Puffern eingesetzt wird. Die Proteine behalten während des Laufs durch das Gel ihre Sekundär- und Tertiärstruktur bei, und aneinander gebundene Proteine werden nicht voneinander getrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel hängt von der Größe, der Ladung, der Gelmatrix und dem pH-Wert von Gel und Puffer ab [24]. In Übereinstimmung mit der Literatur diffundierte der RI mit 50 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 4,7 zur Anode, wohingegen RNase 7 mit 14 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 10,5 zu kationisch war, um zur Anode zu diffundieren. Die Bande des RI-RNase 7-Komplex verschob sich auf die Höhe des rekombinanten RI, was an der fast vierfachen Größe des RI und des Einschusses von RNase 7 in das Innerste der Hufeisenform des RI sowie an seiner Ladung lag [76, 67]. Mitglieder der kationischen RNase A Überfamilie binden den anionischen RI in einer 1:1 Stöchiometrie, was sich schon annähernd an den gleich eingesetzten Mengen von RNase 7 und RI bis zur völligen Komplexbildung und Aufhebung der RNase 7 Bande, erkennen lässt (siehe auch Abb. 7) [30, 77, 64, 76]. 1993 wurde das erste Mal die dreidimensionale Struktur des porcinen RI beschrieben [77] und kurz darauf auch die Struktur

des porcinen RI-RNase A-Komplex, bei dem sich 60% mehr Proteinfläche des Komplexes berührt als bei typischen Antikörper und Antigen Komplexen, und die Anziehung sehr stark auf der Coulombkraft beruht <sup>[78]</sup>. Das aktive Zentrum von der nierenförmigen RNase A liegt zwischen ihren beiden Flügeln <sup>[79]</sup>, die durch eine Bindung mit dem RI blockiert wird. Besonders viele Aminosäurereste von RNase A, die für die Bindung mit RNA verantwortlich sind, interagieren auch mit dem RI <sup>[80]</sup>. Im Jahr 1997 wurde dann der Komplex zwischen humanen RI und Angiogenin beschrieben, der aus 124 Aminosäurekontakten besteht, wovon die meisten aus Seitenketten des RI gebildet werden. Der RI bindet besonders oft am aktiven Zentrum von Angiogenin <sup>[81]</sup>. So kann man sich auch seine Bindung zu RNase 7 vorstellen, und die Bindung am aktiven Zentrum erklärt, warum die Ribonukleaseaktivität von RNasen durch eine Bindung an den RI inaktiviert wird <sup>[64, 82, 83]</sup>, einen Effekt, den wir auch beobachten konnten. Besonders interessant ist Abb. 8, da sie deutlich macht, dass der RI und RNase 7 auch im Komplex von beiden verwendeten Antikörpern (gegen RI und gegen RNase 7) erkannt werden, obwohl RNase 7 nahezu in den hufeisenförmigen RI eingeschlossen wird, wie Abb. 43 exemplarisch für Angiogenin und den RI zeigt <sup>[64]</sup>.



**Abb. 43: Ribonuklease-Inhibitor-Angiogenin-Komplex.** Der RI besteht aus  $\alpha$ -Helices (blau) und  $\beta$ -Faltblättern. Angiogenin (grün) wird an seinem aktiven Zentrum an den RI gebunden <sup>[64]</sup>.

Das bedeutet auch, dass die mittels ELISA gemessene RNase 7 Proteinexpression in Zellüberständen nicht ausschließt, dass RNase 7 auch an den RI im Überstand gebunden vorliegt. Um die Ribonukleaseaktivität von RNasen eines Tages für therapeutische Zwecke, zum Beispiel zur Destruktion von Tumorzellen, einsetzen zu können, ohne, dass diese möglicherweise vom RI noch vorm Erreichen ihres Zieles, inhibiert werden, wurden bereits

RNase A Tandenenzyme durch künstliche Peptidverbindungen gebildet. Diese werden allerdings bis dato noch vom RI inhibiert [21].

### 4.3 RI und RNase 7 in Keratinozyten

Die biologische Rolle des RI ist nach wie vor ungeklärt, weswegen bereits versucht wurde, sein Expressionsmuster aufzuklären. Zwar findet man den RI in nahezu allen Zellen im Zytosol, aber nicht in gesunden Extrazellulärflüssigkeiten, wo sich potentielle Liganden, die Ribonukleasen, befinden, wie z.B. im Plasma, Speichel und dem Urin gesunder Patienten [64]. Bislang wurden eher widersprüchliche Ergebnisse bekannt: Erhöhte RI Expressionen wurden in Rattenleber gefunden, in denen ein Tumor induziert wurde, als auch in neugeborenen Ratten [84, 85] und auch in differenzierten Keratinozyten [30], dafür aber nicht in stimulierten, differenzierten HL-60 Zellen [86]. Das Expressionsmuster von RNase 7 in Keratinozyten hingegen ist hinlänglich bekannt, genauso wie schon einige Signalwege für die Induktion von RNase 7 aufgeklärt wurden. Zum Beispiel wird mittels Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (STAT3) RNase 7 durch die Zytokine IL-17A/IFN $\gamma$  induziert [87]. Ebenfalls wird die Induktion von RNase 7 durch *S. epidermidis* und *S. aureus* ausgelöst [88]. *S. epidermidis* aktiviert Toll-like-Rezeptor 2 (TLR-2) oder Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), wodurch der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde erforscht, ob der RI die RNase 7 Protein- und mRNA-Expression beeinflusst. Dafür wurde das Gen des RI, das RNH1-Gen durch „small interfering“ RNA (siRNA) supprimiert. Das System der RNA Interferenz (RNAi), was evolutionär betrachtet, ein Schutzmechanismus eukaryontischer Zellen gegen Viren und Transposons ist, wird heute vielfach für wissenschaftliche Untersuchungen genutzt und kann, vorausgesetzt, dass die Gensequenz bekannt ist, jedes Gen supprimieren. Dabei werden siRNAs, Zwischenprodukte dieses Systems, mit 19 Basenpaaren doppelsträngiger RNA und 2 Nukleotiden am 3' Überhang, in Zellen mit Hilfe eines Transfektionsreagenzes eingeschleust. Dort wird ein Strang, der Leitstrang, in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingebaut und der andere RNA-Strang wird abgebaut. Die siRNA mit RISC erkennt und bindet nun an die passende Sequenz des Zieltranskripts und führt zu dessen Inhibition bzw. Degradation [89, 90, 91]. Es ist ein schneller Weg, um die Funktion bekannter Gene aufzuklären [92]. Zunächst ging man davon aus, dass dieser Prozess äußerst spezifisch ist, musste dann aber feststellen, dass es häufig zu sogenannten „off-target“-Effekten kommt [89, 93, 94]. Diese entstehen dann, wenn die siRNAs ihr ähnliche Sequenzen binden, was schon dann geschieht, wenn nur wenige Basenpaare, so 11-15 Nukleotide, übereinstimmen [95]. Unter anderem wurden auch „off-target“-Effekte beschrieben, die durch die Aktivierung des Interferon-Systems durch

siRNA ausgelöst wurden. Das Eindringen doppelsträngiger RNA löst dabei eine Immunantwort aus, die wiederum eine Apoptose einleitet. Normalerweise schützt dieses System Zellen zum Beispiel vor eindringender doppelsträngiger RNA von Viren <sup>[96, 97]</sup>. In dieser Arbeit wurde siRNA transient mit Hilfe eines Transfektionsreagens transfiziert. Die temporäre Gensuppression hält dabei nur wenige Tage an, da mit jeder Zellteilung die vorhandene siRNA für jede Zelle geringer wird. In dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob der im Zytosol omnipräsente RI einen Einfluss auf die RNase 7-mRNA und Proteinexpression in Keratinozyten hat. Darum wurde das RNH1-Gen durch den Gebrauch von entsprechender siRNA ausgeschaltet und die RNase 7 mRNA- und Proteinexpression betrachtet. Die verwendeten RNH1-siRNAs von insgesamt drei Herstellern lieferten sowohl auf der mRNA-, als auch auf der Proteinebene sehr beeindruckende „Knockout“ Ergebnisse. Es wurden je zwei verschiedene RNH1-siRNAs von Qiagen und von Life Technologies verwendet, als auch eine RNH1 „Smartpool“ siRNA von Thermo Scientific. Hinsichtlich der Hypothese, dass der RI RNase 7 in den Keratinozyten bindet, wäre es vorstellbar, dass es bei diesen Experimenten zu einer vermehrten RNase 7 Expression kommt, da nicht genügend RI vorhanden wäre, um RNase 7 an der Sezernierung zu hindern <sup>[33]</sup>. Trotz vielmaligen Wiederholens der Experimente konnte kein eindeutiger Einfluss auf die RNase 7-Expression ausgemacht werden. Selbst in einem Versuchsansatz, in dem die verschiedenen RNH1-siRNAs getestet wurden, gab es keine eindeutige Tendenz, ob die RNase 7 Proteinexpression durch eine stark verringerte RI mRNA- und Proteinexpression eher mehr oder eher weniger wird. Annehmbar ist, dass es zu den oben beschriebenen „off-target“-Effekten gekommen ist oder, dass der RI auf diesem Wege keinen besonderen Einfluss auf RNase 7 ausübt. Wie schon zuvor berichtet, lässt sich RNase 7 durch *P. aeruginosa* induzieren, damit mehr RNase 7 Proteine sezerniert werden, wenn besonders viele Bakterien die Hautoberfläche besiedeln und ihre Gesundheit gefährden <sup>[34]</sup>. Auch in solch einem Versuchsaufbau, in dem RNase 7 induziert wurde und der RI supprimiert wurde, konnte kein Zusammenhang mit der Abwesenheit des RI in Keratinozyten ausgemacht werden. Es ist hinlänglich bekannt, dass der RI zytosolisch ist und RNase 7 sezerniert wird <sup>[34, 33]</sup>. Native Gelelektrophorese mit Keratinozyten-Lysaten zeigte zum einen, dass sich mehr RI Proteine in den Lysaten befanden als RNase 7 Proteine und zum anderen, dass sich der Komplex durch die Auflösung der Zellmembranen und der Kompartemente während der Zelllyse extrem schnell bildet, was mit der Literatur übereinstimmt, da beschrieben wurde, dass RI und Ribonukleasen sehr affin aufeinander agieren <sup>[64]</sup>. Beeindruckend ist ebenfalls, dass der Komplex auch nach der Ultraschallbehandlung noch besteht. Ultraschall kann dafür sorgen, dass das aktive Zentrum von Enzymen inaktiviert wird <sup>[98]</sup>. Einmal gebunden, bleibt der Komplex bestehen. Das zeigt auch ein Versuch, in dem der RI mit RNase A abgesättigt

wurde und dem dann zusätzlich RNase 7 hinzugefügt wurde. Die Bindung zwischen dem RI und RNase A blieb bestehen. RNase 7 wurde nicht gebunden. Es gab also keinen Austausch der Ribonukleasen durch die starke Bindung von RI und RNase A <sup>[64]</sup>. Bei den gezeigten nativen Gelelektrophoresen muss man im Hinterkopf behalten, dass es auch möglich sein könnte, dass sich der RNase-RI-Komplex während der Vorbereitung für die Gelelektrophorese wieder zusammenfindet. Man kann nicht davon ausgehen, dass diese Ergebnisse Aufschluss über den Zustand von RNase 7 und dem RI in den Keratinozyten geben. Um herauszufinden, wie sich beide Proteine in Keratinozyten zueinander verhalten, wurden sie mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Abb. 26 zeigt zwar, dass sich die Positionen von RNase 7 und dem RI teilweise überlagern, aber eine Colokalisation lässt sich nicht eindeutig bestimmen. Auffallend ist, dass sich sehr viel RI im Zellkern befindet. Das wurde bereits 2011 von Furia *et al.* beschrieben und sie fanden den RI auch in Mitochondrien, den zentralen Organellen der zellulären Redox-Homöostase. Sie vermuteten, dass er dort mit seiner Anfälligkeit für Oxidation als Radikalfänger dient und die Zelle vor oxidativen Stress schützt. HeLa-Zellen, eine Zelllinie, die ursprünglich aus Epithelzellen eines Gebärmutterhalskrebses stammten, zeigten zum Beispiel eine verbesserte Resistenz gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Zellsterblichkeit, wenn der RI überexprimiert wurde <sup>[99]</sup>. Des Weiteren haben sie den RI ausschließlich in der Kernmatrix gefunden, nicht aber im Nucleolus. Sie könnten sich vorstellen, dass der RI im Nucleus Angiogenin inhibiert, das in HeLa-Zellen akkumuliert und dort eine Rolle in der rRNA Biogenese spielt <sup>[100]</sup>. Die meisten Proteine werden über das Endoplasmatische Retikulum und über den Golgi-Apparat sezerniert. In Keratinozyten Überständen lässt sich RNase 7 als sezerniertes Protein immer nachweisen. In Überständen, die in einem Western-Blot untersucht wurden, konnte man keinen RI mit RI-Antikörpern nachweisen.

#### 4.3.1 Untersuchungen zur Beeinflussung des RI durch Caspase-1

Vor einiger Zeit wurde dargelegt, dass einige Proteine unabhängig vom Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi Apparat indirekt durch Caspase-1 reguliert werden. Dabei veranlasst Caspase-1 zum Beispiel die Verstärkung der Expression von IL-1, was wiederum eine größere RNase 7 Expression auslöst <sup>[101]</sup>. Dazu ist noch bekannt, dass Caspase-1 durch Bakterien induziert wird <sup>[102]</sup>. Anhand einer Protein-Datenbank-Software („PeptideCutter“, ExPASy) wurde ermittelt, dass der RI eine putative Schnittstelle für Caspase-1 aufweist, was zu einem Verlust von 80 C-terminalen Aminosäuren des RI führen würde, die wichtig für die Bindung von RNasen sind <sup>[80]</sup>. Eine im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung, in der Caspase-1 in Keratinozyten herunterreguliert wurde, zeigte keine

vermehrte RI-Proteinexpression, und es wurde nur eine minimal erhöhte, nicht signifikante RNase 7 mRNA- und Proteinexpression ausgelöst, wenn Keratinozyten mit *P. aeruginosa* stimuliert wurden, während Caspase-1 herunterreguliert wurde. Außerdem zeigte sich, dass die Inkubation des RI mit rekombinanter Caspase-1 nicht zu einer Inaktivierung des RI führten, da der RI trotzdem noch funktionell aktiv war und die Ribonuklease-Aktivität von RNase 7 komplett hemmen konnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Caspase-1 den RI nicht degradiert und nicht über den RI Einfluss auf RNase 7 nimmt.

#### **4.3.2 Untersuchungen zur RI-regulierten und durch UV-B Strahlung induzierten RNase 7-Sezernierung**

Gläser *et al.* zeigten, dass sich RNase 7 in Keratinozyten durch UV-B Strahlung induzieren lässt. UV Strahlung, besonders die UV-B Strahlung, ist einer der am meisten auf den Menschen Einfluss nehmender Umweltfaktor [32, 103]. Sie löst Sonnenbrände, Hautalterung und Hautkrebs aus und unterdrückt das adaptive Immunsystem [104]. In der Haut sorgen das langsame, spezifische adaptive und in das schnelle, aber unspezifische angeborene Immunsystem für den Schutz der Haut [105]. Das adaptive Immunsystem ist nicht so effektiv, wie ursprünglich angenommen wurde und kann schädigende Reaktionen wie allergische oder autoimmune Reaktionen durch T-Lymphozyten auslösen. Komponenten des angeborenen Immunsystems sind neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, Mastzellen, Zytokine und AMPs. Das angeborene Abwehrsystem ist sehr wichtig für die Abwehrmechanismen der Haut [106]. UV-Strahlung hat eine immunsuppressive Wirkung und inhibiert zelluläre Immunreaktionen des adaptiven Systems, löst aber im Gegenzug Abwehrreaktionen des angeborenen Immunsystems aus [107]. Keller *et al.* demonstrierten, dass das Inflammasom und Caspase-1 in Keratinozyten durch UV-Licht aktiviert werden können [101]. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass RNase 7 durch UV-B Strahlung dosisabhängig induziert wird (Abb. 35). Eine zu hohe und zu lange Bestrahlung scheint zu einem Zelltod der Keratinozyten zu führen, was die hohe Relevanz der schädigenden Wirkung von UV-Strahlen deutlich macht. Allerdings sei noch kurz erwähnt, dass UV-Strahlen auch positive Eigenschaften aufweisen, zum Beispiel sind sie für die Produktion des essentiellen Vitamin D3 notwendig [108]. Ein weiterer Versuch zeigte, dass das ausgeschaltete Caspase-1 Gen während der UV-B Strahlung keinen signifikanten Einfluss auf die UV-induzierte RNase 7-Proteinexpression ausübte.

#### 4.4 Untersuchungen zu einer möglichen zytotoxischen Aktivität von RNase 7

Eine Besonderheit der RNasen ist ihre Ribonukleaseaktivität, die indes auch einige ihrer Mitglieder zytotoxische Effekte ausüben lässt. Einige greifen selektiv entartete Zellen an und lösen eine Apoptose in diesen Zellen aus, was sie zu einem möglichen Therapeutikum gegen Krebszellen macht. In der Vergangenheit zeigten von der RNase A Überfamilie, vor allem die Rindersamen-RNase, Onconase (eine RNase aus dem Leopardfrosch *Rana pipiens*), zwei eng verwandte RNasen aus den Fröschen *R. catesbeiana* und *R. japonica* und die humanen RNasen 2 (EDN) und 3 (ECP) Zytotoxizität gegen Tumorzelllinien <sup>[109]</sup>. Ein besonderes Augenmerk lag in den letzten Jahren auf Onconase, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zunächst gute zytotoxische Aktivitäten zeigte, aber in Phase III klinischen Studien dann doch keine signifikanten Effekte zeigte <sup>[62]</sup>. Die zytotoxische Aktivität einiger RNasen korreliert mit ihrer Affinität für den RI. Onconase beispielsweise bindet nicht besonders schnell an den RI und ist dadurch sehr zytotoxisch <sup>[110]</sup>. Die zytotoxische Wirkung wird durch die Degradation von RNA erreicht, was nachfolgend Apoptose auslöst. RNase A hat zum Beispiel eine größere Ribonukleaseaktivität als Onconase, wirkt aber weniger zytotoxisch. Schon die Veränderung von wenigen Aminosäuren in humaner RNase 1 und RNase 2 führten dazu, dass die Affinität für den RI geringer wurde, was mit einem verstärkten zytotoxischen Effekt einherging <sup>[54, 111]</sup>. Basierend auf diesen Studien wurde untersucht, ob RNase 7 einen zytotoxischen Effekt auf Keratinozyten ausübt, wenn bei diesen die Expression des RI mittels siRNA gehemmt wird. Dabei zeigten HaCaT-Zellen, die stabil mit einem RNase 7-Überexpressionsplasmid transfiziert waren und in denen das RNH1-Gen durch siRNA herunterreguliert wurde, keine signifikanten Unterschiede im LDH-Test, der Auskunft gibt über die Zellschädigung durch die Messung von freigesetzter L-Lactatdehydrogenase. Auch die externe Zugabe von rekombinanter RNase 7 zu den Zellen bewirkte keinen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität. Sekretorische Proteine wie RNase 7 werden von Ribosomen produziert und danach im Endoplasmatischen Retikulum in ihre native Konformation gebracht, bevor sie durch Transportvesikel an der Zellmembran aus den Zellen ausgeschleust werden <sup>[112]</sup>. So betrachtet, schützen die Transportvesikel die Zelle vor der möglichen Apoptose durch RNase 7. Für den zytotoxischen Effekt von Onconase auf Krebszellen wurde das Protein biotechnologisch verändert, um das Eindringen des Proteins in die Zelle zu erleichtern. Naturgemäß ist es den kationischen RNasen aber durchaus möglich, an anionische Zellmembranen zu binden und durch Endosomen eingeschleust zu werden. Dadurch könnten RNasen in das Zytosol gelangen und dort zytotoxisch wirken <sup>[63, 113]</sup>. Bislang ist dieses Phänomen für RNasen noch schlecht erforscht; 95 % aller zytotoxische RNasen A Varianten werden auf ihrem Weg ins Zytosol durch das trans-Golgi-Netzwerk von lysosomalen Kompartementen degradiert <sup>[63]</sup>.

„Scratch-Assays“ werden meistens dazu benutzt, eine Wundheilung nachzuahmen, indem ein Zellstreifen durch mechanische Einwirkung aus der Zellmonolayer entfernt wird. Das erneute Zusammenwachsen der Monolayer gibt Auskünfte über die Zellmigration und Proliferation als auch über den, falls verwendet, eingesetzten Stimulus im Medium. Keratinozyten im „Scratch-Assay“, die mit rekombinanter RNase 7, RI oder mit RNase 7 und RI zusammen stimuliert wurden, zeigten keine Unterschiede im Zellwachstum oder der Zellmigration. Wie oben beschrieben, gelingt es nur wenigen RNasen in das Zytosol einzudringen. So ließ sich kein zytotoxischer Effekt durch hinzugegebene RNase 7 feststellen, allerdings wirkt RNase A, hinzugegeben zu einem Tumor, auch erst in Konzentrationen im Milligrammbereich zytotoxisch [62].

#### 4.5 Degradation des RI durch *Stratum corneum* Extrakt

Immunhistologische Färbungen mit Antikörpern von RI und RNase 7 in Normalhaut belegten, dass RNase 7 sich lediglich im *Stratum corneum* befindet, wohingegen der RI in einer tieferen Hautschicht, dem *Stratum spinosum* auffindbar war. Die Interzellularspalten zwischen den Keratinozyten im *Stratum corneum* gesunder menschlicher Haut machen aus ihr eine lamellenartige, wasserabweisende Barriere. Die verhornten Keratinozyten verlieren hier 60-80 % ihres Wassergehaltes, bevor sie abgeschuppt werden [114]. Lipide und antimikrobielle Proteine werden durch Lamellarkörper aus tieferen Hautschichten in das *Stratum corneum* sezerniert und füllen dort die Interzellularspalten auf und sorgen somit gleichzeitig für einen Schutz vor noch größerer Austrocknung und vor eindringenden Bakterien. Im Falle einer Hautschädigung werden Mechanismen ausgelöst, die eine schnelle Freilassung von Lamellarkörpern, mit AMPs und weiteren Proteinen, auslösen [33]. Zasloff stellte, inspiriert von Abtins *et al.* Studie, die These auf, dass RNase 7 und RI als Komplex bis in das *Stratum spinosum* vorliegen und der RI beim Übergang ins *Stratum corneum* von Proteasen von RNase 7 abgespalten wird, so dass RNase 7 an der Hautoberfläche antimikrobiell aktiv ist [33, 30]. Dadurch stellte sich die Frage, ob und durch welche Faktoren der RI im *Stratum corneum* abgebaut wird. Eine wichtige Beobachtung dieser hier vorliegenden Doktorarbeit war, dass sich in dem *Stratum corneum* Extrakt, der für die Degradation vom RI verwendet wurde, kein RI durch Antikörper nachweisen ließ. Der Extrakt, der aus *Stratum corneum* von Fußpflegeabfällen gewonnen wurde, war frei vom RI. Eine Inkubation von RI mit *Stratum corneum* Extrakt zeigte, dass der RI über Nacht abgebaut wurde. Proben, die nur kurz inkubiert wurden, zeigten keine Degradation des RI, was allerdings keine Rückschlüsse auf das mögliche Tempo einer Degradation *in vivo* schließen lässt, genauso wenig wie die eingesetzte Proteinmenge des Extrakts Rückschlüsse auf die



Situation *in vivo* zulässt. Um die Proteasen zu ermitteln, die den RI abbauen, wurde der *Stratum corneum* Extrakt in einem ersten Schritt mittels Zentrifugations-Filtereinheiten nach Proteingrößen separiert und dann auf seine Degradationsfunktionalität geprüft. Wie Abb. 13 bereits zeigt, konnte keine reproduzierbare Größenfraktion ermittelt werden, die den RI wiederholt abbaut. Hinderlich an der Ermittlung war vor allem, dass man besonders viel Protein einsetzen musste in der Zentrifugations-Filtereinheit, um nach der Auftrennung noch eine genügend hohe Proteinkonzentration für eine Funktionsanalyse zu haben, da es zum Teil beim Aufkonzentrieren der Proben zu Funktionsverlusten kam. Im nächsten Schritt wurde eine Umkehrphasenchromatographie mit dem Extrakt durchgeführt. Zunächst wurden kleinere Mengen des Extrakts eingesetzt, um eine gute Auftrennung zu gewährleisten. Die geringe Proteinkonzentration in den Proben nach der Auftrennung erschwerte allerdings die Degradation des RI, sodass bewusst eine sehr hohe Menge des Extrakts in der Chromatographie eingesetzt wurde. Eine Denaturierung der Proben in der Chromatographie auf Grund des Lösungsmitelesinsatzes könnte auch ein Grund für den Funktionsverlust sein <sup>[115]</sup>. Nach der Chromatographie wurde der Extrakt auf seine Degradationsfunktion auf den RI geprüft. Hierbei bereitete das Aufkonzentrieren der Proben Probleme für die Reproduzierbarkeit der Versuche, aber es wurde wiederholt gezeigt, dass der *Stratum corneum* Extrakt den RI degradiert.

#### 4.5.1 Serinproteasen degradieren den RI

Bekannte Serinproteasen der Haut sind unter anderem Kallikrein 5, Kallikrein 7 und Kallikrein 14. Die Abschuppung von Keratinozyten im *Stratum corneum* wird vor allem durch Proteasen und ihren Inhibitoren reguliert <sup>[116]</sup>. Eine große Rolle spielen dabei Kallikreine. Sie sind die größte Familie Trypsin- oder Trypsin-ähnlicher Serinproteasen, die von 15 Genen kodiert werden <sup>[117]</sup>. Acht davon werden in Normalhaut exprimiert, von denen KLK5 (serine proteases stratum corneum tryptic enzyme, SCTE), KLK7 (stratum corneum chymotryptic protease, SCCE), KLK8 und KLK14 besonders wichtig sind <sup>[118]</sup>. Ihre Aktivität wird durch den pH und durch spezifische Protease Inhibitoren reguliert <sup>[119]</sup>. KLK 5 und KLK7 degradieren Proteine der Desmosomen und Corneodesmosomen, die für die Abschuppung der Haut verantwortlich sind <sup>[120]</sup>. Pro-KLK7 kann von KLK5 aktiviert werden und Pro-KLK5 von KLK14 und von KLK5 selbst <sup>[121]</sup>. Der RI wurde von den hautrelevanten Kallikreinen degradiert. KLK5, KLK7, KLK8 und KLK14 waren effektiv gegen den RI, wohingegen KLK1, KLK2, KLK4 und KLK 13 den RI nicht über Nacht abbauten. Ein Versuch mit KLK14 demonstrierte außerdem, dass die Degradation zeitabhängig erfolgte. Ganz besonders interessant ist, dass die Kallikreine den RI nicht mehr abbauen können, wenn dieser an RNase 7 gebunden ist,

wie eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt. Funktionell wurde mit einem RNase-Assay mit fluoreszierendem Substrat ebenfalls nachgewiesen, dass KLK14 den RI nur abbauen kann, wenn dieser nicht an RNase 7 gebunden ist. Dieses wurde ebenfalls für KLK5 und KLK7 gezeigt (Daten nicht gezeigt). Dies verdeutlicht, dass der RI-RNase 7-Komplex den RI eher vor Kallikreinen schützen würde und Kallikreine im *Stratum corneum* nicht zur Freisetzung von RNase 7 aus dem Komplex mit dem RI durch Degradation des RI beitragen können. KLK 5 präferiert es, am C-terminalen Arginin über Lysin zu schneiden [122, 123]. KLK 7 hingegen präferiert Tyrosin über Phenylalanin [124] und KLK14 Arginin [125, 126]. Vermutlich sind diese Aminosäuren vom RI in die Komplexbildung eingebunden, und der RI ist nicht mehr frei für die Kallikreine zum Zerschneiden. Übrigens kontrollieren sowohl KLK5 als auch KLK7 die Aktivierung von der Vorstufe des humanen antimikrobiellen Cathelicidin und beeinflussen die weitere Prozessierung in kleinere Peptide [122], während KLK14 zugeschrieben wird, eine der Hauptproteasen in der Haut zu sein, die ungefähr die Hälfte der Trypsin-ähnlichen proteolytischen Aktivitäten übernimmt [127]. Die hier dargestellten Ergebnisse werfen die Frage auf, ob der RI eventuell auch durch andere, bisher nicht untersuchte Proteasen, im *Stratum corneum* degradiert wird, oder ob nicht ein großer Anteil des RI durch Oxidation dort abgebaut wird, da der RI wie oben bereits beschrieben, mit seinen Cysteinresten sehr anfällig auf Sauerstoff reagiert [61]. Dies könnte die Abwesenheit des RI im *Stratum corneum* in den Western-Blot und immunohistochemischen Analysen erklären. Möglich ist auch, dass die experimentellen Prozeduren zum Nachweis des RI die Oxidation und nachfolgende Degradierung des RI beschleunigten, so dass dieser nicht mehr nachweisbar war.

#### 4.6 Der RI hemmt die antimikrobielle Aktivität von RNase 7

Wie oben bereits erwähnt, wurde beobachtet, dass eine artifizielle Mutation in RNase 7 zwar bewirkt, dass die Ribonukleaseaktivität gehemmt ist, aber das dies die antimikrobielle Aktivität nicht einschränkt [46, 49]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass RNase 7 *S. cohnii*, ein gram-positives Bakterium der Haut, effizient und dosisabhängig abtötet, wie der antimikrobielle Test in Abb. 19 zeigt. *S. cohnii* wurde in dieser Arbeit exemplarisch für die Bakterienspezies verwendet, die durch RNase 7 abgetötet werden. Ist RNase 7 an den RI gebunden, wird die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 unterdrückt. Zunächst ist dieses Ergebnis erstaunlich, wenn man bedenkt, dass *Huang et al.* zeigten, dass die Ribonuklease-Aktivität und die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 nicht in einem Kontext stehen [49]. Ein Grund für diese Hemmung könnte sein, dass RNase nicht mehr kationisch genug ist, um an Bakterienmembranen zu binden, wenn sich ein Komplex

zwischen dem 50 kDa anionischen RI und der 14 kDa kationischen RNase 7 gebildet hat. Die positive Ladung ist nämlich verantwortlich für die Bindung an Bakterienmembranen <sup>[49]</sup>. Ebenfalls ist denkbar, dass der RI die kleinere RNase 7 in seiner Hufeisenform so sehr einschließt, dass es zu einer sterischen Behinderung oder zu einer Konformationsänderung von RNase 7 kommt, so dass Bakterien nicht mehr gebunden und abgetötet werden können. Der antimikrobielle Test bestätigte nochmals, dass es KLK14 tatsächlich möglich ist, den RI zu degradieren und zu inaktivieren, da der degradierte RI dann keinen Einfluss mehr auf die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 hatte.

#### 4.7 Der RI in Zusammenhang mit Hauterkrankungen

Hauterkrankungen sind weit verbreitet und können viele Ursachen haben, wie z.B. Infektionen, falsche Pflegeprodukte, Erbkrankheiten oder andere Umwelteinflüsse. Die Symptome haben zahlreiche Erscheinungsformen auf der Haut: Rötungen, Juckreiz, Schmerzen, Schuppungen, Risse, Quaddeln, Exzeme und weitere Entzündungsreaktionen. Oft sind die psychischen und physischen Belastungen der Betroffenen hoch, da die Erkrankung für Außenstehende offensichtlich ist, wie zum Beispiel eine Akneerkrankung im Gesicht. Schon das große Angebot an Hautpflegeprodukten zeigt, wie wichtig eine gesunde Haut ist <sup>[128]</sup>. Die atopische Dermatitis ist eine nicht ansteckende, chronisch-entzündliche Hauterkrankung. Ihre Symptome weisen rote, schuppige und gelegentlich nässende und juckende Exzeme auf <sup>[128]</sup>. Besonders oft wurde *S. aureus* von läsionaler atopischer Dermatitis isoliert. RNase 7 hat eine starke antimikrobielle Wirkung auf *S. aureus*, was zur Hypothese führt, dass die atopische Dermatitis mit einer geringen RNase 7 Expression assoziiert ist. Allerdings zeigten läsionale Biopsien von atopischer Dermatitis Haut erhöhte RNase 7 Expressionswerte <sup>[129]</sup>, genauso wie immunhistologische Färbungen eine stärkere RNase 7-Expression aufwiesen <sup>[130]</sup>. In der hier vorliegenden Arbeit zeigten Biopsien läsionaler und nicht läsionaler atopischer Dermatitis Haut signifikant erhöhte RI mRNA-Expressionen. Bislang wurde der RI noch nicht in einen Zusammenhang mit Hauterkrankungen gebracht. Ein näherer Blick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem RI und atopischer Dermatitis könnte Aufschluss darüber geben, ob der RI dort eine Rolle spielt. Eine weitere nicht ansteckende, aber oft organübergreifende, systemische Hauterkrankung ist Psoriasis. Sie zeigt sich auf der Haut mit schuppigen und oft juckenden Stellen <sup>[128]</sup>. Auch in läsionaler psoriatischer Haut gibt es eine vermehrte RNase 7-Expression, allerdings ist die Haut hier weniger von Pathogenen besiedelt <sup>[131]</sup>. Für RNase 1 und RNase 2 wurde berichtet, dass sie immunmodulatorische Fähigkeiten haben. Ob dieses auch auf RNase 7 in Bezug auf Hauterkrankungen zutrifft, ist noch nicht bekannt <sup>[132]</sup>. Wäre dies der

Fall, dann könnte man sich vorstellen, dass solche immunomodulatorischen Eigenschaften von RNase 7 die Erkrankungen beeinflussen und dass der RI durch eine potentielle Inaktivierung der immunomodulatorischen Funktionen von RNase 7 auch einen Einfluss ausübt. In diesem Zusammenhang zeigen unsere Daten, dass die läsionale Psoriasis-Haut eine höhere RI mRNA-Expression aufweist als die nicht läsionale Haut. In der Immunhistologie konnte der RI sogar im *Stratum corneum* nachgewiesen werden, was einen Hinweis auf eine potentielle Rolle des RI im *Stratum corneum* in der Psoriasis gibt. Die hier festgestellte erhöhte Expression des RI in der läsionalen Haut von Patienten mit Psoriasis und atopischer Dermatitis gibt Anlass zur Vermutung, dass der RI in diesen entzündlichen Hauterkrankungen eine Bedeutung haben könnte, eine Hypothese die in weiterführenden Studien näher untersucht werden sollte.

## 5 Zusammenfassung

RNase 7 spielt eine große Rolle in der antimikrobiellen Abwehr der Haut gegen Pathogene und verfügt über potente Ribonukleaseaktivität. Das konstitutiv exprimierte antimikrobielle Peptid RNase 7 lässt sich durch proinflammatorische Zytokine und Bakterien induzieren. *In vivo* befindet sich RNase 7 hauptsächlich in der äußersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum corneum*. Ein starker Inhibitor von RNase 7, der Ribonuklease-Inhibitor (RI), dagegen, befindet sich hauptsächlich in der darunterliegenden Hautschicht, dem *Stratum spinosum*, wo er überwiegend im Zytosol der Keratinozyten exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des RI mit RNase 7 näher untersucht. Es zeigte sich, dass es RNase 7 möglich ist, *in vitro* an den RI zu binden, der dadurch sowohl die antimikrobielle als auch die Ribonukleaseaktivität von RNase 7 hemmt. Im *Stratum corneum* vorkommende Kallikrein-Proteasen können den RI degradieren, allerdings nicht, wenn der RI schon einen Komplex mit RNase 7 eingegangen ist. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass Proteasen im *Stratum corneum* RNase 7 aus einem RI-RNase 7-Komplex freisetzen können. Die Bindung des RI an RNase 7 führte auch zur Frage, ob der RI die Expression und insbesondere die Sekretion von RNase 7 aus den Keratinozyten beeinflusst. Transfektionsstudien mit RI-Überexpressionsplasmiden sowie RI-siRNA konnten hier keinen Einfluss herausstellen. Auch eine potentielle Schutzwirkung des RI vor einer potentiellen zytotoxischen Aktivität von RNase 7 in den Keratinozyten konnte nicht gefunden werden. Da RNase 7 überwiegend aus dem Keratinozyten sezerniert wird und der RI nur in den Keratinozyten nachweisbar ist, nicht aber im Zellkultur-Überstand, ist es fraglich, ob der RI außerhalb der Zelle überhaupt einen regulativen Einfluss auf RNase 7 haben könnte. Eine Freisetzung des RI im Rahmen von Zelltod wäre allerdings denkbar. *In vivo* konnten erhöhte

RI-Genexpressionslevel in der läSIONalen Haut von Patienten mit den chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen atopischer Dermatitis und Psoriasis nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass der RI in diesen Erkrankungen eine Bedeutung haben könnte.

## 6 Summary

RNase 7 plays a major role in the antimicrobial defence of the skin against pathogens and exhibits a potent ribonuclease activity. The constitutively expressed peptide RNase 7 is inducible by proinflammatory cytokines and bacteria. *In vivo*, RNase 7 is mainly located in the outermost layer of the epidermis, in the *Stratum corneum*. In contrast, a strong inhibitor of RNase 7, the Ribonuclease inhibitor (RI), is mainly found in the layer below the *Stratum corneum*, in the *Stratum spinosum*, where it is mainly expressed in keratinocyte cytosol. In the present work the interaction of RI and RNase 7 was investigated intensively. It was shown, that RNase 7 is able to bind to the RI *in vitro*. Through the interaction the RI blocks the antimicrobial activity as well as the ribonuclease activity of RNase 7. Kallikrein-proteases in the *Stratum corneum* may degrade the RI, but not if the RI is already bound to RNase 7. Hence, it is rather unlikely, that those proteases may release RNase 7 from a RI-RNase 7-complex in the *Stratum corneum*. The binding of the RI to RNase 7 led to the question, if the RI influences the expression and especially the secretion of RNase 7 from keratinocytes. Transfection experiments with RI-overexpression plasmids as well as experiments with RI-siRNA here did not show any influence on RNase 7. Furthermore, the RI did not show any potential protective influence on a possible cytotoxic activity of RNase 7 in the keratinocytes. As RNase 7 is predominantly secreted by keratinocytes and the RI is only detectable in the keratinocytes but not in the keratinocyte supernatant it is not clear if the RI has a regulatory influence on RNase 7 outside of the keratinocytes at all. However, a release of the RI within the scope of cell death might be supposable. Increased levels of RI-gene expression in lesional skin of patients with the chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis and psoriasis has been shown *in vivo*. This leads to the conclusion that the RI may play a role for those skin diseases.

---

## 7 Literaturverzeichnis

---

- <sup>11</sup> Harder, J., Schröder, J.M., Gläser, M. (2013). *The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks*. *Experimental Dermatology*, 22: 1–5.
- <sup>2</sup> Madison, K.C. (2003). *Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Etre” of the Epidermis*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 121: 231-241.
- <sup>3</sup> Freinkel, R.K., Woodley, D.T.(2001). *The biology of the skin*. New York: The Parthenon Publishing Group
- <sup>4</sup> Cundell, A.M. (2016). *Microbial Ecology of the Human Skin*. *Microbial Ecology*, Epub ahead of print
- <sup>5</sup> Oh, J., Byrd, A.L., Park, M., NISC Comparative Sequencing Program, Kong, H.H., Segre, J.A. (2016). *Temporal Stability of the Human Skin Microbiome*. *Cell*, 165: 854–866.
- <sup>6</sup> Uçkay, I., Pittet, D., Vaudaux, P., Sax, H., Lew, D., Waldvogel, F. (2009). *Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis*. *Annals of medicine*, 41: 109-119.
- <sup>7</sup> Wos-Oxley, M.L., Plumeier, I., von Eiff, C., Taudien, S., Platzer, M., Vilchez-Vargas, R., Becker, K., Pieper, D.H. (2010). *A poke into the diversity and associations within human anterior nare microbial communities*. *The ISME Journal*, 4: 839-851.
- <sup>8</sup> Miller, L.G., Kaplan, S.L. (2009). *Staphylococcus aureus: a community pathogen*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23: 35-52.
- <sup>9</sup> Brüssow, H. (2016). *Turning the inside out: the microbiology of atopic dermatitis*. *Environmental Microbiology*, 18: 2089-2102.
- <sup>10</sup> Zasloff, M. (1987). *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84:5449-53.
- <sup>11</sup> Harder, J., Schröder, J.M., Gläser, R. (2013). *The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks*. *Experimental Dermatology*, 22: 1-5.
- <sup>12</sup> Harder, J., Schröder, J.M. (2005). *Antimicrobial peptides in human skin*. *Chemical Immunology and Allergy*, 86: 22-41.
- <sup>13</sup> Rademacher, F., Simanski, M., Harder, J. (2016). *RNase 7 in Cutaneous Defense*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 560-572.
- <sup>14</sup> Rademacher, F., Simanski, M., Schröder, L., Mildner, M., Harder, J.(2016). *The role of RNase 7 in innate cutaneous defense against Pseudomonas aeruginosa*. *Experimental Dermatology*, X: x-x.
- <sup>15</sup> Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988). *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. *Journal of Cell Biology* 106: 761-771.
- <sup>16</sup> Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.
- <sup>17</sup> Frey, M. und Suppmann B. (1995). *Demonstration of the Expand PCR System’s greater fidelity and higher yields with a lacl-based fidelity assay*. *Biochemica*, 2: 34–35.
- <sup>18</sup> Hanahan, D. (1983). *Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids*. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580.

- 
- <sup>19</sup>Tang, X., Nakata, Y., Li, H.-O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., Yokoyama, K. (1994). *The optimization of preparations of competent cells for transformation of E. coli*. Nucleic Acids Research 22: 2857-2858.
- <sup>20</sup>Siurkus J., Neubauer, B. (2011). *Reducing conditions are the key for efficient production of active ribonuclease inhibitor in Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, 10: 31.
- <sup>21</sup>Arnold, U., Leich, F., Neumann, P., Lilie, H., Ulbrich-Hofmann, R. (2011). *Crystal structure of RNase A tandem enzymes and their interaction with the cytosolic ribonuclease inhibitor*. FEBS Letters, 278: 331–340.
- <sup>22</sup>Lewis, M.K., Schultz, J.W. (1996). *Methods and Compositions for Production of Human Recombinant Placental Ribonuclease Inhibitor*. US Patent 5552302.
- <sup>23</sup>Schägger, H. und Jagow, G. (1987). *Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa*. Analytical Biochemistry, 166: 368-379.
- <sup>24</sup>Rehm, H. und Letzel, T. (2009). *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics*. Deutschland, Heidelberg: Spektrum.
- <sup>25</sup>Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., Kang, C. (2002). *Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 23: 1511-1512.
- <sup>26</sup>Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., Lehrer, R.I. (1985). *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. The Journal of Clinical Investigation, 76: 1427-1435.
- <sup>27</sup>Kelemen, B.R., Klink, T.A., Behlke, M.A., Eubanks, S.R., Leland, P.A., Raines, R.T. (1999). *Hypersensitive substrate for ribonucleases*. Nucleic Acids Research, 27: 3696-3701.
- <sup>28</sup>Steffanson, K., Brattsand, M., Ny, A., Glas, B., Egelrud, T. (2006). *Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum*. Biological Chemistry, 387: 761-768.
- <sup>29</sup>Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical Biochemistry, 162: 156-159.
- <sup>30</sup>Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Ghannadan, M., Harder, J., Schröder, J.-M., Tschachler, E. (2009). *Degradation by Stratum Corneum Proteases Prevents Endogenous RNase Inhibitor from Blocking Antimicrobial Activities of RNase 5 and RNase 7*. Journal of Investigative Dermatology, 129: 2193–2201.
- <sup>31</sup>Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., Beer, H.-D. (2008). *Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion*. Cell, 132: 818-831.
- <sup>32</sup>Gläser, R., Navid, F., Schuller, W., Jantschitsch, C., Harder, J., Schröder, J.M., Schwarz, A., Schwarz, T. (2009). *UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 123: 1117-1123.
- <sup>33</sup>Zasloff, M. (2009). *Antimicrobial RNases of Human Skin*. Journal of Investigative Dermatology, 129: 2091-2093.
- <sup>34</sup>Harder, J.und Schröder, J.-M. (2002). *RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin*. The Journal of Biological Chemistry, 277: 46779–46784.
- <sup>35</sup>Zhang, J., Dyer, K.D., Rosenberg, H.F. (2003). *Human RNase 7: A new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily*. Nucleic Acids Research, 31: 602–607.

- 
- <sup>36</sup> Cho, S., Beintema, J.J., Zhang, J. (2005). *The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: Identifying new members and tracing evolutionary histories*. *Genomics*, 85, 208–220.
- <sup>37</sup> Rosenberg, H.F. (2008). *RNase A ribonucleases and host defense: An evolving story*. *Journal of Leukocyte Biology*, 83: 1079–1087.
- <sup>38</sup> Simanski, M., Köten, B., Schröder, J.M., Gläser, R., Harder, J. (2012). *Antimicrobial RNases in cutaneous defense*. *Journal of Innate Immunity*, 4: 241–247.
- <sup>39</sup> Rudolph, B., Podschun, R., Sahly, H., Schubert, S., Schröder, J.M., Harder, J. (2006). *Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 3194–3196.
- <sup>40</sup> Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V., Gordon, J.I. (2003). *Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. *Nature Immunology*, 4: 269–273.
- <sup>41</sup> Malik, A., Batra, J.K. (2012). *Antimicrobial activity of human eosinophil granule proteins: Involvement in host defence against pathogens*. *Critical Reviews in Microbiology*, 38: 168–181.
- <sup>42</sup> Rosenberg, H.F., Domachowske, J.B. (2001). *Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens*. *Journal of Leukocyte Biology*, 70: 691–698.
- <sup>43</sup> Rosenberg, H.F. (2015). *Eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and the mouse eosinophil-associated RNases (mEars): Expanding roles in promoting host defense*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 15442–15455.
- <sup>44</sup> Spencer, J.D., Schwaderer, A.L., Dirosario, J.D., Mchugh, K.M., McGillivray, G., Justice, S.S., Carpenter, A.R., Baker, P.B., Harder, J., Hains, D.S. (2011). *Ribonuclease 7 is a potent antimicrobial peptide within the human urinary tract*. *Kidney International*, 80: 174–180.
- <sup>45</sup> Wang, H., Schwaderer, A.L., Kline, J., Spencer, J.D., Kline, D., Hains, D.S. (2013) *Contribution of structural domains to the activity of ribonuclease 7 against uropathogenic bacteria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57: 766–774.
- <sup>46</sup> Köten, B., Simanski, M., Gläser, R., Podschun, R., Schröder, J.M., Harder, J. (2009). *RNase 7 contributes to the cutaneous defense against Enterococcus faecium*. *PLoS ONE*, 4: e6424.
- <sup>47</sup> Simanski, M., Dressel, S., Gläser, R., Harder, J. (2010). *RNase 7 Protects Healthy Skin from Staphylococcus aureus Colonization*. *Journal of Investigative Dermatology*, 130: 2836–2838.
- <sup>48</sup> Fritz, P., Beck-Jendroschek, V., Brasch, J. (2012). *Inhibition of dermatophytes by the antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensin-2, ribonuclease 7 and psoriasin*. *Medical Mycology*, 50: 579–584.
- <sup>49</sup> Huang, Y.C., Lin, Y.M., Chang, T.W., Wu, S.J., Lee, Y.S., Chang, M.D.T., Chen, C., Wu, S.H., Liao, Y. (2007). *The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 4626–4633.
- <sup>50</sup> Torrent, M., Pulido, D., Valle, J., Nogués, M.V., Andreu, D., Boix, E. (2013). *Ribonucleases as a host-defence family: Evidence of evolutionarily conserved antimicrobial activity at the N-terminus*. *Biochemical Journal*, 456: 99–108.
- <sup>51</sup> Torrent, M., Badia, M., Moussaoui, M., Sanchez, D., Nogués, M.V., Boix, E. (2010). *Comparison of human RNase 3 and RNase 7 bactericidal action at the Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall*. *The FEBS Journal*, 277: 1713–1725.
- <sup>52</sup> Lin, Y.M., Wu, S.J., Chang, T.W., Wang, C.F., Suen, C.S., Hwang, M.J., Chang, M.D.T., Chen, Y.T., Liao, Y. (2010). *Outer membrane protein I of Pseudomonas aeruginosa is a target of cationic antimicrobial peptide/protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 8985–8994.



- 
- <sup>53</sup> Iyer, S., Holloway, D.E., Kumar, K., Shapiro, R., Acharya, K.R. (2005). *Molecular recognition of human eosinophil-derived neurotoxin (RNase 2) by placental ribonuclease inhibitor*. Journal of Molecular Biology, 347: 637–655.
- <sup>54</sup> Johnson, R.J., McCoy, J.G., Bingman, C.A., Phillips, G.N., Jr., Raines, R.T. (2007). *Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein*. Journal of Molecular Biology, 368: 434–449.
- <sup>55</sup> Shapiro, R., Vallee, B.L. (1987). *Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84: 2238–2241.
- <sup>56</sup> Hofsteenge, J., Kieffer, B., Matthies, R., Hemmings, B.A., Stone, S.R. (1988). *Amino acid sequence of the ribonuclease inhibitor from porcine liver reveals the presence of leucine-rich repeats*. Biochemistry, 27: 8537–8544.
- <sup>57</sup> Lee, F.S., Fox, E.A., Zhou, H.M., Strydom, D.J., Vallee, B.L. (1988). *Primary structure of human placental ribonuclease inhibitor*. Biochemistry, 27: 8545–8553.
- <sup>58</sup> Kobe, B., Deisenhofer, J. (1994). *The leucine-rich repeat: A versatile binding motif*. Trends in Biochemical Sciences, 19: 415–421.
- <sup>59</sup> Shapiro, R., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1995). *LRRning the RLte of springs*. Nature Structural & Molecular Biology, 2: 350–354.
- <sup>60</sup> Kobe, B., Kajava, A.V. (2001). *The leucine-rich repeat as a protein recognition motif*. Current Opinion in Structural Biology, 11: 725–732.
- <sup>61</sup> Blázquez, M., Fominaya, J.M., Hofsteenge, J. (1996). *Oxidation of sulfhydryl groups of ribonuclease inhibitor in epithelial cells is sufficient for its intracellular degradation*. The Journal of Biological Chemistry, 271: 18638–18642.
- <sup>62</sup> Leland, P.A., Raines, R.T. (2001). *Cancer chemotherapy — ribonucleases to the rescue*. Chemistry & Biology, 8: 405–413.
- <sup>63</sup> Rutkoski, T.J., Raines, R.T. (2008). *Evasion of Ribonuclease Inhibitor as a Determinant of Ribonuclease Cytotoxicity*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 9: 185–216.
- <sup>64</sup> Dickson, A., Haigis, M.C., Raines, R.T. (2005). *Ribonuclease Inhibitor: Structure and Function*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 80: 349–374.
- <sup>65</sup> Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Ghannadan, M., Harder, J., Schröder, J.-M., Tschachler, E. (2009). *Degradation by stratum corneum proteases prevents endogenous RNase inhibitor from blocking antimicrobial activities of RNase 5 and RNase 7*. Journal of Investigative Dermatology, 129: 2193–2201.
- <sup>66</sup> Zasloff, M. (2009). *Antimicrobial RNases of Human Skin*. Journal of Investigative Dermatology, 129, 2091–2093.
- <sup>67</sup> Spencer, J.D., Schwaderer, A.L., Eichler, T., Wang, H., Kline, J., Justice, S.S., Cohen, D.M., Hains, D.S. (2014). *An endogenous ribonuclease inhibitor regulates the antimicrobial activity of ribonuclease 7 in the human urinary tract*. Kidney International, 85: 1179–1191.
- <sup>68</sup> Valore E.V., Ganz T., (1997). *Laboratory production of antimicrobial peptides in native conformation*. Methods in Molecular Biology, 78: 115–131.
- <sup>69</sup> Lee, F.S., Fox, E.A., Zhou, H.-M., Strydom, D.J., Vallee, B.L. (1988). *Primary Structure of Human Placental Ribonuclease Inhibitor*. Biochemistry, 27: 8545–8553.

- 
- <sup>70</sup> Lee, F.S., Vallee, B.L. (1989). *Expression of Human Placental Ribonuclease Inhibitor in Escherichia Coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 160: 115-120.
- <sup>71</sup> Lee, J.E., Raines, R.T. (2005). *Cytotoxicity of Bovine Seminal Ribonuclease: Monomer versus Dimer*. Biochemistry, 44: 15760 – 15767.
- <sup>72</sup> Guo, W., Cao, L., Jia, Z., Wu, G., Li, T., Lu, F., Lu, Z. (2011). *High level soluble production of functional ribonuclease inhibitor in Escherichia coli by fusing it to soluble partners*. Protein Expression and Purification, 77: 185–192.
- <sup>73</sup> Storhas, W. (2013). Bioverfahrensentwicklung. Wiley.
- <sup>74</sup> Blackburn, P. (1979). *Ribonuclease Inhibitor from Human Placenta: Rapid Purification and Assay*. The Journal of Biological Chemistry, 254: 12484-12487.
- <sup>75</sup> Rudolph, R., Lilie, H. (1996). *In vitro folding of inclusion body proteins*. The FASEB Journal, 10: 49-56.
- <sup>76</sup> Naddeo, M. Vitagliano, L., Russo, A., Gotte, G., Alessio, G.D., Sorrentino, S. (2005). *Interactions of the cytotoxic RNase A dimers with the cytosolic ribonuclease inhibitor*. FEBS Letters, 579: 2663–2668.
- <sup>77</sup> Kobe, B., Deisenhofer, J. (1993). *Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats*. Nature, 366: 751-756.
- <sup>78</sup> Kobe, B., Deisenhofer, J. (1995). *A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands*. Nature, 374: 183–186.
- <sup>79</sup> Wlodawer, A. (1985). Structure of bovine pancreatic ribonuclease by X-ray and neutron diffraction. In: Jurnak, F.A.; McPherson, A., editors. Biological Macromolecules and Assemblies, Vol. II, Nucleic Acids and Interactive Proteins. Wiley; New York: p. 395-439.
- <sup>80</sup> Kobe, B., Deisenhofer, J. (1996). *Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with RNase A*. Journal of Molecular Biology, 264: 1028–1043.
- <sup>81</sup> Papageorgiou, A.C., Shapiro, R., Acharya, K.R. (1997). *Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor-an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution*. The EMBO Journal, 16: 5162–5177.
- <sup>82</sup> Lee, F.S., Vallee, B.L. (1993). *Structure and action of mammalian ribonuclease (angiogenin) inhibitor*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 44: 1–30.
- <sup>83</sup> Becknell, B., Spencer, J.D. (2016). *A Review of Ribonuclease 7's Structure, Regulation, and Contributions to Host Defense*. International Journal of Molecular Sciences, 17, 423-433.
- <sup>84</sup> Wojnar, R.J., Roth, J.S. (1965). *Ribonuclease inhibitor and latent ribonuclease in rat liver during feeding of 2-acetamidofluorene*. Cancer Research, 25: 1913–1918.
- <sup>85</sup> Suzuki, Y., Takahashi, Y. (1970). *Developmental and regional variations in ribonuclease inhibitor activity in brain*. Journal of Neurochemistry, 17: 1521–1524.
- <sup>86</sup> Kyner, D., Christman, J.K., Acs, G. (1979). *The effect of 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate on the ribonuclease activity of circulating human lymphocytes*. European Journal of Biochemistry, 99: 395–399.
- <sup>87</sup> Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Schumacher, H.M., Gläser, R., Harder, J. (2013). *IL-17A and IFN-γ Synergistically Induce RNase 7 Expression via STAT3 in Primary Keratinocytes*. PLoS ONE, 8: e59531.

- 
- <sup>88</sup> Wanke, I., Steffen, H., Christ, C., Krismer, B., Götz, F., Peschel, A., Schaller, M., Schitteck, B. (2011). *Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways*. *Journal of Investigative Dermatology*, 131: 382–390.
- <sup>89</sup> Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. *Nature*, 411: 494 – 498.
- <sup>90</sup> Hutvagner, G., Simard, M.J. (2008). *Argonaute proteins: key players in RNA silencing*. *Nature Review of Molecular Cellular Biology*, 9: 22 – 32.
- <sup>91</sup> Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. (2003). *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. *Cell*, 115: 209 – 216.
- <sup>92</sup> Waterhouse, P. M., Wang, M. B., Lough, T. (2001). *Gene silencing as an adaptive defence against viruses*. *Nature*, 411: 834-842.
- <sup>93</sup> Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., et al. (2003) *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi*. *Nature Biotechnology*, 21: 635 – 637.
- <sup>94</sup> Birmingham, A., Anderson, E.M., Reynolds, A., Ilesley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., et al. (2006). *30 UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets*. *Nature Methods*, 3: 199 – 204.
- <sup>95</sup> Jackson, A.L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B.N., Cleary, M., Lim, L., et al. (2006). *Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity*. *RNA*, 12: 1179 – 1187.
- <sup>96</sup> Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L., Iggo, R. (2003). *Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells*. *Nature Genetics*, 34: 263-264.
- <sup>97</sup> Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., Williams, B. R. (2003). *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. *Nature Cell Biology*, 5: 834-839.
- <sup>98</sup> Johns, L.D. (2002). *Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis*. *Journal of Athletic Training*, 37: 293–299.
- <sup>99</sup> Cui, X.Y., Fu, P.F., Pan, D.N., Zhao, Y., Zhao, J. and Zhao, B.C. (2003) *The antioxidant effects of ribonuclease inhibitor*. *Free Radical Research*, 37: 1079–1085.
- <sup>100</sup> Furia, A., Moscato, M., Cali, G., Pizzo, E., Confalone, E., Amoroso, M.R., Esposito, F., Nitsch, L., D’Alessio, G. (2011). *The ribonuclease/angiogenin inhibitor is also present in mitochondria and nuclei*. *FEBS Letters*, 585: 613–617.
- <sup>101</sup> Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., Beer, H.D. (2007). *Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion*. *Cell*, 132: 818–831.
- <sup>102</sup> Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R., Nunez, G. (2009). *The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis*. *Nature Immunology*, 10: 241-247.
- <sup>103</sup> Felton, S., Navid, F., Schwarz, A., Schwarz, T., Gläser, R., Rhodes, L.E. (2013). *Ultraviolet radiation-induced upregulation of antimicrobial proteins in health and disease*. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 12: 29–36
- <sup>104</sup> Rüniger, T.M., Ultraviolet light. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 2nd ed. London: Mosby Elsevier; 2008. p. 1321-31.

- 
- <sup>105</sup> Schwarz, T. (2008) Immunology. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 2nd ed. London: Mosby Elsevier; . p. 63-79.
- <sup>106</sup> Braff, M.H., Gallo, R.L. (2006). *Antimicrobial peptides: an essential component of the skindefensive barrier*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306: 91-110.
- <sup>107</sup> Schwarz T. Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *Keio J Med* 2005;54:165-71.
- <sup>108</sup> Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E.(2005). *Vitamin D*. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 289: F8-28.
- <sup>109</sup> Makarov, A.A., Ilinskaya, O.N. (2003). *Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets*. *The FEBS Letters*, 540: 15-20.
- <sup>110</sup> Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V.M., Saxena, S.K., Ardelt, W., Ladner, J., Youle, R.J. (1996). *Role of the N terminus in RNase A homologues: Differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity*. *Journal of Molecular Biology*, 257: 992–1007.
- <sup>111</sup> Suzuki, M., Saxena, S.K., Boix, E., Prill, R.J., Vasandani, V.M., Ladner, J.E., Sung, C., Youle, R.J. (1999). *Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction*. *Nature Biotechnology*, 17: 265-270.
- <sup>112</sup> N. A. Campbell, J.B. Reece, J.M. Markl, *Biologie*, Pearson Education Deutschland GmbH, [6. Auflage], 2006.
- <sup>113</sup> Saxena, S.K., Rybak, S.M., Winkler, G., Meade, H.M., McGray, P., Youle, R.J., Ackerman, E.J. (1991). *Comparison of RNases and toxins upon injection into Xenopus oocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 21208–21214.
- <sup>114</sup> Aberg, K.M., Man, M.Q., Gallo, R.L., Ganz, T., Crumrine, D., Brown, B.E., Choi, E.H., Kim, D.K., Schröder, J.M., Feingold, K.R., Elias, P.M. (2008) *Co-regulation and interdependence of the mammalian epidermal permeability and antimicrobial barriers*. *Journal of Investigative Dermatology*, 128: 917–925.
- <sup>115</sup> Lottspeich F, Engels JW (2012) *Bioanalytik*. Elsevier (Spektrum Akademischer Verlag), Heidelberg
- <sup>116</sup> Meyer-Hoffert, U. (2009). *Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases*. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 57: 345–354.
- <sup>117</sup> Rawlings, A.V., Voegeli, R. (2013). *Stratum corneum proteases and dry skin conditions*. *Cell Tissue Research*, 351: 217 – 235.
- <sup>118</sup> Shaw, J.L.V., Diamandis, E.P. (2007). *Distribution of 15 Human Kallikreins in Tissues and Biological Fluids*. *Clinical Chemistry*, 53: 1423–1432.
- <sup>119</sup> Meyer-Hoffert, U., Wu, Z., Kantyka, T., Fischer, J., Latendorf, T., Hansmann, B., Bartels, J., He, Y., Gläser, R., Schröder, J.M. (2010). *Isolation of SPINK6 in Human Skin*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 32174–32181
- <sup>120</sup> Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., Guerrin, M., Bernard, D., Schmidt, R., Egelrud, T., Simon, M., and Serre, G. (2004). *Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7*. *Journal of Investigative Dermatology*, 122: 1235–1244.
- <sup>121</sup> Kishibe, M., Bando, Y., Terayama, R., Namikawa, K., Takahashi, Y., Ishida-Yamamoto, A., Jiang, Y.P., Mitrovic, B., Perez, D., Iizuka, H., Yoshida, S. (2007). *Kallikrein 8 Is Involved in Skin Desquamation in Cooperation with Other Kallikreins*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 5834–5841.

- 
- <sup>122</sup> Yamasaki, K., Schaubert, J., Coda, A., Lin, H., Dorschner, R.A., Schechter, N.M., Bonnart, C., Descargues, P., Hovnanian, A., Gallo, R.L. (2006). *Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin*. The FASEB Journal, 20: 2068-2080.
- <sup>123</sup> Michael, I. P., Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., Magklara, A., Ghosh, M., Wasney, G., and Diamandis, E. P. (2005). *Biochemical and enzymatic characterization of human kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression*. Journal of Biological Chemistry, 280: 14628–14635.
- <sup>124</sup> Franzke, C. W., Baici, A., Bartels, J., Christophers, E., Wiedow, O. (1996). *Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme. Evidence for a regulative function in desquamation*. Journal of Biological Chemistry, 271: 21886–21890.
- <sup>125</sup> Borgono, C. A., Michael, I. P., Shaw, J. L., Luo, L. Y., Ghosh, M. C., Soosaipillai, A., Grass, L., Katsaros, D., Diamandis, E. P. (2006) *Expression and Functional Characterization of the Cancer-related Serine Protease, Human Tissue Kallikrein 14*. The Journal of Biological Chemistry, 281: 2405-2422.
- <sup>126</sup> Felber, L. M., Borgono, C. A., Cloutier, S. M., Kundig, C., Kishi, T., Ribeiro, C. J., Jichlinski, P., Gygi, C. M., Leisinger, H. J., Diamandis, E. P., Deperthes, D. (2005) *Enzymatic profiling of human kallikrein 14 using phage-display substrate technology*. Biological Chemistry, 386, 291–298.
- <sup>127</sup> Stefansson, K., Brattsand, M., Ny, A., Glas, B., and Egelrud, T. (2006) *Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum*. Biological Chemistry, 387: 761–768.
- <sup>128</sup> Rupec, R.A., Ruzicka, T. (2007). *Diagnose und Therapie entzündlicher Hautkrankheiten*. Bayrisches Ärzteblatt, 7-8: 392-396
- <sup>129</sup> Gambichler, T.; Skrygan, M.; Tomi, N.S.; Othlinghaus, N.; Brockmeyer, N.H.; Altmeyer, P.; Kreuter, A. (2008). *Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin*. International Archives of Allergy and Immunology, 147: 17–24.
- <sup>130</sup> Harder, J.; Dressel, S.; Wittersheim, M.; Cordes, J.; Meyer-Hoffert, U.; Mrowietz, U.; Fölster-Holst, R.; Proksch, E.; Schröder, J.-M.; Schwarz, T.; et al. (2010). *Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury*. Journal of Investigative Dermatology, 130: 1355–1364.
- <sup>131</sup> Harder, J.; Schröder, J.-M. (2005). *Psoriatic scales: A promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins*. Journal of Leukocyte Biology, 77: 476–486.
- <sup>132</sup> Yang, D.; Chen, Q.; Rosenberg, H.F.; Rybak, S.M.; Newton, D.L.; Wang, Z.Y.; Fu, Q.; Tchernev, V.T.; Wang, M.; Schweitzer, B.; et al. (2004). *Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation*. Journal of Immunology, 173: 6134–6142.

---

**Abkürzungsverzeichnis**

(v/v)	volume per volume (Volumen pro Volumen)
(w/v)	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
∞	Unendlichzeichen
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACN	Acetonitril
Ac-YVAD-CMK	Acetyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-alanyl-L-aspart-1-yl-Chloromethan
AMPs	antimikrobielle Peptide
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub>	Kaliumacetat
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CASO	Casein-Soja-Pepton-Bouillon
cDNA	(complementary DNA) komplementäre DNA
CFU	colony forming unit (koloniebildende Einheit)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FBS	fetal bovine serum (Fätales Kälberserum)
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAc	Essigsäure
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes
hBD-2	Humanes Beta-Defensin 2

hBD-3	Humanes Beta-Defensin 3
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KGM 2	Keratinocyte Growth Medium 2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KLK	Kallikrein
LB	Luria-Bertani
LRRs	leucine-rich repeats
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MnCl <sub>2</sub>	Mangandichlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NAPP	Natriumphosphatpuffer
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Opr1	outer membrane protein I
P.a.	Pseudomonas aeruginosa
PAK	Pseudomonas aeruginosa Stamm K
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFR-AMC	L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine 7-amido-4-methylcoumarin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
q-PCR	Real-time-quantitative-PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
rcf	relative centrifuge force

RE	Restriktionsendonukleasen
RI	Ribonuklease-Inhibitor
RIPA Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA Interferenz
RNase 7	Ribonuklease 7
RNH1	Ribonuklease/Angiogenin Inhibitor 1Gen
RP38	ribosomales Protein 38
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S.c.</i>	<i>Stratum corneum</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA (kleine eingreifende RNA)
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
t	Zeit
T	Thymin
T/E	Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TB	Terrific-Broth
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
TfB	Standard tranformation buffer (Standard Transformationspuffer)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptone Soya Broth (Trypton-Soja-Bouillon)
U	Unit
U/ml	units per milliliter
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
V	Volt



### **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe und Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder für die Bereitschaft, das Gutachten für diese Arbeit zu übernehmen und Herrn Prof. Dr. Jürgen Harder, der meine Arbeit als Betreuer, auch über mein Arbeitsverhältnis in der Dermatologie hinaus, gefördert und vorangebracht hat.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Harder auch für die zahlreichen interessanten Debatten und Ideen, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Dissertation in der jetzigen Form vorliegt.

Franziska Rademacher und Maren Simanski möchte ich besonders danken für Ihre konstruktive Kritik und Hilfe bei allen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Franzi, Dankeschön für deine Freundschaft.

Dankeschön Conny Wilgus und Heilwig Hinrichs für eure kompetente Einführung in die praktische Laborarbeit und Eure herzliche Zusammenarbeit mit mir. Die AG Harder ist ein hervorragendes Team und neben all dem Fachlichen sind mir besonders die guten persönlichen Kontakte sowie die wöchentlichen, köstlichen Salatrunden in Erinnerung geblieben.

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

Ein besonders lieber Dank gilt Mike für seinen emotionalen Rückhalt und seine unentwegte Motivation.

Abschließend möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mich stets ermutigt haben, diese Arbeit abzuschließen.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Lena Schröder  
Geburtsdatum: 08.10.1985  
Geburtsort: Kiel  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
derzeitige Anschrift: Lindenweg1d, 24791 Alt Duvenstedt

### Schulbildung

1992-1996 Grundschole Emkendorf  
1996-2006 Helene-Lange-Gymnasium Rendsburg,  
Abschluss: Abitur

### Weiterer Bildungsweg

Sep. 2006 – Jul. 2008 „Internationaler Studiengang Technische und Angewandte Biologie“ an der Hochschule Bremen

Sep. 2008 – Jun. 2009 Studium der Biochemie an der University of Salford  
Abschluss Bachelor of Science mit First Class Honours in Biochemical Science  
Abschlussarbeit “Association of Propranolol with Amphiphatic Systems”

Okt. 2009 – Okt. 2010 Forschungsstipendium an der University of Salford  
Abschluss Master of Science in Biochemical Science  
Abschlussarbeit “Antioxidant Activity of Lycopene and Tomato Products”

Mai 2011-Sep. 2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel  
„Untersuchungen zur Bedeutung des humanen Ribonuklease-Inhibitors und der antimikrobiellen Ribonuklease RNase 7 für die kutane Abwehr“

### Berufserfahrung

seit Okt. 2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei SGS SIT GmbH

---

Lena Schröder

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Lena Schröder, dass ich die vorliegende Dissertation, mit Ausnahme von der wissenschaftlichen Konsultation durch meinen akademischen Betreuer, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Dissertation, die anderen Quellen im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen sowie für Quellen aus dem Internet. Die Dissertation wurde unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Kiel, Juli 2018

---

Lena Schröder