

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

**UNTERSUCHUNG ZUR ROLLE DER FILAGGRIN-DOMÄNEN FLG<sub>764-903</sub> UND FLG<sub>2849-2900</sub>  
IN DER KUTANEN ABWEHR**

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

vorgelegt von  
**ANGELA HARTNAGEL, geb. SCHMIDT**  
aus Waren (Müritz)

Kiel 2018

1. Berichtstatter:	Prof. Dr. Thomas Schwarz
2. Berichtstatter:	Prof. Dr. Joachim Grötzing
Tag der mündlichen Prüfung:	14.06.2019
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	14.03.2019

gez.: Priv.-Doz. Dr. Sascha Gerdes, Prof. Dr. Jürgen Harder

Prof. Dr. Johann Roider

Meiner Familie und Dominik

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Haut.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aufbau und Differenzierung der Haut .....	2
<b>1.2 Korrelate der Differenzierung .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Der „Epidermale Differenzierungskomplex“ .....	5
1.2.2 „S100 Fused Type“-Proteine .....	5
1.2.3 Profilaggrin und Filaggrin.....	7
<b>1.3 Schutzmechanismen der Haut .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Bedeutung der kutanen antimikrobiellen Peptide .....	10
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>12</b>
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Chemikalien.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Lösungen und Puffer.....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Erworbene Lösungen und Puffer.....	14
2.2.2 Angefertigte Lösungen und Puffer .....	15
<b>2.3 Oligonukleotide.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Expressionssystem.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Enzyme .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Mikroorganismen .....</b>	<b>17</b>
<b>2.7 Nährmedien.....</b>	<b>18</b>
<b>2.8 Kits .....</b>	<b>18</b>
<b>2.9 Geräte und Trennsäulen .....</b>	<b>19</b>
<b>2.10 Pipettierhilfen und Behältnisse .....</b>	<b>21</b>
<b>2.11 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.11.1.1 Standard-PCR .....	22
2.11.1.2 „Nested PCR“ .....	23
2.11.1.3 Colony-Check-PCR zur Überprüfung der Vektorklonierung .....	26

2.11.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	28
2.11.3	DNA-Aufreinigung und -Konzentrationsbestimmung.....	29
2.11.4	Restriktionshydrolyse .....	29
2.11.5	Ligation .....	30
2.11.6	Transformation.....	31
2.11.6.1	Transformation von elektrokompetenten Bakterien .....	31
2.11.6.2	Transformation von chemokompetenten Bakterien.....	32
2.11.7	Isolierung der Plasmide .....	33
2.11.8	DNA-Sequenzierung.....	33
<b>2.12</b>	<b>Rekombinante Expression von FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> in <i>E. coli</i>.....</b>	<b>34</b>
2.12.1	Aufbau des pE-SUMO3-Expressionsvektors.....	34
2.12.2	Durchführung der Expression .....	35
<b>2.13</b>	<b>Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine .....</b>	<b>36</b>
2.13.1	Lyse der BL 21 (DE3) pLysS <i>E. coli</i> .....	36
2.13.2	Immobilisierte Nickel-Affinitätschromatografie.....	36
2.13.3	C8-Umkehrphasen-HPLC.....	38
2.13.4	Entsalzung der Fusionsprotein-Proben mittels FPLC.....	39
2.13.5	Protease-Verdau der Fusionsproteine .....	39
2.13.6	C4-Umkehrphasen-HPLC.....	39
2.13.7	C2/C18-Umkehrphasen-HPLC .....	40
<b>2.14</b>	<b>Proteinanalytik .....</b>	<b>41</b>
2.14.1	Konzentrationsbestimmung der Filaggrin-Peptide.....	41
2.14.2	Massenspektrometrische Analyse.....	41
<b>2.15</b>	<b>Antimikrobielle Testung von FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> .....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Amplifizierung der Filaggrin-Gensequenzen in der PCR .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Klonierung in den pE-SUMO3-Vektor .....</b>	<b>48</b>
3.2.1	Restriktionshydrolyse .....	48
3.2.2	Ligation und Transformation in „TOP 10 F' chemocompetent <i>E. coli</i> “ und „XL1-blue competent <i>E. coli</i> “ .....	49
3.2.3	Plasmidisolierung und Sequenzierung.....	50
3.2.4	Transformation in BL 21 (DE3) pLysS <i>E. coli</i> .....	51
<b>3.3</b>	<b>Herstellung und Aufreinigung von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> und SUMO-FLG<sub>2849-2900</sub> .....</b>	<b>51</b>

3.3.1 Herstellung von SUMO-FLG <sub>764-903</sub> und SUMO-FLG <sub>2849-2900</sub> .....	51
3.3.2 Aufreinigung von SUMO-FLG <sub>764-903</sub> und SUMO-FLG <sub>2849-2900</sub> .....	52
<b>3.4 Aufreinigung von rekombinantem FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5 Herstellung des 36 Aminosäuren großen Filaggrinpeptids (FLG 36 AS) .....</b>	<b>59</b>
<b>3.6 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität .....</b>	<b>65</b>
3.6.1 Radialdiffusionstest .....	65
3.6.2 Antimikrobielle Aktivität von FLG <sub>764-903</sub> .....	65
3.6.3 Antimikrobielle Aktivität von FLG <sub>2849-2900</sub> .....	68
3.6.4 Antimikrobielle Aktivität von FLG 36 AS .....	71
3.6.5 Übersicht der antimikrobiellen Aktivitäten .....	72
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 Einleitung .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2 Expression der Filaggrin-Proteine .....</b>	<b>74</b>
4.2.1 Bedeutung der Mutationen innerhalb der FLG-Genabschnitte .....	74
4.2.2 Bedeutung des gespaltenen FLG-Fragments .....	76
<b>4.3 FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> zeigen antimikrobielle Aktivität .....</b>	<b>80</b>
<b>4.4 Antimikrobielle Wirkmechanismen .....</b>	<b>85</b>
<b>4.5 Antimikrobielle Peptide als Therapeutika und Ausblick .....</b>	<b>87</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>98</b>
<b>7.1 Peptidfragmente .....</b>	<b>98</b>
7.1.1 FLG <sub>764-903</sub> .....	98
7.1.2 FLG <sub>2849-2900</sub> .....	98
7.1.3 FLG 36 AS .....	99
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>100</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP	Antimikrobielles Peptid
AT	Annealing-Temperatur
$\beta$	Beta
bp	Basenpaare
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
c	Konzentration
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FLG	Filaggrin
FPLC	„Fast protein liquid chromatography“
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	„High performance liquid chromatography“
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
M	molar
MEK	„Minimale effektive Konzentration“
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mPa	Millipascal
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometer
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	mikromolar (Einheit $\mu$ mol/l)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
sec	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	„Tris buffered saline“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TSB	„Tryptic soy broth“
Upm	Umdrehungen pro Minute
W	Watt
<i>Xba</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>



## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abbildung 1.1: Aufbau der menschlichen Epidermis .....	3
Abbildung 1.2: Genomische Organisation und Proteinstruktur von Profilaggrin .....	6
Tabelle 1.1: Auswahl antimikrobieller Peptide der Haut und ihrer Charakteristika (modifiziert nach (Schröder und Harder, 2006)) .....	11
Abbildung 2.1: Aufbau der pE-SUMO3-Primer .....	25
Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme und ihre Antibiotikaresistenzen .....	32
Abbildung 2.2: Struktur des pE-SUMO3-Vektors. ....	34
Abbildung 2.3: Schema der Komplexbildung in der Nickel-Säule .....	37
Tabelle 2.2: Parameter der affinitätschromatografischen Aufreinigung von SUMO-FLG .....	38
Tabelle 2.3: RP4-Gradienten-Verlauf für die Aufreinigung von FLG <sub>764-903</sub> und FLG <sub>2849-2900</sub> .....	40
Tabelle 2.4: Volumina der Mikroorganismenkulturen für den Radialdiffusionstest .....	43
Abbildung 3.1: Amplifikate der Standard-PCR in der Agarose-Gelelektrophorese.....	46
Abbildung 3.2: Amplifikate der „Nested PCR“ in der Agarose-Gelelektrophorese .....	47
Abbildung 3.3: Skizzierung der Restriktionshydrolyse am Beispiel der FLG <sub>764-903</sub> -Gensequenz.....	48
Abbildung 3.4: Überprüfung der Restriktionshydrolyse in der Agarose-Gelelektrophorese.....	49
Abbildung 3.5: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel zur Überprüfung der Plasmid-Isolierung.....	51
Abbildung 3.6: Chromatogramm der Auftrennung des rekombinant hergestellten SUMO-FLG <sub>764-903</sub> mittels C8-Umkehrphasen-HPLC .....	53
Abbildung 3.7: Massenbestimmung von SUMO-FLG <sub>764-903</sub> mittels QTOF-Massenspektrometrie .....	54
Abbildung 3.8: Chromatogramm der C18-Umkehrphasen-HPLC von SUMO-FLG <sub>764-903</sub> .....	55
Abbildung 3.9: Massenbestimmung von SUMO-FLG <sub>764-903</sub> mittels QTOF-Massenspektrometrie .....	56
Abbildung 3.10: Chromatogramm der Auftrennung des rekombinant hergestellten FLG <sub>764-903</sub> mittels C4-Umkehrphasen-HPLC .....	57
Abbildung 3.11: Massenbestimmung von FLG <sub>764-903</sub> mittels QTOF-Massenspektrometrie .....	58
Abbildung 3.12: Massenbestimmung von FLG <sub>2849-2900</sub> mittels QTOF-Massenspektrometrie .....	59
Abbildung 3.13: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Standard-PCR- und „Nested PCR“-Amplifikate .....	60
Abbildung 3.14: cDNA und Proteinsequenz von FLG <sub>2339-2374</sub> .....	62
Abbildung 3.15: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel mit Produkten der Colony-Check-PCR zur Überprüfung der Transformation.....	63

Abbildung 3.16: Massenbestimmung von FLG 36 AS mittels QTOF-Massenspektrometrie .....	64
Tabelle 3.1: Ergebnisse des Radialdiffusionstests von FLG <sub>764-903</sub> .....	67
Abbildung 3.17: Auswertung des Radialdiffusionstests für FLG <sub>764-903</sub> (Steinberg und Lehrer).....	67
Abbildung 3.18: Radialdiffusionstest von FLG <sub>764-903</sub> gegen <i>C. albicans</i> ATCC 24433 bei pH 5.....	68
Tabelle 3.2: Ergebnisse des Radialdiffusionstests von FLG <sub>2849-2900</sub> bei pH 5.....	69
Abbildung 3.19: Auswertung des Radialdiffusionstest für FLG <sub>2849-2900</sub> (Steinberg und Lehrer).....	70
Abbildung 3.20: Trübungsphänomen von <i>S. aureus</i> ATCC 6538 im Hof des FLG <sub>2849-2900</sub> .....	70
Tabelle 3.3: Ergebnisse des Radialdiffusionstests von FLG <sub>2849-2900</sub> bei zunehmenden NaCl-Konzentrationen.....	71
Tabelle 3.4: Übersicht zur antimikrobiellen Wirksamkeit der Filaggrin-Peptide .....	72
Tabelle 4.1: Eigenschaften der synthetisierten Filaggrinpeptide.....	80

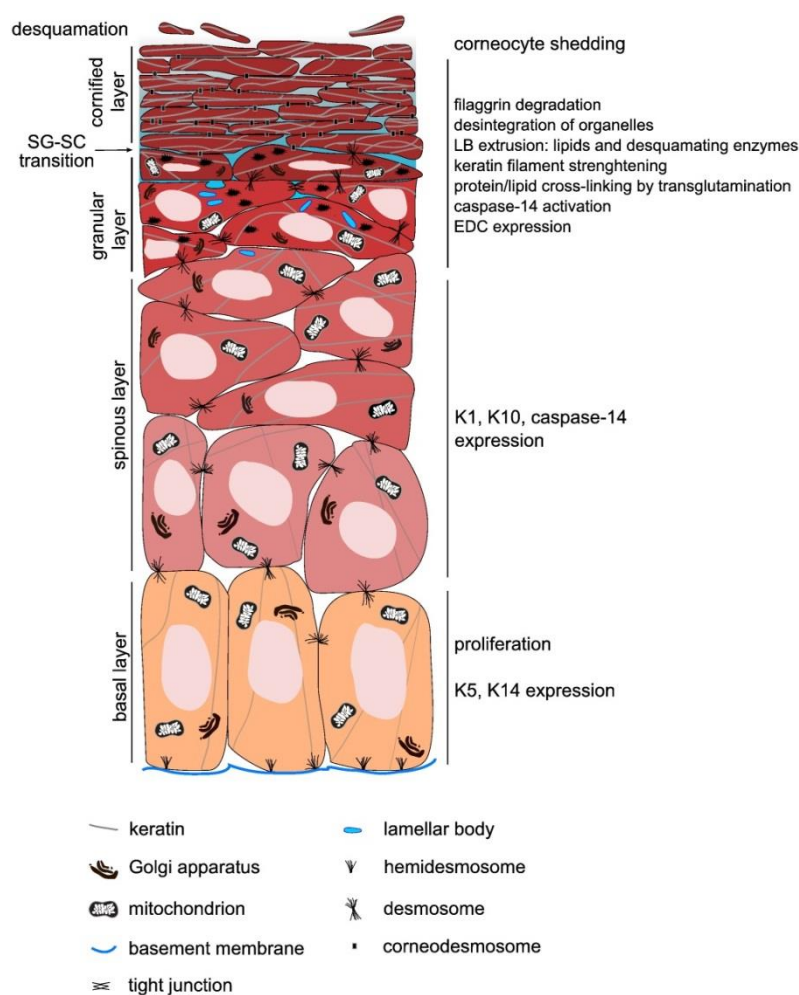
## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Die Haut

Die Haut gleicht einem Verteidigungswall der besonderen Art. Die menschliche Körperoberfläche ist verschiedensten Umwelteinflüssen ausgesetzt, allen voran chemischen und physikalischen Reizen wie beispielsweise Reibung, Druck, Hitze oder elektromagnetische Strahlung (Baroni et al., 2012). Die Haut bildet gegen alle Arten dieser „Angriffe“ aus der Umwelt eine wirksame „Schutzmauer“ mit ihren wallartig geschichteten epidermalen Zellen. Aber nicht nur diesen Umwelteinflüssen hält sie stand. Auf jedem Quadratzentimeter der Haut leben ca.  $10^2$  bis  $10^7$  Mikroorganismen (Schröder und Harder, 2006), die nicht nur von einer chemischen - sowie mechanischen Barriere, sondern auch von immunologischen Abwehrmechanismen vonseiten der Haut am Eindringen in den Körper gehindert werden. Der Schutz der Haut ist auch von innen nach außen wirksam, indem sie übermäßigen Wasseraustritt aus dem Körper verhindert und eine regulierte Feuchtigkeitsabgabe an der Hautoberfläche ermöglicht. Die Sekretion der Schweißdrüsen und die besondere Architektur der Gefäßkapillaren in der Haut dienen neben der Flüssigkeitshomöostase auch der Thermoregulation des Körpers (Lüllmann-Rauch, 2006). Als eines der größten menschlichen Organe mit einer Fläche von etwa  $1,8 \text{ m}^2$  bei Erwachsenen (Henry et al., 2012) ist die Haut Träger kleiner Sinnesorgane (Thermosensoren, Mechanorezeptoren, Nozizeptoren), welche die Kommunikation zwischen Umwelt und Innerem des Körpers vermitteln. Ebenso lassen das Erblassen, Erröten oder Schwitzen der Haut auf Vorgänge im Körperinneren deuten und dienen als medizinisches Diagnostikum. Zur Aufrechterhaltung ihrer lebenswichtigen Funktionen ist eine ständige Reparatur und Erneuerung der obersten Hautschichten essentiell (Simpson et al., 2011). Aus fehlerhafter Formierung, Reparatur oder Erneuerung der oberen Hautschichten resultieren schwerwiegende Krankheitsbilder wie beispielsweise Psoriasis oder atopische Dermatitis (Segre, 2006).

### 1.1.1 Aufbau und Differenzierung der Haut

Die Funktionen der Haut sind eng mit ihrem Aufbau verknüpft. Die menschliche Hautdecke (Integumentum commune) setzt sich zusammen aus der Haut (Cutis) und der Unterhaut (Subcutis). Die Cutis wird nochmals in Dermis und darüber liegende Epidermis aufgeteilt (Lüllmann-Rauch, 2006). Von innen nach außen betrachtet liegt die Subcutis den Muskelfaszien und Knochen auf und besteht vorwiegend aus lockerem Bindegewebe und -je nach Lokalisation- Fettgewebe, in welchem die epifaszialen Nerven und Gefäße verlaufen. Neben ihrer Funktion als druckpolsterartiges verschiebbares Widerlager dient sie der Wärmeisolierung und Energiespeicherung des Körpers. Die darüber befindliche Dermis ist eine bindegewebige Schicht, welche der Haut sowohl Elastizität als auch Reißfestigkeit verleiht. Sie enthält eine Matrix aus Kollagen und elastischen Fasern, welche von Fibroblasten synthetisiert wird. Die Dermis ist hochvaskularisiert und mit einem feinen Netzwerk von Lymphgefäßen ausgestattet (Baroni et al., 2012). In ihr haben Schweißdrüsen, Talgdrüsen, Haarfollikel und Meißner-Tastkörperchen ihren Sitz. Unter einer Vielzahl an unterschiedlichen Zellen enthält die Subcutis weiterhin Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen als Zellen des Immunsystems. Durch die Basalmembran ist die Subcutis nach außen von der Epidermis (siehe Abbildung 1.1) abgegrenzt. Der vorherrschende Zelltyp des mehrschichtig verhornenden Plattenepithels in der Epidermis sind Keratinozyten, aber auch pigmentbildende Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkelzellen finden sich vereinzelt (Lüllmann-Rauch, 2006). Innerhalb von vier histologischen Schichten vollziehen die Keratinozyten eine komplexe Differenzierung, deren Ziel die Verhornung und Herstellung einer widerstandsfähigen äußeren Barriere darstellt (Eckhart et al., 2013).



### Abbildung 1.1: Aufbau der menschlichen Epidermis

Schematisch dargestellt sind die einzelnen Schichten der Epidermis. Ausgehend vom *Stratum basale* („basal layer“), dem Ort der Zellproliferation, durchwandern die Keratinozyten während ihrer Differenzierung *Stratum spinosum* („spinal layer“) und *Stratum granulosum* („granular layer“) um schließlich als tote Korneozyten das *Stratum corneum* („granular layer“) zu bilden. Während der Differenzierung verändern die Keratinozyten ihre Zellform und durchlaufen wichtige Schlüsselschritte, welche rechts im Bild angeführt sind (Eckhart et al., 2013)

Die hochprismatischen Zellen des *Stratum basale* bestehen aus interfollikulären epidermalen Stammzellen und teilungsfähigen Tochterzellen, welche allesamt durch Hemidesmosomen fest mit der Basalmembran verankert sind (Alonso und Fuchs, 2003). Sie sind gering differenziert und exprimieren Keratinfilamente vom Typ 5 und 14 (Fuchs und Green, 1980). Die aus den asymmetrischen mitotischen Teilungen hervorgehenden Keratinozyten verlieren den Kontakt zur Basalmembran und steigen in das darüber befindliche *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) auf. Namensgebend für diese Zellschicht sind die sich hier ausbildenden Desmosomen, durch welche die Keratinozyten untereinander verbunden sind (Lüllmann-Rauch, 2006). In gesunder Epidermis sind die Keratinozyten der Stachelzellschicht nicht mehr

teilungsfähig und gehen in den Prozess der Differenzierung über, wobei die Genexpression etlicher Enzyme (z.B. Caspase 14), Strukturproteine der späteren Hornhülle (z.B. Involucrin, Trichohyalin, Loricrin, „Small proline-rich proteins“) und des Zytoskeletts wie auch Keratin 1 und 10 eingeleitet wird (Candi et al., 2005). Im Verlauf der Differenzierung steigen die Keratinozyten in das *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht) auf, in welchem sie histologisch anhand ihrer granulären, intrazellulären Strukturen zu erkennen sind. Innerhalb der Granula (Keratohyalingranula) werden sowohl Loricrin (L-Granula) als Protein der späteren Hornhülle („cornified envelope“) als auch phosphoryliertes Profilaggrin (F-Granula) gespeichert (Steven et al., 1990). Nach Dephosphorylierung erfolgt die Prozessierung des über 400 kDa großen Profilaggrin in seine Filaggrin-Untereinheiten (siehe 1.2.3), welche die Keratin-Intermediärfilamente zu Makrofibrillen zu vernetzen scheinen und so eine Abflachung der Keratinozyten bewirken (Dale et al., 1997). Die gebündelten Keratin-Fibrillen dienen auch der späteren Formierung der Hornhülle als Gerüst (Candi et al., 2005). Am Übergang zum *Stratum corneum* (Hornschicht) werden die Proteine der Hornhülle unterhalb der Zellmembran von Transglutaminasen zu einer starren, bis zu 15 nm dicken Matrix („Cornified envelope“) kovalent vernetzt (Jarnik et al., 1998), welche nachfolgend die Zellmembran ersetzt. Im Verlauf der Wanderung nach superficial werden in den Keratinozyten ebenfalls lamellierte Granula („Lamellar bodies“) synthetisiert, in welchen gestapelte Lipidlamellen gespeichert sind (Madison, 2003). Diese Granula fusionieren am Übergang zum *Stratum corneum* mit der Plasmamembran und setzen die Lipidlamellen in die Zellzwischenräume frei, wo sie wie eine Art Mörtel die ziegelartigen Zellen umgeben (Nemes und Steinert, 1999). Hauptbestandteile der horizontal angeordneten Lipidlamellen sind Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren (Weerheim und Ponec, 2001), welche außerhalb der Zelle prozessiert und mit einzelnen Proteinen der Hornhülle verbunden werden. Die unpolare Lipidhülle verhindert das Eindringen polarer Stoffe in die Haut und vermindert den transepidermalen Wasserverlust. Außerdem sind Tight junctions, welche zwischen den Keratinozyten der obersten Zellschicht des *Stratum granulosum* ausgebildet werden, für die Aufrechthaltung der epidermalen Barriere essentiell (Lüllmann-Rauch, 2006). Innerhalb der Keratinozyten werden im Prozess der Verhornung sämtliche Zellorganellen degradiert (Eckhart et al., 2013), der Wassergehalt der Zellen sinkt von ca. 70 % auf 40 % (Caspers et al., 2001) und die Zellen unterlaufen einen geplanten Zelltod, welcher von der Apoptose zu unterscheiden ist (Lippens et al., 2005). Es verbleiben ziegelartige Bündel aus Keratinfilamenten, welche von einer festen Hornhülle

umgeben sind und nachfolgend als Korneozyten bezeichnet werden (Nemes und Steinert, 1999). Die in 25 bis 100 Zelllagen geschichteten Korneozyten sind untereinander durch Korneodesmosomen verknüpft, welche in den obersten Schichten der Hornschicht proteolytisch gespalten werden und die Desquamation der obersten Zelllagen einleiten (Eckhart et al., 2013). Der Prozess, in welchem ein Keratinozyt alle Differenzierungsschritte bis hin zur abschließenden Abschuppung durchläuft, nimmt eine Zeitspanne von etwa 30 Tagen in Anspruch (Houben et al., 2007).

## 1.2 Korrelate der Differenzierung

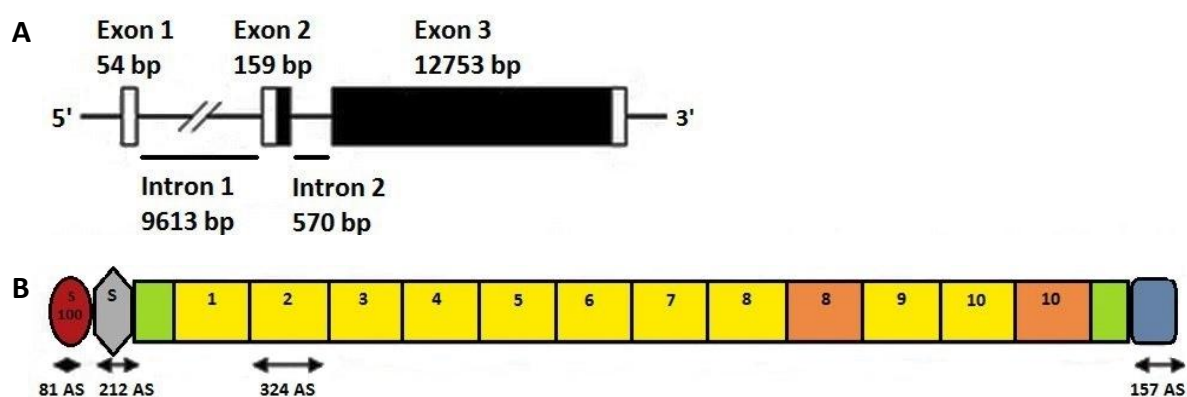
### 1.2.1 Der „Epidermale Differenzierungskomplex“

Der gesamte Differenzierungsprozess wird straff kontrolliert, sowohl auf Ebene der Enzymaktivitäten als auch auf Ebene der Genexpression (Eckhart et al., 2013). Chromosom 1 ist das größte Chromosom des Menschen und enthält annähernd acht Prozent aller genetischer Information (Gregory et al., 2006). Unter diesen Genen befindet sich in der Region 1q21 auch der „Epidermale Differenzierungskomplex“ (Mischke et al., 1996), welcher die Gene von ca. 60 epidermalen Differenzierungsproteinen herbergt. Diese zwei Megabasenpaare zählende Region kodiert im Wesentlichen vier Proteinklassen, die allesamt an der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt sind - darunter S100-Proteine, „Late cornified envelope“-Proteine, „Cornified Cell Envelope Precursor“-Proteine und „S100 Fused Type“-Proteine (Henry et al., 2012).

### 1.2.2 „S100 Fused Type“-Proteine

Zur Klasse der sieben humanen „S100 Fused Type“-Proteine zählt man Profilaggrin, Filaggrin 2/Ifapsoriasin (Wu et al., 2009a), Hornerin (Takaishi et al., 2005), Trichohyalin (Lee et al., 1993), Trichohyalin-like 1 (Wu et al., 2011), Repetin (Huber et al., 2005) und Cornulin (Contzler et al., 2005). Die Gensequenzen dieser Proteine sind auf einer 330 kb zählenden Region des „epidermalen Differenzierungskomplexes“ lokalisiert und haben Ähnlichkeit in ihrer Genorganisation (Henry et al., 2012). Sie beginnen mit einem kleinen, nicht-kodierenden Exon am 5'-Ende, welchem sich das erste Intron anschließt (siehe Abbildung 1.2 A). Das ebenfalls kleine zweite Exon enthält den Start der translatierenden Region. Einem zweiten Intron folgt am 3'-Ende ein ungewöhnlich großes Exon, das den größten Umfang der

„S100 Fused Type“-Proteine kodiert. Die „S100 Fused Type“-Proteine werden in mehrschichtigen verhornenden Plattenepithelien und/oder Haarfollikeln exprimiert (Henry et al., 2012). Sie vereinigen Strukturen und Eigenschaften von S100-Proteinen und „Cornified Cell Envelope Precursor“-Proteinen, was zur Namensgebung dieser Proteinklasse beigetragen hat. In Homologie zu den S100-Proteinen enthalten die „S100 Fused Type“-Proteine eine N-terminale, potentielle  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Region mit zwei „EF-Hand“-ähnlichen Bindungsstellen (S100-Domäne). Die präzise Funktion dieser Region ist derzeit unerforscht, allerdings lässt sich eine Beteiligung an der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der terminalen Differenzierung von Keratinozyten vermuten (Henry et al., 2012). Die N-terminale Domäne der Proteine ist fusioniert mit einer für „Cornified Cell Envelope Precursor“-Proteine typischen riesigen zentralen Domäne, welche aus einer Vielzahl sich wiederholender Peptidsequenzen besteht. Es folgt eine kleinere C-terminale Domäne, die für jedes der Proteine spezifisch ist (Kyriotou et al., 2012). Die Proteinsequenz der „S100 Fused Type“-Proteine ist im Folgenden am Beispiel von Profilaggrin verdeutlicht (siehe Abbildung 1.2 B).



### Abbildung 1.2: Genomische Organisation und Proteinstruktur von Profilaggrin

A) Schematische Exon-/Intronorganisation von „S100 Fused Type“-Genen im „Epidermalen Differenzierungskomplex“ am Beispiel der Profilaggrin-Gensequenz. Weiß: nicht kodierende Exonbereiche; schwarz: proteinkodierende Exonbereiche. Alle Zahlenangaben der Basenpaare (bp) für Profilaggrin. B) Schematischer Aufbau der „S100 Fused Type“-Proteine am Beispiel von Profilaggrin. Strukturmerkmale sind N-terminale  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende S100-Domäne (rot), Spacer-Region (grau), Wiederholungssequenzen (gelb) sowie die C-terminale proteinspezifische Domäne (blau). Für Profilaggrin charakteristisch sind die zehn bis zwölf Filaggrin-Wiederholungssequenzen mit potentiellen Dopplungen von Sequenz 8 und/oder 10 (orange), sowie die umrahmenden trunkeierten Filaggrinsequenzen (grün). Alle Zahlenangaben der Aminosäuren (AS) für Profilaggrin (modifiziert aus Henry et al., 2012).



### 1.2.3 Profilaggrin und Filaggrin

Profilaggrin ist das erste beschriebene „S100 Fused Type“-Protein und Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit. Es wird als 4061 Aminosäuren zählendes Vorläuferprotein im *Stratum granulosum* synthetisiert (Presland et al., 1995). Die Aminosäuren Serin, Glycin, Arginin und Histidin machen fast 60 % der Aminosäuren dieses kationischen Proteins aus. Kurz nach seiner Translation wird Profilaggrin an vielen Stellen phosphoryliert und als unlösliches Propeptid in F-Keratohyalin granula gespeichert (Harding et al., 2013). Profilaggrin (siehe Abbildung 1.2 B) enthält eine N-terminale  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende S100-Domäne, eine Spacer-Region (B-Domäne), zehn bis zwölf Filaggrin-Wiederholungssequenzen, welche von partiellen Filaggrinsequenzen umrahmt werden, und eine C-terminale Domäne (McKinley-Grant et al., 1989, Gan et al., 1990, Presland et al., 1992). Die N-terminale Domäne von Profilaggrin weist - ähnlich wie S100-Proteine - zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen auf (S100-Domäne), was dem Protein möglicherweise eine Rolle in der Regulation von calciumabhängigen Vorgängen während der terminalen Differenzierung verschafft (Presland et al., 1992, Nirunsuksiri et al., 1995). Eine *in vitro* Calciumbindung dieser Domäne ist erwiesen (Markova et al., 1993), genauso wie eine Konformationsänderung von Profilaggrin bei Entfernung der gebundenen Calcium-Ionen (Presland et al., 1995), wodurch möglicherweise Schnittstellen für die weitere Prozessierung von Profilaggrin in seine Untereinheiten freigelegt werden (Sandilands et al., 2009). Die Spacer-Region (B-Domäne) des Profilaggrin enthält eine Kern-Zielsequenz, die die Translokation der B-Domäne in den Zellkern der terminal differenzierten Keratinozyten nach sich zieht und möglicherweise zur Degradierung des Zellkerns am Übergang von *Stratum granulosum* zu *Stratum corneum* beiträgt (Ishida-Yamamoto et al., 1998). Die Funktion der C-terminalen Domäne ist bisher unbekannt, wobei ein Fehlen dieser Domäne die proteolytische Spaltung von Profilaggrin in einzelne Filaggrin-Monomere verhindert (Sandilands et al., 2007b). Eine Vielzahl beschriebener Enzyme (z.B. Calpain 1, Furin, Maltriptase 1, Profilaggrin Endoproteinase 1, Elastase 2) trägt zur Prozessierung von Profilaggrin und Spaltung in seine Filaggrinmonomere bei (Übersicht in (Harding et al., 2013)). Die einzelnen Filaggrin-Sequenzen („Repeats“) sind jeweils 324 Aminosäuren lang und untereinander verbunden durch kleine Linkersequenzen, innerhalb welcher die proteolytische Spaltung in einzelne Monomere erfolgt (McKinley-Grant et al., 1989). Die Monomere weisen große Heterogenität auf und zeigen schon zwischen benachbarten Sequenzen hohe

Variabilität ihrer Aminosäuren (Gan et al., 1990). Auch die jeweilige Anzahl der FLG-Repeats ist individuell und wird nach den Mendelschen Regeln vererbt (Gan et al., 1990), wobei eine Anzahl von zwölf Wiederholungssequenzen einer Dopplung von Repeat 8 und 10 entspricht (Sandilands et al., 2007a). Die einzelnen Filaggrin-Einheiten vermögen *in vitro* Keratinfilamente zu vernetzen (Steinert et al., 1981), was ihnen ihren Namen als „*Filament aggregating protein*“ einbrachte. Die Vernetzung von Keratinfilamenten zu straffen Bündeln verursacht eine Abflachung der Keratinozyten (Dale et al., 1997), wie sie sich am Übergang von *Stratum granulosum* zu *Stratum corneum* vollzieht. Verschiedene Enzyme sind an der anschließenden Degradierung von Filaggrin in einzelne Aminosäuren beteiligt, welche sich innerhalb kürzester Zeit vollziehen kann - beispielhaft genannt seien Calpain 1, Caspase 14 und Bleomycin Hydrolase (Übersicht in (Harding et al., 2013)). Die hygroskopischen Aminosäuren und ihre Metabolite (z.B. Pyrrolidincarbonsäure aus Glutamin) erreichen als „Natural moisturizing factors“ innerhalb der Hornhaut die Speicherung von Wasser und schützen sie somit vor Austrocknung (Harding et al., 2000). Seit einigen Jahren rückt Filaggrin auch vermehrt in den Fokus der medizinischen Forschung, da Mutationen im Filaggrin-Gen als Auslöser von Ichthyosis vulgaris (Smith et al., 2006) sowie als Risikofaktor für die Entwicklung von atopischer Dermatitis (Palmer et al., 2006) oder einer Erdnussallergie (Brown et al., 2011) beschrieben wurden.

### 1.3 Schutzmechanismen der Haut

Auf vielfältige Art und Weise vermag die Haut den menschlichen Körper vor schädlichen Einflüssen zu schützen und ihn vor Infektionen durch Mikroorganismen zu bewahren. Zum einen bietet das *Stratum corneum* mit einer intakten physikalischen Barriere aus Korneozyten, festen Zellkontakten und umgebender Lipidhülle wenig Eintrittsmöglichkeiten für kolonisierte Mikroorganismen auf der Körperoberfläche. Außerdem wird ihre Adhärenz durch die immerwährende Desquamation zusätzlich erschwert. Als eine chemische Komponente der Hautbarriere sei weiterhin ihr saurer pH-Wert (4,5-5,0) erwähnt (Elias, 2005), welcher eine selektive Kolonisation der kommensalen Mikroflora (z.B. Staphylokokken, Propionibakterien) zulässt und somit die Ansiedlung potenziell pathogener Keime unwahrscheinlicher macht (Baroni et al., 2012).

Zur chemischen Barriere der Epidermis werden außerdem antimikrobielle Lipide (Übersicht in (Drake et al., 2008)) und Peptide gezählt, welche von Keratinozyten synthetisiert werden und vor einer bakteriellen Überbesiedlung der Haut schützen. Antimikrobielle Peptide und Lipide zählen nebenbei - wie auch Komplementfaktoren- zu den azellulären Bestandteilen der angeborenen Immunität. Die angeborene Immunität wird als phylogenetisch älter als die adaptive Immunität angesehen, da auch schon Pflanzen und Wirbellose über einige ihrer Schutzmechanismen verfügen (Broekaert et al., 1995, Tzou et al., 2000). Das angeborene Immunsystem ist fähig sehr schnell artfremde Strukturen und pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) wie beispielsweise Lipopolysaccharide, Flagellin oder Peptidoglykan von Bakterien mittels „*Pattern-recognition receptors*“ (z.B. Toll-like-Rezeptoren) zu erkennen und in kürzester Zeit eine Immunantwort einzuleiten (Richmond und Harris, 2014). Die Immunantwort auf fremde Strukturen ist allerdings wenig variabel und unspezifisch. Die Effektoren der angeborenen Immunität in der Haut sind auf zellulärer Ebene hauptsächlich ortständige Langerhans-Zellen, Mastzellen, Makrophagen und dermale dendritische Zellen sowie rekrutierbare Granulozyten, „Natural Killer“-Zellen und Monozyten. Ihre Abwehr vermitteln sie beispielsweise über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, Phagozytose, Opsonierung oder Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Der Vorteil der adaptiven Immunität liegt in der Fähigkeit eine sehr spezifische Immunreaktion einzuleiten, sowie in ihrer hohen Variabilität und der Ausbildung eines immunologischen „Gedächtnisses“. Die Immunantwort des adaptiven Immunsystems braucht im Allgemeinen jedoch eine längere Anlaufzeit als die des angeborenen Immunsystems. Die erworbene Abwehr wird auf zellvermittelter Ebene von T-Lymphozyten und auf humoraler Ebene von B-Lymphozyten, Plasmazellen und den von ihnen sezernierten Antikörpern bewerkstelligt (Lüllmann-Rauch, 2006). Zur Auslösung einer Immunreaktion muss an der Oberfläche der Lymphozyten zunächst ein Antigen gebunden und erkannt werden, ehe ein komplexer Abwehrmechanismus initiiert wird. So können T-Lymphozyten als zytotoxische T-Zellen infizierte körpereigene Zellen lysieren, als T-Helferzellen andere Zellen des Immunsystems aktivieren oder als ortständige Gedächtniszellen gezielte Abwehr bei Reinfektionen desselben Pathogens vermitteln. Erworbene und angeborene Vorgänge der Immunabwehr sind eng miteinander verflochten und fein aufeinander abgestimmt. Als Beispiele hierfür sei das Wechselspiel zwischen

antigenpräsentierenden Makrophagen und von ihnen aktivierten T-Lymphozyten oder die Rolle von Antikörpern in der klassischen Einleitung der Komplementkaskade erwähnt.

### 1.3.1 Bedeutung der kutanen antimikrobiellen Peptide

Auch antimikrobielle Peptide können als Aktivatoren des adaptiven Immunsystems und als Brückenelement zwischen angeborener und erworbener Immunantwort fungieren. In Hinblick auf ihre vielfältigen weiteren Funktionen wurden sie ebenso mit Namen wie „Host Defense“-Peptide (Oyston et al., 2009) oder „Alarmine“ (Oppenheim und Yang, 2005) bezeichnet (Nakatsuji 2012). In dieser Arbeit soll jedoch der Einfachheit halber der historische Terminus der antimikrobiellen Peptide genutzt werden. Antimikrobielle Peptide (AMP) der Haut sind charakterisiert durch eine meist relativ geringe Größe, ihre Kationizität aufgrund einer Vielzahl an Lysin- und Argininresten, ihre amphipathische Struktur und ihre Fähigkeit, Mikroorganismen am Wachstum zu hindern oder gar zu töten (Lai und Gallo, 2009). Das erste beschriebene humane AMP wurde von Fleming im Jahr 1922 „Lysozym“ genannt und im Nasensekret nachgewiesen (Fleming und Allison, 1922, Nakatsuji und Gallo, 2012). Eine klassische Einteilung der humanen AMPs wird durch ihre Größe, ihre Peptidfrequenzen und ihre Sekundärstrukturen vorgenommen; hier sind die vier Gruppen der Defensine, Cathelicidine, Ribonukleasen und S100-Proteine zu nennen (Harder et al., 2007). Die AMPs, die vorrangig in der Kutis exprimiert werden, lassen sich weiterhin nach vorrangigem Vorkommen in der entsprechenden epidermalen Schicht einteilen. So kommt Psoriasin (S100A7) im Stratum granulosum und corneum vor (Gläser et al., 2005), während RNase 7 (R7) vor allem im Stratum corneum nachzuweisen ist (Harder und Schröder, 2002). Ebenso lassen sich die AMPs der Haut in ein Wirkspektrum gegenüber verschiedenen Mikroorganismen einteilen; während Psoriasin eine außerordentliche antimikrobielle Aktivität gegenüber *E. coli* besitzt (Gläser et al., 2005), zeigt RNase 7 eine Wirksamkeit gegenüber *S. aureus* (Simanski et al., 2010). Bemerkenswerterweise gibt es sowohl konstitutiv exprimierte AMPs (Psoriasin, RNase 7) als auch induzierbare AMPs, wie das durch proinflammatorische Zytokine induzierte hBD2 (Schröder und Harder, 1999) sowie auch das vor allem in psoriatischen Hautschuppen enthaltene hBD3 (Harder et al., 2001). In einer modifizierten Übersicht (Tabelle 1.1) sind nachfolgend die einzelnen Charakteristika der oben genannten kutanen antimikrobiellen Peptide zusammengefasst (Schröder und Harder, 2006).

**Tabelle 1.1: Auswahl antimikrobieller Peptide der Haut und ihrer Charakteristika (modifiziert nach (Schröder und Harder, 2006))**

Name	Antimikrobielle Aktivität	Chemotaktische Wirkung auf	Induzierbarkeit in der Entzündungssituation
RNase 7	Gram +/- Bakterien Pilze	?	ja
Psoriasin	Gram (+)/- Bakterien	T-Zellen Neutrophile	ja
h-BD2	Gram (+)/- Bakterien Pilze	T-Zellen, Mastzellen, dendritische Zellen	ja
h-BD3	Gram +/- Bakterien Pilze	T-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen	ja
Lysozym	Gram +/- Bakterien Pilze	?	nein

Eine weitere Unterscheidung der AMPs ergibt sich durch ihre verschiedensten Wirkmechanismen, die eng an ihre chemische Struktur geknüpft sind. Einige dieser Funktionen sind *in vitro* erforscht, andere bleiben jedoch *in vivo* noch unerforscht zur jetzigen Zeit. Folgende Beispiele sind hier zu nennen: Ganz und Lehrer postulierten im Jahr 1989 als Wirkmechanismus der humanen Defensine auf *Escherichia coli* eine Interaktion der kationischen Proteinreste mit den negativ geladenen Phospholipidgruppen der bakteriellen Membranoberfläche durch elektrostatische Wechselwirkungen. Diese Wirkung konnte jedoch nur auf metabolisch aktive und wachsende Bakterien nachgewiesen werden, wobei sowohl die innere als auch die äußere Zellmembran aufgelöst wurden (Lehrer et al., 1989). Ebenso stützten die späteren Erkenntnisse von Kagan und Lehrer diese These (Kagan et al., 1990). Hier wurde eine Porenbildung von Defensinen in Doppelmembranen *in vitro* beschrieben, durch welche die Bakterien bei einem plötzlichen Verlust des Membranpotentials und einem Ausströmen des Zellinhalts abgetötet wurden. Anders als bei Defensinen als kationische Proteine wird für Psoriasin eine Zink-Ionenbindung diskutiert, welche dann als essenzielle Ionen für *Escherichia coli* nicht mehr zur Verfügung stehen. Zink-Ionen sind für die Funktion der Kupfer/Zink-Superoxiddismutase vonnöten, welche die Bakterien vor oxidativem Stress schützt. Eine Zink-Sequestration durch die besondere Zink-bindende Domäne des Psoriasins mündet durch oxidativen Stress somit ebenfalls in Zelltod (Wiedow et al., 1998, Gläser et al., 2005). Eine neuere Untersuchung von Sass ergab als antimikrobiellen Mechanismus eine Inhibition der Zellwandsynthese von grampositiven Staphylokokken durch h-BD3 (Sass et al., 2010). Hierbei wurde elektronenmikroskopisch an Bakterien die lokale Protrusion von

Zellinhalt festgestellt, nachdem sie mit h-BD3 behandelt wurden. *In vitro* inhibierte h-BD3 hierbei die Enzyme der membrangebundenen Zellwandbiosynthese.

Antimikrobielle Peptide der Haut und des Körpers sind jedoch in viel weiter reichende Prozesse der Immunmodulation involviert, sodass eine Bezeichnung als AMPs diese zusätzlichen Funktionen nicht hinreichend beschreibt. Beispielsweise wurde eine Tumorzellabtötung durch das AMP Magainin 2 beschrieben, welche *in vivo* und *in vitro* eine antitumoröse Wirkung in murinen Peritonealtumoren, Leukämien und ovariellen Tumorzellen zeigte (Baker et al., 1993). Eine weitere Funktion ist die Modulation anderer Komponenten der angeborenen Immunabwehr, so wie schon oben eine chemotaktische Wirkung von hBD3 für Monozyten beschrieben wurde. Einige diese Peptide können wichtige zelluläre Funktionen wie Chemotaxis, Apoptose, Genexpression oder Zytokinproduktion modifizieren, zusätzlich wurde sogar eine Rolle einiger Peptide in der Stimulation von Wundheilung und Angiogenese festgestellt (Allaker, 2008). Nicht zuletzt treten AMPs auch als Verbindungselement zwischen angeborener und erworbener Immunantwort auf.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Gegenstand der Forschung in unserer Arbeitsgruppe sind die AMPs der Epidermis. Besondere Beachtung wurde dabei den „S100 Fused Type“-Proteinen geschenkt, welche in erster Linie für ihre Beteiligung an der späten epidermalen Differenzierung bekannt sind (siehe 1.2.2). Im Jahr 2005 gelang es, Hornerin als ein Vorläuferpeptid zu identifizieren, welches durch proteolytische Spaltung antimikrobiell aktive Fragmente hervorbringt (Wu, 2005). Ebenso ließ sich für Fragmente des humanen Filaggrin 2/Ifapsoriasin antimikrobielle Aktivität nachweisen (Hansmann, 2008, Junge, 2011). Nach HPLC-Analysen von Proteinextrakten des *Stratum corneum* in gesunder Haut und anschließender mikrobiologischer Testung zeigten sich unter positiv getesteten HPLC-Fractionen neben den schon bekannten AMPs RNase 7, Psoriasin und Lysozym auch Fragmente des „S100 Fused Type“-Proteins Profilaggrin. Somit ergab sich die Frage, ob auch Teile des Profilaggrins zu dieser antimikrobiellen Aktivität beigetragen hatten und eine Komponente der angeborenen kutanen Abwehr vor Mikroorganismen darstellen. In vorangehenden Dissertationen wurden bereits Fragmente der Spacer-Region (B-Domäne) von Profilaggrin als antimikrobiell aktive Peptide identifiziert (Schulz, 2010, Karsch, 2011). In dieser Arbeit sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob ebenso Fragmente der Filaggrin-

Untereinheiten eine antimikrobielle Aktivität aufweisen, denn auch sie waren Bestandteile der vormals antimikrobiell getesteten HPLC-Fractionen. Dafür wurden die Domänen FLG 764-903 (verbindet Repeat 1 und 2) und FLG 2849-2900 (in Repeat 8) zunächst rekombinant exprimiert, aufgereinigt und anschließend auf mögliche antimikrobielle Eigenschaften getestet.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

2-Propanol HiPerSolv CHROMANORM® for HPLC	VWR
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
Coomassie®* Brilliant Blue G 250 Powder	Serva
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas
Waters API Calibration Solution (NaCsl)	ULTRA Scientific
SmartLadder - 200 to 10000 bp	Eurogentec
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas
Tris-(2-chlorethyl)-phosphat	Serva
Universal-Agarose	BIO&SELL

Die nicht angeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck und Sigma-Aldrich bezogen.

### 2.2 Lösungen und Puffer

#### 2.2.1 Erworbene Lösungen und Puffer

5x Phusion® HF Buffer	Finnzymes
10x FastDigest® Green Buffer	Fermentas
10x T4 DNA Ligase Buffer	Fermentas
Acrylamid/Bisacrylamid 30% (29:1/3,3%C)	Bio-Rad
dNTPs	Fermentas
Human Genomic DNA	Promega
KAPA2G dNTP's	Peqlab
KAPA2G Reaction Buffer B	Peqlab
PCR Buffer E	Genaxxon



### 2.2.2 Angefertigte Lösungen und Puffer

CaCl <sub>2</sub> -Lösung (200ml)	2,94 g 0,1 M CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O 0,121 g 5 mM Tris 0,2037 g 5 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O Auf pH 7 einstellen (mit 1 M HCl) Autoklavieren
TBS (200ml)	1,1688 g 0,1 M NaCl 0,121 g 5 mM Tris 0,2037 g 5 mM MgCl x 6 H <sub>2</sub> O Auf pH 7 einstellen (mit 1 M HCl) Autoklavieren
10x PBS (1l)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O ad 1l Auf pH 7,4 einstellen Autoklavieren
10x Anodenpuffer (1l)	242,28 g Tris H <sub>2</sub> O ad 800 ml Auf pH 8,9 einstellen (mit 10 M HCl) H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
10x Kathodenpuffer (1l)	121,14 g Tris 179,2 g Tricin 10g SDS H <sub>2</sub> O ad 1000 ml Auf pH 8,25 einstellen
4x SDS-PAGE Ladepuffer (25 ml)	1 g SDS 0,91 g Tris 17,24 ml 87% - Glycerin 2,5 mg Coomassie G 250 H <sub>2</sub> O ad 25 ml

Coomassie Färbelösung	1 g Coomassie Blue G 250 125 g Ethanol 35 ml Essigsäure 340 ml H <sub>2</sub> O
Coomassie Entfärbelösung	17,5 g Eisessig 62,5 ml 2-Propanol 170 ml Aqua dest.

### 2.3 Oligonukleotide

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

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz in 5'-3'-Richtung</u>	<u>Schmelztemperatur</u>
--------------------	----------------------------------	--------------------------

#### **Primer für Standard-PCR**

FLG-1323-F	AAAGGCTGGGCTGAGACAG	64,5 °C
FLG-3033-R	CTCTGCGTGAGGAGTTCC	61,3 °C
FLG-7682-F	GGAAGTGGGGATCCAGTTT	62,7 °C
FLG-9555-R	AGCTTCATGGTGACGTGACA	64,6 °C

#### **Primer des pE-SUMO3-Systems**

pE-SUMO3-FLG-2290-F	GCAGAAGACATAGGTGGCCCATGGACAGGCTGGTC	82,5 °C
pE-SUMO3-FLG-2709-R	GCATCTAGATCATCTTGATTGTTCCCTCATTACGTG	73,2 °C
pE-SUMO3-FLG-8545-F	GCAGGTCTCAAGGTGACGGCTCCAGGCACTCA	84,3 °C
pE-SUMO3-FLG-8700-R	GCAGGTCTCACTAGTCAATGTCCCTCACTGTCCTGTC	79,2 °C

#### **Vektorprimer für Colony-Check-PCR und Sequenzierungen**

SUMO Forward 5455	TCAATGAGGCAGATCAGATT	59,8 °C
T7 term short	CTAGTTATTGCTCAGCGG	56,0 °C

## 2.4 Expressionssystem

pE-SUMOpro3 Kan Kit	LifeSensors
---------------------	-------------

## 2.5 Enzyme

FastDigest® <i>Bbs</i> I	Fermentas
--------------------------	-----------

FastDigest® <i>Eco31</i> I	Fermentas
----------------------------	-----------

FastDigest® <i>Xba</i> I	Fermentas
--------------------------	-----------

KAPA2G Robust DNA Polymerase	Peqlab
------------------------------	--------

Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
--	-----------

T4 DNA Ligase	Fermentas
---------------	-----------

Taq-Polymerase	Genaxxon
----------------	----------

## 2.6 Mikroorganismen

<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
-------------------------	------------

<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue Competent Cells (Stratagene)
	BL 21 (DE3) pLysS <i>E. coli</i> (Novagen)
	„TOP 10 F' chemocompetent <i>E. coli</i> “ (Invitrogen)
	ATCC 11775

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
-------------------------------	------------

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
------------------------------	-----------

## 2.7 Nährmedien

SOC-Medium	2 % Sojamehlpepton 0,5 % Hefe-Extrakt 0,05 % NaCl Aqua bidest ad 1000 ml nach dem Autoklavieren: 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 10 ml 1 M MgSO <sub>2</sub> 20 mM Glucose
LB ("lysogeny broth") - Medium	1 % Sojamehlpepton 0,5 % Hefe-Extrakt 1 % NaCl Auf pH 7,4 einstellen H <sub>2</sub> O ad 1 l Autoklavieren
LB-Agar	1 l LB-Medium 15 g Agar-Agar
TSB (Trypticase Soy Broth) – Medium	30 g TSB Aqua bidest ad 1000 ml Autoklavieren

## 2.8 Kits

GeneJET™ Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific

## 2.9 Geräte und Trennsäulen

<u>Gerät</u>	<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Gelkammern:	Horizon® 11.14	Life Technologies
Gelsystem der SDS-PAGE:	Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Thermocycler:	T3-Thermocycler	Biometra
	peqSTAR 96 Universal	Peqlab
UV-Tisch:	Dual Intensity Ultraviolet	UVP
	Transilluminator TM-20	
Geldokumentationskamera:	BioDoc II	Biometra
Rotationsschüttler:	VF II – Vortex-Schüttler	Janke&Kunkel/ IKA®
	Reax 2000 Reagenzglasschüttler	Heidolph
Photometer:	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
	BioPhotometer	Eppendorf
Elektroporator:	MicroPulser™ Electroporator	BIO-RAD
Elektroporator Küvetten:	Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes	BIO-RAD
Schüttler:	Minitron	INFORS HAT
	Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubator:	CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific
Ultraschallgerät:	Sonopuls GM70	Bandelin

Laborwaage:	Analysewaage	Kern & Sohn GmbH
HPLC-Anlage:	SPD-10A UV-VIS DETECTOR	Shimadzu
	LC-10AT Liquid Chromatograph	Shimadzu
	FCL-10AL Gradient Valve	Shimadzu
	Degasser	Knauer
	ÄKTAmicro™	GE Healthcare
	Ettan LC	GE Healthcare
FPLC-Anlage:	ÄKTApurifier™	GE Healthcare
UV-Integrator:	SP 4270 Integrator	Spectra-Physics
Massenspektrometer:	Waters Micromass QTOF II	Waters Micromass
Zentrifugen:	Heraeus Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Scientific
	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific
	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf
Labor-pH-Meter:	inoLab pH 720	WTW
H <sub>2</sub> O - Aufbereitungsanlage:	TKA Smart2Pure	Thermo Scientific
Gelsystem für SDS-PAGE:	Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Speedvac:	Concentrator 5301	Eppendorf
Lyophilisator:	Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4 LSC	Christ

Trennsäule	Name	Hersteller
FPLC-Trennsäule:	HiPrep™ 26/10 Desalting Column	GE Healthcare
HPLC-Trennsäulen:	SP 250/10 NUCLEOSIL 300-7 C8	Macherey-Nagel
	Jupiter 5U C4 300A (260 x 4,6 mm)	Phenomenex
	Jupiter 5U C18 300A (150 x 2mm)	Phenomenex
Säulen der Nickel-		
Affinitätschromatografie:	Protino® Ni-NTA Column 1 ml	Macherey-Nagel
	HisTrap HP 1 ml Columns	GE Healthcare

## 2.10 Pipettierhilfen und Behältnisse

Einmalküvetten (Photometer)	Sarstedt
Filter (0,2 µm; 0,45 µm)	Sarstedt
Petrischalen (92 x 16 mm; mit Nocken)	Sarstedt
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl; 1000 µl)	Sarstedt
Probengefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Probengefäße (0,2 – 2 ml)	Sarstedt

## 2.11 Molekularbiologische Methoden

### 2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Methode der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, genau definierte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen (Mullis et al., 1986). Das Grundprinzip besteht in einer Replikation der DNA. Ein Reaktionsansatz enthält die zu amplifizierende DNA, Oligonukleotide (Primer), welche die gesuchte Sequenz einrahmen,

Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), eine DNA-Polymerase und die Polymerase-spezifische Pufferlösung. Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt und umfasst mehrere Zyklen, die aus je 3 Phasen bestehen. Initial findet die Denaturierung der Doppelstrang-DNA bei einer Temperatur von 95-98 °C statt. Bei der nachfolgenden Primer-Anlagerung (Annealing) binden die Oligonukleotide an die entstandenen Einzelstränge. Es muss hierzu eine unterhalb der Denaturierungstemperatur liegende Primer-abhängige Temperatur gewählt werden (Primer-Sequenzen siehe Seite 16). Ist die Annealingtemperatur zu hoch gewählt, können Primer nicht binden und es kommt möglicherweise zu keiner DNA-Replikation, andererseits können Primer bei zu gering gewählter Temperatur auch unpräzise an nicht passende DNA-Sequenzen binden und ungewünschte DNA-Abschnitte replizieren. In der Phase der Elongation wird durch die DNA-Polymerase aus den dNTPs ein zu den DNA-Einzelsträngen komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Der entstehende semi-konservative Doppelstrang steht anschließend als Matrize für einen neuen Amplifikationszyklus zur Verfügung.

#### 2.11.1.1 Standard-PCR

Zunächst wurden mittels der Standard-PCR zwei größere DNA-Fragmente amplifiziert, welche die kodierenden Sequenzen von FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> enthielten. Dazu wurden die unter 2.3 gelisteten Primer verwendet. Die Durchführung erfolgte mithilfe der Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA-Polymerase, welche einige Vorteile gegenüber anderen DNA-Polymerasen aufweist: ihre 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verleiht ihr eine „proof reading“-Funktion, wodurch auch die Amplifikation großer DNA-Abschnitte ohne den Einbau fehlerhafter Nukleotide gewährleistet ist. Somit wird die Wahrscheinlichkeit einer unkorrekten DNA-Synthese im Vergleich zur herkömmlichen *Pfu*-Polymerase – einer aus *Pyrococcus furiosus* isolierten DNA-Polymerase – bis um den Faktor sechs gemindert. Des Weiteren besitzt die Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA-Polymerase ein reversibel gebundenes Affibody®-Protein (Nord et al., 1997), welches erst bei der Denaturierungstemperatur freigegeben wird und somit eine unspezifische Polymerase-Aktivität bei geringeren Temperaturen unterbindet.

Für die Amplifikation des 1711 bp (bzw. 1874 bp) großen Fragments, das die FLG<sub>764-903</sub> - Gensequenz (bzw. FLG<sub>2849-2900</sub> – Gensequenz) enthielt, diente die cDNA von



primären humanen Keratinozyten als Matrize. Diese wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, indem isolierte mRNA von ausdifferenzierten Präputium-Keratinozyten zuvor in komplementäre DNA („complementary DNA“) umgeschrieben wurde.

Folgender 50  $\mu\text{l}$  - Reaktionsansatz wurde verwendet:

10,0	$\mu\text{l}$	5x Phusion® HF Buffer
1,0	$\mu\text{l}$	dNTPs (10 mM)
2,5	$\mu\text{l}$	FLG-1323-F- bzw. FLG-7582-F-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
2,5	$\mu\text{l}$	FLG-3033-R- bzw. FLG-9555-R-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
3,0	$\mu\text{l}$	Keratinozyten-cDNA
30,5	$\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O
0,5	$\mu\text{l}$	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA-Polymerase (2U/ $\mu\text{l}$ )

Unter folgenden Bedingungen wurde die PCR durchgeführt:

98 °C	30 s	} 35 Zyklen
98 °C	10 s	
61 bzw. 62 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
10 °C	$\infty$	

Die Annealing-Temperatur von 61 bzw. 62 °C wurde den Schmelztemperaturen der jeweiligen FLG-Primer angepasst (siehe Seite 16).

#### 2.11.1.2 „Nested PCR“

Die „Nested PCR“ ist eine Polymerase-Kettenreaktion, die sich an erste Standard-PCR anschloss. Charakteristisch für diese PCR ist, dass die Produkte der vorangegangenen PCR als Matrize („template“) der „Nested PCR“ dienten. Wurde in der Standard-PCR (siehe 2.11.1.1) eine längere Gensequenz vervielfältigt, so wurden hierbei Oligonukleotide zum Reaktionsansatz gegeben, welche ein kleineres DNA-Fragment innerhalb dieser größeren

Sequenz flankierten. Von Vorteil bei dieser Methode ist, dass eventuelle unspezifisch entstandene PCR-Produkte der ersten Reaktion in der „Nested PCR“ durch den Wechsel der Primer nicht weiter amplifiziert werden und damit die gesuchte Gensequenz sehr spezifisch und in großer Menge hergestellt werden kann. Ebenso von Vorteil bei dieser Methode ist, dass die DNA als relativ homologes Template für die „Nested PCR“ vorliegt, wohingegen bei der Standard-PCR mit der Keratinozyten-cDNA ein heterogenes Template vorlag, welches die Effizienz der PCR verringerte.

Zur Amplifizierung der FLG<sub>764-903</sub>- Gensequenz (bzw. der FLG<sub>2849-2900</sub>- Gensequenz) wurde in der zweiten Polymerase-Kettenreaktion der „Nested PCR“ folgender 50µl-Reaktionsansatz verwendet:

10	µl	5x Phusion® HF Buffer
1,0	µl	dNTPs (10 mM)
2,5	µl	pE-SUMO3-FLG-2290-F- bzw. pE-SUMO3-FLG-8545-F-Primer (10 µM)
2,5	µl	pE-SUMO3-FLG-2709-R- bzw. pE-SUMO3-FLG-8700-R-Primer (10 µM)
1,0	µl	DNA (aus der ersten Standard-PCR, mittels Gelextraktion isoliert)
32,5	µl	H <sub>2</sub> O
0,5	µl	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA-Polymerase (2U/µl)

Die „Nested PCR“ wurde zunächst als Drei-Schritt PCR mit den üblichen drei Phasen Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation durchgeführt. Nach sieben Zyklen wurde sie in eine Zwei-Schritt-PCR umgewandelt, wobei die Temperatur in einem Zyklus nur noch zwischen Denaturierungs- und Elongationstemperatur variierte. Grund dafür ist, dass die pE-SUMO3-FLG-Primer nur an ihrem 3'-Ende zu den Filaggrin-Gensequenzen komplementär sind (siehe Abbildung 2.1). Die 5'-Enden der Oligonukleotide bestehen aus Nukleotidüberhängen, welche als Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme dienen und für die spätere Klonierung der amplifizierten DNA in den pE-SUMO3-Vektor essentiell sind. Diese künstlich angehängten Nukleotidbasen wurden in den ersten Zyklen der Drei-Schritt-PCR nur in geringem Ausmaß amplifiziert, da sie nicht komplementär zur DNA-Sequenz der Filaggrin-Sequenz sind. Um in den ersten sieben Zyklen der PCR eine erleichterte Bindung des nicht vollständig komplementären Primers an die Matrizen-DNA zu erreichen, wurde die Annealing-

Temperatur zunächst auf 58 °C gesetzt. In den weiteren PCR-Zyklen wurden durch die DNA-Polymerase vermehrt auch die Restriktionssequenzen des Primers amplifiziert und so wurden DNA-Abschnitte synthetisiert, die komplementär zur vollständigen Primersequenz sind. Durch die korrekte Bindung des gesamten Primers an die PCR-Produkte wurde die Schmelztemperatur heraufgesetzt und lag zwischen Denaturierungs- und Elongationstemperatur, was die Durchführung einer Zwei-Schritt-PCR ermöglichte.

**A**  
**pE-SUMO3-FLG-2290-F**

5' **GCAG****AAGACAT****I****AGGTGGCCATGGACAGGCTGGTC** 3'

Rot – FLG-Gensequenz  
Grün – AGGT-Überhang zur Klonierung in den pE-SUMO3-Vektor  
Hellblau – Erkennungssequenz des BbsI-Restriktionsenzym  
Orange – zusätzlich angefügte Nukleotide für eine optimale Restriktionshydrolyse  
I – Schnittstelle des Restriktionsenzym

**B**  
**pE-SUMO3-FLG-2709-R**

5' **GCATCTA****I****GATC****ATCTTGATTGTTCTCATTACGTG** 3'

Rot – Revers komplementäre FLG-Gensequenz  
Grau – Revers komplementäres Basentriplett zum Stoppcodon TGA  
Blau – Erkennungssequenz des XbaI-Restriktionsenzym  
Orange – zusätzlich angefügte Nukleotide für eine optimale Restriktionshydrolyse  
Gelb hinterlegt – GATC-Überhang zur Klonierung in den pE-SUMO3-Vektor  
I – Schnittstelle des Restriktionsenzym

### Abbildung 2.1: Aufbau der pE-SUMO3-Primer

Am Beispiel der Primer der FLG<sub>764-903</sub> – Gensequenz.

A) pE-SUMO3-FLG-2290-Forward-Primer. B) pE-SUMO3-FLG-2709-Reward-Primer.

Es wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

<u>98 °C</u>	<u>30 s</u>		
98 °C	10 s	}	7 Zyklen
58 °C	30 s		
<u>72 °C</u>	<u>1 min</u>		
98 °C	30 s	}	25 Zyklen
<u>72 °C</u>	<u>45 s</u>		
72 °C	5 min		
10 °C	∞		

### 2.11.1.3 Colony-Check-PCR zur Überprüfung der Vektorklonierung

Im Anschluss an die Transformation der pE-SUMO3-Vektoren in die Bakterien wird per Colony-Check-PCR überprüft, ob die Vektoren erfolgreich in die Zellen aufgenommen wurden. Dazu wurden mit einer Pipettenspitze einzelne Kolonien von der Übernachtskultur der Agarplatte (siehe 2.11.6) entnommen und als Template zu je einem PCR-Ansatz gegeben. Durch die hohen Denaturierungstemperaturen während der PCR wurden die Zellen lysiert und die Vektoren der Amplifikation zugänglich. Für die Durchführung wurden zwei verschiedene DNA-Polymerasen mit ihren jeweiligen Pufferlösungen verwendet, die in ihrer Effizienz etwa gleichwertig sind: eine Taq-Polymerase und eine KAPA2G Robust DNA-Polymerase.

Für die Colony-Check-PCR mit transformierten TOP 10 F' chemically competent *E. coli*-Bakterien und transformierten XL1-Blue *E. coli* wurde im Reaktionsansatz die KAPA2G Robust DNA-Polymerase verwendet. Als Oligonukleotide dienten zwei Primer des pE-SUMO3-Vektorsystems (siehe 2.3). Als F-Primer wurde der SUMO Forward 5455 – Primer verwendet, welcher 116 bp außerhalb der Filaggrin-Gen-Sequenz an den Vektor bindet. Dadurch wurde das Insert innerhalb der Amplifikation am 5' Ende um 116 Vektorbasenpaare verlängert. Unter Verwendung des T7 term short - Vektorprimers als R-Primer wurde die Filaggrin-Gensequenz am 3'-Ende in der PCR nochmalig um 169 bp erweitert, sodass als Produkt der Colony-Check-PCR eine um 285 bp verlängerte Filaggrin-Gen-Sequenz entstand.

Folgender 20  $\mu\text{l}$  – PCR-Ansatz wurde verwendet:

4,0	$\mu\text{l}$	PCR Buffer S
0,4	$\mu\text{l}$	KAPA2G dNTP's (10 mM)
1,0	$\mu\text{l}$	Sumo Forward 5455 - Primer (10 $\mu\text{M}$ )
1,0	$\mu\text{l}$	T7 term short - Primer
13,5	$\mu\text{l}$	TKA-H <sub>2</sub> O
0,1	$\mu\text{l}$	KAPA2G Robust DNA Polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ )
1		Bakterienkolonie

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C	3 min	
95 °C	30 s	} 30 Zyklen
55 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	5 min	
10 °C	$\infty$	

Für die PCR mit transformierten BL 21 (DE3) pLysS *E. coli*-Bakterien wurde ein Reaktionsansatz mit der Taq-Polymerase verwendet. Als F-Primer wurden die jeweiligen pE-SUMO3-FLG-F-Primer eingesetzt und als R-Primer diente wiederum der 169 bp außerhalb der Filaggrin-Gen-Sequenz bindende T7 term short - Vektorprimer. Bei Plasmidaufnahme in die Bakterienzellen und korrekter Ausrichtung der Filaggrin-Gen-Sequenz im pE-SUMO3-Vektor wurde bei der PCR ein um 169 bp verlängertes Insert amplifiziert.

Der nachstehende 20  $\mu\text{l}$  - PCR-Ansatz wurde verwendet:

2,0	$\mu\text{l}$	PCR Buffer E
0,4	$\mu\text{l}$	dNTPs (10 mM)
0,4	$\mu\text{l}$	pESUMO3-FLG-2290-F- bzw. pE-SUMO3-FLG-8545-F-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
0,4	$\mu\text{l}$	T7 term short – Primer (10 $\mu\text{M}$ )
16,7	$\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O
0,1	$\mu\text{l}$	Taq-Polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ )
1		Bakterienkolonie

Die Colony-Check-PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

95 °C	3 min	
95 °C	30 s	} 30 Zyklen
58 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	5 min	
10 °C	$\infty$	

### 2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

An die Amplifizierung von DNA oder Plasmiden schloss sich die Agarose-Gelelektrophorese an. Das Ziel bestand in der Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld, sowie ihrer Größen-Bestimmung mithilfe von fluoreszierenden Molekülen unter UV-Licht. Zur Herstellung eines 1%igen Gels wurde 1 g Universal-Agarose in 100 ml TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA: 40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA) durch Aufkochen aufgelöst. Da die spätere Gelmatrix für die DNA-Fragmente wie ein molekulares Sieb wirkt, wurde die Menge an Agarose bei erwarteten langen DNA-Fragmenten wie Plasmiden vermindert (0,8%) und bei kleineren Fragmenten erhöht (1,5%). Nach Abkühlung des Gels auf etwa 50 °C wurden 15  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid ( $c=3,33 \text{ mg/ml}$ ) zur flüssigen Gelmasse gegeben, welches in Nukleinsäuren der DNA interkaliert. Durch diese Einlagerung fluoreszieren die DNA-Fragmente bei Beleuchtung mit UV Licht und ließen sich so im Gel nachweisen. Zum Aushärten

wurde das flüssige Gel in horizontale Gelträger mit Probenkämme gegossen. Anschließend wurde das Gel in die mit TAE-Puffer ausgefüllte Gelkammer eingebracht und die mit 6x Ladepuffer (30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 10 mM Tris/HCl, pH 8) versetzten DNA-Proben sowie die Größenstandards in die Geltaschen gegeben. Als Größenstandard zur Bestimmung der DNA-Länge dienten GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder oder SmartLadder, je nach erwarteter Größe der Amplifikate. Durch Anschließen einer Spannung im Bereich von 70 bis 120 mV an die Elektroden der Gelkammer wanderten die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste zur Anode. Nach der Größen-Auftrennung der DNA in Banden wurden diese unter dem UV-Tisch sichtbar gemacht und per Kamera und zugehöriger Software fotodokumentiert.

---

### 2.11.3 DNA-Aufreinigung und -Konzentrationsbestimmung

Die im ausgehärteten Agarosegel fixierten DNA-Banden der Gelelektrophorese wurden per Einmal-Skalpell auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und ihre Masse per Analysewaage bestimmt. Zur Weiterverarbeitung der DNA-Fragmente wurden sie mithilfe des GeneJET™ Gel Extraction Kit in Lösung gebracht und aufgereinigt. Nach Durchführung der Gelextraktion gemäß dem Protokoll des Herstellers wurden die Proben mit je 25 µl Elutions-Puffer eluiert. Der Aufreinigung folgte die DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Spektrophotometer NanoDrop 1000, in welchem selbst DNA-Mengen im Nanogramm-Bereich gemessen werden können.

---

### 2.11.4 Restriktionshydrolyse

Bei der Restriktionshydrolyse werden DNA-Fragmente für die anschließende Ligation in einen Vektor enzymatisch gespalten. Die dafür verwendeten Restriktionsenzyme *Bbs* I, *Xba* I und *Eco*31 I sind bakterielle Endonukleasen, die fremde DNA an genau definierten Sequenzen erkennen. Bei Auswahl eines bestimmten Enzyms ist darauf zu achten, dass sich keine Erkennungssequenzen dieses Enzyms innerhalb der kodierenden Sequenzen befinden, in diesem Fall ist zur Vermeidung einer Proteolyse innerhalb der Sequenz auf ein anderes Restriktionsenzym auszuweichen. Bei der hydrolytischen Spaltung der DNA entstanden Doppelstränge, die jeweils überhängende Enden mit ungepaarten Basen aufwiesen, welche außerhalb der peptidkodierenden Filaggrin-Gensequenz lagen. Die ungepaarten Basen AGGT und GATC waren komplementär zur den Basenüberhängen des pE-SUMO3-Vektors, der vor

der Ligation mit *Eco31 I* behandelt wurde und hierdurch einen ACCT-Überhang am 5'-Ende sowie einen CTAG-Überhang am 3'-Ende besaß (siehe Abb. 2.1). Der vorbehandelte Vektor wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Für einen 30 µl-Reaktionsansatz wurden verwendet:

	400	ng	eluierte DNA
	<u>3,0</u>	<u>µl</u>	<u>10x FastDigest® Green Buffer</u>
	1,0	µl	<i>Bbs I</i> und 1 µl <i>Xba I</i> (für FLG <sub>764-903</sub> – Gensequenz)
oder	<u>2,0</u>	<u>µl</u>	<u><i>Eco31 I</i> (für FLG<sub>2849-2900</sub> – Gensequenz)</u>
	H <sub>2</sub> O ad 30 µl		

Die Ansätze wurden für 20 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und die Restriktionshydrolyse per Agarose-Gelelektrophorese auf ihren Erfolg hin überprüft. Bei erfolgreicher Hydrolyse wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die verdaute DNA zur folgenden Ligation wiederum per GeneJET™ Gel Extraction Kit in Lösung gebracht und ihre Konzentration per NanoDrop 1000 bestimmt.

### 2.11.5 Ligation

Die Ligation dient dazu, bestimmte DNA-Sequenzen in ein Plasmid einzubringen. Als Insert fungierten die geextrahierten, verdauten Filaggrin-Gensequenzen, die in den 5,6 kb-großen pE-SUMO3-Vektor (siehe 2.12.1) kloniert wurden. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert in einem Ligationsansatz betrug etwa 1:8. Die Klonierung erfolgte über Nacht im Kühlschrank und wurde mittels Colony-Check-PCR überprüft, wobei statt einer Bakterienkolonie 1 µl des jeweiligen Ligationsansatzes als Substrat diente.

Mit folgendem Pipettierschema wurde ein 10 µl-Reaktionsansatz hergestellt:

1,0	µl	geextrahierte, verdaute DNA
3,0	µl	pE-SUMO3-Vektor (6 ng/ µl, mit <i>Eco31 I</i> verdaut)
1,0	µl	10x T4 DNA Ligase Buffer
0,5	µl	T4 DNA Ligase
4,5	µl	H <sub>2</sub> O



### 2.11.6 Transformation

Als Transformation bezeichnet man einen Vorgang, bei welchem von kompetenten Bakterien freie DNA, z. B. auch in Form von Plasmiden, aus ihrer zellulären Umgebung in ihr Zellinneres aufgenommen wird. Der Zustand der Kompetenz ist bei einigen Bakterienstämmen konstitutiv, bei anderen – wird die Kompetenz künstlich erzeugt. Erst diese Voraussetzung der Bakterien ermöglicht die intrazelluläre Vermehrung von Plasmiden und die Expression von artfremden Proteinen. Ebenso ist die Kompetenz von Bedeutung für die Ausbildung bakterieller Antibiotika-Resistenzen, da die Resistenz-vermittelnden Gene Bestandteil von Plasmiden sein können. Auch im pE-SUMO3-Vektor ist ein Kanamycin-Resistenz-Gen enthalten, welches die erfolgreich transformierten Bakterien zum selektiven Wachstum auf Kanamycin-haltigem Agar befähigt. Die Transformation von Bakterienzellen kann auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden: per Hitzeschock oder Elektroporation.

#### 2.11.6.1 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Die Elektroporation wurde mithilfe des MicroPulser™ Electroporator unter Verwendung von elektrokompetenten Bakterienzellen durchgeführt. Die elektrokompetenten Zellen wurden vorherig in LB-Medium angezüchtet, mehrmals in Aqua bidest gewaschen, pellettiert und danach in steril filtrierter 10 % Glycerol-Lösung (90 % Aqua bidest, 11,7 % von 86 % Glycerol) aufgenommen. Schließlich wurden 50 µl-Aliquots mit einer Zellkonzentration von  $1 - 3 \times 10^{10}$ /ml hergestellt und freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Vor der Elektroporation wurde ein 50 µl-Bakterien-Aliquot mit 2 µl des Plasmid-Ligationsansatzes (siehe 2.11.5) versetzt und für zwei Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen in Küvetten überführt und im Electroporator vier bis fünf Millisekunden lang einem elektrischen Schock von 1,8 kV ausgesetzt, um ihre Phospholipid-Zellmembranen kurzfristig zu perforieren, sodass die Plasmide ins Zellplasma aufgenommen wurden (Kinosita et al., 1988). Die Dauer des Schocks korreliert hierbei positiv mit dem Erfolg der Transformation. Zu den Zellen wurde im Folgenden zügig 1 ml SOC-Medium pipettiert und die Suspension in Probenröhrchen für eine Stunde im Schüttler bei 170 Upm inkubiert, bevor sie auf LB Agarplatten ausgestrichen wurde und über Nacht bei 37 °C im Inkubator belassen wurde. Der LB Agar wurde mit verschiedenen bakterienspezifischen Antibiotika versetzt, um selektiv nur das Wachstum derjenigen Bakterien zu ermöglichen, die bei der Transformation

das Plasmid aufgenommen hatten. Bei den „XL1-blue competent *E. coli*“, welche auf ihrem F-Plasmid bereits ein Tetrazyklin-Resistenzgen tragen, wurde dem Agar sowohl Kanamycin (c=50 µg/ml) als auch Tetrazyklin (c=12,5 µg/ml) zugefügt. Bei den BL 21 (DE3) pLysS *E. coli*, die für die Expression verwendet wurden und eine Chloramphenicol-Resistenz besitzen, wurde der Agar mit Kanamycin (c=50 µg/ml) und Chloramphenicol (c=34 µg/ml) hergestellt (siehe Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme und ihre Antibiotikaresistenzen**

Bakterienstamm	Antibiotika-Resistenz	Endkonzentration des Antibiotikums im Nährmedium
<b>TOP 10 F' chemically competent <i>E. coli</i></b>	-	-
- transformiert mit pE-SUMO3:	Kanamycin	50 µg/ml
<b>„XL1-blue competent <i>E. coli</i>“</b>	Tetrazyklin	12,5 µg/ml
- transformiert mit pE-SUMO3:	+ Kanamycin	50 µg/ml
<b>BL 21 (DE3) pLysS <i>E. coli</i></b>	Chloramphenicol	34 µg/ml
- transformiert mit pE-SUMO3:	+ Kanamycin	50 µg/ml

Zu sehen sind die drei verwendeten Bakterienstämme und ihre Antibiotika-Resistenzen, sowie die daraus resultierenden Konzentrationen der verwendeten Antibiotika bei Kultivierung der Stämme im Nährmedium. Durch eine gestrichelte Linie getrennt zu sehen ist die zusätzliche Kanamycin-Resistenz, welche im pE-SUMO3-Vektor auf einem Resistenz-Gen kodiert ist. Bei Transformation der Zellen mit dem pE-SUMO3-Vektor werden die Zellen mit dieser zusätzlichen Resistenz ausgestattet.

#### 2.11.6.2 Transformation von chemokompetenten Bakterien

Die Transformation der TOP 10 F' chemically competent *E. coli* - Bakterien beruht auf der Applikation eines Hitzeschocks von 42 °C, durch den die im Ligationsansatz enthaltenen Vektoren über die Membran in die Zellen aufgenommen werden sollen. Die Zellen wurden zuvor durch mehrmaliges Waschen in TBS und CaCl<sub>2</sub>-Lösung behandelt, bei -80 °C gelagert und konnten als 50 µl-Aliquot aus den Laborbeständen genutzt werden. Zunächst erfolgte für

30 sec eine Inkubation von 50 µl Bakterien und zugefügten 2 µl des Ligationsansatzes auf Eis, wobei sich die im Überschuss zugefügten, von CaCl<sub>2</sub> komplexierten Plasmide der bakteriellen Zellmembran anlagerten. Danach wurden die Bakterien-Plasmid-Mischung im Thermomixer für 40 sec einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt, wobei die Vektoren aufgenommen wurden. Es folgte eine zwei-minütige Inkubationszeit auf Eis. Schließlich wurden 1 ml 37 °C warmes SOC-Medium zum Transformationsansatz gegeben und dieser für eine Stunde im Minitron-Schüttler (170 Upm) inkubiert, bevor die Ausplattierung auf Kanamycin-Agarplatten (Kanamycin-Konzentration siehe Tabelle 2.1) erfolgte. Das weitere Wachstum der transformierten Bakterien erfolgte über Nacht bei 37 °C im Inkubator. Am folgenden Tag wurden sowohl elektrische als auch chemische Transformationen mittels Colony-Check-PCR (siehe 2.11.1.3) auf ihren Erfolg hin überprüft.

---

#### 2.11.7 Isolierung der Plasmide

Zur Isolierung der Plasmide wurden aus den Transformationskolonien 3 ml-Übernachtskulturen in Antibiotika-versetztem LB Medium angelegt (Antibiotika-Konzentrationen siehe Tabelle 2.1) und bei 170 Upm und 37 °C im Schüttler inkubiert. Zunächst wurden mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit nach dem Protokoll des Herstellers die Bakterien alkalisch lysiert und ihre zellulären Bestandteile durch Zentrifugation sedimentiert. Der lösliche Überstand wurde auf einer Silika-Membran gegeben, welche die Plasmid-DNA selektiv bindet. Anschließend wurden die Plasmide mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Konzentration der Vektoren wurde im NanoDrop 1000 bestimmt und das Ergebnis der Plasmid-Isolierung mittels Agarose-Gelelektrophorese dokumentiert.

---

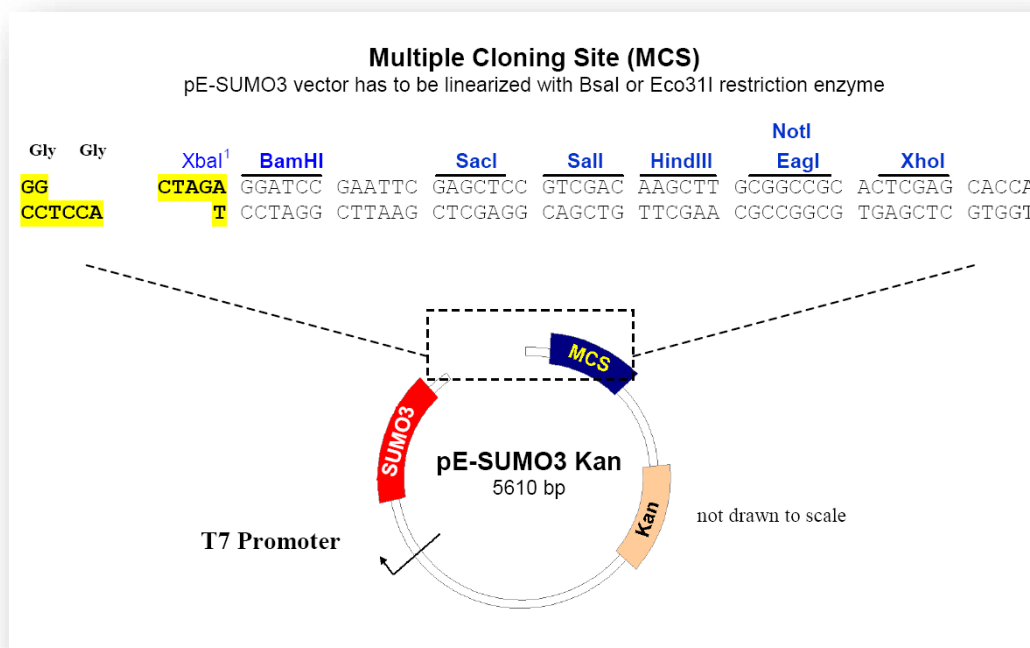
#### 2.11.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mittels Strangabbruch-Methode nach Sanger im Zentrallabor der Inneren Medizin im Universitätsklinikum Schleswig Holstein. Dazu wurden Proben mit jeweils 3 µl des eluierten Plasmids und 1 µl T7 term short – Primer (c=4,8 µM) übermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Chromas Lite 2.0 und die pE-SUMO3-Vektoren, die die korrekten Filaggrin-Sequenzen enthielten, wurden für die Transformation der Expressionskulturen weiterverwendet.

## 2.12 Rekombinante Expression von FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> in *E. coli*

### 2.12.1 Aufbau des pE-SUMO3-Expressionsvektors

Der ringförmige pE-SUMO3-Vektor, der sowohl für die intrazelluläre Replikation als auch für die Expression der gewünschten Filaggrin-Gene genutzt wurde, besitzt eine Größe von 5610 bp (siehe Abb. 2.2).



#### Abbildung 2.2: Struktur des pE-SUMO3-Vektors.

Gezeigt sind T7-Promotor, kodierende Sequenz des „His6-hSUMO3-Fusionstag“ (SUMO3), „Multiple Cloning Site“ (MCS) und Kanamycin-Resistenz-Gen (Kan) sowie die in der MCS gelegenen Erkennungssequenzen der blau geschriebenen Restriktionsenzyme. (Aus: Polylinker map (pE-SUMO3 vector, T7 Kan), LifeSensors.)

Der Ursprungsort der Transkription wird auf dem Plasmid durch den T7-Promotor markiert. Dadurch wird eine regulierte Expression in *E. coli*-Bakterien durch die induzierbare T7-RNA-Polymerase garantiert. Benachbart zum T7-Promotor liegt die kodierende Sequenz für den humanen „His6-hSUMO3 Fusionstag“, ein 101 Aminosäuren langes Protein. Das His6-hSUMO3-Protein ist über eine Peptidbindung mit dem späteren Filaggrin-Fragment verbunden und ermöglicht durch einen N-terminal gelegenen „6x Histidin-Tag“ als sein besonderes Merkmal die Aufreinigung des Fusionsproteins. Überdies entspricht der

„His6-hSUMO3-Fusionstag“ einer um wenige Aminosäuren veränderte Variante des humanen SUMO3-Proteins mit 103 Aminosäuren. Das natürlich vorkommende humane SUMO-Protein reguliert die Stabilität von Proteinkomplexen und viele andere zelluläre Prozesse. Der His6-hSUMO3-kodierenden Sequenz folgt die „Multiple Cloning Site“, in der eine künstliche Sequenz mit vielen Schnittstellen für Restriktionsenzyme geschaffen wurde und so die Spaltung des Vektors erlaubt. Durch die Restriktionsenzyme *Eco31 I* und *Xba I* wird der pE-SUMO3-Vektor linearisiert. Am einen Ende des linearen Plasmids entsteht dabei ein ACCT-Nukleotidüberhang, wogegen am anderen Ende ein CTAG-Überhang generiert wird. Die Unterschiedlichkeit der Überhänge gestattet eine gerichtete Klonierung des Gens in die „Multiple Cloning Site“. Das ebenfalls im Plasmid enthaltene Kanamycin-Resistenz-Gen befähigt zur Selektion der Bakterienkolonien, die den Vektor beherbergen.

### 2.12.2 Durchführung der Expression

Die Expression der Fusionsproteine wird in zuvor transformierten BL 21 (DE3) pLysS *E. coli*-Zellen durchgeführt, welche eine durch IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induzierbare T7-Polymerase besitzen. Die T7-RNA-Polymerase bewerkstelligt die Transkription und besitzt dabei eine höhere Syntheserate als die übrigen bakteriellen RNA-Polymerasen, was eine mengenmäßig hohe Expressionsrate ermöglicht. Vorab wurde eine Übernachtskultur der Bakterien in 20 ml Antibiotika-LB-Medium (Antibiotika-Konzentrationen siehe Tabelle 2.1) hergestellt. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze eine Bakterienkolonie der BL 21 (DE3) pLysS *E. coli* von der Agarplatte entnommen und mitsamt Antibiotika-LB-Medium in einen 100 ml fassenden Erlenmeyer Kolben gegeben und dieser bei 37 °C im Schüttler (170 Upm) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte (OD) einer 1/10-Verdünnung der Kultur im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen. Die optische Dichte fungiert als indirektes Maß für die Bakterienanzahl und mithilfe ihrer wiederholten Bestimmung lässt sich bakterielle Vermehrung im Nährmedium nachvollziehen. Als Referenzwert diente bei allen Messungen 1 ml LB-Medium. In Vorbereitung der folgenden Expressionskulturen wurde in drei 1 l-Schikane-Kolben je 250 ml Antibiotika-LB-Medium (Antibiotika-Konzentrationen siehe Tabelle 2.1) gegeben und die Kulturen durch Animpfen eines definierten Volumens der Übernachtskultur auf eine Ziel- $OD_{600}$  von 0,025 eingestellt. Während der anschließenden Inkubation der Schikane-Kolben im Schüttler (37 °C, 170 Upm) wurde in halbstündlichen

Abständen die  $OD_{600}$  von 1 ml jeder Flüssigkultur gemessen. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,8 wurde jeder Kolben mit 250  $\mu$ l 1 M IPTG induziert und hiermit die Expression des Fusionsproteins in den Bakterien gestartet. Nach einer weiteren Inkubationsphase von drei Stunden wurden alle Kulturen für zehn Minuten bei 6000 x g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die drei Bakterien-Pellets wurden allesamt mit 15 ml NPI 20 (20 mM  $NaH_2PO_4$ , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert, bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und im Folgenden der Bakterien-Lyse zugeführt.

## 2.13 Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine

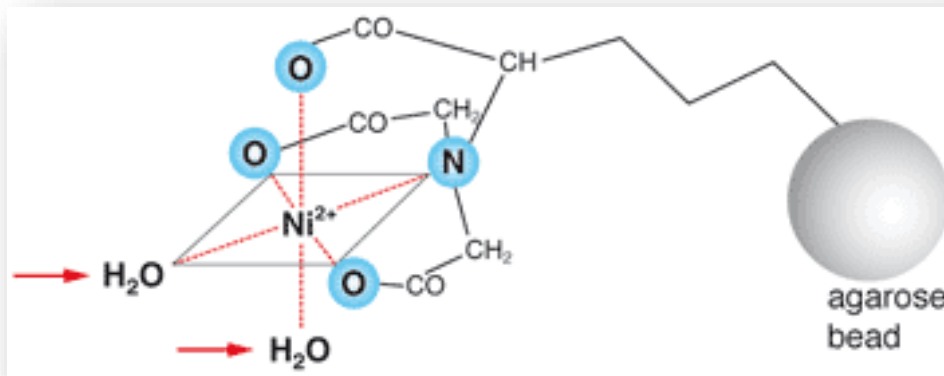
### 2.13.1 Lyse der BL 21 (DE3) pLysS *E. coli*

Die in NPI 20-Puffer aufgenommenen BL 21 (DE3) pLysS *E. coli* wurden im Wasserbad aufgetaut, im Weiteren auf Eis gelagert und mithilfe einer Ultraschallbehandlung mit dem Sonopuls GM70-Ultraschallgerät lysiert. Dazu wurde ein Ultraschall-Stab in die eisgekühlte Zellsuspension getaucht und 15 Zyklen appliziert, die jeweils aus 36 sec Ultraschallimpulsen (a 0,6 sec Signal und 0,4 sec Pause) und nachfolgenden 30 sec Pausen bestanden. Das Gerät arbeitete bei 60 % Arbeitsleistung. Nachfolgend wurde die Suspension für zehn Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und das Pellet mit unlöslichen bakteriellen Bestandteilen verworfen. Der proteinhaltige Überstand wurde durch einen 0,45  $\mu$ m - Filter gegeben. Dem Filtrat wurden nochmals 15 ml NPI 20-Puffer zugesetzt und ein zweiter Filterungsschritt (0,2  $\mu$ m Filter) angeschlossen. Die weitere Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte über die Nickel-Affinitätschromatografie.

### 2.13.2 Immobilisierte Nickel-Affinitätschromatografie

In der Nickel-Affinitätschromatografie wurde mithilfe der ÄKTapurifier™ FPLC-Anlage („fast protein liquid chromatography“) aus dem verbliebenen löslichen Zellbestand der BL 21 (DE3) pLysS *E. coli* das gewünschte SUMO FLG Fusionsprotein isoliert. Die Proben wurden auf mehrere Läufe aufgeteilt und entweder über „Protino® Ni-NTA Columns 1 ml“ oder über „HisTrap HP 1 ml Columns“ aufgereinigt. Innerhalb dieser Säulen befanden sich in

Agarose gebettete Nitrilotriessigsäure-Moleküle (NTA), die mit  $\text{Ni}^{2+}$  Ionen über vier Koordinationsstellen stabile Komplexe bildeten (siehe Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3: Schema der Komplexbildung in der Nickel-Säule**

Rote Pfeile markieren die zwei Koordinationsstellen des zentralen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ions, über die die Imidazolringe der Histidine koordinative Bindungen eingehen können. Die anderen Koordinationsstellen sind von Nitrilotriessigsäure komplexiert.

(Quelle: [http://www.mn-net.com/Portals/8/images/Redakteure\\_Bio/ProtinoNTA\\_struc.gif](http://www.mn-net.com/Portals/8/images/Redakteure_Bio/ProtinoNTA_struc.gif))

Der N-Terminus im Fusionsprotein enthaltene „6x Histidin-Tag“ ist fähig, die Nickel-Ionen über zwei Bindungsstellen zu komplexieren und wurde daher beim Durchfluss der Probe an die Säule gebunden, wogegen andere Proteine die Säule passieren konnten. Der NPI 20-Puffer, in welchem die Probe gelagert wurde, verringerte die Bindung von kleineren „Histidin-Tags“ anderer Proteine an die Säulenmatrix, indem seine Imidazolmoleküle mit den Histidinen der Proteine um die Bindungsstellen konkurrierten. Innerhalb der Chromatografie wurde nach dem Durchfluss der Probe NPI 500-Puffer (500 mM Imidazol) mit ansteigendem Konzentrationsgradienten in die Säule appliziert, wodurch ab einer Konzentration von etwa 50 % NPI 500 die Fusionsproteine vollständig durch die Imidazolmoleküle von der Säule verdrängt wurden und als Eluat in einem 50 ml Probengefäß gesammelt wurde. Die Nickel-Affinitätschromatografie wurde für beide Fusionsproteine mithilfe unterschiedlicher Einstellungen durchgeführt, deren Parameter in Tabelle 2.2 miteinander verglichen sind. Im Anschluss der Aufreinigung wurde eine Konzentrationsbestimmung der eluierten Fusionsproteine per NanoDrop 1000 vorgenommen (siehe 2.14.1).

**Tabelle 2.2: Parameter der Affinitätschromatografischen Aufreinigung von SUMO-FLG**

Aufgereinigtes Protein	SUMO-FLG 764-903	SUMO-FLG 2849-2900
Verwendete Säule	Protino® Ni-NTA Column 1 ml	HisTrap HP 1 ml Column
Flussrate	1,25 ml/min	1,0 ml/min
Säulenvolumen	0,962 ml	0,962 ml
Gradienten-Länge	6,6 Säulenvolumen	10,0 Säulenvolumen
NPI 500-Konzentration im Gradient	5% → 100%	5% → 100%

### 2.13.3 C8-Umkehrphasen-HPLC

Die Aufreinigung der Fusionsproteine wurde mithilfe der C8-Umkehrphasen-HPLC („reversed phase-high performance liquid chromatography“) überprüft. Hierbei wurde ein Aliquot der vorherig eluierten Proteinprobe auf eine HPLC-Trennsäule (SP 250/10 NUCLEOSIL 300-7 C8) gegeben, in welcher verschiedene Proteine je nach Hydrophobizität mit der stationären Phase, bestehend aus einer mit C8-Alkylresten modifizierten Silika-Gelmatrix, wechselwirkten. Die Detektion der Proteine erfolgte durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 215 nm, was dem Absorptionsmaximum von Peptidbindungen entspricht. Der UV-Absorptionsverlauf wurde mithilfe des SP 4270 Integrators als Chromatogramm aufgezeichnet. Die Durchflussrate der Säule betrug 3 ml/min bei einem maximalen Druck von 300 bar. Zur Elution der Probe wurde ein Gradient aus zwei verschiedenen Lösungen verwendet – der unpolaren Lösung A (0,05% TFA in H<sub>2</sub>O) und der polaren Lösung B (0,05% TFA in 80% 2-Propanol). Zunächst wurde die Säule bei 10% Lösung B äquilibriert. Gleichzeitig erfolgte in Anlehnung an den äquilibrierten Säulen-pH-Wert die Einstellung der Probe auf einen pH-Wert von drei durch 5 %ige TFA, sowie eine sterile Filterung. Fünf Minuten nach Injektion der Probe erfolgte ein linearer Gradient bis 60 % Lösung B in 25 Minuten. Ein weiterer fünfminütiger Gradient bis 100 % Lösung B schloss sich an. Die Spülung mit 100 % Lösung B wurde für fünf Minuten aufrechterhalten. Die innerhalb eines Laufes eluierten Proteine wurden manuell fraktioniert und durch die Molekulargewichtsbestimmung per MS-Analyse (siehe 2.14.2) auf das Vorhandensein des gewünschten SUMO-FLG 764-903 bzw. SUMO-FLG 2849-2900 überprüft.



#### 2.13.4 Entsalzung der Fusionsprotein-Proben mittels FPLC

Mit dem Restbestand des SUMO-FLG-Eluats wurde eine Entsalzung über die ÄKTApurifier™ FPLC-Anlage in “HiPrep™ 26/10 Desalting Columns” nach dem Prinzip der Größenausschluss-Chromatografie durchgeführt. Grund dafür war, dass die Fusionsproteine bisher in etwa 50 % NPI 500 (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol) gelöst waren und die Anwesenheit dieses Puffers die nachfolgende Protease-Hydrolyse beeinträchtigt. Demzufolge wurde innerhalb eines Laufes die Probe in 1x PBS („phosphate buffered saline“) umgelagert. Die Probe wurde vorerst sterilfiltriert (0,45 µm Filter) und danach auf die Säule gegeben. Bei einer Säulendurchflussrate von 10 ml/min und einem Maximaldruck von 0,11 MPa wurde die Entsalzung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.13.5 Protease-Verdau der Fusionsproteine

Mithilfe der hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen wurde schließlich der „SUMO-Fusionstag“ vom herzustellenden Filaggrinpeptid separiert. Die Hydrolyse wurde von der SUMO Protease 2 durchgeführt, einem Enzym, das die Tertiärstruktur des SUMO-Teils im Fusionsprotein erkennt und diesen hochspezifisch abtrennt.

Folgende Reaktionsansätze wurden hergestellt und im Thermomixer (30 °C, 300 rpm) über Nacht inkubiert:

1 mg Fusionsprotein in PBS

1x PBS ad 5 ml

25 µl Tris-(2-chlorethyl)-phosphat (500 mM)

mit:

8 U SUMO Protease 2 (1 U/ µl) für SUMO-FLG **764-903**

oder 30 U SUMO Protease 2 (1U/ µl) für SUMO-FLG **2849-2900**

#### 2.13.6 C4-Umkehrphasen-HPLC

Im Anschluss an die proteolytische Spaltung erfolgte die Aufreinigung der Filaggrin-Peptide mittels HPLC-Technik. Für die Aufreinigung des FLG **764-903** erfolgte die Trennung sowohl mittels C8-Umkehrphasen-HPLC (mit identischen Bedingungen wie unter 2.13.3 beschrieben) als auch mittels C4-Umkehrphasen-HPLC. Grund für die Nutzung der verschiedenen Verfahren war die

Möglichkeit über die C8-Umkehrphasen-HPLC ein größeres Probenvolumen aufzureinigen als über die C4-Umkehrphasen-HPLC. Das FLG<sub>2849-2900</sub>-Peptid wurde ausschließlich mittels C4-Umkehrphasen-HPLC isoliert. Für die RP4-HPLC wurde eine Jupiter 5U C4 300A-Säule gewählt, weiterhin eine Durchflussrate von 0,5 ml/min und ein Maximaldruck von 245 bar. In Analogie zur C8-Umkehrphasen-HPLC wurde bei der C4-Umkehrphasen-HPLC zur Proteintrennung ein Gradient aus Lösung A (0,05% TFA in H<sub>2</sub>O) und Lösung B (0,05% TFA in 80% 2-Propanol) genutzt. Die zeitlichen Verläufe der Gradienten wurden für die jeweiligen Filaggrin-Peptide angepasst und sind in Tabelle 2.3 gegenübergestellt.

**Tabelle 2.3: RP4-Gradienten-Verlauf für die Aufreinigung von FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub>**

Dargestellt sind die Zeitwerte in Minuten und die simultan gewählte Konzentration der Lösung B (0,05% TFA in 80% 2-Propanol) in %.

FLG <sub>764-903</sub>		FLG <sub>2849-2900</sub>	
Zeit in min	% Lösung B	Zeit in min	% Lösung B
0	10	0	5
10	40	10	5
25	70	15	22
30	100	25	70
35	100	30	100
		35	100

### 2.13.7 C2/C18-Umkehrphasen-HPLC

Sowohl zur Analyse der Reinheit als auch zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen (siehe 2.14.1) wurde im Anschluss an die Umkehrphasen-HPLC mit einem Aliquot der gewonnenen Filaggrin-Fraktionen eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Mit der ÄKTAmicro™-HPLC-Anlage und einer Jupiter 5U C18 300A-Säule (150x2 mm) wurde bei einer Durchflussrate von 150 µl/min und einem Arbeitsdruck von 7 mPa gearbeitet. Die Elution der Proteine erfolgte mittels eines Konzentrationsgradienten, der durch unterschiedliche Verhältnisse der Lösung C (0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O) und D (0,1 % TFA in 80 % Acetonitril) erzeugt wurde. Zunächst erfolgte die Äquilibration der Säule bei 100 % Lösung C. Nach Injektion der

FLG-Probe wurde die Konzentration der Lösung D innerhalb von zehn Minuten linear von 0 % auf 25 % gesteigert, in den folgenden 30 Minuten auf 70% und abschließend in zehn Minuten auf 100%. Die Proteine wurden bei UV-Licht unterschiedlicher Wellenlänge (215 nm, 254 nm, 280 nm) detektiert und manuell fraktioniert.

## 2.14 Proteinanalytik

### 2.14.1 Konzentrationsbestimmung der Filaggrin-Peptide

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteine, die mindestens eine aromatische Aminosäure enthielten, eignete sich die Berechnung mittels ihrer Extinktionskoeffizienten. Bei dieser Methode wurde ausgenutzt, dass die aromatischen Aminosäuren mit ihren konjugierten Doppelbindungen ein UV-Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm besitzen. Dabei wurde per NanoDrop 1000 die Extinktion des analysierten Proteins bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und dessen Konzentration aus dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet ( $E_{280\text{ nm}} = c \times d \times \epsilon$ ;  $E_{280\text{ nm}}$  – Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm,  $c$  – Konzentration in mol/l,  $d$  - optische Weglänge in cm,  $\epsilon$  - molarer Extinktionskoeffizient in l/mol x cm). Der molare Extinktionskoeffizient ließ sich für jedes Protein mithilfe des „ProtParam Tool“ auf der Internetseite des „SIB Bioinformatics Resource Portal“ (<http://web.expasy.org/protparam/>) abrufen. Für Proteine, die keine aromatischen Aminosäuren besaßen, eignete sich dieses Verfahren nicht, sondern ihre Konzentration konnte nur mittels C2C18-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.13.7) ermittelt werden.

### 2.14.2 Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrie bietet eine Möglichkeit die Masse der hergestellten Fusionsproteine und der FLG-Peptide Dalton-genau zu ermitteln. Anwendung fand die Elektronenspray-Ionisierungs-Massenspektrometrie im Quadrupol-Time-of-flight Massenspektrometer („Q-Tof™ II“). Zunächst wurde das Gerät mit einer Natrium- und Cäsiumjodidlösung (2 µg/µl Natriumjodid und 50 ng/µl Cäsiumjodid in 50 % 2-Propanol) in einem Bereich von 80 - 2000 m/z kalibriert und mit einer Probe von Proteinen definierter Molekulargröße, bestehend aus Myosin und Trypsinogen, auf die eingestellte Genauigkeit hin

kontrolliert. Die zu messenden Proben wurden etwa um den Faktor zehn mit einem Laufmittel (50 % Acetonitril mit 0,2 % Methansäure) verdünnt und über eine 150 °C warme Nadel in das Massenspektrometer eingespritzt (Flussgeschwindigkeit: 20 µl/min) und dort ionisiert. Als Trägergas diente hierbei Stickstoff. Die entstehenden Ionen wurden in einem statischen elektrischen Feld beschleunigt. Eine Massen-Ladungs-Selektion der ionisierten Proteine fand anschließend innerhalb des elektrischen Feldes zwischen den Quadrupol-Elektrodenstäben statt, welches nur von Teilchen mit definierter Molekülgröße durchlaufen wurde. Die Erfassung der separierten Ionen erfolgte am Time-of-Flight-Detektor, an welchem die Impulse der Ionen in elektrische Spannung umgewandelt wurden. Mithilfe der „MassLynx 4“ MS-Software (Waters) wurden die erhaltenen kombinierten Rohdaten der Massenspektren Hintergrund-korrigiert. Anschließend wurde eine „MaxEnt1“-Auswertung vorgenommen und die dabei erhaltenen Proteinmassen nachfolgend zentriert. Die gemessenen molekularen Massen der Proteine ließen sich mit den theoretisch ermittelten Werten des „ProtParam Tool“ (s.o.) vergleichen.

### 2.15 Antimikrobielle Testung von FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub>

Die antimikrobielle Aktivität der Filaggrinpeptide wurde mittels Radialdiffusionstest untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Testverfahren, bei welchem nur geringe Mengen der Testsubstanz eingesetzt werden müssen. Dieser Test wurde freundlicherweise im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikum Schleswig Holstein durchgeführt. Zunächst wurden hierfür die mittels HPLC aufgereinigten Proteine in der Speedvac konzentriert, im Lyophilisator gefriergetrocknet und in 0,01 % Essigsäure wiederaufgenommen (c<sub>FLG</sub> = 1 µg/µl).

Jeweils eine Kolonie der verwendeten Mikroorganismen wurde in 8 ml TSB-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht schüttelnd inkubiert. Von diesen Übernacht-Kulturen wurden je nach Stamm verschiedene Volumina (siehe Tabelle 2.4) abgenommen, mit 8 ml TSB-Medium versetzt und nochmals für zweieinhalb Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Kultivierung von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* erfolgte stehend, diejenige – von *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* als Schüttelkultur.

**Tabelle 2.4: Volumina der Mikroorganismenkulturen für den Radialdiffusionstest**

Mikroorganismus	überimpftes Volumen in 8 ml TSB-Medium/ überimpftes Volumen in 10 ml Overlay-Agarose
<i>Escherichia coli</i>	50 µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	100 µl
<i>Candida albicans</i>	200 µl
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200 µl

Währenddessen wurde die Underlay-Agarose (1 % Agarose, 0,02 % Tween20, 1 % TSB-Medium, 10 mM Natriumphosphatpuffer) verflüssigt und auf eine Temperatur von 46 °C abgekühlt. Jeweils 10 ml der Underlay-Agarose wurden mit spezifischen Volumina der Mikroorganismen-Kulturen (siehe Tabelle 2.4) versetzt und in Petrischalen überführt. Die Aushärtung erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur und nachfolgend für 30 min im Kühlschrank. Mit einer Hautstanze wurden innerhalb von Rasterfeldern Löcher mit 3 mm Durchmesser in den Nährboden gestanzt, in welche jeweils 5 µl der Protein-Proben appliziert wurden. Während der anschließenden Inkubation der Petrischalen über Nacht bei 37 °C erfolgte die Diffusion der Testlösungen in die Agarose, sowie ein geringes Wachstum der Bakterienkolonien innerhalb des Nährbodens. Am folgenden Tag wurde jeweils 10 ml flüssige, 46 °C warme Overlay-Agarose (1 % Agarose, 3,4 % Caseinpepton, 0,6 % Sojamehlpepton, 0,5 % D+-Glukose-Monohydrat, 1 % NaCl, 0,5 % Kaliumhydrogenphosphat) auf das Underlay geschichtet und noch einmal für drei Stunden inkubiert um sichtbares Bakterienwachstum zu erreichen. Anschließend wurden die Durchmesser der Hemmhöfe um die Stanzlöcher - abzüglich des 3 mm Stanzdurchmessers - bestimmt.

Für den Radialdiffusionstest wurden verschiedene Testmodi gewählt. Zunächst erfolgte die Testung unter Standardbedingungen bei einem pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 für jedes Protein dreimalig. Als Positivkontrolle und zur Ermittlung eines Referenzwertes wurde humanes Lysozym ( $c=100 \text{ ng}/\mu\text{l}$  in 0,01 % Essigsäure) in ein zusätzliches Stanzloch gegeben. Als Negativkontrolle diente 0,01 % Essigsäure. Die in 0,01 % Essigsäure gelösten Filaggrin-Peptide wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet (unverdünnt mit  $c_{\text{FLG}} = 1 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; verdünnt 1:3, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300).

Um den Radialdiffusionstest physiologischen Hautbedingungen (Lambers et al., 2006) anzupassen, wurde dieser ebenfalls dreimalig bei einem Nährboden-pH-Wert von 5 durchgeführt. Hierbei diente Chlorhexidin ( $c=30 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) als Positivkontrolle, 0,01 %ige Essigsäure als Negativkontrolle. Es wurden wiederum unterschiedliche Proteinkonzentrationen getestet (siehe oben).

Eine dritte antimikrobielle Testung wurde einmalig mit Nährböden unterschiedlichen Natriumchlorid-Gehaltes (0 mM; 50 mM; 100 mM; 150 mM; 400 mM) bei gleichbleibender Proteinkonzentration ( $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) durchgeführt. Chlorhexidin ( $30 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle diente 0,01 % Essigsäure.

Im Falle von Hemmhöfen bei mindestens zwei verschiedenen Filaggrin-Konzentrationen wurde nachfolgend die „Minimale effektive Konzentration“ (MEK) als Maß für die antimikrobielle Aktivität berechnet (Steinberg und Lehrer, 1997).

## 3 ERGEBNISSE

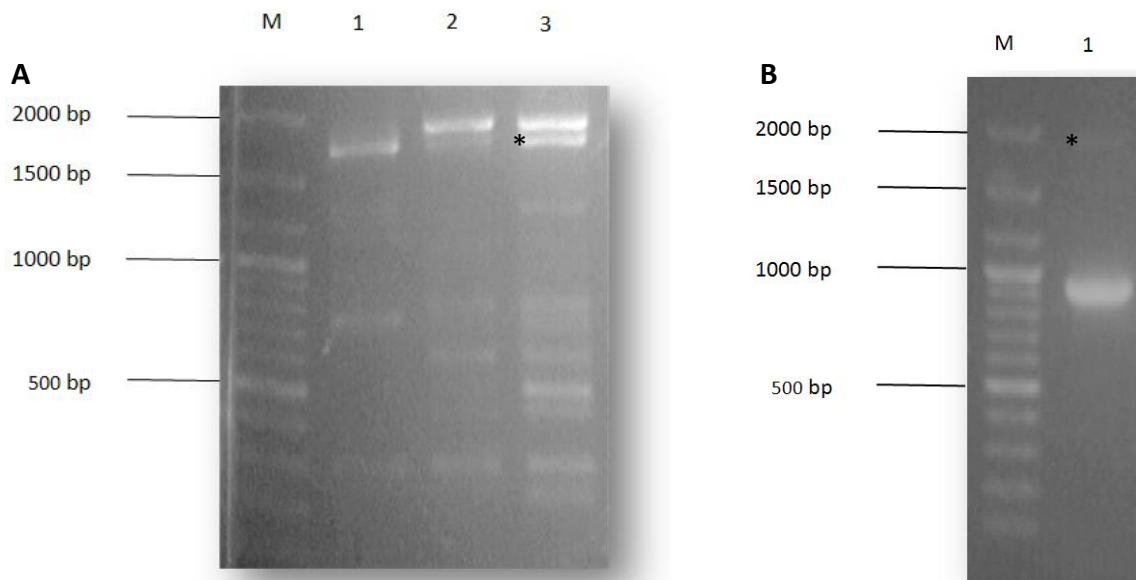
Die menschliche Haut ist ständig verschiedensten Umweltbedingungen und Mikroorganismen ausgesetzt. Bemerkenswert dabei ist, dass sie trotzdem selten von Infektionen betroffen ist. Dieses Phänomen und die Rolle, welche AMPs der Epidermis in der Abwehr von Bakterien und Pilzen spielen, ist Forschungsgegenstand unserer Arbeitsgruppe. Schon für die „S100 Fused Type“-Proteine Hornerin und Ifapsoriasin konnte in der Vergangenheit antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden (Wu, 2005, Hansmann, 2008). In HPLC-Analysen von Polypeptiden aus dem Stratum corneum fanden sich innerhalb der antimikrobiell wirksamen Fraktionen ebenfalls Peptide des Filaggrins. Ziel dieser Arbeit war es, zwei dieser identifizierten Filaggrin-Peptide FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> herzustellen, aufzureinigen und sie hinsichtlich möglicher antimikrobieller Aktivität zu prüfen.

### 3.1 Amplifizierung der Filaggrin-Gensequenzen in der PCR

In einer Standard-PCR wurden zunächst zwei größere DNA-Fragmente vervielfältigt, welche die gesuchten kodierenden Sequenzen der Filaggrinpeptide enthielten. Die Primer FLG 1323-F und FLG 3033-R wurden für die Herstellung des 1711 bp großen Fragments als Vorstufe der FLG<sub>764-903</sub>-Gensequenz eingesetzt. Als Matrize diente cDNA, die von ausdifferenzierten kultivierten humanen Keratinozyten der neonatalen Präputiumepidermis gewonnen und freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate zeigten sich im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel für das 1711 bp-Fragment zwei mögliche Banden mit Größen von ca. 1700 und 1800 bp (siehe Abbildung 3.1 A). Die ca. 1700 bp fassende Sequenz erwies sich im Folgenden als korrektes PCR-Produkt. Weitere kleinere DNA-Fragmente wurden ebenfalls amplifiziert, was die ungenaue Bindung der Oligonukleotide an ähnliche DNA-Sequenzen der Filaggrin-Repeats vermuten lässt.

Zur Amplifikation des 1874 bp großen Fragments von FLG<sub>2849-2900</sub> wurden die Oligonukleotide FLG 87682-F und FLG 9555-R verwendet. Unter den Standardbedingungen (siehe 2.11.1.1) wurde eine Sequenz mit ca. 1900 bp vervielfacht, die in der späteren Sequenzierungsauswertung allerdings nur in Anteilen mit der FLG<sub>2849-2900</sub>-Gensequenz übereinstimmte. Trotzdem wurden alle weiteren Arbeitsschritte auch mit diesem Fragment

(Namensgebung FLG 36 AS) durchgeführt und sind unter Abschnitt 3.5 beschrieben. Im Folgenden wurde die PCR abgewandelt, indem humane genomische DNA (Human genomic DNA; Promega; c=129µg/ml) anstatt verdünnter cDNA als Matrize zum Einsatz kam. Ebenso wurde die Annealing-Temperatur in der PCR von ursprünglichen 62 °C auf 52,5 °C abgesenkt um eine quantitativ höhere, wenn auch unpräzisere Primerbindung an die genomische DNA erreichen. Unter diesen Bedingungen zeigten sich in der anschließenden Agarosegelelektrophorese die korrekten Sequenzen als eine schwache Bande in einer Größenordnung von ca. 1900 bp (siehe Abbildung 3.1 B). Die gekennzeichneten Banden (\*) wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und nachfolgend mittels Gelextraktion aufgereinigt.



### Abbildung 3.1: Amplifikate der Standard-PCR in der Agarose-Gelelektrophorese

M: 100 bp-DNA-Leiter; A) Amplifikate des FLG<sub>764-903</sub>-Fragments mit einer Größe von 1711 bp.

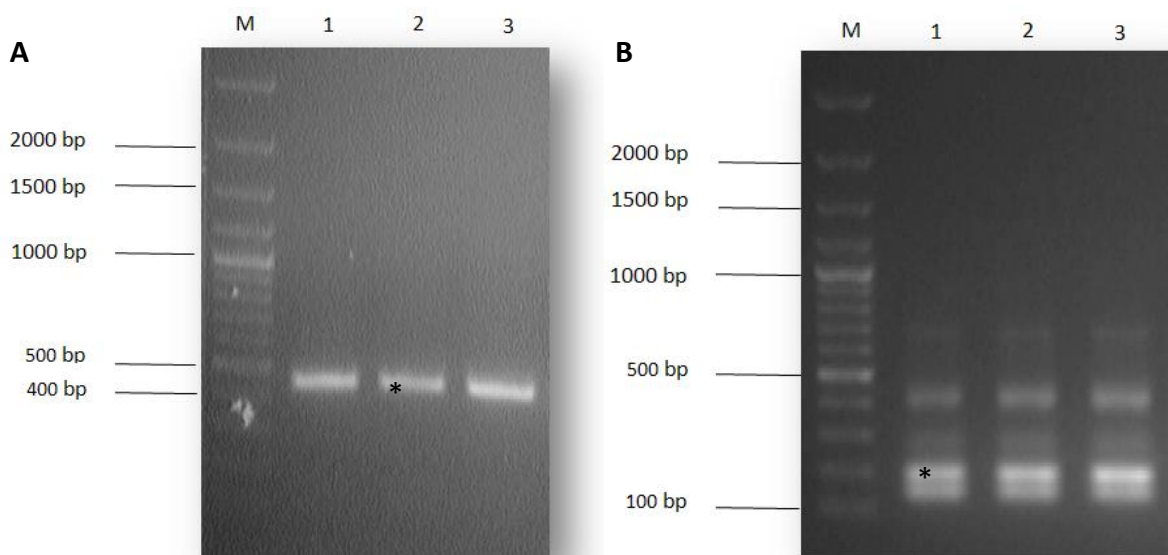
Verschiedene c-DNAs wurden verwendet. 1: MN1 SUSC- cDNA; 2+3: 11U-cDNA

B) Amplifikate des FLG<sub>2849-2900</sub>-Fragments mit einer Größe von 1874 bp. 1: sehr schwache, ca. 1900 bp große Bande zu sehen.

Die gekennzeichneten Banden (\*) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und weiter verarbeitet.



Die extrahierte DNA wurde als Matrize in der nachfolgenden „Nested PCR“ (siehe 2.11.1.2) verwendet um kleinere, innerhalb der Sequenzen liegende DNA-Abschnitte zu generieren. Für die Amplifikation der Gensequenz mit 447 bp (420 bp der FLG<sub>764-903</sub>-DNA-Sequenz und 27 bp als Primer-Sequenzanhänge) wurden die Oligonukleotide pE-SUMO3-FLG-2290 F und pE-SUMO3-FLG-2709 R eingesetzt. Die generierten Produkte entsprachen der erwarteten Länge (siehe Abbildung 3.2). Die Vervielfältigung der 187 bp langen zählenden Gensequenz (156 bp der FLG<sub>2849-2900</sub>-DNA-Sequenz und 31 bp der Primer-Sequenzanhänge) wurde durch die Primer pE-SUMO3-FLG-8545 F und pE-SUMO3-FLG-8700 R gewährleistet. Hierbei erfolgte in den ersten sieben Zyklen des Zwei-Schrittprotokolls der PCR ein Gradient der Annealing-Temperatur, woraufhin sich in der elektrophoretischen Auftrennung im 1 % Agarosegel die eindeutigsten Banden bei einer Annealing-Temperatur (AT) von 50,4 °C zeigten. Die markierten Banden (\*) der erwarteten Fragmentlänge (siehe Abbildung 3.2) wurden wiederum aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert.



**Abbildung 3.2: Amplifikate der „Nested PCR“ in der Agarose-Gelelektrophorese**

M: 100 bp-DNA-Leiter; A) Amplifikate für das FLG<sub>764-903</sub>-Fragment mit einer Größe von 447 bp. Verschiedene c-DNA-Fragmente dienten als template. 1: FLG<sub>1323-3033</sub> aus MN1 SUSC-cDNA; 2+3: FLG<sub>1323-3033</sub> aus 11U-cDNA

B) Amplifikate für das FLG<sub>2849-2900</sub>-Fragment mit einer Größe von 187 bp bei einem Annealing-Temperaturgradient 1: AT=50,4 °C; 2: AT=51,8 °C; 3: AT=53,6 °C. Die gekennzeichneten Banden (\*) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und weiterbearbeitet.

## 3.2 Klonierung in den pE-SUMO3-Vektor

### 3.2.1 Restriktionshydrolyse

In der Restriktionshydrolyse wurde aus den extrahierten DNA-Fragmenten eine definierte Anzahl an außerhalb der kodierenden Sequenz liegenden Nukleotiden abgespalten. Dies wurde mithilfe verschiedener Restriktionsenzyme erreicht, die jeweils am 5'-Ende der Sequenzen vier ungepaarte Basen (AGGT bzw. GATC) entstehen ließen. In der Proteolyse des FLG<sub>764-903</sub>-kodierenden DNA-Fragments wurde mittels *Bbs* I ein AGGT-Überhang und mittels *Xba* I ein GATC-Überhang generiert. In Abbildung 3.3 ist die Hydrolyse durch *Bbs* I und *Xba* I noch einmal verdeutlicht.

#### Restriktionshydrolyse der FLG<sub>764-903</sub>-Gensequenz

Vor der Hydrolyse (447bp):

```
5' GCAGAAGACATAGGTGGCCATGGACAGGCTGGTC -378bp- CACGTAATGAGGAACAATCAAGATGATCTAGATGC 3'
3' CGTCTTCTGTATCCACCGGTACCTGTCCGACCAG -378bp- GTGCATTACTCCTTGTTAGTTCTACTAGATCTACG 5'
```

Nach der Hydrolyse (428 bp):

```
5'          AGGTGGCCATGGACAGGCTGGTC -378bp- CACGTAATGAGGAACAATCAAGAT 3'
3'          CCGGTACCTGTCCGACCAG -378bp- GTGCATTACTCCTTGTTAGTTCTACTAG 5'
```

Blau - Bindungsstelle des pESUMO3-FLG-2709 R Primers

Rot - Bindungsstelle des pESUMO3-FLG-2290 F Primers

Gelb hinterlegt - Erkennungssequenz von *Bbs*I

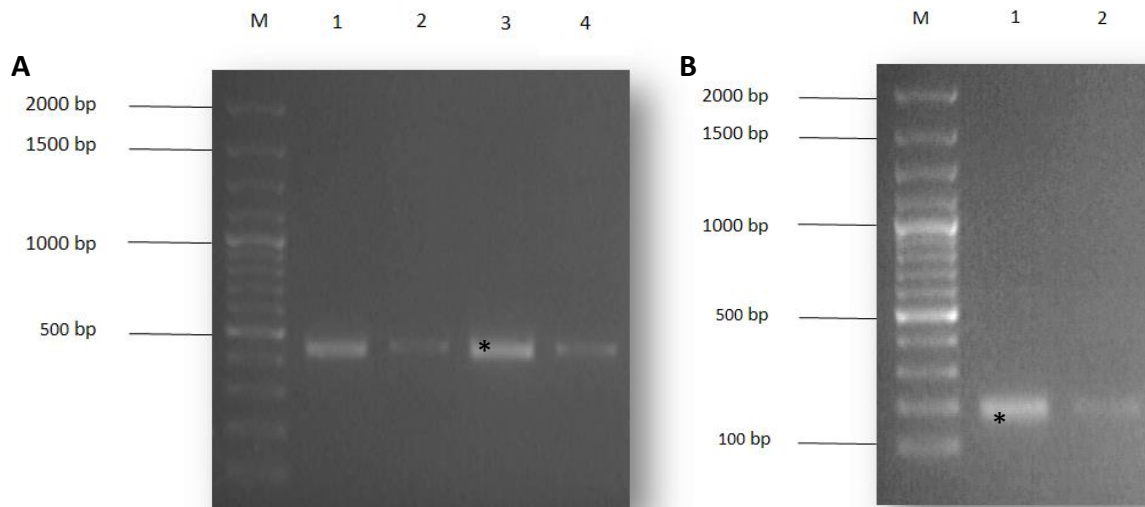
Blau hinterlegt - Erkennungssequenz von *Xba*I

Unterstreichung - Nukleotidbasenüberhänge

#### **Abbildung 3.3: Skizzierung der Restriktionshydrolyse am Beispiel der FLG<sub>764-903</sub>-Gensequenz**

Eine Anwendung des *Eco*31 I-Enzyms hätte zu Spaltungen innerhalb der FLG<sub>764-903</sub>-Sequenz geführt und war daher nicht möglich. Die Restriktionshydrolyse des FLG<sub>2849-2900</sub>-kodierenden Fragments konnte jedoch ausschließlich mit *Eco*31 I durchgeführt werden. Nach korrekter Hydrolyse zeigten sich die elektrophoretisch getrennten Proben nach Restriktion im Agarosegel als Banden von etwas geringerer DNA-Größe als ihre unverdauten Äquivalente in

der Negativkontrolle (siehe Abbildung 3.4). Die markierten Banden (\*) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und per Gelextraktion für die anschließende Ligation aufgereinigt.



#### Abbildung 3.4: Überprüfung der Restriktionshydrolyse in der Agarose-Gelelektrophorese

M: 100 bp-DNA-Leiter; A) Hydrolyse des FLG<sub>764-903</sub>-Fragments. Spur 1 und 3: Fragment nach Hydrolyse (428bp). Die Verkürzung der Fragmente im Vergleich zur Negativkontrolle (2 und 4) ist sichtbar. Spur 2 und 4: Unverdaute DNA aus der „Nested PCR“ (447 bp) als Negativkontrolle stellt sich aufgrund geringerer Probenmenge als schwächere Bande dar.

B) Hydrolyse des FLG<sub>2849-2900</sub>-Fragments. Spur 1: Fragment nach Hydrolyse (163 bp). Die Verkürzung der Fragmente im Vergleich zur Negativkontrolle (2) ist sichtbar. Spur 2: Unverdaute DNA aus der „Nested PCR“ (187 bp) als Negativkontrolle stellt sich aufgrund geringerer Probenmenge als schwächere Bande dar.

Die gekennzeichneten Banden (\*) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und weiter bearbeitet.

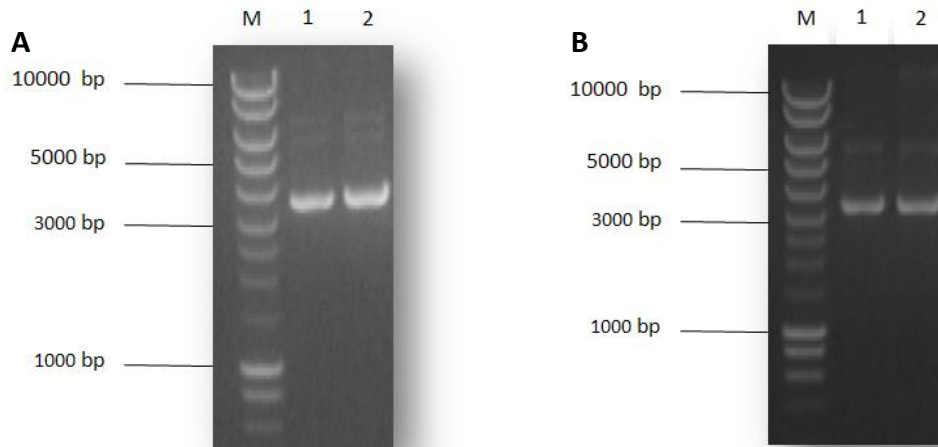
### 3.2.2 Ligation und Transformation in „TOP 10 F' chemocompetent *E. coli*“ und „XL1-blue competent *E. coli*“

Die gereinigten DNA-Fragmente der Restriktionshydrolyse wurden anschließend in den pE-SUMO3-Vektor (siehe 2.12.1) ligiert. Vor der Ligation (siehe 2.11.5) wurde der Vektor bereits mit dem Enzym *Eco31 I* linearisiert und freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Nach der Schließung der Vektoren wurde eine Transformation durchgeführt, wobei für das Plasmid, welches die FLG<sub>764-903</sub>-kodierende Sequenz enthielt, eine Elektroporation von elektrokompetenten XL1-blue *E. coli*-Stämmen durchgeführt wurde. Diese *E. coli*-Stämme besitzen eine Tetrazyklinresistenz, weshalb sie zum selektiven Wachstum in Tetrazyklin versetztem Medium kultiviert wurden. Zur Transformation der pE-SUMO3-Vektoren, die die FLG<sub>2849-2900</sub>-kodierende Sequenz beinhalteten, wurden

chemokompetente TOP 10 *E. coli*-Bakterien verwendet. Die transformierten Kolonien wurden auf Kanamycin-haltigen Agarplatten (bzw. Kanamycin- Tetrazyklin-Agarplatten im Fall von XL1-blue *E. coli*) über Nacht inkubiert, wobei nur diejenigen Klone in der Lage waren zu wachsen, die durch den aufgenommenen Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen besaßen. Am Folgetag wurden von den gewachsenen Kolonien einzelne - per Pipettenspitze aufgenommen und mittels Colony-Check-PCR auf das Vorhandensein des Vektors überprüft.

### 3.2.3 Plasmidisolierung und Sequenzierung

Die Bakterienkolonien, in welchen mittels Colony-Check-PCR der transformierte Vektor nachgewiesen wurde, wurden in Antibiotika-haltigem LB-Medium über Nacht kultiviert. Die zugegebene Antibiotika-Menge richtete sich nach dem jeweiligen Bakterienstamm (siehe Tabelle 2.1). Nach der Kultivierung der Bakterien erfolgte die Plasmid-Isolierung (siehe 2.11.7). Die Präparation der Vektoren wurde in einer 0,8 % Agarose-Gelelektrophorese überprüft, bei welcher im Ethidiumbromid-gefärbten Gel für die FLG<sub>764-903</sub>-DNA-Sequenz ein Vektor einer Größe von ca. 6000 bp erwartet wurde. Für den Vektor, in welchen die FLG<sub>2849-2900</sub>-DNA-Sequenz ligiert war, wurde eine Größe von ca. 5800 bp erwartet. In der Gelelektrophorese ließen sich die Plasmide nachweisen (siehe Abbildung 3.5), jedoch zeigten ihre Banden nicht die errechnete theoretische Basenpaargröße. Grund dafür war, dass die Plasmide als zirkuläre DNA und in unterschiedlichen Konformationen vorlagen und dadurch ein von linearer DNA abweichendes Laufverhalten im Gel zeigten. Daher ließ die Gelelektrophorese eine optische Qualitätskontrolle der Vektorenaufreinigung zu, jedoch ließ sich keine genaue Aussage über die Größe der Plasmide treffen. Eine genaue Überprüfung der Plasmide und der korrekten Basen-Abfolge ihrer FLG-Inserts lieferte die Auswertung der Sequenzierung (siehe 2.11.8). Die Basenabfolge des FLG<sub>764-903</sub>-Insert stellte sich als korrekt heraus (siehe 7.1.1). In der Auswertung der Plasmidsequenzierung für die FLG<sub>2849-2900</sub>-Gensequenz zeigten sich im Vergleich zur theoretischen Gensequenz zwei Basenpaarmutationen, die jedoch keine Auswirkungen auf die translatierte Aminosäureabfolge des exprimierten FLG<sub>2849-2900</sub> hatten (siehe 7.1.2).



**Abbildung 3.5: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel zur Überprüfung der Plasmid-Isolierung**

M: 1000 bp-DNA-Leiter; A) pE-SUMO3-Vektoren mit FLG<sub>764-903</sub>-Insert. 1+2: Banden im Bereich von ca. 3700-3800 bp zu sehen. Die tatsächliche Größe beträgt ca. 6000 bp, aufgrund der Zirkularität der Plasmide zeigen sie ein verändertes Laufverhalten im Gel.

B) pE-SUMO3-Vektoren mit FLG<sub>2849-2900</sub>-Insert. 1+2: Banden im Bereich von ca. 3500-3600 bp zu sehen. Die tatsächliche Größe beträgt ca. 5800 bp, aufgrund der Zirkularität der Plasmide zeigen sie ein verändertes Laufverhalten im Gel, die verschiedenen Banden repräsentieren die Plasmide in unterschiedlichen Konformationen.

### 3.2.4 Transformation in BL 21 (DE3) pLysS *E. coli*

Zur rekombinanten Herstellung der Fusionsproteine wurden im Folgenden die eluierten Plasmide per Elektroporation (siehe 2.11.6.1) in BL 21 (DE3) pLysS *E. coli* transformiert. Der Nähragar zum Ausstreichen der transformierten Kolonien wurde entsprechend der bakteriellen Resistenzen mit Chloramphenicol und Kanamycin (Konzentrationen siehe Tabelle 2.1) versetzt. Nach einer Inkubation über Nacht wurde von einzelnen Klonen eine Pipettenspitze entnommen und mit ihnen eine weitere Colony-Check-PCR durchgeführt. In dieser PCR wurde nochmals die Aufnahme der Vektoren überprüft.

## 3.3 Herstellung und Aufreinigung von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> und SUMO-FLG<sub>2849-2900</sub>

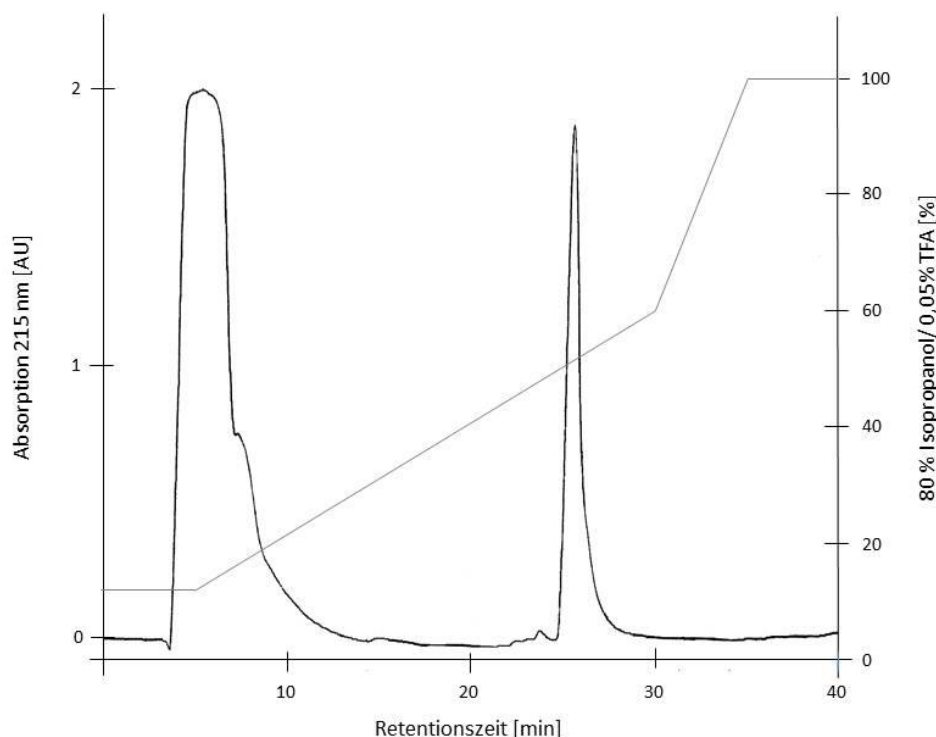
### 3.3.1 Herstellung von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> und SUMO-FLG<sub>2849-2900</sub>

In Vorbereitung der Expression wurde von den in der Colony-Check-PCR positiv getesteten BL 21 (DE3) pLysS *E. coli*-Stämmen jeweils eine Flüssigkultur in Antibiotika-versetztem

LB-Medium (siehe Tabelle 2.1) hergestellt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden jeweils drei Expressionskulturen (250 ml Antibiotika LB Medium; Antibiotika-Konzentrationen siehe Tabelle 2.1) mit einem definierten Volumen der Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,025 angeimpft. Das Wachstum der Kulturen wurde anhand halbstündlicher OD<sub>600</sub>-Messungen kontrolliert. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,8 wurde die eigentliche Expression durch Zugabe von IPTG induziert. Nach weiterer Kultivierung wurden die Bakterien zentrifugiert, lysiert, ihre unlöslichen zellulären Bestandteile entfernt und die löslichen Bestandteile inklusive der Fusionsproteine mit NPI-Puffer versetzt.

### 3.3.2 Aufreinigung von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> und SUMO-FLG<sub>2849-2900</sub>

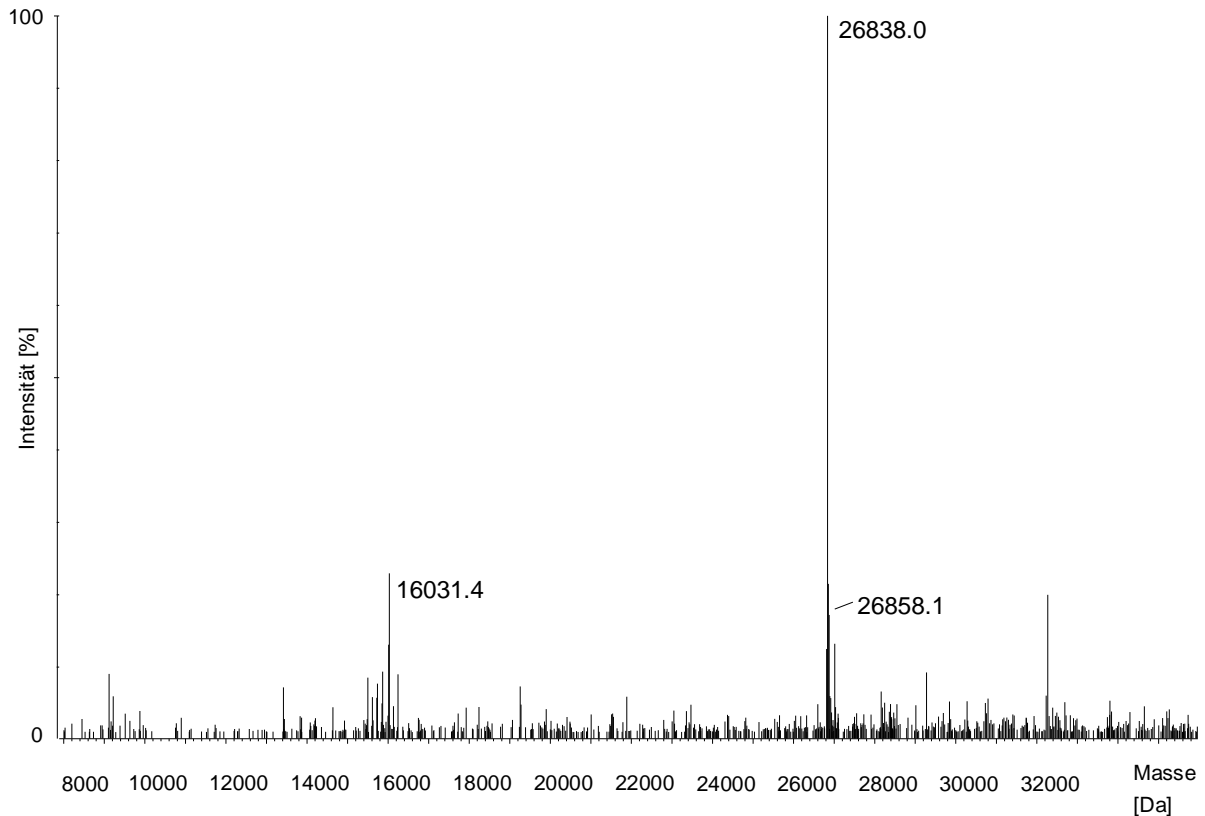
Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurden die Proben der lysierten, in NPI-Puffer vorliegenden Bakterienbestandteile einer immobilisierten Nickel-Affinitätschromatografie unterzogen um die Fusionsproteine von den löslichen zytosolischen Zellbestandteilen zu separieren (siehe 2.13.2). Anschließend wurden die Fusionsproteine mittels FPLC (siehe 2.13.4) in eine PBS-Pufferlösung umgelagert, da die Salzkonzentration des NPI-Puffers die folgende Abspaltung des SUMO-Proteins durch die SUMO Protease 2 verhindert hätte. Anschließend wurde die Konzentration der SUMO-Fusionsproteine im Nanodrop 1000 ermittelt und jeweils mit einem 800 µg-Aliquot eine C8-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt (siehe 2.13.3), um ein möglichst reines Fusionsprotein zu isolieren. In der Abbildung 3.6 ist ein repräsentatives Chromatogramm der C8-Umkehrphasen-HPLC am Beispiel der Aufreinigung von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> gezeigt. Darin ist zunächst ein Peak nach einem kurzen Zeitintervall von ca. vier Minuten zu sehen, welcher durch die UV-Absorption kleinerer Moleküle aus der Probe wie Imidazol bedingt ist und daher nicht gesammelt wurde. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte innerhalb des Gradienten nach 25 Minuten. Das manuell fraktionierte Eluat wurde anschließend massenspektrometrisch untersucht (siehe 2.14.2).



**Abbildung 3.6: Chromatogramm der Auftrennung des rekombinant hergestellten SUMO-FLG<sub>764-903</sub> mittels C8- Umkehrphasen-HPLC**

Hierin ist die relative Absorption der Probenbestandteile in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie) zu sehen. Die Konzentration des Eluenten ist auf der rechten Achse aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min auf die C8-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mithilfe eines Gradienten aus 0,05 % TFA in H<sub>2</sub>O und 0,05 % TFA in 80 % Isopropanol. Der gezeigte Peak nach 25 Minuten enthielt das Fusionsprotein, welches manuell fraktioniert wurde.

In der MS-Analyse ließ sich für SUMO-FLG<sub>764-903</sub> eine Molekularmasse von 26838,0 Da messen, was mit der theoretisch berechneten Masse von 26839,6 Da nahezu identisch ist (siehe Abbildung 3.7). Auch die Proteinmasse von SUMO-FLG<sub>2849-2900</sub> mit 17163,9 Da entsprach dem theoretisch ermittelten Wert mit 17163,5 Da.

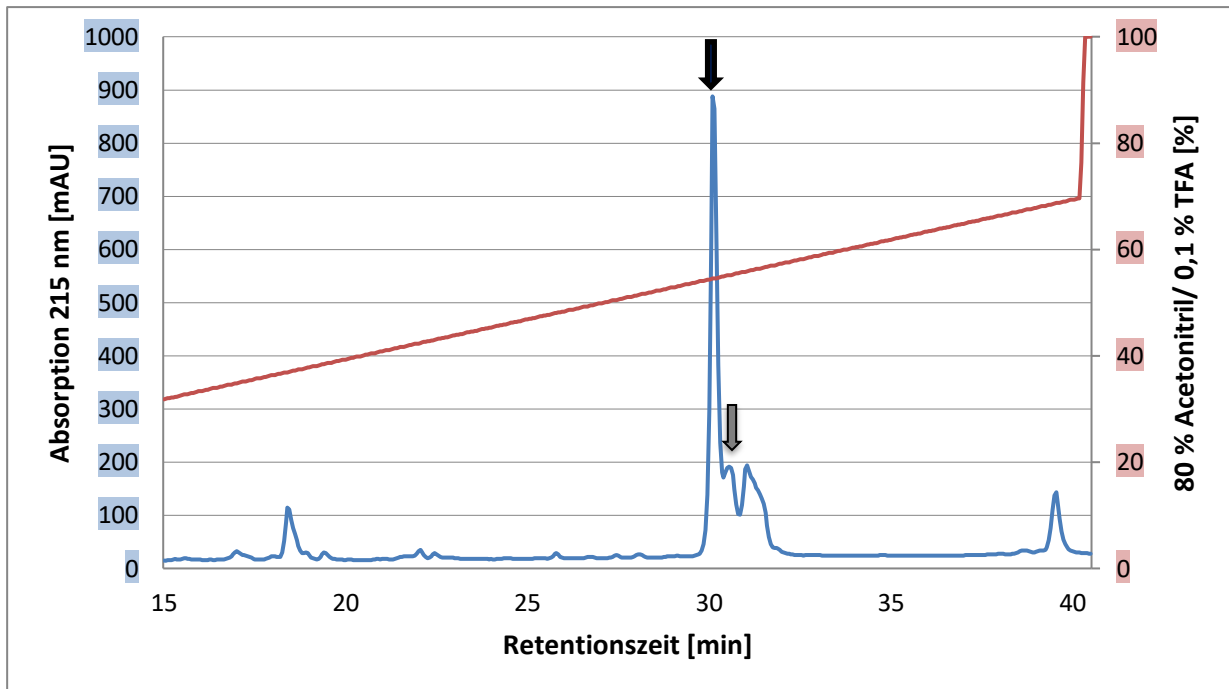


**Abbildung 3.7: Massenbestimmung von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> mittels QTOF-Massenspektrometrie**

Dargestellt ist die „MaxEnt1“-Auswertung des SUMO-FLG<sub>764-903</sub>-Fusionsproteins, welches zuvor mittels C8-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt wurde. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks auf der Vertikalachse ist gegen die Masse in Dalton aufgetragen. Es wurde eine Masse von 26838,0 Da berechnet.

Zur erneuten genauen Konzentrationsbestimmung der in PBS gelagerten SUMO-FLG<sub>764-903</sub>-Probe mittels C18-Umkehrphasen-HPLC fielen im Chromatogramm eine neu aufgetretene „Schulter“ im Peak des analysierten Fusionsproteins sowie ein weiterer Peak auf. Die Chromatografie wurde in etwa einmonatigem Abstand zur vorhergehenden C8-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt und die Probe bis dato bei -20 °C gelagert. In Abbildung 3.8 sind das Chromatogramm der C18-Umkehrphasen-HPLC und der darin enthaltene geschulterte Peak des Fusionsproteins mit einer Retentionszeit von etwa 30 Minuten dargestellt. Ebenso sieht man einen weiteren Peak mit einer Retentionszeit von etwa 32 Minuten. Das Eluat des ersten Peaks (ohne Schulter) wurde fraktioniert und anschließend einer massenspektrometrischen Analyse zugeführt.

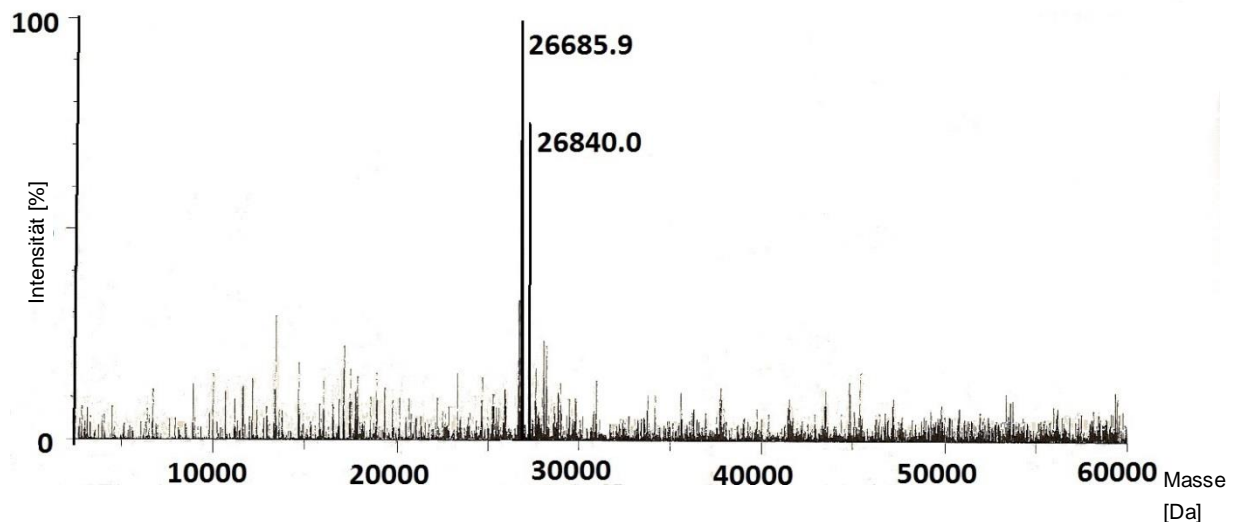




**Abbildung 3.8: Chromatogramm der C18-Umkehrphasen-HPLC von SUMO-FLG<sub>764-903</sub>**

Gezeigt ist ein Ausschnitt der relativen Absorption der Probenbestandteile in mAU bei 215 nm (blaue Linie) im Gradientenverlauf (rote Linie). Die relative Absorption ist auf der linken Vertikalachse, die Konzentrationen des Eluenten auf der rechten Vertikalachse dargestellt. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 150  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf die C18-Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte bei ansteigenden Konzentrationen von 80 % Acetonitril in 0,1 % TFA mit einer Retentionszeit von etwa 30 min und 32 min, wobei der erste Peak (schwarzer Pfeil) eine Schulter (grauer Pfeil) enthält. Die eluierten Proteine wurden im Folgenden massenspektrometrisch analysiert.

In der folgenden MS-Analyse ließ sich für den schwarz gekennzeichneten Peak des Fusionsproteins eine Mischung aus zwei hauptsächlich enthaltenen Proteinen nachweisen (siehe Abbildung 3.9). Das größere Protein mit gemessenen 26840,0 Da entspricht der theoretischen Masse des SUMO-FLG<sub>764-903</sub> mit 26839,6 Da. Das kleinere Protein mit einer molaren Masse von 26685,9 Da war um etwa 154 Da kleiner als SUMO-FLG<sub>764-903</sub>. Diese Molekularmasse entspricht mit 2 Da Abweichung einer um die C-terminale Aminosäure Arginin verkürzten Version des SUMO-FLG<sub>764-903</sub> und wird deshalb im Folgenden als SUMO-FLG<sub>764-902</sub> (theoretische Molekularmasse 26683,4 Da) bezeichnet. Der Versuch einer Trennung beider Fusionsproteine erfolgte mithilfe einer Kationenaustauschchromatografie, welche jedoch keinen Erfolg zeigte. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden aus diesem Grund mit der Mixtur beider Proteine durchgeführt.

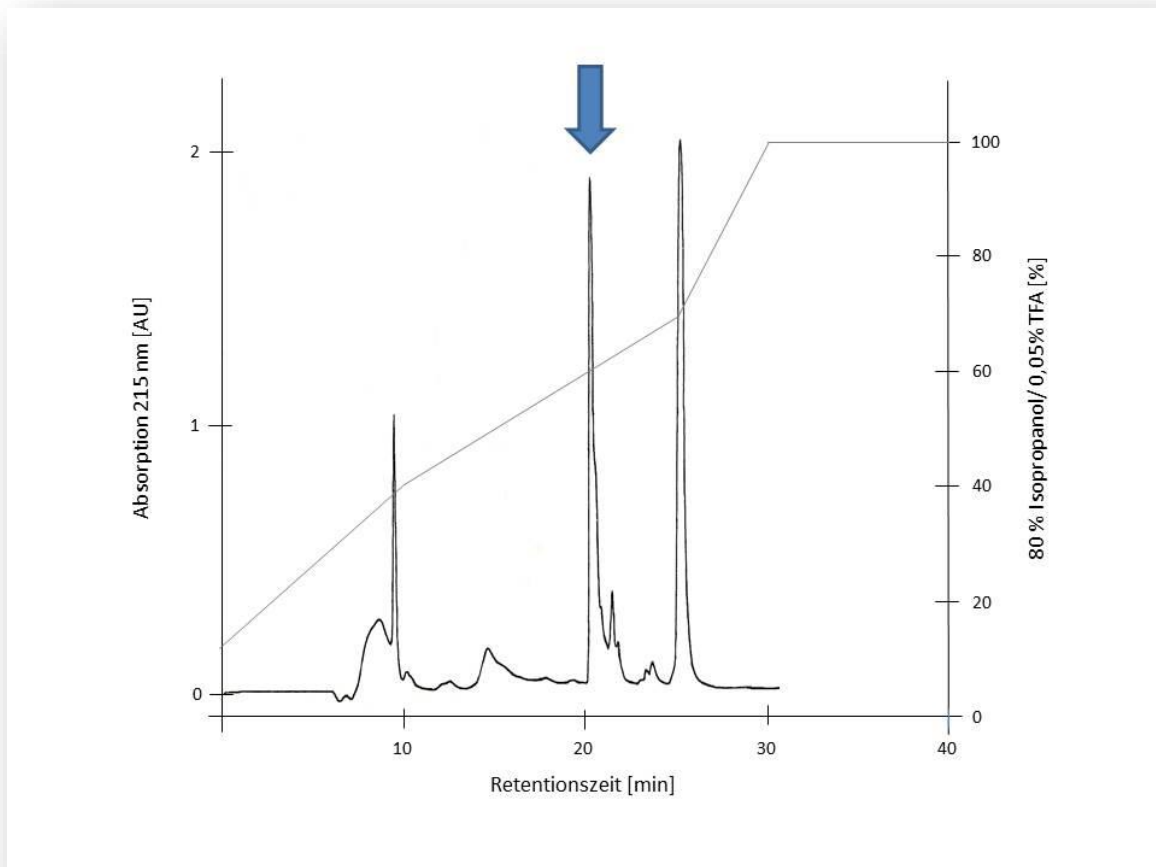


**Abbildung 3.9: Massenbestimmung von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> mittels**

Dargestellt ist die „MaxEnt1“-Auswertung des SUMO-FLG<sub>764-903</sub>-Proteins, welches aus dem höchsten Peak der C18-Umkehrphasen-HPLC gewonnen wurde (siehe Abbildung 3.8). Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks auf der Vertikalachse ist gegen die Masse in Dalton aufgetragen. Es wurde zwei Massen von 26685,9 Da und 26840,0 Da errechnet. Bei dem kleineren Protein mit 26685,9 Da handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine um die C-terminale Aminosäure (Arginin) verkürzte Version des SUMO-FLG<sub>764-903</sub>.

### 3.4 Aufreinigung von rekombinantem FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub>

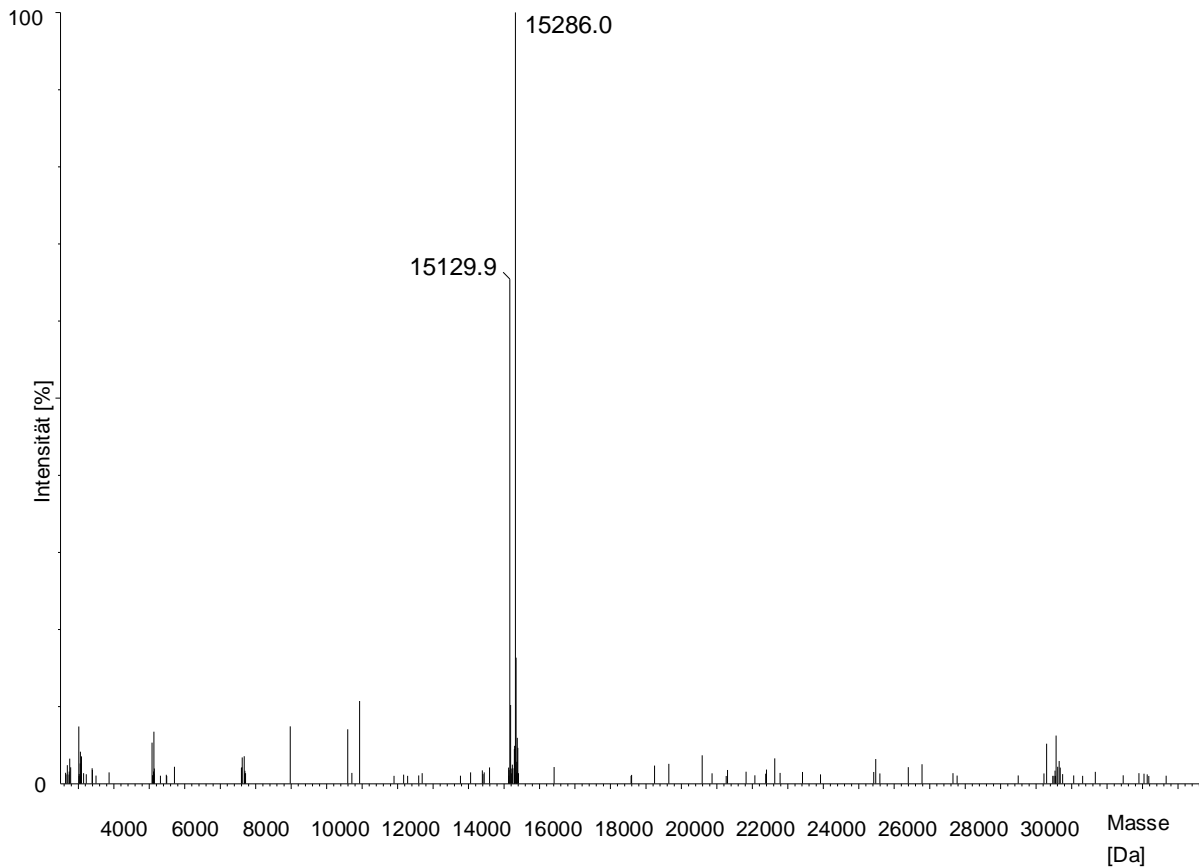
Zunächst wurde die hydrolytische Spaltung der Fusionsproteine in SUMO-Protein und Filaggrinpeptide mittels der SUMO Protease 2 vollzogen. Dazu wurde ein Reaktionsansatz jeweils bei 30 °C über Nacht inkubiert (siehe 2.13.5). Anschließend erfolgte die Aufreinigung von FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> erneut mittels Umkehrphasen-HPLC, wie unter 2.13.6 beschrieben. Exemplarisch ist das Chromatogramm der C4-Umkehrphasen-HPLC von FLG<sub>764-903</sub> in Abbildung 3.10 dargestellt. Der zweite Peak mit einer Retentionszeit von 20 Minuten beinhaltete das Filaggrinpeptid, der nachfolgende Peak mit einer Retentionszeit von 25 Minuten enthielt das abgespaltene SUMO-Protein. Bei beiden Peaks wurde das Eluat manuell fraktioniert und im Massenspektrometer gemessen.



**Abbildung 3.10: Chromatogramm der Auftrennung des rekombinant hergestellten FLG<sub>764-903</sub> mittels C4- Umkehrphasen-HPLC**

Gezeigt ist die relative Absorption der Probenbestandteile in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Die Konzentration des Eluenten ist auf der rechten Achse aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mithilfe eines Gradienten aus 0,05 % TFA in H<sub>2</sub>O und 0,05 % TFA in 80 % Isopropanol. Der gezeigte Peak nach 20 Minuten (blauer Pfeil) enthielt FLG<sub>764-903</sub>, welches manuell fraktioniert wurde. Der anschließende Peak mit einer Retentionszeit von 25 Minuten entsprach dem SUMO-Fusionsprotein.

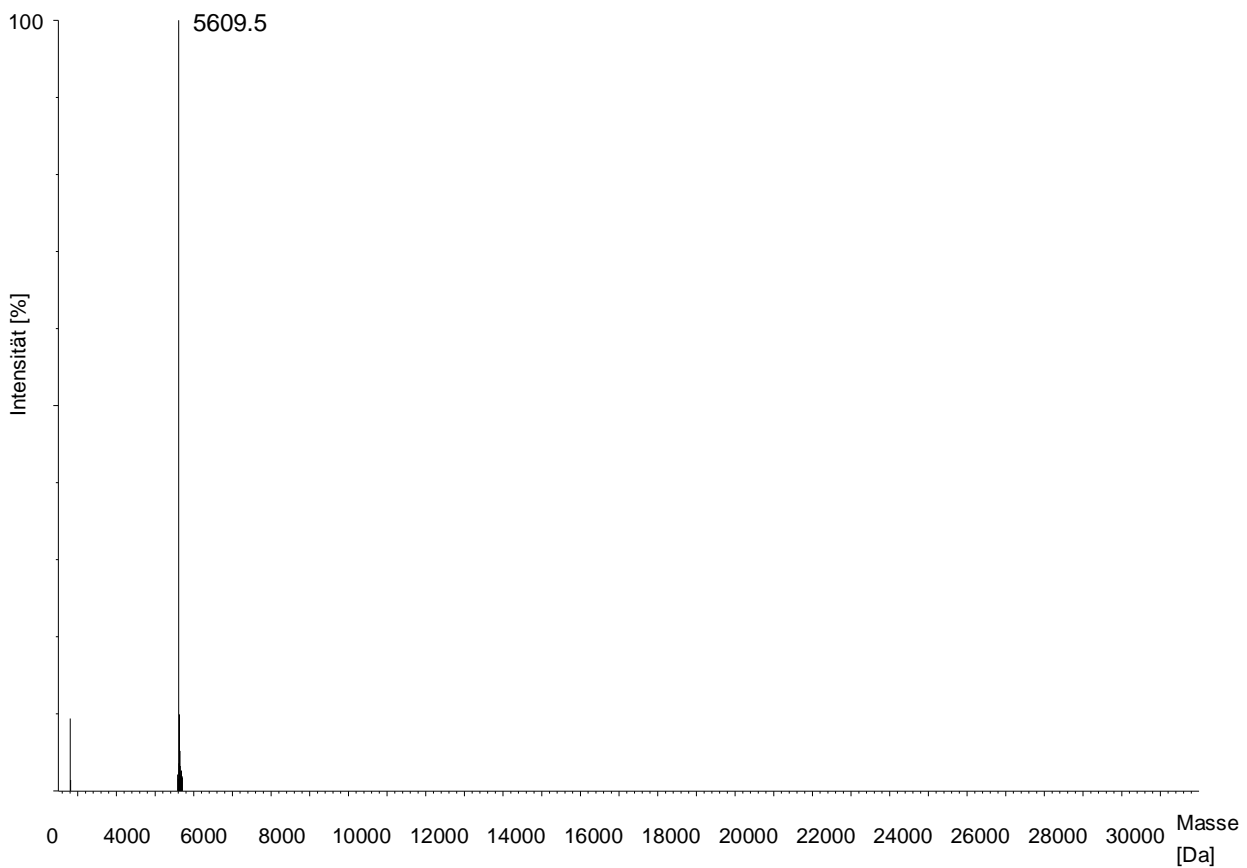
In der massenspektrometrischen Analyse fanden sich für FLG<sub>764-903</sub> wiederum zwei Proteine, die sich um 156 Da unterschieden (siehe Abbildung 3.11). Das größere Protein mit gemessenen 15286,0 Da erwies sich als korrekt synthetisiertes FLG<sub>764-903</sub> (theoretisches Molekulargewicht 15285,7 Da). Das kleinere Protein mit einer Masse von 15129,9 Da entsprach vermutlich FLG<sub>764-902</sub> (theoretische Molekularmasse 15129,5 Da).



**Abbildung 3.11: Massenbestimmung von FLG<sub>764-903</sub> mittels QTOF-Massenspektrometrie**

Dargestellt ist die „MaxEnt1“-Auswertung des FLG<sub>764-903</sub>-Proteins, welches zuvor mittels C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt wurde. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks auf der Vertikalachse ist gegen die Masse in Dalton aufgetragen. Es wurde zwei Massen von 15286,0 Da und 15129,9 Da errechnet.

In der MS-Analyse der FLG<sub>2849-2900</sub>-Probe ließ sich ein Protein von 5609,5 Da Größe detektieren, welches nur geringfügig von der theoretischen Masse von FLG<sub>2849-2900</sub> mit 5609,7 Da differiert (siehe Abbildung 3.12).



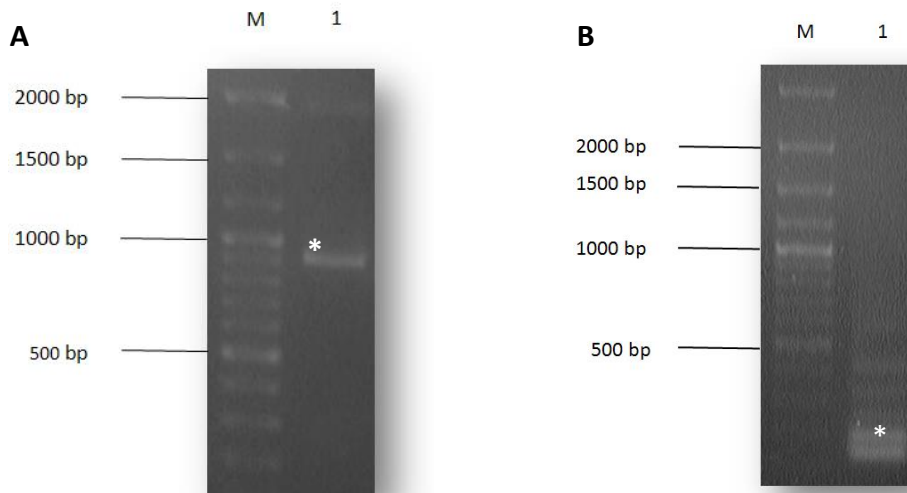
**Abbildung 3.12: Massenbestimmung von FLG<sub>2849-2900</sub> mittels QTOF-Massenspektrometrie**

Dargestellt ist die „MaxEnt1“-Auswertung des FLG<sub>2849-2900</sub>-Proteins, welches zuvor mittels C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt wurde. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks auf der Vertikalachse ist gegen die Masse in Dalton aufgetragen. Es wurde eine Masse von 5609,5 Da errechnet.

### 3.5 Herstellung des 36 Aminosäuren großen Filaggrinpeptids (FLG 36 AS)

Wie bereits unter 3.1 beschrieben, wurde unter PCR-Standardbedingungen mit humaner Keratinozyten-cDNA als „template“ und unter Verwendung der Oligonukleotide FLG-7682-F und FLG-9555-R zunächst auch ein etwa 1900 bp umfassender DNA-Abschnitt amplifiziert. In der Agarose-Gelelektrophorese waren die Amplifikate dieser PCR als mäßige Bande sichtbar (siehe Abbildung 3.13 A) und wurden unter dem UV-Detektor aus dem Gel ausgeschnitten, sowie als Matrize der nachfolgenden „Nested PCR“ verwendet. Die „Nested PCR“ ließ unter Standardbedingungen und Verwendung der Primer pE-SUMO3-FLG-8545 F und pE-SUMO3-FLG-8700 R statt einer erwarteten 187 bp großen DNA-Sequenz (156 bp der

FLG<sub>2849-2900</sub>-DNA-Sequenz und 31 bp der Primer-Sequenzüberhänge) zwei verschieden große Amplifikate entstehen. Diese generierten DNA-Sequenzen wurden nach der Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht und sind als zwei deutliche Banden im Bereich von 150-200 bp in Abbildung 3.13 B gezeigt. Die größere der beiden Banden wurde aus dem Gel ausgeschnitten und per Gelextraktion aufgereinigt.



**Abbildung 3.13: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Standard-PCR- und „Nested PCR“-Amplifikate**

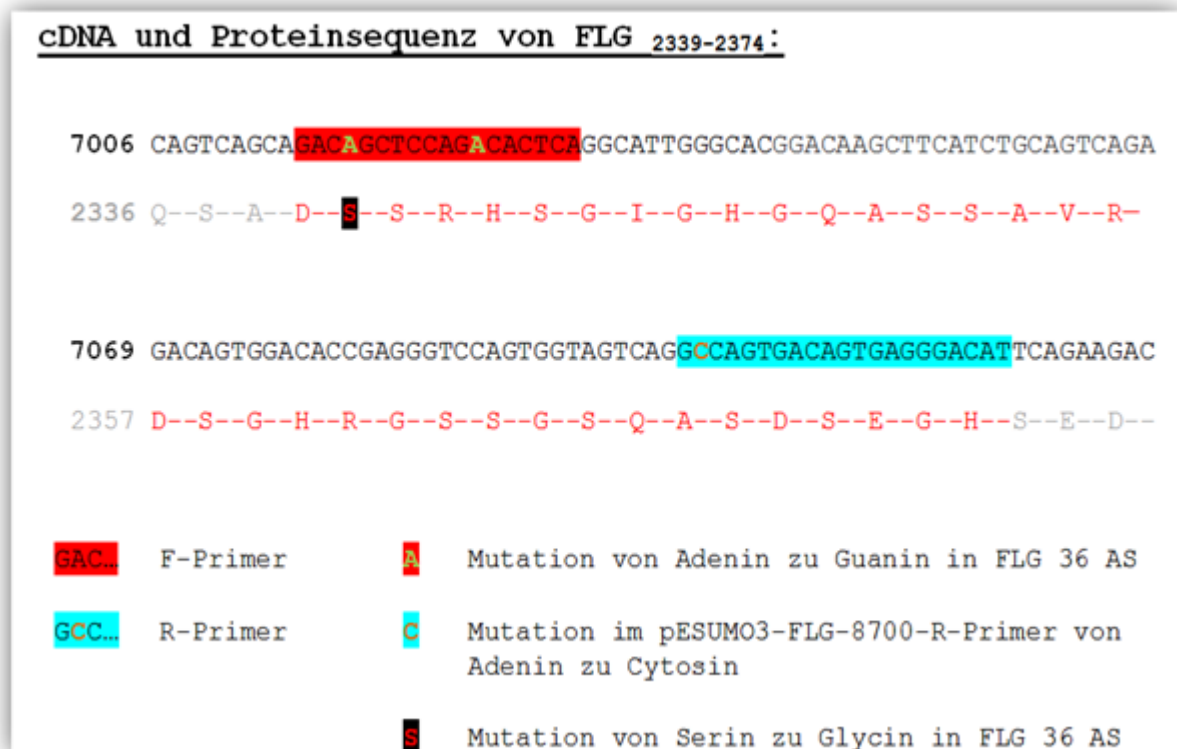
M: 100 bp-DNA-Leiter; A) Amplifikate des FLG-Fragments aus der Standard-PCR. 1: sehr schwache, ca. 1900 bp große Bande zu sehen. Als template wurde KIA2-cDNA verwendet.

B) Amplifikate des FLG-Fragments aus der „Nested PCR“. 1: Zwei schwache Banden im Bereich von 150-200 bp zu sehen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden mit den ca. 200 bp großen DNA-Fragmenten durchgeführt. Als template der PCR diente die gelextrahierte DNA aus A).

Die gekennzeichneten Banden (\*) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und weiter verarbeitet.

Im Anschluss der „Nested PCR“ wurde eine Restriktionshydrolyse (siehe 2.11.4) mit der extrahierten DNA durchgeführt. Hierzu wurde ein Reaktionsansatz mit *Eco31I* als Restriktionsendonuklease gewählt. In der Überprüfung der Hydrolyse zeigte sich die enzymatisch behandelte DNA im Agarosegel als andeutungsweise kleinere Bande als ihr unverdautes Äquivalent, sie wurde aus dem Gel ausgeschnitten und durch eine Gelextraktion für die weitere Ligation vorbereitet. Die Ligation (siehe 2.11.5) der enzymatisch behandelten DNA erfolgte in den zuvor mittels *Eco31I* linearisierten pE-SUMO3-Vektor (siehe 2.12.1), der

freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde. Nach der Ligation wurden die Vektoren in chemokompetente TOP 10 *E. coli*-Bakterien transformiert (siehe 2.11.6.2). Das nun enthaltene Plasmid mit einem Kanamycinresistenz-kodierendem Gen stattete die Bakterien zum selektiven Wachstum auf Kanamycin-haltigem Agar aus. Die gewachsenen Bakterienkolonien der Übernachtskultur wurden mittels Colony-Check-PCR auf das Vorhandensein des pE-SUMO3-Vektors hin überprüft. Mit den erfolgreich transformierten TOP 10 *E. coli*-Bakterien wurde eine Kanamycin-haltige Flüssigkultur hergestellt, welche über Nacht schüttelnd inkubiert wurde. Am Folgetag wurden die Plasmide - unter anderem zu Sequenzierungszwecken - isoliert (2.11.7 und 2.11.8). In der Auswertung der Sequenzierung fand sich statt der erwarteten 156 bp zählenden FLG<sub>2849-2900</sub>-Gensequenz eine 108 bp große DNA-Sequenz, die nur in Teilen mit der theoretischen Gensequenz von FLG<sub>2849-2900</sub> übereinstimmte. Im Bereich des pE-SUMO3-FLG-8700-R-Primers fand sich in drei von vier Proben eine Mutation von Adenin zu Cytosin an zweiter Basenstelle, die in frühen Zyklen der „Nested PCR“ möglicherweise zu einer Primerbindung an anderer Stelle in der Filaggrin-Gensequenz geführt haben könnte. Darauf deutet auch die weitere Analyse mittels des Internet-Tools „nucleotide blast“ ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)) hin, in welchem sich eine 98 % Übereinstimmung der analysierten Sequenz zur Gensequenz FLG<sub>2339-2374</sub> und der dazu identischen FLG<sub>3635-3670</sub>-Gensequenz bestätigte (siehe Abbildung 3.14). In lediglich zwei Basenpaaren entsprach die sequenzierte DNA nicht den genannten Filaggrin-Sequenzen. Das hergestellte 36 Aminosäuren zählende Protein stimmte bis auf einen Aminosäureaustausch an zweiter n-terminaler Stelle von Serin zu Glycin mit FLG<sub>2339-2374</sub> und FLG<sub>3635-3670</sub> überein. Der Einfachheit halber ist das generierte Protein im Folgenden unter dem Begriff „FLG 36 AS“ angeführt.



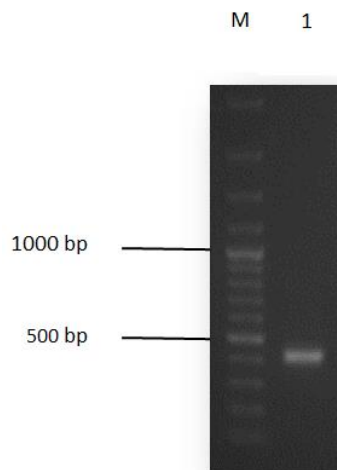
**Abbildung 3.14: cDNA und Proteinsequenz von FLG<sub>2339-2374</sub>**

Gezeigt sind die c-DNA-Sequenz (obere Zeile) sowie die Proteinsequenz (untere Zeile in rot) von FLG<sub>2339-2374</sub>, welche identisch ist zu FLG<sub>3635-3670</sub>. Basen des F-Primers sind rot hinterlegt, Basen des R-Primers blau. Es sind 2 Basenveränderungen (Adenin statt Guanin) der Nukleotide im Vergleich mit der cDNA von FLG 36 AS feststellbar, die jedoch nur zur Transkription einer einzelnen veränderten Aminosäure führen (Glycin anstelle von Serin an zweiter n-terminaler Stelle). Orange gekennzeichnet ist die Ursache der fehlerhaften Primerbindung innerhalb der FLG-cDNA: ein Basenaustausch im pESUMO3-FLG-8700-R-Primer von Adenin zu Cytosin.

Anschließend an die Sequenzierung erfolgte die Transformation der Plasmide in elektrokompetente BL 21 (DE3) pLysS *E. coli*. Die Chloramphenicol-resistenten Bakterien wurden durch die Transformation zusätzlich mit dem Kanamycin-Resistenzgen des pESUMO3-Vektors ausgestattet, sodass eine Kultivierung der Kolonien über Nacht auf Chloramphenicol- und Kanamycin-haltigem Agar durchgeführt wurde. Die gewachsenen Kolonien wurden nachfolgend in einer erneuten Colony-Check-PCR (siehe 2.11.1.3) als Matrize verwendet, um den Erfolg der zweiten Transformation zu überprüfen. In der Colony-Check-PCR war ein Reaktionsansatz mit der Taq-Polymerase und den Oligonukleotiden pE-SUMO3-FLG 8545-F und T7 term short nicht zielführend, vermutlich auch aufgrund der Basenaustausche (auch innerhalb der Primer-bindenden DNA-Sequenz). Die Colony-Check-PCR wurde daher mit der



KAPA2G Robust DNA Polymerase durchgeführt, wobei unter Verwendung der Vektorprimer SUMO Forward 5455 und T7 term short - mit Bindungssequenzen außerhalb des Vektoren-Inserts - ein um 285 bp verlängertes Filaggrin-Gensegment amplifiziert wurde. Das insgesamt 393 bp zählende Vektor-Amplifikat (108 bp der FLG 36 AS-Gensequenz und 285 bp des pE-SUMO3-Vektors) stellte sich nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese als sichtbare Bande unter UV-Licht dar (siehe Abbildung 3.15).

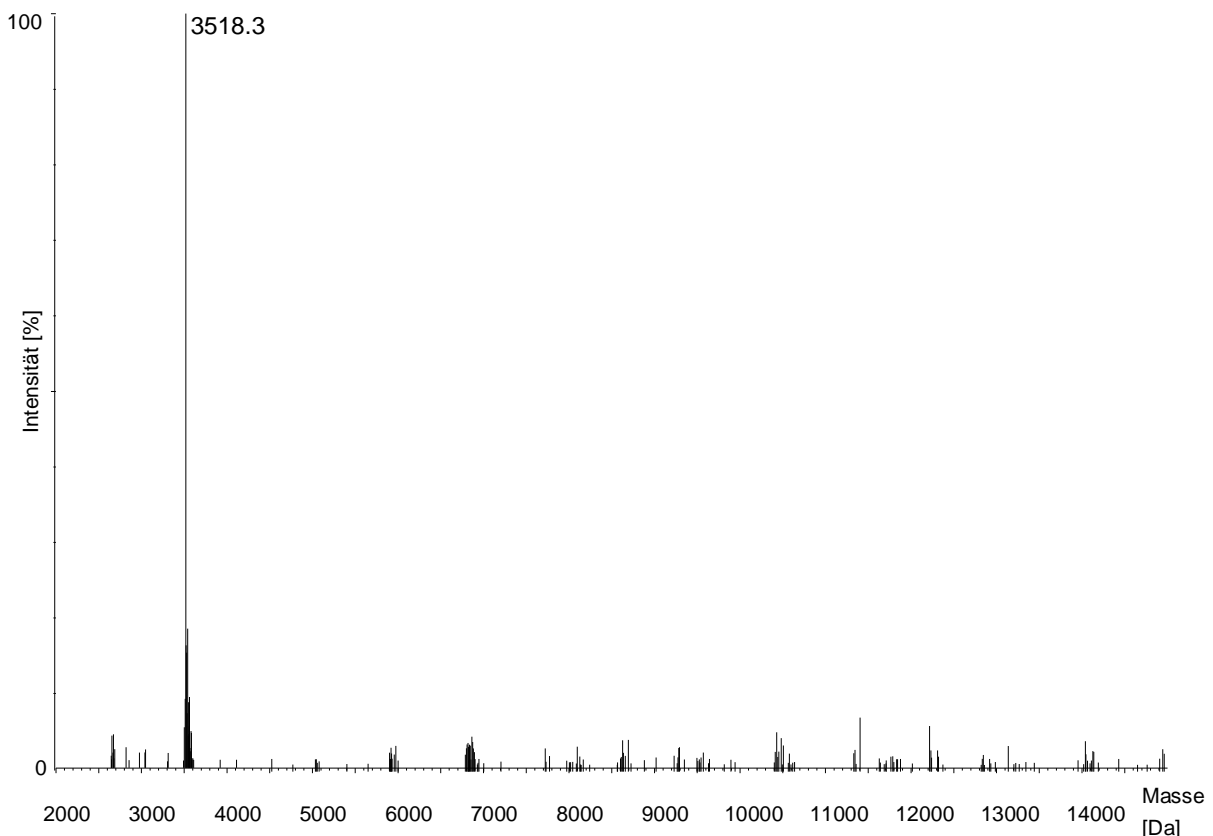


**Abbildung 3.15: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel mit Produkten der Colony-Check-PCR zur Überprüfung der Transformation**

M: 100 bp-DNA-Leiter; Amplifikate aus der Transformation von pE-SUMO3 (inklusive des 108 bp großen FLG 36 AS-DNA-Fragment) in elektrokompetente BL 21 (DE3) pLysS *E.coli*. 1: 393 bp große Amplifikate.

Die erfolgreich transformierten BL 21 (DE3) pLysS *E.coli*-Kolonien wurden nachfolgend zur Synthese des Fusionsproteins verwendet. Die Expression wurde wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt. Der Aufreinigung des Fusionsproteins mittels einer immobilisierten Nickel-Affinitätschromatographie (siehe 2.13.2) zur Separierung von den restlichen löslichen Zellbestandteilen der Bakterien, folgte wiederum die Umlagerung in PBS-Puffer mittels FPLC. Hiernach erfolgte einer Konzentrationsbestimmung des SUMO-FLG 36 AS und eine weitere Aufreinigung mit einem 500 µg-Aliquot des Fusionsproteins per C8-Umkehrphasen-HPLC (siehe 3.13.3). Das Eluat des Fusionsproteins aus der C8-Umkehrphasen-HPLC wurde gesammelt und massenspektrometrisch untersucht. Es wurde für SUMO-FLG 36 AS eine Masse von 15072,6 Da ermittelt, welche nur geringfügig von der theoretisch errechneten Molekülmasse von 15072,3 Da differiert. Nachfolgend erfolgte die hydrolytische Proteinspaltung mittels SUMO Protease 2 (siehe 3.4). Die manuelle Trennung von

„SUMO-Fusionstag“ und FLG 36 AS erfolgte innerhalb der C4-Umkehrphasen-HPLC unter denselben Aufreinigungsbedingungen wie in der C4-Umkehrphasen-HPLC von FLG 2849-2900 (siehe Tabelle 2.3). Die massenspektrometrische Analyse des HPLC-Eluats ergab in der MaxEnt1-Auswertung für FLG 36 AS eine Molekularmasse von 3518,3 Da (siehe Abbildung 3.16). Die theoretisch ermittelte Masse von FLG 36 AS mit 3518,5 Da ist hierbei nur geringfügig größer.



**Abbildung 3.16: Massenbestimmung von FLG 36 AS mittels QTOF-Massenspektrometrie**

Dargestellt ist die „MaxEnt1“-Auswertung des FLG 36 AS-Proteins, welches zuvor mittels C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt wurde. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks auf der Vertikalachse ist gegen die Masse in Dalton aufgetragen. Es wurde eine Masse von 3518,3 Da bestimmt.

## 3.6 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität

Nach erfolgreicher Herstellung und Aufreinigung der drei Filaggrin-Peptide folgte ihre Prüfung auf antimikrobielle Aktivität mittels Radialdiffusionstest (siehe 2.15). Dafür wurden die eluierten Proteine aus den HPLC-Läufen zunächst konzentriert, gefriergetrocknet und in 0,01 % Essigsäure gelöst, wobei die Proteinproben auf eine Testkonzentration von 1000 µg/ml eingestellt wurden.

### 3.6.1 Radialdiffusionstest

Für den Radialdiffusionstest wurden Agarose-Nährböden hergestellt, welchen der zu testende Mikroorganismus vor Aushärtung bereits zugegeben wurde. Dabei handelte es sich um den Stamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 als einen Vertreter grampositiver Bakterien, die gramnegativen Keime *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, sowie den Hefepilz *Candida albicans* ATCC 24433. In ausgestanzte Löcher des Nährbodens wurden jeweils 5 µl der zu testenden Proteinlösung in verschiedenen Konzentrationsstufen (unverdünnt mit c=1000 µg/ml FLG, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100 und 1:300) appliziert. Im Falle von mindestens zwei sichtbaren Hemmhöfen bei Auswertung der Plattendiffusionstests ließ sich durch die Errechnung der „Minimalen effektiven Konzentration“ (MEK) eine Aussage über die Wirkschwelle des antimikrobiellen Peptids treffen.

### 3.6.2 Antimikrobielle Aktivität von FLG<sub>764-903</sub>

Unter Standardbedingungen (pH 7,2-7,4) wurde für FLG<sub>764-903</sub> in verschiedenen Konzentrationen antimikrobielle Aktivität gegenüber den Testorganismen *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 festgestellt (siehe Tabelle 3.1). Alle ausgemessenen Hemmhöfe waren deutlich abgrenzbar, zeigten jedoch geringes diffuses mikrobielles Wachstum innerhalb des sichtbaren Hofes. Aufgrund der antimikrobiellen Wirkung von FLG<sub>764-903</sub> in jeweils zwei unterschiedlichen Testverdünnungen, ließ sich anschließend die MEK des Proteins berechnen (Steinberg und Lehrer, 1997). Dazu wurden jeweils die ermittelten Hemmhofdurchmesser mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Einheit Unit zu erhalten. Die Durchmesser in Units wurden nachfolgend als Punkte gegen die

logarithmische Proteinkonzentration innerhalb eines Koordinatensystems (Abbildung 3.17) aufgetragen. Mithilfe einer Gerade durch die verbundenen Punkte ließ sich an der Schnittstelle mit der Horizontalachse die MEK von FLG<sub>764-903</sub> ermitteln. Die MEK als Stoffmengenkonzentration (M) in mol/l wurde zur besseren Vergleichbarkeit der antimikrobiellen Wirksamkeiten anderer Proteine bei Kenntnis der Proteinkonzentration an der x-Achsenchnittstelle und der Molekularmasse von FLG<sub>764-903</sub> mit 15285,7 g/mol berechnet. Die niedrigste MEK mit 0,6 µM und damit die beste antimikrobielle Wirksamkeit wurde unter Standardbedingungen für FLG<sub>764-903</sub> gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 bei neutralem pH-Wert bestimmt. Geringere antimikrobielle Wirksamkeit erwies FLG<sub>764-903</sub> unter Standardbedingungen gegenüber *Escherichia coli* ATCC 11775 mit einer MEK von 4,5 µM. In Tabelle 3.4 sind die Übersichtsdaten der antimikrobiellen Wirksamkeit zusammengefasst. Gegenüber *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 sowie *Candida albicans* ATCC 24433 ließ sich keinerlei antimikrobielle Aktivität nachweisen, wobei bei ersterem Stamm in allen Tests sogar Trübung innerhalb des Stanzlochsaußens umgab (siehe Abbildung 3.20).

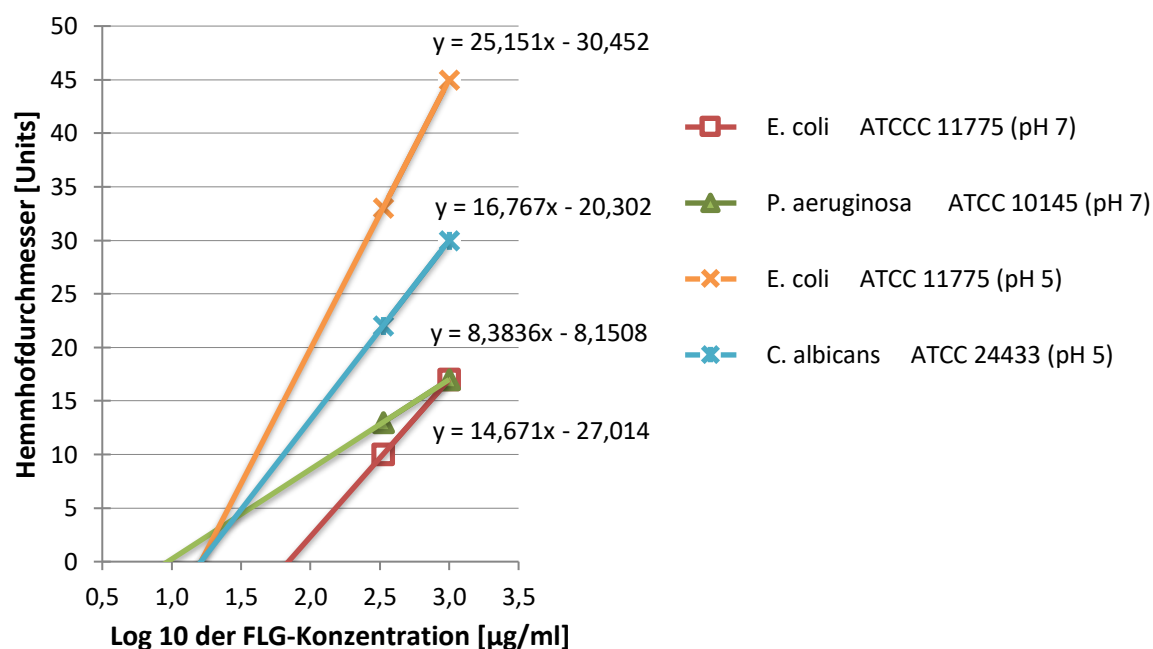
Im Radialdiffusionstest bei Nährboden-pH 5 erwies FLG<sub>764-903</sub> antimikrobielle Aktivität gegenüber *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Candida albicans* ATCC 24433 (siehe Tabelle 3.1). Alle ausgemessenen Hemmhöfe waren abgrenzbar, zeigten allerdings auch wieder eine Trübung innerhalb des Hofes (siehe Abbildung 3.18). Da die antimikrobielle Aktivität in zwei unterschiedlichen Konzentrationsstufen für FLG<sub>764-903</sub> nachweisbar war, ließ sich mithilfe der Hemmhofdaten aus Tabelle 3.1 nachfolgend eine Gerade erstellen (siehe Abbildung 3.17) und die MEK des Proteins – wie oben beschrieben - berechnen. Mit einer MEK von 1,1 µM zeigte FLG<sub>764-903</sub> bei pH 5 eine stärkere antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber *Escherichia coli* ATCC 11775 als unter Standardbedingungen (MEK 4,5 µM). Selbige MEK von 1,1 µM ließ sich bei pH 5 für FLG<sub>764-903</sub> gegenüber *Candida albicans* ATCC 24433 ermitteln. Die Daten zur antimikrobiellen Testung sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Gegenüber *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 war FLG<sub>764-903</sub> bei pH 5 nicht antimikrobiell aktiv. In den mit *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 beimpften Nährböden war wiederum eine Trübung in der Umgebung des Stanzloches zu finden (siehe Abbildung 3.20).

Tabelle 3.1: Ergebnisse des Radialdiffusionstests von FLG 764-903

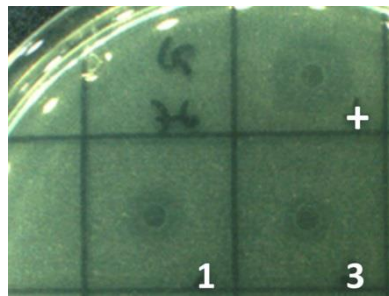
Keim	<i>S. aureus</i> ATCC 6539		<i>E. coli</i> ATCC 11775		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145		<i>C. albicans</i> ATCC 24433	
	H in mm	B	H in mm	B	H in mm	B	H in mm	B
<b>pH 7,2-7,4</b>								
unverdünnt (1000 µg/ml)	0	W	1,7	HH	1,7	HH	0	
1:3 (333 µg/ml)	0	W	1,0	H	1,3	HH	0	
1:10 (100 µg/ml)	0	W	0		0		0	
Positivkontrolle (100 ng/µl)	3,5		2,7		2,3		3,2	
<b>pH 5</b>								
unverdünnt (1000 µg/ml)	0	W	4,5	H	0		3,0	HH
1:3 (333 µg/ml)	0	W	3,3	H	0		2,2	HH
1:10 (100 µg/ml)	0	W	0		0		0	
Positivkontrolle (30 ng/µl)	12,3		9,7		3,0		7,0	

H: Hemmhof; B: Bewertung bei abgrenzbaren Hemmhöfen. HH: geringes diffuses Wachstum im abgegrenzten Hemmhof; H: deutliches Wachstum im abgegrenzten Hemmhof; W: sichtbares mikrobielles Wachstum; Positivkontrolle: humanes Lysozym (pH 7,2-7,4) oder Chlorhexidin (pH 5). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

#### Auswertung des Radialdiffusionstest für FLG 764-903 nach Steinberg und Lehrer



**Abbildung 3.17: Auswertung des Radialdiffusionstests für FLG 764-903 (Steinberg und Lehrer)**  
Das Diagramm zeigt die Hemmhofdurchmesser [Units] aufgetragen gegen die logarithmische Konzentration der FLG 764-903-Proben [µg/ml]. Die Symbole auf den Geraden markieren die erhobenen Datenpunkte. Mithilfe der Schnittpunkte mit der Horizontalachse ließ sich die MEK von FLG 764-903 für die jeweiligen Testorganismen bei festgelegtem pH-Wert berechnen.



**Abbildung 3.18: Radialdiffusionstest von FLG <sub>764-903</sub> gegen *C. albicans* ATCC 24433 bei pH 5**

Gezeigt ist eine Petrischale mit *Candida albicans* ATCC 24433 beimpftem Agarose-Nährboden. Inmitten der Felder befinden sich 3 mm messende Stanzlöcher und die hierin eingebrachten Testlösungen. Das Stanzloch von Feld (+) mit eingebrachter Chlorhexidin-Lösung ( $c=30 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) als Positivkontrolle umgibt ein Hemmhof von 7 mm Durchmesser (abzüglich des Stanzloches). Im Feld (1) zeigt sich um das Stanzloch mit FLG <sub>764-903</sub>-Testlösung ( $c=1000 \text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ein Hemmhof 3 mm Durchmesser. Um das Stanzloch von Feld (3) mit FLG <sub>764-903</sub> in einer Verdünnungsstufe von 1:3 (3) ist ein 2,2 mm messender Hemmhofdurchmesser gezeigt. Die Hemmhöfe um FLG <sub>764-903</sub> sind abgrenzbar, weisen jedoch die oben beschriebene Trübung auf.

Im einmaligen Radialdiffusionstest mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen ab 50 mM zeigte FLG <sub>764-903</sub> keinerlei antimikrobielle Aktivität gegen alle vier Testorganismen. Die Positivkontrollen (Chlorhexidin) wiesen hierbei deutliche Hemmhöfe auf.

### 3.6.3 Antimikrobielle Aktivität von FLG <sub>2849-2900</sub>

In der Radialdiffusionstestung bei neutralem pH-Wert war bei keinem der vier getesteten Keime eine antimikrobielle Aktivität von FLG <sub>2849-2900</sub> nachweisbar. Lediglich die Positivkontrollen mit humanem Lysozym ( $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) erzeugten sichtbare Hemmhöfe.

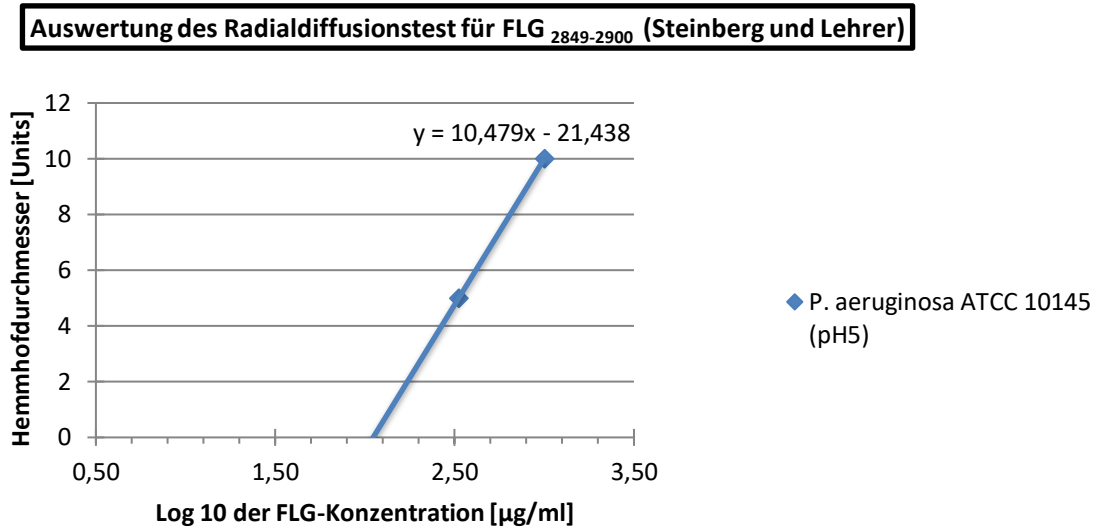
Die Auswertung des Plattendiffusionstests im sauren Milieu (pH 5) zeigte eine antimikrobielle Aktivität von FLG <sub>2849-2900</sub> gegenüber *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 an (siehe Tabelle 3.2). Die Testung von FLG <sub>2849-2900</sub> gegen *Escherichia coli* ATCC 11775 erbrachte einen 4,5 mm durchmessenden getrübbten Hemmhof in der Ausgangskonzentration von  $1000 \text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ . Zwei deutlich abgrenzbare Hemmhöfe konnten in der Testung mit *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 für FLG <sub>2849-2900</sub> mit 1 mm bei Ausgangskonzentration und 0,5 mm in der 1:3 Verdünnung gemessen werden. Aus diesen Daten ließ sich eine Gerade (siehe Abbildung 3.19) für die Wirksamkeit von FLG <sub>2849-2900</sub> erstellen und die MEK in mol/l bei Kenntnis der Proteinkonzentration am x-

Achsenschnittpunkt und der Molekularmasse von FLG<sub>2849-2900</sub> (5609,7 g/mol) berechnen. Mit einer MEK von 19,8 µM wies FLG<sub>2849-2900</sub> bei pH 5 nur eine geringe antimikrobielle Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 auf. Die Daten zur antimikrobiellen Wirksamkeit der Filaggrin-Peptide sind in Tabelle 3.4 veranschaulicht. Gegen *Candida albicans* ATCC 24433 und *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 war FLG<sub>2849-2900</sub> bei pH 5 in keiner Verdünnungsstufe antimikrobiell aktiv. Die Umgebung der Stanzlöcher im *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Nährboden wies wiederum eine Trübung auf, welches in Abbildung 3.20 exemplarisch dargestellt ist.

**Tabelle 3.2: Ergebnisse des Radialdiffusionstests von FLG<sub>2849-2900</sub> bei pH 5**

Keim	<i>S. aureus</i> ATCC 6539		<i>E. coli</i> ATCC 11775		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145		<i>C. albicans</i> ATCC 24433	
	H in mm	B	H in mm	B	H in mm	B	H in mm	B
Unverdünnt (1000 µg/ml)	0	W	4,5	H	1,0	HHHH	0	
1:3 (333 µg/ml)	0	W	0		0,5	HHHH	0	
1:10 (100 µg/ml)	0	W	0		0		0	
1:30 (33 µg/ml)	0	W	0		0		0	
Positivkontrolle (30 ng/µl)	12,2		10,0		3,0		6,8	

H: Hemmhof, Durchmesserangaben in mm; B: Bewertung bei abgrenzbaren Hemmhöfen. H: deutliches Wachstum im abgegrenzten Hemmhof; HHHH: kein Wachstum im abgegrenzten Hemmhof; Positivkontrolle: Chlorhexidin. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 3.19: Auswertung des Radialdiffusionstest für FLG<sub>2849-2900</sub> (Steinberg und Lehrer)**

Das Diagramm zeigt die Hemmhofdurchmesser [Units] aufgetragen gegen die logarithmische Konzentration der FLG<sub>2849-2900</sub>-Probe [µg/ml]. Die Symbole auf der Regressionsgerade markieren die erhobenen Datenpunkte. Mithilfe des Schnittpunktes mit der Horizontalachse ließ sich die „Minimale effektive Konzentration“ (MEK) von FLG<sub>2849-2900</sub> für den Testorganismus *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 bei einem pH-Wert von 5 berechnen.



**Abbildung 3.20: Trübungsphänomen von *S. aureus* ATCC 6538 im Hof des FLG<sub>2849-2900</sub>**

Dargestellt ist eine Petrischale mit Agarose-Nährboden und dem enthaltenen Testorganismus *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Mit schwarzen Linien sind Felder abgetrennt, innerhalb derer sich 3 mm durchmessenden Stanzlöcher und die darin enthaltenen Testlösungen befinden. Links zeigt sich um die unverdünnte FLG<sub>2849-2900</sub>-Probe (**1**) eine Trübungszone im Nährboden. Im rechten Feld bei einer 1:10 Verdünnung von FLG<sub>2849-2900</sub> (**1:10**) ist diese Zone nur noch in schwacher Ausprägung zu sehen. Ähnliche Trübungsphänomene zeigten sich bei allen drei synthetisierten Proteinen im Versuch mit *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.



Im Plattendiffusionstest erwies FLG <sub>2849-2900</sub> auch bei ansteigenden NaCl-Konzentrationen (siehe 3.6.1.3) antimikrobielle Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (siehe Tabelle 3.3). Es ließ sich bei einer NaCl-Konzentration von 50 mM ein Hemmhofdurchmesser von 1 mm beziehungsweise bei 100 mM von 0,5 mm bestimmen. Gegen *Escherichia coli* ATCC 11775 wies FLG <sub>2849-2900</sub> keine antimikrobielle Aktivität auf.

**Tabelle 3.3: Ergebnisse des Radialdiffusionstests von FLG <sub>2849-2900</sub> bei zunehmenden NaCl-Konzentrationen**

Keim	<i>E. coli</i> ATCC 11775		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	
	H in mm	B	H in mm	B
NaCl-Konz in mM				
<b>FLG <sub>2849-2900</sub></b>				
0	-		-	
50	-		1,0	HH
100	-		0,5	HH
150	-		-	
400	-		-	
<b>Positivkontrolle (30 ng/μl)</b>				
0	10,5		3,0	
50	8,5		2,5	
100	8,5		2,5	
150	8,5		1,5	
400	7,5		-	

H: Hemmhof; B: Bewertung bei abgrenzbaren Hemmhöfen. HH: geringes diffuses Wachstum im abgegrenzten Hemmhof; Positivkontrolle: Chlorhexidin (c = 30 ng/μl). Getestet wurde jeweils die FLG <sub>2849-2900</sub>-Stammlösung (c = 1000 μg/ml).

### 3.6.4 Antimikrobielle Aktivität von FLG 36 AS

Das Protein FLG 36 AS wies unter allen durchgeführten Testbedingungen (pH 7,2-7,4; pH 5; unterschiedliche NaCl-Konzentrationen) keinerlei antimikrobielle Aktivität auf. In allen Testversuchen ließen sich für die Positivkontrollen Lysozym und Chlorhexidin deutliche Hemmhöfe im Nährboden abgrenzen.

### 3.6.5 Übersicht der antimikrobiellen Aktivitäten

Tabelle 3.4 zeigt die Übersicht der errechneten MEK der Filaggrin-Peptide FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> bei verschiedenen pH-Werten. Die beste antimikrobielle Aktivität zeigte hierbei FLG<sub>764-903</sub> gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 unter neutralen pH-Bedingungen mit einer MEK von 0,6 µM. Im Vergleich mit hochwirksamem Lysozym ist die antimikrobielle Wirksamkeit von FLG<sub>764-903</sub> jedoch als mittelmäßig einzustufen.

**Tabelle 3.4: Übersicht zur antimikrobiellen Wirksamkeit der Filaggrin-Peptide**

		<i>S. aureus</i> ATCC 6539	<i>E. coli</i> ATCC 11775	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>C. albicans</i> ATCC 24433
Protein	pH-Wert	Minimale effektive Konzentrationen in µM Protein			
FLG <sub>764-903</sub>	7,2-7,4	-	4,5	0,6	-
FLG <sub>764-903</sub>	5	-	1,1	-	1,1
FLG <sub>2849-2900</sub>	7,2-7,4	-	-	-	-
FLG <sub>2849-2900</sub>	5	-	*	19,8	-

\* Berechnung der MEK aufgrund eines singulären Hemmhofes nicht möglich  
- keine antimikrobielle Wirksamkeit

FLG <sub>764-903</sub>	Molekularmasse: 15285,7 g/mol
FLG <sub>2849-2900</sub>	Molekularmasse: 5609,7 g/mol

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Einleitung

Während der menschliche Körper aus ca.  $10^{13}$  Zellen besteht, beherbergt er etwa zehnfach so viele Bakterien (Davis, 1996). Neben bakterieller Besiedelung sind auch Viren, Pilze und Protozoen an der Zusammensetzung eines humanen Mikrobioms beteiligt. Dabei treten o.g. Vertreter sowohl als Kommensale, Symbiont als auch als Pathogen auf. Als Kontakt- und Barriereorgan schafft die menschliche Epidermis einen wirksamen Schutz vor Überbesiedelung und dem Eindringen pathogener Keime. Die Haut bildet nicht nur eine physikalische Barriere, die vor allem durch das äußere Stratum corneum gebildet wird, sondern ebenso eine chemische und immunologische Barriere mithilfe verschiedenster Mechanismen. Ein wichtiger Teil des angeborenen immunologischen Schutzes stellen AMPs dar. Sie stellen in den meisten Fällen kleinere kationische Peptide mit 3–5 kDa dar, welche sowohl in den Zellen des Immunsystems als auch in Keratinozyten exprimiert werden. Hierbei lässt sich in der Datenbank für AMPs (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) eine Übersicht dieser Peptide sehen (Wang et al., 2016), wobei seit dem Jahr 1988 ein kontinuierlicher Anstieg an neu entdeckten AMPs zu verzeichnen ist. Gut charakterisierte Peptide der Haut sind unter anderem hBD-1, hBD-2, hBD-3 und hBD-4, das Cathelicidin LL-37, die Ribonuklease RNase 7, verschiedene S100-Proteine wie Psoriasin (S100A7), Calprotectin (S100A8/A9), Lysozym und Antileukoprotease (Harder et al., 2007). In HPLC-Analysen von Proteinextrakten des *Stratum corneum* in gesunder Haut und anschließender mikrobiologischer Testung durch unsere Arbeitsgruppe, zeigten sich unter positiv getesteten HPLC-Fractionen neben den schon bekannten AMPs RNase 7, Psoriasin und Lysozym auch Fragmente des „S100 Fused Type“-Proteins Profilaggrin. „S100 Fused Type“-Proteine sind zunächst für ihre Funktion in der späten epidermalen Differenzierung bekannt, jedoch konnte für einige dieser Proteine oder ihre Teilstücke eine antimikrobielle Aktivität herausgestellt werden, wie beispielsweise Hornerin (Wu, 2005), Filaggrin 2/Ifapsoriasin (Hansmann, 2008) und auch Proteinregionen des Profilaggrin (Schulz, 2010, Karsch, 2011). In dieser Arbeit wurde eruiert, ob die Domänen FLG<sub>764-903</sub> (verbindet Repeat 1 und 2) und FLG<sub>2849-2900</sub> (in Repeat 8) ebenso eine antimikrobielle Aktivität aufweisen wie die von Schulz und Karsch untersuchte Spacer-Region (B-Domäne) von Profilaggrin, denn auch diese beiden Proteinfragmente waren

Bestandteil der antimikrobiell aktiven HPLC-Fractionen aus Proteinextrakten der Hornhaut. Zur Bewerkstelligung dieser Aufgabe wurden die FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> zunächst rekombinant exprimiert, aufgereinigt und anschließend auf mögliche antimikrobielle Eigenschaften getestet.

## 4.2 Expression der Filaggrin-Proteine

### 4.2.1 Bedeutung der Mutationen innerhalb der FLG-Genabschnitte

Im Rahmen der für die Herstellung des FLG<sub>2849-2900</sub> erfolgten DNA-Amplifikation kam es in den frühen Schritten der Arbeit zu einer Mutation des pE-SUMO3-FLG-8700-R Primers. Hier fand sich in drei von vier Sequenzierungsproben eine Mutation von Adenin zu Cytosin an zweiter Basenstelle, die in frühen Zyklen der PCR möglicherweise zu einer Primerbindung an anderer Stelle in der Filaggrin-Gensequenz geführt haben könnte. Hierfür spricht, dass sich in weiteren Analysen mittels des Internet-Tools „nucleotide blast“ ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)) eine 98% Übereinstimmung der analysierten Sequenz mit der FLG<sub>2339-2374</sub>-Gensequenz und der dazu identischen FLG<sub>3635-3670</sub>-Gensequenz zeigte. In lediglich zwei Basenpaaren entsprach die sequenzierte DNA nicht den genannten Filaggrin-Sequenzen. Das vollständig exprimierte 36 Aminosäuren zählende Protein stimmte bis auf einen Aminosäureaustausch an zweiter N-terminaler Stelle von Serin zu Glycin mit FLG<sub>2339-2374</sub> und FLG<sub>3635-3670</sub> überein. Ein möglicher Grund für die entstandene Mutation kann auf PCR-Ebene eine unsaubere Primer-Bindung an die c-DNA sein, wobei die Primer-Bindung erheblich durch die Annealing-Temperatur des Reaktionsansatzes beeinflusst wird. Hierbei müsste die oben beschriebene falsche Primerbindung schon auf Ebene der ersten PCR stattgefunden haben, da in einem Reaktionsansatz zu einer „Nested PCR“ bei korrekter Amplifikation nur DNA-Abschnitte vorhanden sein sollten, welche bereits in der vorangehenden PCR amplifiziert wurden. Beide o.g. Gen-Abschnitte wären bei präziser Primerbindung und ohne Mutation per se nicht im Reaktionsansatz der „Nested PCR“ vorhanden gewesen. Zur Amplifizierung der korrekten Gen-Abschnitte wurde nachfolgend die Annealing-Temperatur gesenkt und humane genomische DNA als Matrize verwendet. Hieraufhin wurde neben weiteren Gensequenzen aufgrund einer eher ungenaueren, aber quantitativ höheren Primerbindung auch der korrekte Gen-Abschnitt des FLG<sub>2849-2900</sub> amplifiziert. Die Amplifizierung des Filaggrin-Gens ist generell durch seine

hoch-repetitive Struktur erschwert ist und eine Sequenzierung zur Findung von pathologischen Sequenzvarianten ist ebenfalls herausfordernd (McLean, 2016). Arbeitsgruppen, welche sich mit der Gensequenz von Filaggrin auseinandersetzten, fanden 2006 heraus, dass die zwei Mutationen R501X und 2282del4 zu einer Entwicklung von Ichthyosis vulgaris prädisponieren und in geografischer Unterschiedlichkeit bis zu 4 % (R501X) und bis zu 1 % (2282del4) als heterozygote Mutation in der Bevölkerung vorkommen mit unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen (Smith et al., 2006). Eine Nullmutation in beiden Allelen führt wiederum zu einer konsekutiven autosomal semidominanten Ichthyosis vulgaris mit einer Prävalenz von etwa 1:300 in der Bevölkerung. Viele weitere Filaggrinmutationen wurden nachfolgend ausfindig gemacht (Sandilands et al., 2007b), wobei alle Mutationen Rastermutationen oder „Nonsense“-Mutationen darstellten, die dazu führten, dass kein Filaggrin in der Epidermis exprimiert wurde. Pathophysiologisch fehlt hierbei der natürliche Feuchtigkeitsfaktor („Natural moisturizing factor“) der Haut, welcher durch die Degradation der Filaggrin-Repeats in einzelne hygroskopische Aminosäuren und ihre Derivate entsteht, was in einer trockenen und schuppigen Haut resultiert. Weiterhin konnte das Vorhandensein von Filaggrinmutationen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer atopischen Dermatitis (Palmer et al., 2006), Asthma oder einer Erdnussallergie in Verbindung gebracht werden (Irvine et al., 2011). Filaggrin zählt nicht zu den hochkonservierten Proteinen, wodurch beispielweise in der Bevölkerung eine unterschiedliche Anzahl an zehn, elf oder zwölf Filaggrin-Repeats vorkommt. Eine Studie aus Irland zeigte ein häufiges Vorhandensein von elf Repeats (51,5%), wohingegen zehn Repeats (33,9%) und zwölf Repeats (14,6%) weniger häufig vorkommen (Brown et al., 2012). Weiterhin zeigte sie einen dosisabhängigen Effekt; Probanden mit niedriger Repeat-Variante zeigten ein höheres Risiko für die Entwicklung einer atopischen Dermatitis. Das humane Filaggrin besteht demnach aus einer heterogenen Population aus Peptiden verschiedener Größe, Ladung und Aminosäuresequenzen, wobei hier den Forschungen der Arbeitsgruppe um Gan eine besondere Bedeutung zukommt (Gan et al., 1990). Hier wurde eine hohe Heterogenität der Basenabfolge innerhalb der Filaggrin-Repeat kodierenden Regionen festgestellt, welche ebenso eine Variabilität in bis zu 39 % der Aminosäuren zwischen den verschiedenen Filaggrin-Repeats nach sich zog. Eine relativ geringe Anzahl der genomischen Basen des Filaggrin-Gens ist konserviert (Sandilands et al., 2007b), eine größere Anzahl ist variabel und von möglichen Einzelnukleotid-Polymorphismen betroffen. Einzelnukleotid-Polymorphismen stellen 90 %

aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar und treten unregelmäßig stark an bestimmten Gen-Regionen auf. Hierbei bestehen die meisten Einzelnukleotid-Polymorphismen aus einem Austausch von Cytosin zu Thymin. In allen Fällen ändert das Auftreten eines Einzelnukleotid-Polymorphismus zwar die Nukleotidsequenz, jedoch durch die Degeneration des genetischen Codes nur selten die Aminosäuresequenz des synthetisierten Proteins. In diesem Fall liegt eine stumme Mutation vor. Innerhalb der DNA-Sequenzanalysen dieser Arbeit fand sich ein Austausch von Adenin zu Guanin innerhalb der Primersequenz, welcher als Einzelnukleotid-Polymorphismus eine Änderung der Aminosäuresequenz von Serin zu Glycin bewirkte. Hochwahrscheinlich kommen solche Einzelnukleotid-Polymorphismen oft innerhalb der kodierenden Sequenzen des Filaggrin-Gens vor, was auch die hohe Aminosäurevariabilität zwischen den einzelnen Filaggrin-Repeats erklärt (Gan et al., 1990). Möglicherweise stellt sich hier ein Ausdruck genomischer Diversität dar, bei welcher nur die wenigsten Mutationen einen Funktionsverlust des Filaggrins nach sich ziehen und im Falle der meisten Basenpaar-Austausche Filaggrin weiterhin in seiner Herstellung und Funktionsweise wenig beeinträchtigt ist.

#### 4.2.2 Bedeutung des gespaltenen FLG-Fragments

Für die Synthese der beiden Filaggrinpeptide wurden ihre amplifizierten Gen-Abschnitte jeweils in den pE-SUMO3-Vektor ligiert und diese folgend in prokaryotische BL 21 (DE3) pLysS *E. coli* transformiert. Vorteilhaft bei einer rekombinanten Herstellung innerhalb von BL 21 (DE3) pLysS *E. coli* ist vor allem das relativ kostengünstige Verfahren, eine einfache Kultivierung dieser Zellstämme und die schnelle Zellverdopplungszeit von etwa 20 Minuten. Der pE-SUMO3-Vektor wurde aus mehreren Gründen verwendet (siehe 2.12.1). Zum einen beinhaltet dieser Vektor ein Kanamycinresistenzgen, welche die erfolgreich transformierten Bakterien in einem Kanamycin-versetzten Nährmedium wachsen ließ. Zum anderen wurde das gewünschte Protein als pE-SUMO3-FLG-Fusionsprotein hergestellt, welches relativ einfach aufzureinigen ist, das Zielprotein vor einer vorschnellen Proteinhydrolyse schützt und andererseits bei vorhandener antimikrobieller Aktivität gegen *E. coli* im Fall von FLG<sub>764-903</sub> als inaktives Fusionsprotein die exprimierenden Zellen vor einem Zelltod schützen. Weiterhin ist als Vorteil dieser Technik eine präzise spätere Abspaltung des SUMO-Proteins durch spezifische Proteasen zu sehen, welche den SUMO-Teil an seiner Tertiärstruktur erkennt (Butt et al., 2005). Durch eine Induktion mit IPTG wurde die Expression

in BL 21 (DE3) pLysS *E. coli* forciert, anschließend folgten weitere Schritte um die exprimierten Fusionsproteine von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen. Einer Nickel-Affinitätschromatografie (siehe 2.13.2) und C8-Umkehrphasenchromatografie (siehe 2.13.3) folgte anschließend die massenspektrometrische Auswertung der Fusionsproteine. Hier fand sich für beide Proteine die zu erwartende Größe. Im Fall von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> zeigte sich die erwartete Größe von 26840,0 Da. Nach anschließender Umlagerung der Probe in PBS-Puffer, welches die nachfolgende hydrolytische Spaltung der SUMO Protease 2 ermöglichen sollte, und einer Probenlagerung von etwa einem Monat bei -20°C wurde zur Kontrolle nochmals eine C18-Umkehrphasenchromatografie mit dem SUMO-FLG<sub>764-903</sub> Protein durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein ähnliches interessantes Phänomen, wie es auch schon in der vorangegangenen Dissertation von S. Babian beschrieben wurde (Babian, 2010). Bei der in PBS gelagerten SUMO-FLG<sub>764-903</sub>-Probe fiel im Chromatogramm eine neu aufgetretene „Schulter“ im Peak des analysierten Fusionsproteins auf (siehe 3.3.2). In der anschließenden massenspektrometrischen Auswertung stellte sich hier eine Mischung aus zwei Proteinen mit Massen von 26685,9 Da und 26840,0 Da heraus. Das größere Protein entsprach der erwarteten SUMO-FLG<sub>764-903</sub> Protein, bei dem kleineren Protein handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine um die C-terminale Aminosäure Arginin verkürzte Version des SUMO-FLG<sub>764-903</sub>, was sich durch Nachforschungen in der Sequenzdatenbank ExpASY (Expert Protein Analysis System) erhärtete. Hier stimmte die erwartete Masse von SUMO-FLG<sub>764-902</sub> mit 26683,4 Da bis auf zwei Dalton Unterschied mit der Masse des kleineren Proteins überein. In der Dissertation von S. Babian entstand ebenfalls im hergestellten SUMO-Fusionsprotein des FLG<sub>3605-3879</sub>-Protein eine um zwei Arginine kürzere Proteinvariante, wobei es sich jeweils auch um das C-terminalen Peptidende handelte (Babian, 2010). Der Frage nach dem Entstehungsmechanismus dieser sehr ähnlichen Peptidverkürzungen mit Abspaltung von Argin-Aminosäuren am C-terminalen Ende wurde hier bereits nachgegangen und sei nachfolgend daher nur in Auszügen aufgeführt.

Wie schon in der Dissertation von S. Babian zu vermuten war, ist die Verkürzung der Peptide nicht auf eine Genmutation im Sinne von Punktmutationen und Entstehung eines Stoppkodon zurückzuführen, was sich durch DNA-Sequenzierungen bestätigen ließ. Des Weiteren ist auch die These, dass es sich bei den verkürzten Proteinen um bakterielle Verunreinigungen handeln könnte, nicht sehr wahrscheinlich, da sich in den ersten HPLC-Läufen nur eine einzelne und korrekte Proteingröße des Fusionsproteins zeigte. Wie auch durch S. Babian

bereits herausgestellt, ist die Verkürzung am ehesten durch Verunreinigungen mit proteolytischen Substanzen, Umlagerung der Proben in 1x PBS-Puffer oder spontan durch eine natürliche Sollbruchstelle und folgende Proteolyse am C-terminalen Proteinende entstanden. Eine Verkürzung des Proteins durch die Umkehrphasenchromatografie-Analysen scheint aufgrund des zeitlich eingrenzenden erstmaligen Auftretens des verkürzten Proteins weniger wahrscheinlich. Auch eine Verkürzung der Fusionsproteine durch eine unpräzise Proteinspaltung durch die SUMO Protease 2 ist aufgrund der zeitlich einzugrenzenden Entstehung ausgeschlossen.

Durch die Lagerung der Proben bei -20 °C sollte am ehesten eine proteolytische Aktivität durch Proteasen ausgeschlossen sein. Die meisten proteolytischen Enzyme haben ein Temperatur-Optimum von 30 °C bis 45 °C und arbeiten bei einer Temperatur von -20 °C nur mit minimaler bis keinerlei Aktivität. Um der Frage nachzugehen, welches Enzym möglicherweise eine Peptidbindung von Serin an vorletzter C-terminaler Stelle und Arginin an letzter C-terminaler Stelle bewerkstelligen kann, wurde auf die Enzym-Datenbank „MEROPS“ zurückgegriffen. Mittels des Tools „What peptidase can cleave this bond“ (<https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/specsearch.pl>) konnten hier 69 Peptidasen ausfindig gemacht werden, welche in der Lage wären eine Peptidbindung zwischen Serin und Arginin zu spalten. Zur weiteren Verhinderung von Proteasenaktivität innerhalb der Fusionsprotein-Proben hätten neben der Absenkung der Temperatur auch Protease-Inhibitoren zu den Proben mit dazugeben werden können.

Zu diskutieren ist auch eine elektrostatische Wechselwirkung der Proteinproben mit Bestandteilen des PBS-Puffers, welche eventuell eine Konformationsänderung im Protein entstehen ließ, durch welchen eine leichtere spontane Hydrolyse des C-terminalen Arginins möglich wurde. Um die These der Arginin-Abspaltung im Sinne einer spontanen Hydrolyse zu stützen, hätten nach entsprechender Wartezeit weitere Umkehrphasenchromatografie-Analysen und massenspektrometrische Auswertungen erfolgen können, bei welchen sich die Autolyse-Theorie erhärten würde, wenn hierbei weitere Filaggrin-Verkürzungen auszumachen wären. Diese Untersuchungen fanden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht statt.

Ein gut untersuchtes „S100 Fused Type“-Protein, welches ebenso einer Autolyse unterliegt, ist Hornerin (Wu et al., 2009b). Hornerin bringt durch eine Degradierung kleinere Peptiduntereinheiten antimikrobielle Eigenschaften zum Vorschein und lässt sich im Stratum granulosum und corneum gesunder Epidermis finden. Hornerin wird ähnlich wie Profilaggrin



in Keratohyalingranula als großes Vorläuferprotein gelagert und proteolytisch in einzelne repetitive Einheiten gespalten (Makino et al., 2001, Makino et al., 2003). Ebenso wie Hornerin wird Filaggrin innerhalb gesunder Epidermis in seine einzelnen Repeat-Untereinheiten gespalten, wobei Filaggrin Keratinfilamente zu straffen Bündeln verbindet und so einen entscheidenden Einfluss auf die terminale Keratinozytendifferenzierung hat (Steinert et al., 1981). In den obersten Schichten des gesunden Stratum corneum sind die Filaggrinmonomere jedoch nicht mehr nachzuweisen, da sich eine rapide Proteolyse in ihre einzelnen Aminosäuren durch verschiedene Proteasen und weitere noch nicht ausreichend erforschte Prozesse vollzieht (Scott und Harding, 1986). Enzyme, die an dieser schnellen Degradierung der Filaggrinmonomere beteiligt sind, sind Calpain 1, Caspase 14 (Denecker et al., 2008) und Bleomycin Hydrolase (Kamata et al., 2011). Die entstehenden hygroskopischen Aminosäuren und ihre Metabolite dienen als natürlicher Feuchtigkeitsspender innerhalb der Hornhaut und schützen sie vor Austrocknung (Harding et al., 2000). Interessanterweise ist der Vorgang der Degradierung der Filaggrinmonomere stark feuchtigkeitsabhängig. So konnte gezeigt werden, dass Filaggrin nur unter trockenen Bedingungen, wie sie an der Hautoberfläche existieren, in seine einzelnen Aminosäuren degradiert wird (Scott und Harding, 1986). In anderen Studien wurde in oberen Hautschichten der Mundschleimhaut und auch intrauterin im gesamten Stratum corneum noch Filaggrin nachgewiesen, insgesamt immer bei feuchten Bedingungen (De Benedetto et al., 2008). Dies gibt zu bedenken, ob sich eine natürliche Degradierung von Filaggrin in seine einzelnen Aminosäuren generell vor allem in trockenem Umgebungsmilieu abspielt. Ein Versuchsansatz dieser Arbeit wäre gewesen, die Fusionsproteine SUMO-FLG<sub>764-902</sub> und SUMO-FLG<sub>764-903</sub> zu lyophilisieren und anschließend nochmals massenspektrometrische Analysen nachzuschalten, um zu überprüfen, ob weitere Filaggrin-Spaltprodukte detektiert werden können und es sich generell um ein labiles Protein handelt. Um eine Auftrennung beider Fusionsproteingemische zu erreichen, wurde sich der isoelektrische Punkt der Proteine zunutze gemacht. Der isoelektrische Punkt ist der pH-Wert, bei welchem ein Protein in neutraler Nettoladung vorliegt. Mit dem Fehlen der basischen Aminosäure Arginin mit einem isoelektrischen Punkt von 11,15 betrug der pI-Wert von SUMO-FLG<sub>764-902</sub> 9,17 und von SUMO-FLG<sub>764-903</sub> 9,41. Innerhalb dieser Arbeit gelang das Trennen der Proteine mit der MINI S Anionenaustausch-Chromatografie nicht, welches am ehesten an den doch ähnlichen pI-Werten liegt. Auch eine Trennung mittels Größenaustauschchromatografie wäre nicht wegweisend gewesen, da sich hier erst Proteine

mit Größenunterschieden im kDa-Bereich trennen lassen. Im Folgenden wurde daher mit einer Proteinmischung weitergearbeitet, wobei beide Proteine auch nach Abspaltung der SUMO-Proteine als FLG<sub>764-902</sub> und FLG<sub>764-903</sub> vorlagen und hier keine weitere Proteolyse nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.9).

### 4.3 FLG<sub>764-903</sub> und FLG<sub>2849-2900</sub> zeigen antimikrobielle Aktivität

**Tabelle 4.1: Eigenschaften der synthetisierten Filaggrinpeptide**

Peptid	FLG <sub>764-903</sub>	FLG <sub>2849-2900</sub>
Lokalisation in Profilaggrin	in Repeat 1-2	in Repeat 8
Molekulargewicht in Da	15285,7	5609,7
Isoelektrischer Punkt	11,44	7,21
Anteil Histidin	16/140	6/52
Anteil Arginin	19/140	7/52
Anteil Lysin	1/140	0/52
Antimikrobielle Wirksamkeit bei pH 7,2-7,4 (mit minimaler effektiver Konzentration)	<i>E. coli</i> (4,5 µM) <i>P. aeruginosa</i> (0,6 µM)	Nein
Antimikrobielle Wirksamkeit bei pH 5 (mit minimaler effektiver Konzentration)	<i>E. coli</i> (1,1 µM) <i>C. albicans</i> (1,1 µM)	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> (19,8 µM)
Antimikrobielle Wirksamkeit unter steigender Salzkonzentration	Nein	Ja

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für beide Filaggrindomänen, sowohl FLG<sub>764-903</sub> als auch FLG<sub>2849-2900</sub>, *in vitro* antimikrobielle Wirksamkeit nachgewiesen werden. Für das kleinere Peptid FLG 36 AS stellte sich keinerlei antimikrobielle Aktivität heraus.

Aus den Resultaten dieser Arbeit lässt sich vermuten, dass diese beiden Peptide auch *in vivo* einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der kutanen bakteriellen Abwehr leisten. Antimikrobielle Peptide weisen eine große Heterogenität und Vielfalt auf, jedoch sind einige generell typische strukturelle Merkmale herausgestellt worden (Shagaghi et al., 2018). Aus diesem Grund lässt sich anhand der verschiedenen biochemischen Eigenschaften und Strukturen Rückschluss auf die Wahrscheinlichkeit antimikrobieller Potenz der getesteten Filaggrindomänen ziehen. Zum einen sind kationische AMPs gut untersucht, welche bei neutralen pH meist protoniert und

positiv geladen vorliegen (Hancock, 1997). Mit einem isoelektrischen Punkt von 11,4 gehört FLG <sub>764-903</sub> zu den kationischen AMPs. Für das kleinere Fragment FLG <sub>2849-2900</sub> gelten diese Eigenschaften mit einem pI-Wert von 7,21 nicht. Weiterhin wurden AMPs hinsichtlich ihrer Größe gruppiert, wobei bei den kationischen Peptiden eine meist vorliegende Größe zwischen elf und 50 Aminosäuren vorlag (Hancock, 1997). In diesem Fall liegt bei FLG <sub>764-903</sub> mit 140 Aminosäuren und einer Größe von 15286 Da ein relativ großes Protein vor, die beiden kleineren Proteine mit 36 und 52 Aminosäuren fallen in die oben genannte Größenspanne. Auch die Anzahl bestimmter Aminosäuren in der Primärstruktur der Peptide ist für ihre antimikrobielle Aktivität von Bedeutung. So wiesen sie einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren wie Arginin und/oder Lysin auf (Hancock und Diamond, 2000). Weiterhin überwog in Analysen über kationische AMPs Glycin am N-Terminus von Proteinen, mit einerseits vermutetem gutem Schutz einer  $\alpha$ -Helix-Sekundärstruktur und andererseits einer Abschirmung vor proteolytischen Aminopeptidasen (Tossi et al., 2000). Außerdem bestand ein nahezu ausgewogenes Verhältnis zwischen hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren, welches für die Ausbildung ihrer amphipathischen Struktur wichtig ist. In Untersuchungen von Rydengard wurde für Histidin-reiche Peptide eine außerordentliche antimikrobielle Potenz herausgestellt (Rydengard et al., 2007). Erstaunlicherweise zeigt das FLG 36 AS Peptid ohne antimikrobielle Aktivität einen Anteil hydrophober Aminosäuren von 36 % und enthält sieben der Aminosäuren Histidin, Lysin oder Arginin (19 %). Die beiden antimikrobiell wirksamen Peptide enthalten sowohl einen geringeren Anteil an hydrophoben Aminosäuren (FLG <sub>764-903</sub> 25% und FLG <sub>2849-2900</sub> 23%), weisen jedoch einen höheren Anteil oben genannter saurer Aminosäuren auf (FLG <sub>764-903</sub> 26% und FLG <sub>2849-2900</sub> 25%). Nur FLG <sub>764-903</sub> mit der besten Wirksamkeit enthält Glycin als N-terminale Aminosäure, die kleineren Proteine enthalten N-terminal Asparaginsäure.

Dass die Sekundärstruktur eines Peptides für die Funktion erheblich ist, zeigt eine Studie von Brouwer, in welcher  $\alpha$ -helikale synthetisierte Proteine die höhere dosisabhängige antimikrobielle Aktivität gegen *MRSA* entfalteten als Proteine, welche die Sekundärstruktur eines  $\beta$ -Faltblattes aufwiesen. Dieser Effekt wurde auch für weitere Keime wie *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* gezeigt (Brouwer et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass hier in der antimikrobiellen Testung das größere kationische Protein FLG 764-903 ein größeres Wirkspektrum und eine bessere Effektivität aufwies, als die kleineren Proteine FLG 2849-2900 mit einem geringeren pI-Wert, wodurch als Mechanismus auch hier die initiale elektrostatische Anziehungskraft zwischen positiv geladenen Proteinen und negativ geladenen Bakterienmembranen angenommen werden kann. Ebenso wurde bei vorliegenden Proteinen mit höherem Anteil an sauren Aminosäuren wie Histidin, Arginin und Lysin eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen (FLG 764-903 und FLG 2849-2900).

Um eine genauere Aussage über die antimikrobielle Wirksamkeit der Peptide unter physiologischen Hautbedingungen zu treffen, wurden die Plattendiffusionstests bei unterschiedlichen pH- und Salzbedingungen durchgeführt. Bei einem pH-Wert von 7,2 bis 7,4 erwies FLG 764-903 die beste antimikrobielle Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* mit einer minimalen effektiven Konzentration (MEK) von 0,6  $\mu\text{M}$  und eine mäßige Aktivität gegen *Escherichia coli* mit 4,5  $\mu\text{M}$ . Interessanterweise änderte sich unter sauren Bedingungen bei pH 5 die Wirksamkeit und auch das Wirkspektrum, hier war für FLG 764-903 gegenüber *Escherichia coli* nun eine verbesserte Wirksamkeit mit einer MEK von 1,1  $\mu\text{M}$  nachzuweisen. Unter sauren Bedingungen war keinerlei antimikrobielle Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* mehr nachzuweisen, jedoch zeigte sich eine gute Wirksamkeit mit einer MEK von ebenfalls 1,1  $\mu\text{M}$  gegenüber der Hefe *Candida albicans*. Unter zunehmender Salzkonzentration erwies FLG 764-903 keinerlei antimikrobielle Aktivität mehr. Diese Ergebnisse lassen schließen, dass es sich bei FLG 764-903 um ein im Vergleich zu Lysozym mittelgradig wirksames AMP handelt, welches durch pH-Einflüsse eine entscheidende Änderung innerhalb des Wirkspektrums zeigt, jedoch die Wirksamkeit unter zunehmender Salzkonzentration zum Erliegen kommt. Es lässt sich vermuten, dass dieses Peptid auch auf der Hautoberfläche antimikrobielle Wirksamkeit zeigen könnte, jedoch durch ansteigende NaCl-Konzentrationen in seiner Wirksamkeit zum Erliegen kommt. Dass antimikrobielles Wirken sehr von den Umgebungsbedingungen abhängt, studierte Kacprzyk anhand von histidinreichen synthetisierten Peptiden (Kacprzyk et al., 2007). Hier wurde zum einen (analog zum Wirkspektrum von FLG 764-903) die gute antimikrobielle Wirksamkeit und signifikant höhere Bindung von Histidin-reichen Proteinen bei saurem pH-Wert an *Escherichia coli* und *Candida albicans* beschrieben, welches im neutralen pH-Medium nicht der Fall war. Dies wird auf den

Effekt von Histidin zurückgeführt, denn im Vergleich zu Arginin- und Lysin-reichen Peptiden zeigte sich solch eine pH-abhängige antimikrobielle Wirksamkeit nicht. Ebenso wurde wenig bis gar keine antimikrobielle Aktivität der Histidin-reichen Peptide auf *Staphylococcus aureus* beschrieben (Kacprzyk et al., 2007). Ansteigende Salzkonzentrationen hoben die Wirksamkeit der Histidin-reichen Proteine auf, wie dies auch der Fall für FLG<sub>764-903</sub> ist. Möglicherweise ist die mikrobielle Aktivität von FLG<sub>764-903</sub> auf die Aufteilung und Anzahl der Histidin-Aminosäuren zurückzuführen. Hierfür würde sprechen, dass die Histidin-Seitenkette bei einem Test-pH-Wert von 5 mit hoher Wahrscheinlichkeit schon protoniert vorliegt (Isoelektrischer Punkt 7,6) und sich so eine bessere elektrostatische Anziehungskraft zwischen negativ geladenen Mikrogen-Oberflächen und positiv geladenen FLG<sub>764-903</sub> vollziehen kann.

Die antimikrobiellen Testungen ergaben für das kleinere Peptid FLG<sub>2849-2900</sub> mit einer MEK von 19,8  $\mu\text{M}$  nur eine minimale Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* bei einem pH-Wert von 5. Weiterhin erwies das Peptid in der unverdünnten Konzentration auch eine Aktivität gegenüber *Escherichia coli*, jedoch ließ sich hier aufgrund eines einzelnen Hemmhofes keine minimale effektive Konzentration bestimmen. Bei neutralem pH-Wert von 7,4 erwies FLG<sub>2849-2900</sub> keinerlei antimikrobielle Aktivität. Hier könnte ebenso ein pH-abhängiger Mechanismus wie der von Kacprzyk oben beschriebene - angenommen werden (Kacprzyk et al., 2007). Jedoch ist bei diesem Peptid bemerkenswert, dass auch eine Wirksamkeit des Peptids noch bei höheren Salzkonzentrationen nachzuweisen ist. Es ließen sich bei einer Nährbodenkonzentration von 50 mM NaCl ein Hemmhofdurchmesser von 1 mm und unter Konzentration von 100 mM NaCl ein Hemmhofdurchmesser von 0,5 mm bestimmen, welches zeigt, dass FLG<sub>2849-2900</sub> auch in der Haut und vor allem im salzhaltigen Schweiß noch Aktivität gegen den Problem- und Nass-Keim *Pseudomonas aeruginosa* erweisen könnte. Dies wäre vor allem interessant für eine therapeutische Nutzung für Patienten mit einer zystischen Fibrose, bei welchen ein Großteil der Respirationstrakt-Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* bedingt ist und die Spanne an herkömmlichen Antibiotika gering ist (Lipuma, 2010). Bei diesen Patienten weisen Haut und Schleimhäute einen höheren Salzgehalt aufgrund eines Chloridkanaldefektes auf, sodass salzempfindliche AMPs am ehesten in ihrer Aktivität gemindert sind und salzunempfindlicheren Peptiden eine größere Bedeutung zukommt.

Zusammenfassend zeigen die Testungen dieser Arbeit, dass sich die körpereigenen AMPs der Haut in einer Vielfältigkeit an Wirksamkeitsprofilen zu unterschiedlichen Umgebungsfaktoren

präsentieren, wobei eine physiologische Symbiose und eine ergänzende Wirksamkeit der verschiedenen Peptide angenommen werden kann.

Diskussionswürdig ist ebenfalls die mehrmals im Ergebnisteil beschriebene Trübung der Hemmhöfe in allen Testungen gegen *Staphylococcus aureus* (siehe Abbildung 3.20). Hier wurde für alle getesteten Peptide eine dosisabhängige Trübungszone um die Stanzlöcher mit den darin enthaltenen Proteinen festgestellt. Eine Ursachenforschung dieses Phänomens konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht stattfinden. Jedoch sollen im Folgenden Begründungsansätze und weitere Untersuchungsmöglichkeiten formuliert werden. Eine Begründung für das Trübungsphänomen könnte ein vermehrtes bakterielles Wachstum von *S. aureus* um das Stanzloch herum sein. Hierbei ist zu bedenken, dass das vermeintliche Wachstum dosisabhängig mit intensiverer Trübung bei höherer Proteindosis stattgefunden hat. Weiterhin zeigte sich die Trübung stärker in direkter Stanzlochumgebung und nahm in steigender Entfernung zum Stanzloch ab. Sollte die Trübung ein Zeichen vermehrten bakteriellen Wachstums sein, gäbe es zu bedenken, ob die Filaggrinpeptide eventuell sogar eine Nährstoffquelle für *S. aureus* darstellen und den Bakterien einen Anreiz zu vermehrtem Wachstum in Stanzlochnähe geben. Es wäre hier beispielsweise zu untersuchen, ob der Stamm *S. aureus* proteolytische Enzyme bilden und sezernieren kann, welche Filaggrinpeptide in ihre Aminosäuren spalten können. Hier könnte jedoch die Stanzloch-nahe Trübung auch ein Präzipitat der Proteinlösungen und ihrer Aminosäuren darstellen. Neben diesen naheliegenden Erklärungsversuchen könnte zur genaueren Analyse dieses Phänomens eine Elektronenmikroskopie mit einer Probe der Stanzlochumgebung Aufschluss darüber geben, welche Wechselwirkungen in der Trübungszone zwischen *S. aureus*, dem Nährboden und der Proteinlösung stattgefunden hat. Außerdem wäre eine zeitliche Erweiterung des Plattendiffusionstests hilfreich gewesen um eine mögliche Veränderung der Trübungszonen in Intensität und Ausdehnung feststellen zu können. Weiterhin könnten Testungen nicht nur mit Laborkeimen, sondern mit Umweltkeimen durchgeführt werden, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob nur bei dem verwendeten Laborstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 das Trübungsphänomen auftritt, oder ob dies eine generelle Fähigkeit aller *Staphylococcus aureus*-Stämme als möglicher Ausdruck einer Biofilmbildung ist.

#### 4.4 Antimikrobielle Wirkmechanismen

Für den großen Teil der kationischen Proteine wurde eine Wechselwirkung mit den negativ geladenen Lipidmembranen von Bakterien, Pilzen, Viren und Protozoen beschrieben (Kagan 1994; Maloy und Kari 1995). Die initiale elektrostatische Anziehungskraft ermöglicht eine Adhärenz der AMPs an den Membranen. Die bakterizide Wirkung allerdings wird erst durch die amphipatischen Eigenschaften der Proteine bewerkstelligt, durch welche eine porenartige Anordnung innerhalb der Membran möglich ist. Die schnelle bakterizide Wirkung beruht auf dem Verlust eines Ionen- und Energiegradienten innerhalb des Zielorganismus, welcher nicht zu kompensieren ist (Bernard 2011). Dieser Effekt kann auch für die antimikrobielle Aktivität des kationische FLG<sub>764-903</sub> verantwortlich sein. Hierfür spricht, dass die antimikrobielle Wirksamkeit beim Vorliegen eines sauren pH-Wertes und einem Protein mit mehr positiv geladenen Seitenketten noch zunimmt, wie es in dieser Arbeit für *Escherichia coli* der Fall war. Des Weiteren könnte dieser Mechanismus auch für die Aktivität von FLG<sub>2849-2900</sub> gegen *Pseudomonas aeruginosa* im sauren Milieu vorliegen, hierfür spricht der theoretische isoelektrische Punkt des Proteins, welches in einem sauren pH-Wert von 5 auch schon anteilig in kationischer Form vorliegen dürfte. Bei einem neutralen pH-Wert und am ehesten neutraler Nettoladung konnte FLG<sub>2849-2900</sub> keine antimikrobielle Wirksamkeit zeigen. Um den Effekt der synthetisierten Peptide auf bakterielle Membranen zu untersuchen, könnte man eine Transmissionselektronenmikroskopie oder eine Fluoreszenzmikroskopie mit fluoreszierenden markierten Peptiden nutzen. Hier könnte dargestellt werden, ob die Peptide die Membranintegrität zerstören oder gar die Zellen penetrieren, so wie auch durch Sochacki et al. der lytische Effekt von Rhodamin-markiertem Cathelicidin LL-37 auf Membranen von *Escherichia coli* nachgewiesen wurden (Sochacki et al., 2011). Vorteil bei dieser Methode wäre auch eine zeitliche und konzentrationsabhängige Darstellung der antimikrobiellen Effekte.

Grundsätzlich lassen sich die direkten antimikrobiellen Wirkmechanismen in membrangebundene und nicht membrangebundene Vorgänge unterteilen. Neben dem oben beschriebenen membrangebundenen antimikrobiellen Wirkeffekt sind für einige Peptide nicht membrangebundene Mechanismen beschrieben, bei welchen vor allem intrazelluläre Vorgänge moduliert werden. In der Einleitung wurde schon der Effekt des AMP Psoriasin beschrieben, bei welchem *Escherichia coli* als Folge von oxidativem Stress geschädigt wird, indem die Zink-bindende Domäne des Psoriasins Zink-Ionen bindet, welche daraufhin der

Kupfer/Zink-Superoxiddismutase nicht mehr zur Verfügung stehen (Gläser et al., 2005). Ein weiterer intrazellulärer Wirkort wurde für das Prolin-reiche Peptidderivat des Oncocin (Onc112) beschrieben. Onc112 vermag die bakterielle Proteinbiosynthese zu inhibieren, indem es an drei funktionellen Stellen der ribosomalen 50S-Untereinheit interagiert; zum einen blockiert es an zwei Stellen das Peptidyltransferase-Zentrum und zum anderen den Proteinausgangstunnel des Ribosoms. Dem Effekt der dreifachen Bindung wird ebenso ein Vorteil als Schutz vor Resistenzentwicklungen zugeschrieben, da eine der drei Bindungsstellen einen hochkonservierten Bereich der 50S-Untereinheit darstellt und hier die Resistenzentwicklung durch Bakterien durch Mutationen als gering einzuschätzen ist (Lomakin et al., 2015, Roy et al., 2015, Seefeldt et al., 2015). Ein weiterer intrazellulärer antimikrobieller Wirkmechanismus wird für Indolicidin (IR13), ein Mitglied der Cathelicidine, beschrieben. IR13 stabilisiert doppelsträngige DNA und verhindert so die DNA-Replikation und Transkription (Hsu et al., 2005, Ghosh et al., 2014).

Noch eher unbekannt sind die Mechanismen, durch welche AMPs auf Pilze wie die Hefe *Candida albicans* wirken. Hier ist ebenfalls für das oben beschriebene Indolicidin aus der Gruppe der Cathelicidine eine Membranpermeabilisation und nachfolgende Schädigung als Wirkmechanismus vorgeschlagen worden (Benincasa et al., 2006). In einer weiteren Studie von den Hertog et al. wurde der Mechanismus des humanen Cathelicidin LL-37 und Histatin 5 auf *Candida albicans* herausgestellt. Hier zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie und der Immunogold-Transmissionselektronenmikroskopie eine Assoziation von LL-37 mit der Zellwand und Zellmembran. Hieraufhin ließ sich eine sofortige Freisetzung von lebenswichtigen Zellkomponenten nachweisen, welches den nachfolgenden Zelltod nach sich zog (den Hertog et al., 2005). In selbiger Studie wurde ebensolche *Candida*-tödliche Wirkung auch für das histidinreiche Protein Histatin 5 festgestellt, jedoch erfolgte hier nur minimale Bindung des Proteins an die Zellwand und Zellmembranen, sondern eine Anreicherung im Zytoplasma von *Candida albicans*. Die Aufnahme in die metabolisch aktiven Zellen erfolgt hier mittels zwei Polyamin-Transportern Dur3 und Dur31 (Kumar et al., 2011). Intrazellulär wirkt Histatin 5 durch die Aufhebung der Membranintegrität von aktiven Mitochondrien toxisch (Helmerhorst et al., 1999). Auch für FLG<sub>764-903</sub> sind als Wirkmechanismen gegenüber *Candida albicans* ähnliche oben beschriebene membrangebundene und nicht



membrangebundene Vorgänge wie für Cathelicidin LL-37 und Histatin 5 vorstellbar. Diese Mechanismen könnten Gegenstand weiterer Analysen sein.

Neben den direkten zellgebundenen Mechanismen sind der Vollständigkeit halber auch die indirekten Effekte zu erwähnen, welche AMPs im Sinne von Immunmodulatoren haben können und Gegenstand weitreichender aktueller Forschungen sind. Beispielsweise können sie als potente Immunregulatoren agieren, indem sie die Gen-Expression ändern, als Chemokine fungieren oder die Chemokin-Produktion induzieren, proinflammatorische Zytokinproduktion inhibieren oder die Immunantwort von Zellen des erworbenen Immunsystems modulieren (Lai und Gallo, 2009).

#### 4.5 Antimikrobielle Peptide als Therapeutika und Ausblick

Seit Antibiotika vor etwa 50 Jahren weitreichend verfügbar wurden, bekamen sie immensen Einfluss in der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen weltweit. Jedoch hat sich als eine zunehmende Belastung des Gesundheitssystems in den letzten Jahren die immense Resistenzentwicklung von pathogenen Keimen gegen herkömmliche antimikrobielle Substanzen gezeigt. Ein Grund für diese hohe Rate und Zunahme der Infektionen durch multiresistente Keime ist die massive Nutzung von Breitspektrum-Antibiotika, wobei die genaue Korrelation weiterhin unklar ist (Cruz 2014). Aus diesem Grund sind natürliche AMPs und ihre synthetisierten Analoga vielversprechende Kandidaten für eine therapeutische Nutzung gegen Erkrankungen durch Bakterien und Pilze geworden. Als Vorteile der AMPs sind zu sehen, dass sie meist eine Breitspektrum-Aktivität aufweisen, ihre rasche Wirksamkeit und ihre geringe Tendenz zur Resistenzentwicklung. Hierbei wurden wenige Raten an Resistenzentwicklung nur bei riesiger Anzahl von Passagen bei Verwendung subinhibitorischer Konzentrationen der AMPs festgestellt (Marr et al., 2006). Jedoch sind die Hürden der Entwicklung therapeutisch zu nutzenden Peptiden noch sehr groß, was die relativ kleine klinische gegenwärtige Nutzung von AMPs erklärt. Zum einen muss zur Zulassung dieser Peptide eine gute Aktivität gegenüber herkömmlichen Antibiotika bei guter Verträglichkeit gezeigt werden (Fjell et al., 2011). Dies erfordert Struktur-/Funktionsanalysen und die weitere Untersuchung geeigneter Applikationsarten und -orte. Bei der Applikation ist zu berücksichtigen, dass viele AMPs mit steigender Kationizität zwar ein breiteres Spektrum an antimikrobieller Wirksamkeit zeigen, jedoch dies mit einem Anstieg der Toxizität und

hämolytischen Eigenschaften einhergeht. Dies wurde ebenso in einer Studie von Conlon über das Peptid Kassinatuerin-1 postuliert (Conlon et al., 2005). Von Bedeutung sind die hämolytischen Eigenschaften bei der Applikationsart, denn die hämolytischen Peptide kämen nur für eine topische Hautanwendung und nicht für eine systemische Applikation in Frage. Dies gilt es auch für eine mögliche therapeutische Anwendung des kationischen FLG 764-903 zu bedenken. Weiterhin sind Proteine anfällig für eine proteolytische Degradierung, welche schon in den vorhergehenden Abschnitten als Entstehungsmechanismus der verkürzten FLG 764-902-Variante diskutiert wurde. Um die Stabilität von AMPs zu erhöhen und ihre Halbwertszeit zu verlängern, sind als geläufige Methoden der Ersatz von herkömmlichen L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren oder unnatürliche Aminosäuren, eine Amidierung des N-Terminus oder eine Zyklisierung von Proteinen bekannt (Mirski et al., 2017). Von der Arbeitsgruppe um Hancock wurde ebenso eine Applikation als proteasen-resistente Prodrugs oder eine Integration der AMPs in Liposomen zur Verbesserung der Stabilität als aussichtsreich erachtet (Hancock und Sahl, 2006). Hier gibt es jedoch weitestgehend einen Mangel an Studien, welche die Auswirkungen der oben genannten Modifikationen auf die Halbwertszeit, antimikrobielle Aktivität und Toxizität der Peptide haben. Hier sei stellvertretend eine aktuelle Untersuchung von der Arbeitsgruppe um Yang mit Studien über  $\beta$ -Defensin-verwandte Vogelpeptide erwähnt. Getestet wurden diese Peptide in Bezug auf ihre antimikrobielle Aktivität, ihre hämolytischen und zelltoxischen Eigenschaften und ihre Protease-Resistenz. Auch eine Beeinflussung der Wirksamkeit von der Salzkonzentration, wie sie auch im Rahmen dieser Dissertation stattfand, wurde berücksichtigt (Yang et al., 2018).

Ein weiteres Hindernis für die therapeutische Nutzung der AMPs stellen die hohen Kosten der Peptide dar, welche sich auf 100 bis 600 Dollar pro Gramm belaufen (Hancock und Sahl, 2006). Um hier eine Kostenreduktion und Ökonomisierung der Herstellung zu erzielen, beschäftigt sich eine aktuelle Studie mit der Optimierung der Aufreinigungsschritte von rekombinant hergestelltem Pexiganan (Sun et al., 2018). Pexiganan ist ein Derivat des Magainin 2 und zeigte bei Patienten mit diabetischem Fuß-Syndrom in leichten Wunden eine gleichwertige Wirksamkeit bei topischer Creme-Anwendung wie das oral applizierte Fluorchinolon Ofloxacin (Lipsky et al., 2008, Fjell et al., 2011), jedoch erhielt es bisher keine Zulassung von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA). Ebenso aussichtsreich für die therapeutische Nutzung erschien Omiganan, ein Abkömmling des kationischen Indolicidins, in

der klinischen Phase-III Studie als topisches Antiseptikum zur Vermeidung von Katheter-assoziierten Infektionen und in einer klinischen Phase II-Studie zur Behandlung von Akne und Rosazea (Fjell et al., 2011). Jedoch ist auch Omiganan bis zum jetzigen Zeitpunkt kein zugelassenes Medikament. Einige weitere AMPs befinden sich in Phase I/II Studien. Aus diesem Grund besteht Hoffnung in Zukunft auch AMPs in der klinischen Infektionsabwehr nutzen zu können.

Eine weitere aussichtsreiche zukünftige Anwendung von AMPs stellt auch die Kombination mit herkömmlichen Antibiotika dar, wobei beide Substanzen synergistisch wirken könnten und sogar in Kombination Resistenzbarrieren durchbrechen und bereits resistenten Antibiotika wieder eine Wirksamkeit verschaffen könnten (Marr et al., 2006). Vielversprechende Studien erfolgten hier durch Mitsugui und Nuding (Mitsugui et al., 2011, Nuding et al., 2014). Zum einen konnte *in vitro* eine Senkung der Resistenzraten einiger *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme bei einer Kombination von herkömmlichen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit Polypeptid-Antibiotika (Polimyxin-B und -E) gezeigt werden, wodurch sich die minimale Hemmkonzentration senken ließ und sogar als resistent eingestufte Keime wieder empfindlich reagierten (Mitsugui et al., 2011). Zum anderen konnte ein synergistischer Effekt der AMPs LL-37 und hBD3 in Kombination mit den herkömmlichen Antibiotika Meronem, Tigecyclin, Moxifloxacin und Piperazillin/Tazobactam bei der Abtötung von *Clostridium difficile*-Stämmen festgestellt werden (Nuding et al., 2014). Diese Ergebnisse lassen auf die zukünftige Anwendung von AMPs - selbst in der Behandlung von Erkrankungen mit Antibiotika-resistenten Bakterien - hoffen. Jedoch ist bis zur Möglichkeit des klinischen Einsatzes von diesen Peptiden noch die außerordentlich große Aufgabe vielschichtiger Struktur-, Funktions- und Pharmakokinetik-Analysen zu bewältigen, welcher in dieser Arbeit zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von FLG 764-903 und FLG 2849-2900 nur begrenzt nachgegangen werden konnte.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In Zeiten zunehmender Infektionen durch multiresistente pathogene Keime wird zunehmend der Ruf nach einem verantwortungsvolleren Gebrauch von herkömmlichen Antibiotika laut. Ebenso lässt sich trotz hohen Forschungsaufwands ein Rückgang von neuen Antibiotikazulassungen verzeichnen. Auf der Suche nach wirksamen Alternativen gerieten die phylogenetisch alten antimikrobiellen Peptide in einen neuen Fokus. Antimikrobielle Peptide werden als Bestandteil des angeborenen Immunsystems auch von humanen Keratinozyten exprimiert. Als antimikrobiell aktiv haben sich auch einzelne Differenzierungsproteine der Haut, die zu den „S100 Fused Type“-Proteinen gehören, erwiesen. So wurden unter diesen in unserer Arbeitsgruppe bereits Hornerin, Ifapsoriasin und auch Teile des Profilaggrin als antimikrobielle Peptide entdeckt. Profilaggrin ist ein Vorläuferprotein der epidermalen Differenzierung, welches in den obersten Hautschichten in einzelne Filaggrin-Fragmente prozessiert wird, welche Keratinfilamente zu Bündeln vernetzen. Anschließend werden Filaggrin-Fragmente durch proteolytische Prozesse in einzelne Aminosäuren und ihre Derivate gespalten, welche als natürliche Feuchtigkeitsspender einer Austrocknung der Hautoberfläche entgegenwirken. In dieser Arbeit wurden FLG<sub>764-903</sub> (Repeat 1 bis 2) und FLG<sub>2849-2900</sub> (Repeat 8) als zwei weitere Filaggrin-Fragmente hinsichtlich antimikrobieller Eigenschaften untersucht. Hierzu wurden beide Proteine rekombinant hergestellt, aufgereinigt und im radialen Plattendiffusionstest gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* sowie der Hefe *Candida albicans* getestet. FLG<sub>764-903</sub> erwies bei neutralem pH-Wert eine gute antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, unter sauren pH-Bedingungen veränderte sich das Wirkspektrum mit ebenso guter Wirksamkeit gegenüber *Escherichia coli* und *Candida albicans*. FLG<sub>2849-2900</sub> zeigte bei neutralem pH-Wert keine antimikrobielle Aktivität, war jedoch bei sauren pH-Bedingungen moderat wirksam gegenüber *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass es sich bei diesen beiden Filaggrin-Fragmenten um vielseitige antimikrobiell aktive Peptide handelt, welche möglicherweise auch *in vivo* einen Beitrag zur natürlichen Immunbarriere der Haut leisten. Neben den bereits angestellten Struktur- und Funktionsanalysen dieser Arbeit müssen sich weitere Studien anschließen um einen möglichen zukünftigen therapeutischen Einsatz von Filaggrin in der Medizin zu prüfen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Allaker RP, 2008. Host defence peptides-a bridge between the innate and adaptive immune responses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 102: 3.
2. Alonso L, Fuchs E, 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100 Suppl 1: 11830.
3. Babian S, 2010. Untersuchungen zur Rolle des Profilaggrin-Proteins Flg3605-3879 in der antimikrobiellen Hautabwehr. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
4. Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, et al., 1993. Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res*; 53: 3052.
5. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, et al., 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*; 30: 257.
6. Benincasa M, Scocchi M, Pacor S, et al., 2006. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J Antimicrob Chemother*; 58: 950.
7. Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, et al., 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol*; 108: 1353.
8. Brouwer CP, Bogaards SJ, Wulferink M, et al., 2006. Synthetic peptides derived from human antimicrobial peptide ubiquicidin accumulate at sites of infections and eradicate (multi-drug resistant) *Staphylococcus aureus* in mice. *Peptides*; 27: 2585.
9. Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, et al., 2011. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*; 127: 661.
10. Brown SJ, Kroboth K, Sandilands A, et al., 2012. Intragenic copy number variation within filaggrin contributes to the risk of atopic dermatitis with a dose-dependent effect. *J Invest Dermatol*; 132: 98.
11. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, et al., 2005. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif*; 43: 1.
12. Candi E, Schmidt R, Melino G, 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6: 328.
13. Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, et al., 2001. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol*; 116: 434.
14. Conlon JM, Abraham B, Galadari S, et al., 2005. Antimicrobial and cytolytic properties of the frog skin peptide, kassinatuerin-1 and its L- and D-lysine-substituted derivatives. *Peptides*; 26: 2104.
15. Contzler R, Favre B, Huber M, et al., 2005. Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol*; 124: 990.
16. Dale BA, Presland RB, Lewis SP, et al., 1997. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J Invest Dermatol*; 108: 179.
17. Davis CP, 1996. In: *Medical Biology*. 4th edition. Galveston (TX)

18. De Benedetto A, Qualia CM, Baroody FM, et al., 2008. Filaggrin expression in oral, nasal, and esophageal mucosa. *J Invest Dermatol*; 128: 1594.
19. den Hertog AL, van Marle J, van Veen HA, et al., 2005. Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *Biochem J*; 388: 689.
20. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, et al., 2008. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*; 180: 451.
21. Drake DR, Brogden KA, Dawson DV, et al., 2008. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res*; 49: 4.
22. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, et al., 2013. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta*; 1833: 3471.
23. Elias PM, 2005. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol*; 125: 183.
24. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, et al., 2011. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*; 11: 37.
25. Fleming A, Allison VD, 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions.
26. Fuchs E, Green H, 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*; 19: 1033.
27. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, et al., 1990. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*; 29: 9432.
28. Ghosh A, Kar RK, Jana J, et al., 2014. Indolicidin targets duplex DNA: structural and mechanistic insight through a combination of spectroscopy and microscopy. *ChemMedChem*; 9: 2052.
29. Gläser R, Harder J, Lange H, et al., 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol*; 6: 57.
30. Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, et al., 2006. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*; 441: 315.
31. Hancock RE, 1997. Peptide antibiotics. *Lancet*; 349: 418.
32. Hancock RE, Diamond G, 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*; 8: 402.
33. Hancock RE, Sahl HG, 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*; 24: 1551.
34. Hansmann B, 2008. Proteinexpressionsanalysen und Funktionsuntersuchungen von Ifapsoriasin in der menschlichen Haut. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
35. Harder J, Bartels J, Christophers E, et al., 2001. Isolation and characterization of human beta - defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*; 276: 5707.
36. Harder J, Gläser R, Schröder JM, 2007. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J Endotoxin Res*; 13: 317.

37. Harder J, Schröder JM, 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*; 277: 46779.
38. Harding CR, Aho S, Bosko CA, 2013. Filaggrin - revisited. *Int J Cosmet Sci*; 35: 412.
39. Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, et al., 2000. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci*; 22: 21.
40. Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van't Hof W, et al., 1999. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem*; 274: 7286.
41. Henry J, Toulza E, Hsu CY, et al., 2012. Update on the epidermal differentiation complex. *Front Biosci (Landmark Ed)*; 17: 1517.
42. Houben E, De Paepe K, Rogiers V, 2007. A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol Physiol*; 20: 122.
43. Hsu CH, Chen C, Jou ML, et al., 2005. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Res*; 33: 4053.
44. Huber M, Siegenthaler G, Mirancea N, et al., 2005. Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *J Invest Dermatol*; 124: 998.
45. Irvine AD, McLean WH, Leung DY, 2011. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med*; 365: 1315.
46. Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Presland RB, et al., 1998. Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest*; 78: 1245.
47. Jarnik M, Simon MN, Steven AC, 1998. Cornified cell envelope assembly: a model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. *J Cell Sci*; 111 ( Pt 8): 1051.
48. Junge A, 2011. Untersuchungen zur Rolle von Ifapsoriasisin-/Filaggrin-2-Peptiden in der antimikrobiellen Hautabwehr. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
49. Kacprzyk L, Rydengard V, Morgelin M, et al., 2007. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochim Biophys Acta*; 1768: 2667.
50. Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, et al., 1990. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87: 210.
51. Kamata Y, Yamamoto M, Kawakami F, et al., 2011. Bleomycin hydrolase is regulated biphasically in a differentiation- and cytokine-dependent manner: relevance to atopic dermatitis. *J Biol Chem*; 286: 8204.
52. Karsch D, 2011. Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG 91-122 und FLG 87-197 in der kutanen Abwehr. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
53. Kinoshita K, Jr., Ashikawa I, Saita N, et al., 1988. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope. *Biophys J*; 53: 1015.

54. Kumar R, Chadha S, Saraswat D, et al., 2011. Histatin 5 uptake by *Candida albicans* utilizes polyamine transporters Dur3 and Dur31 proteins. *J Biol Chem*; 286: 43748.
55. Kyriou M, Huber M, Hohl D, 2012. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Exp Dermatol*; 21: 643.
56. Lai Y, Gallo RL, 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*; 30: 131.
57. Lambers H, Piessens S, Bloem A, et al., 2006. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*; 28: 359.
58. Lee SC, Kim IG, Marekov LN, et al., 1993. The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J Biol Chem*; 268: 12164.
59. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, et al., 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest*; 84: 553.
60. Lippens S, Denecker G, Ovaere P, et al., 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ*; 12 Suppl 2: 1497.
61. Lipsky BA, Holroyd KJ, Zasloff M, 2008. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin Infect Dis*; 47: 1537.
62. Lipuma JJ, 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*; 23: 299.
63. Lomakin IB, Gagnon MG, Steitz TA, 2015. Antimicrobial peptides targeting bacterial ribosome. *Oncotarget*; 6: 18744.
64. Lüllmann-Rauch R, 2006. In: Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage, Thieme. Stuttgart
65. Madison KC, 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol*; 121: 231.
66. Makino T, Takaishi M, Morohashi M, et al., 2001. Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J Biol Chem*; 276: 47445.
67. Makino T, Takaishi M, Toyoda M, et al., 2003. Expression of hornerin in stratified squamous epithelium in the mouse: a comparative analysis with profilaggrin. *J Histochem Cytochem*; 51: 485.
68. Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, et al., 1993. Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Mol Cell Biol*; 13: 613.
69. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE, 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol*; 6: 468.
70. McKinley-Grant LJ, Idler WW, Bernstein IA, et al., 1989. Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 86: 4848.
71. McLean WH, 2016. Filaggrin failure - from ichthyosis vulgaris to atopic eczema and beyond. *Br J Dermatol*; 175 Suppl 2: 4.



72. Mirski T, Niemcewicz M, Bartoszcze M, et al., 2017. Utilisation of peptides against microbial infections - a review. *Ann Agric Environ Med*; 25: 205.
73. Mischke D, Korge BP, Marenholz I, et al., 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*; 106: 989.
74. Mitsugui CS, Tognim MC, Cardoso CL, et al., 2011. In vitro activity of polymyxins in combination with beta-lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*; 38: 447.
75. Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 51 Pt 1: 263.
76. Nakatsuji T, Gallo RL, 2012. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol*; 132: 887.
77. Nemes Z, Steinert PM, 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med*; 31: 5.
78. Nirunsuksiri W, Presland RB, Brumbaugh SG, et al., 1995. Decreased profilaggrin expression in ichthyosis vulgaris is a result of selectively impaired posttranscriptional control. *J Biol Chem*; 270: 871.
79. Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, et al., 1997. Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol*; 15: 772.
80. Nuding S, Frasch T, Schaller M, et al., 2014. Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*; 58: 5719.
81. Oppenheim JJ, Yang D, 2005. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*; 17: 359.
82. Oyston PC, Fox MA, Richards SJ, et al., 2009. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J Med Microbiol*; 58: 977.
83. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al., 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*; 38: 441.
84. Presland RB, Bassuk JA, Kimball JR, et al., 1995. Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J Invest Dermatol*; 104: 218.
85. Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, et al., 1992. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem*; 267: 23772.
86. Richmond JM, Harris JE, 2014. Immunology and Skin in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 4.
87. Roy RN, Lomakin IB, Gagnon MG, et al., 2015. The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin. *Nat Struct Mol Biol*; 22: 466.
88. Rydengard V, Olsson AK, Morgelin M, et al., 2007. Histidine-rich glycoprotein exerts antibacterial activity. *FEBS J*; 274: 377.

89. Sandilands A, Smith FJ, Irvine AD, et al., 2007a. Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*; 127: 1282.
90. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, et al., 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*; 122: 1285.
91. Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, et al., 2007b. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet*; 39: 650.
92. Sass V, Schneider T, Wilmes M, et al., 2010. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect Immun*; 78: 2793.
93. Schröder JM, Harder J, 1999. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol*; 31: 645.
94. Schröder JM, Harder J, 2006. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci*; 63: 469.
95. Schulz C, 2010. Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG 87-122 und FLG 123-200 in der kutanen Abwehr. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
96. Scott IR, Harding CR, 1986. Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Dev Biol*; 115: 84.
97. Seefeldt AC, Nguyen F, Antunes S, et al., 2015. The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex. *Nat Struct Mol Biol*; 22: 470.
98. Segre JA, 2006. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest*; 116: 1150.
99. Shagghi N, Palombo EA, Clayton AHA, et al., 2018. Antimicrobial peptides: biochemical determinants of activity and biophysical techniques of elucidating their functionality. *World J Microbiol Biotechnol*; 34: 62.
100. Simanski M, Dressel S, Glaser R, et al., 2010. RNase 7 protects healthy skin from *Staphylococcus aureus* colonization. *J Invest Dermatol*; 130: 2836.
101. Simpson CL, Patel DM, Green KJ, 2011. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 12: 565.
102. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al., 2006. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*; 38: 337.
103. Sochacki KA, Barns KJ, Bucki R, et al., 2011. Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108: E77.
104. Steinberg DA, Lehrer RI, 1997. Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. *Methods Mol Biol*; 78: 169.
105. Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, et al., 1981. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 78: 4097.
106. Steven AC, Bisher ME, Roop DR, et al., 1990. Biosynthetic pathways of filaggrin and lorixin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J Struct Biol*; 104: 150.

107. Sun B, Wibowo D, Middelberg APJ, et al., 2018. Cost-effective downstream processing of recombinantly produced pexiganan peptide and its antimicrobial activity. *AMB Express*; 8: 6.
108. Takaishi M, Makino T, Morohashi M, et al., 2005. Identification of human hornerin and its expression in regenerating and psoriatic skin. *J Biol Chem*; 280: 4696.
109. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A, 2000. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*; 55: 4.
110. Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, et al., 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*; 13: 737.
111. Wang G, Li X, Wang Z, 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*; 44: D1087.
112. Weerheim A, Ponc M, 2001. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res*; 293: 191.
113. Wiedow O, Harder J, Bartels J, et al., 1998. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 248: 904.
114. Wu Z, 2005. Analysis of Two Human Gene Clusters Involved in Innate Immunity. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
115. Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, et al., 2009a. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PLoS One*; 4: e5227.
116. Wu Z, Latendorf T, Meyer-Hoffert U, et al., 2011. Identification of trichohyalin-like 1, an s100 fused-type protein selectively expressed in hair follicles. *J Invest Dermatol*; 131: 1761.
117. Wu Z, Meyer-Hoffert U, Reithmayer K, et al., 2009b. Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin. *J Invest Dermatol*; 129: 1446.
118. Yang M, Zhang C, Zhang MZ, et al., 2018. Beta-defensin derived cationic antimicrobial peptides with potent killing activity against gram negative and gram positive bacteria. *BMC Microbiol*; 18: 54.

## 7 ANHANG

### 7.1 Peptidfragmente

#### 7.1.1 FLG<sub>764-903</sub>

Nukleotidsequenz (bp 2290-2709):

```
ACCATCAGCAGAGCCACCAAGAGTCCGCACGTGACCGGTCAGGGGAAAGGTCTCGACGTTTCAGGGTCTTTCCT
CTACCAGGTGAGCACTCATAAACAGTCTGAGTCCTCCCATGGATGGACAGGGCCAGCACTGGAGTAAGACA
AGGATCCCACCATGAGCAGGCACGAGACAACCTCCAGGCACTCAGCATCCCAAGATGGTCAGGACACCATTCGT
GGACACCCGGGGTCAAGCAGAAGAGGAAGGCAGGGGTCCACCACGAGCAATCGGTAGATAGGTCTGGACA
CTCAGGGTCCCATCACAGCCACACCACATCCCAGGGAAGGTCTGATGCCTCCCGTGGGCAGTCAGGATCCAGA
AGTGCAAGCAGAACAA
```

Proteinsequenz (Aminosäuren 764-903):

```
GHGQAGHHQQSHQESARDRSGERSRRSGSFLYQVSTHKQSESSHGWTGPSTGVRQGSHEQARDNSRHSASQD
GQDTIRGHPGSSRRGRQGSHEQSVDRSGHSGSHSHTTSQGRSDASRGQSGRSASRTRRNEEQSR
```

Molekulargewicht [Da]: 15285,7  
theoretischer pI-Wert: 11,44  
Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]: 6990

#### 7.1.2 FLG<sub>2849-2900</sub>

Nukleotidsequenz (bp 8545-8700):

```
GGGTCGCGTCACCATGAAGCTTCCACTCATGCCGACATCTCTAGACACTCACAGGCAGTCCAGGGACAATCAG
AGGGGTCCAGGAGAAGCAGGCGCCAGGGATCCAGTGTGAGCCAG
```

Proteinsequenz (Aminosäuren 2849-2900):

```
DGSRHSGSRHHEASTHADISRHSQAVQGQSEGSRRSRRQSSVSQDSDSEGH
```

Molekulargewicht [Da]: 5609,7  
theoretischer pI-Wert: 7,21  
Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]: -

### 7.1.3 FLG 36 AS

Nukleotidsequenz (98%ig identisch zur FLG<sub>2339-2374</sub>- und FLG<sub>3635-3670</sub>- Gensequenz):

GACGGCTCCAGGCACTCAGGCATTGGGCACGGACAAGCTTCATCTGCAGTCAGAGACAGTGGACACCGAGGG  
TCCAGTGGTAGTCAGGCCAGTGACAGTGAGGGACAT

Proteinsequenz (36 Aminosäuren):

DGSRHSGIGHGQASSAVRDSGHRGSSGSQASDSEGH

Molekulargewicht [Da]: 3518,5

theoretischer pI-Wert: 6,43

Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]: -

## 8 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Schröder für die freundliche Überlassung des aufschlussreichen und spannenden Themas und die Betreuung der Arbeit während der ersten Jahre. Weiterhin danke ich Professor Schwarz für die weiterführende und stets zuverlässige nachfolgende Betreuung meiner Dissertation.

Besonders hervorzuheben ist die unermüdliche und aufschlussreiche Hilfe von Dr. Britta Hansmann. Vielen Dank, liebe Britta, für deine außerordentlich gute und aufopferungsvolle Betreuung dieser Doktorarbeit.

Mein Dank gilt weiterhin an Ulrich Gerstel, Ties Latendorf, Jan Fischer und Joachim Bartels, welche zu jeder Zeit mit Rat, Denkanstößen und neuen Ideen zur Seite standen. Danke an alle fleißigen MTAs der Arbeitsgruppe, hier vor allem Jutta, Claudia, Anke und Silvia Voss für die Hilfe bei der HPLC-Analytik und den antimikrobiellen Testungen.

Weiterhin danke ich meinen Mitstreiterinnen und Kommilitoninnen Kristin Garske und Katharina Teders. Durch euch hat die manchmal langatmige Arbeit an dieser Dissertation immer wieder an Motivation gewonnen. Es war ein gutes Gefühl mit euch „im selben Boot“ zu sitzen.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Dominik und meiner Familie. Durch vielerlei Zuspruch und Nachdruck haben sie alle entscheidend zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen, und dies vielmehr, als sie es selbst wahrscheinlich ahnen. Vielen Dank für eure Unterstützung!

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher an keiner anderen Stelle ein medizinisches oder zahnmedizinisches Promotionsverfahren beantragt oder mich einem solchen erfolglos unterzogen habe. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen als Hilfen verwendet habe.

### Bisherige Veröffentlichung:

Schmidt, A., Hansmann, B., Bartels, J., Schröder, J. (2012). Profilaggrin peptide fragments as contributors to the antimicrobial barrier of the skin [Abstract]. 39th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Marburg. P032.