

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

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT  
C-TERMINALER PEPTIDE DES MURINEN  
IFAPSORIASINS/FILAGGRIN-2**

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

vorgelegt von  
Katharina Metzner, geb. Teders  
aus Walsrode  
Kiel 2019

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Schwarz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Scheffold
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion:	Prof. Dr. Johann Roider
Tag der mündlichen Prüfung:	07.08.2020
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 28.02.2020

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Haut	1
1.1.1 Aufbau und Differenzierung der Haut	1
1.1.2 Der „Epidermale Differenzierungskomplex“	3
1.1.3 Die „S100 fused-type“-Proteinfamilie	4
1.1.4 Ifapsoriasis / Filaggrin-2	6
1.2 Abwehrstrategien der Haut	8
1.2.1 Antimikrobielle Peptide	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Geräte	12
2.3 Oligonukleotide (Primer)	13
2.4 Vektoren	14
2.5 Mikroorganismen	15
2.6 Molekularbiologische Methoden	15
2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion	15
2.6.1.1 Primerdesign für die PCR	16
2.6.1.2 PCR	17
2.6.1.3 Kolonie-PCR	18
2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	19
2.6.3 Gelextraktion und DNA-Aufreinigung	20
2.6.4 Ligation	20
2.6.5 Transformation mittels Elektroporation	21
2.6.6 Plasmidisolierung	23
2.6.7 Restriktionshydrolyse	23

2.6.8	DNA-Sequenzierung	24
2.7	Rekombinante Expression der Fusionsgene in <i>Escherichia coli</i>	24
2.8	Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine	25
2.8.1	Lyse der Bakterien	25
2.8.2	Nickel-Affinitätschromatographie	26
2.8.3	Entsalzung über Gelfiltrations-Chromatographie	26
2.8.4	Spaltung der Fusionsproteine mit Bromcyan	27
2.8.5	C18-Umkehrphasen-HPLC	27
2.9	Proteinanalytik	28
2.9.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	28
2.9.2	Massenspektrometrie	29
2.10	Antimikrobielle Testung	29
2.10.1	Radialer Plattendiffusionstest	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Amplifizierung der Gensequenzen von mFLG-2 <sub>2060-2117</sub> und mFLG-2 <sub>2080-2117</sub>	31
3.2	Klonierung im pJET1.2-System	32
3.3	Klonierung im pE-SUMO3-System	35
3.3.1	Transformation in <i>E. coli</i> XL1blue-Zellen	35
3.3.2	DNA-Sequenzierung	36
3.3.3	Transformation in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS-Zellen	37
3.4	Herstellung und Aufreinigung der Fusionsproteine	37
3.5	Spaltung und Aufreinigung der rekombinanten Proteine	39
3.6	Ergebnisse der antimikrobiellen Testung	41
4	Diskussion	43
4.1	Problematik bei der Herstellung und Aufreinigung der murinen C-terminalen Filaggrin-2-Fragmente	44
4.2	Antimikrobielle Aktivität von murinem Filaggrin-2	46
4.3	Antimikrobieller Wirkmechanismus des C-Terminus von Filaggrin-2	50
4.4	Rolle von antimikrobiellen Peptiden und Filaggrin-2 in Hauterkrankungen	52
4.5	Antimikrobielle Peptide als Therapeutika	54

5	Zusammenfassung	58
6	Anhang	59
6.1	Symbole	59
6.1.1	Symbole für den Nukleinsäurecode:	59
6.1.2	Symbole des Einbuchstabencodes für kanonische Aminosäuren:	59
6.2	Vektorkarten	59
6.2.1	pJET1.2/blunt-Vektor	59
6.2.2	pE-SUMO3-Vektor	60
6.3	Proteinsequenzen und -daten	60
6.3.1	Daten für mFLG-2 <sub>2060-2117</sub>	60
6.3.2	Daten für mFLG-2 <sub>2080-2117</sub>	61
7	Literaturverzeichnis	62
8	Danksagung	72
9	Erklärung	73

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Haut	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Gen-, mRNA- und Proteinstruktur der SFTP-Familie	5
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des humanen <i>Filaggrin-2</i> -Gens und Filaggrin-2-Proteins	6
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der genomischen, mRNA- und Proteinstruktur des murinen Filaggrin-2	8
Abb. 2.1: Primerdesign am Beispiel des Vorwärtsprimers mFLG-2-2060-f	16
Abb. 2.2: Primerdesign am Beispiel des Rückwärtsprimers mFLG-2-2117-r	17
Abb. 3.1: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel mit PCR-Produkten unter UV-Licht	32
Abb. 3.2: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel mit Kolonie-PCR-Produkten unter UV-Licht	33
Abb. 3.3: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel der Restriktionshydrolyse-Produkte	34
Abb. 3.4: DNA-Sequenzvergleich für mFLG-2 <sub>2060-2117</sub> und mFLG-2 <sub>2080-2117</sub>	36
Abb. 3.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen für mFLG-2 <sub>2060-2117</sub> und mFLG-2 <sub>2080-2117</sub>	36
Abb. 3.6: Chromatogramm der Nickelsäulen-Affinitätschromatographie des Fusionsproteins pE-SUMO3-mFLG-2 <sub>2080-2117</sub>	38
Abb. 3.7: Massenspektren der Fusionsproteine	39
Abb. 3.8: HPLC-Chromatogramm der Bromcyanspaltung des Proteins mFLG-2 <sub>2060-2117</sub>	40
Abb. 3.9: HPLC-Chromatogramm der Bromcyanspaltung des Proteins mFLG-2 <sub>2080-2117</sub>	40
Abb. 3.10: Massenspektrometrisches Ergebnis der rekombinanten murinen Filaggrin-2-Abschnitte	41
Abb. 4.1: a) Vergleich von C-terminalen Sequenzabschnitten in putativen Orthologen von Filaggrin-2, b) Vergleich der murinen C-terminalen Filaggrin-2-Sequenzen	48
Abb. 4.2: Sequenzvergleich von Microcin J25 und einem C-terminalen Abschnitt von Filaggrin-2	50
Abb. 6.1: Schematische Darstellung des pJET1.2/blunt-Klonierungsvektors	59
Abb. 6.2: Schematische Darstellung des pE-SUMO3-Expressionsvektors	60

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Antibiotikakombinationen aufgrund der Resistenzen der <i>E. coli</i> -Stämme und der Vektoren	22
Tab. 2.2: Zeitliche Gradientenänderung der Lösungen A und B bei konstanter Flussgeschwindigkeit	28
Tab. 3.1: Ergebnisse des radialen Plattendiffusionstest	41

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AD	Atopische Dermatitis
AMP	antimikrobielles Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	„RNA complementary DNA“ (komplementäre DNA)
°C	Grad Celsius
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CE	„Cornified Envelope“
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDC	„epidermal differentiation complex“
EFAD	„essential fatty acid deficiency“
FDA	„Food and Drug Administration“
FPLC	„fast protein liquid chromatography“
FA	„formic acid“ (Ameisensäure)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
HPLC	„High performance liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
hBD	humanes Beta-Defensin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
LB-Medium	„lysogenic broth“-Medium
M	molar
MDR	„Multiple Drug Resistance“
MEK	minimale effektive Konzentration
mFLG-2	murines Filaggrin-2
mM	Millimolar
mRNA	„messenger“ RNA

## Verzeichnis

MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
NGAL	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600nm
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	potentia hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
RP	„Reversed Phase“
rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFTP	„S100-fused-type“-Protein
SOC	„Super Optimal Broth“
SPRR	„small proline-rich regions“-Proteine
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TFA	„trifluoroacetic acid“ (Trifluoressigsäure)
TSB	„Tryptic Soy Broth“ (tryptische Soja-Bouillon)
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Haut

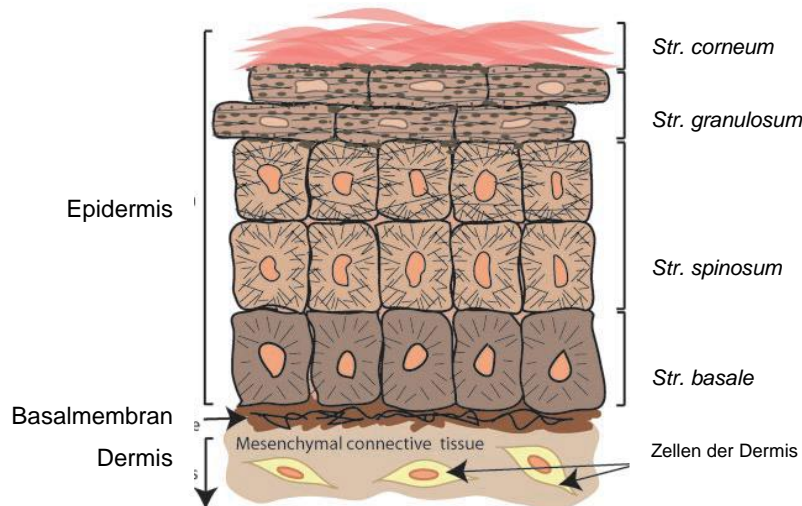
Die Haut ist ein lebenswichtiges Organ, das flächen- und gewichtsmäßig mit zu den größten Organen zählt. Beim Menschen bedeckt die Haut ca. 1-2 m<sup>2</sup> (Alonso und Fuchs, 2003).

Die Funktionen der Haut sind vielfältig. Sie stellt einen Schutz gegenüber Umwelteinflüssen dar und verhindert das Eindringen schädigender Substanzen und gleichzeitig den übermäßigen Wasserverlust des Körpers. Zudem beinhaltet sie kleine Sinnesorgane, wie Mechano- und Nozizeptoren, die die Wahrnehmung von Reizen aus der Umwelt ermöglichen. An der Thermoregulation ist die Haut maßgeblich beteiligt, da durch die spezielle Gefäßarchitektur eine Wärmeabstrahlung erfolgen kann und durch die Verdunstung des Schweißes aus Schweißdrüsen ebenfalls Wärme abgegeben wird (Lüllmann-Rauch, 2006).

### 1.1.1 Aufbau und Differenzierung der Haut

Die Haut, auch Kutis, des Menschen unterteilt sich in zwei Schichten. Der zur Außenwelt gewandte Teil wird als Epidermis bezeichnet und stellt ein verhornendes mehrschichtiges Plattenepithel dar. Der darunter liegende bindegewebige Teil ist die Dermis, die Blutgefäße beinhaltet und für die mechanische Widerstandsfähigkeit verantwortlich ist. Beide Schichten sind durch eine dermo-epidermale Verbindungszone eng miteinander verzahnt (Lüllmann-Rauch, 2006).

Die Epidermis besteht zum größten Teil aus Keratinozyten, die zusammen ein Netzwerk bilden, das in unterschiedliche Schichten unterteilt wird (Simpson et al., 2011). Zusätzlich gibt es jedoch noch weitere Zellen wie die Langerhans-Zellen, die eine wichtige Überwachungsfunktion des Immunsystems übernehmen (Clausen und Kel, 2010), Merkel-Zellen, die im Rahmen der Oberflächensensibilität eine Rolle spielen und Melanozyten, die das Pigment bilden (Lüllmann-Rauch, 2006). Die Epidermis der Felderhaut, die den Körper größtenteils bedeckt, ist in die vier Schichten *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* unterteilt (siehe Abb. 1.1). Die Leistenhaut an Handflächen und Fußsohlen besitzt ein zusätzliches eosinophiles *Stratum lucidum* zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*.



### Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Haut

Dargestellt sind die Dermis und die Epidermis, die durch die Basalmembran miteinander verbunden sind. Die Keratinozyten der Epidermis sind schematisch in ihren vier Schichten gezeigt: Das *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (aus Alonso und Fuchs, 2003).

Das *Stratum basale* wird aus einer Schicht hochprismatischer Zellen gebildet, die der Basallamina anhaften (Lüllmann-Rauch, 2006). Hier finden sich epidermale Stammzellen, die aus dem Haarwulst am Haarfollikel stammen (Alonso und Fuchs, 2003). Diese Stammzellen teilen sich periodisch und bilden verschiedene Tochterzellen, die entweder im *Stratum basale* verbleiben und weiter proliferieren, oder die den Kontakt zur Basallamina und damit die Fähigkeit zur Proliferation verlieren, in die terminale Differenzierung eintreten und somit in die nächste Schicht, das *Stratum spinosum*, gelangen (Houben et al., 2007). Diese Schicht besteht aus zwei bis fünf Lagen polygonaler Zellen (Lüllmann-Rauch, 2006). Die Zellen sind wie schon in der vorherigen Schicht untereinander durch Desmosomen verbunden (Alonso und Fuchs, 2003). Im Rahmen der terminalen Differenzierung exprimieren die Zellen spezifische Gene wie insbesondere die des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ (siehe 1.1.2). Des Weiteren wird die Expression der Gene der basalen Hauptstrukturproteine Keratin 5, 14 und 15 herunterreguliert und dafür die Expression der Gene von Keratin 1 und 10 hochreguliert, was zu einer Veränderung des Aufbaus der Keratin-Intermediärfilamente führt (Fuchs und Green, 1980; Houben et al., 2007). Die Keratin-Intermediärfilamente verbinden die Desmosomen an der Zelloberfläche mit der Zellkernhülle und formen zusammen mit den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten das Zytoskelett (Candi et al., 2005). Im darauffolgenden *Stratum granulosum* synthetisieren die Zellen lichtmikroskopisch sichtbare Keratohyalin granula, die vorwiegend die Proteine Loricrin und Profilaggrin enthalten. Profilaggrin wird durch Dephosphorylierung und Proteolyse in Filaggrin-Monomere gespalten. Diese Filaggrin-Monomere vernetzen und bündeln die Keratin-Intermediärfilamente am Übergang vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum*

miteinander (Houben et al., 2007). Dies führt dazu, dass die Zellform sich verändert und die Zelle die charakteristische flache Form der Zellen im *Stratum corneum*, hier dann auch Korneozyten genannt, annimmt (Candi et al., 2005). Die Keratin-Intermediärfilamente und Filaggrin, die 80-90% der Proteinmasse der Epidermis von Säugetieren ausmachen, bilden das Gerüst für eine Hornhülle, „Cornified Envelope“ genannt, die sich von innen an die Plasmamembran anlegt und diese im Verlauf ersetzt. Weitere Strukturproteine wie Loricrin, Involucrin und „small proline-rich regions“-Proteine (SPRR) werden im *Stratum granulosum* synthetisiert und über verschiedene Transglutinasen untereinander sowie mit dem Gerüst vernetzt zur Verstärkung des sich ausbildenden „Cornified Envelope“. Ebenso werden Lipide gebildet, kovalent an die Proteine des „Cornified Envelope“ gebunden und bilden so die äußere Lipidhülle (Candi et al., 2005). Gleichzeitig zerfällt der Zellkern und die Zellorganellen verschwinden, wobei die hierfür verantwortlichen Mechanismen nicht vollständig verstanden sind. Das Zellvolumen nimmt durch Wasserverlust ab und präformierte Lipidlamellen aus intrazellulären Lamellenkörpern werden an der apikalen Seite der Zellen des *Stratum granulosum* in den Interzellularraum freigesetzt (Eckhart et al., 2013). Die Lipidhülle des „Cornified Envelope“ kann zur Außenseite hin mit ihren Sphingosinketten mit den freien interzellulären Lipidlamellen interagieren und diese organisieren. Nach innen bleibt sie durch lange Fettsäureketten mittels Esterbindungen mit den Proteinen des „Cornified Envelope“ kovalent verbunden (Candi et al., 2005). So bildet sich insgesamt im *Stratum corneum* eine Barriere, die dem Modell einer Wand aus mit Mörtel verbundenen Ziegelsteinen gleicht (Nemes und Steinert, 1999). Die Desmosomen, die die Zellen bis zum *Stratum granulosum* untereinander verbinden, verändern sich in der Struktur und werden zu Korneodesmosomen. Deren intrazellulärer Plaque-Anteil wird im „Cornified Envelope“ verankert und es bildet sich ein homologer Plaque-Anteil in der extrazellulären Hülle. Diese Korneodesmosomen sind wichtig für die Adhäsion zwischen den Korneozyten im *Stratum corneum* (Serre et al., 1991; Candi et al., 2005). Die Proteolyse der Proteine, aus denen die Korneodesmosomen aufgebaut sind, führt schließlich zur Desquamation der obersten Lage der Korneozyten (Candi et al., 2005).

Die Zeitspanne, in der eine Zelle in der Epidermis die gesamte Differenzierung durchläuft, beträgt beim Menschen ca. einen Monat (Houben et al., 2007). Bei der Haut der Maus benötigt der Differenzierungsprozess nur ca. 10 bis 14 Tage (Potten, 1975; Alonso und Fuchs, 2003).

### 1.1.2 Der „Epidermale Differenzierungskomplex“

Viele Gene für Proteine, die in der terminalen Differenzierung der epithelialen Zellen eine wichtige Rolle spielen, sind in einer Region auf dem humanen Chromosom 1q21 lokalisiert.

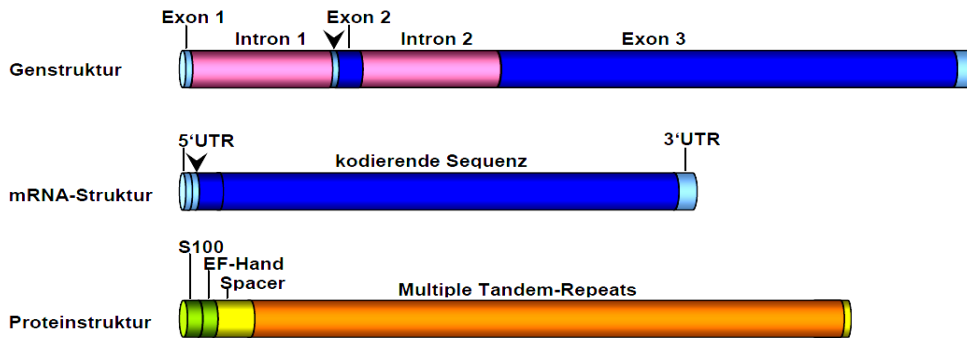
Diese Region wird als „Epidermaler Differenzierungskomplex“ (EDC) bezeichnet und enthält Genfamilien, die evolutionär, strukturell und funktionell eng miteinander verwandt sind (Mischke et al., 1996; Marenholz et al., 1996). Der EDC ist etwa 1,62 Megabasen groß und umfasst ca. 50 Gene (Toulza et al., 2007). Im EDC sind vier Genfamilien enthalten, die die folgenden Proteinfamilien kodieren: Die „Cornified Envelope Precursor“-Proteine, die S100-Proteine, die „Late cornified envelope“-Proteine und die „S100 fused-type“-Proteine (SFTP) (Kyriiotou et al., 2012; Henry et al., 2012). Die „Cornified Envelope Precursor“-Proteinfamilie beinhaltet die Proteine Loricrin, Involucrin und die „small proline-rich regions“-Proteine (SPRR). Die S100-Proteinfamilie besteht aus Calcium-bindenden Proteinen, die EF-Hand-Domänen beinhalten (Eckert et al., 2004; Kyriiotou et al., 2012). Man nimmt an, dass die „S100 fused-type“-Proteinfamilie durch die Fusion der beiden erstgenannten Familien entstanden ist. Sie besteht aus Filaggrin, Filaggrin-2, Trichohyalin, Trichohyalin-like 1, Cornulin, Hornerin und Repetin. Diese Proteine bestehen aus zwei aminoterminalen EF-Hand-Motiven, einer zentralen „Repeat“-Region und einer C-terminalen Domäne, die spezifisch für jedes einzelne Protein ist. Die Gene dieser Proteinfamilie bestehen aus drei Exons, wovon Exon 2 und Exon 3 das jeweilige gesamte Protein kodieren (Kyriiotou et al., 2012). Die „Late cornified envelope“-Proteinfamilie ist den SPRR in Aufbau und Funktion sehr ähnlich und wird in drei Subgruppen unterteilt (Jackson et al., 2005). Syntenische Bereiche des EDC gibt es auch bei anderen Spezies der Säugetiere. Insbesondere bei der Maus wurde die Region des EDC auf dem Chromosom 3F2.1 identifiziert (Moseley und Seldin, 1989).

### **1.1.3 Die „S100 fused-type“-Proteinfamilie**

Die Gene, die die „S100 fused-type“-Proteinfamilie kodieren, sind in einer ca. 330 kb umfassenden Region gruppiert (Henry et al., 2012). Auf genomischer, mRNA- und Proteinebene zeigen die Mitglieder dieser Familie eine stark konservierte Struktur (siehe Abb. 1.2).

Die Intron-Exon-Organisation dieser Gene ist hochkonserviert. Sie besteht aus einem ersten Exon, das nicht kodierend ist; das zweite Exon enthält den Translationsstart und das dritte Exon kodiert den größten Teil des Proteins. Die Proteine sind ebenfalls strukturell ähnlich organisiert. Die N-terminale Region ist homolog zu den S100-Proteinen und enthält wie diese zwei Calcium-bindende EF-Hand-Motive. Die anschließende lange zentrale Region enthält multiple Tandem-Wiederholungen, was ebenso charakteristisch für die „Cornified Envelope Precursor“-Proteine ist. Die C-terminale Region ist spezifisch für jedes einzelne SFTP. Alle Proteine dieser Familie werden hauptsächlich im verhornten Epithel und/oder in Haarfollikeln exprimiert (Henry et al., 2012).

## Einleitung



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Gen-, mRNA- und Proteinstruktur der SFTP-Familie**

Die konservierte Struktur der SFTP-Familie besteht auf allen drei Ebenen. Hellblau: nicht-kodierende Sequenzen; dunkelblau: kodierende Sequenzen; grün: S100- und EF-Hand-Domäne; gelb: Spacer-Sequenzen; orange: multiple Tandemwiederholungen; UTR: untranslatierte Region. Der Pfeil markiert das Translationsstartkodon ATG (aus Hansmann, 2008).

Das bekannteste SFTP ist Profilaggrin, das sich in den Keratohyalingranula der Epithelzellen im *Stratum granulosum* befindet und durch Desphosphorylierung und Proteolyse in Filaggrin-Monomere gespalten wird, die wiederum Keratin-Filamente bündeln. Der frei werdende N-terminale Abschnitt transloziert in den Zellkern und spielt vermutlich eine Rolle in der Zellkernauflösung (Sandilands et al., 2009). Die Filaggrin-Monomere werden durch Peptidyl-Arginin-Deiminasen citrulliniert, welches eine Änderung der Nettoladung bewirkt und die ionische Bindung zwischen Filaggrin und Keratin aufhebt. Daraufhin kann eine weitere Proteolyse und Degradation in einzelne freie Aminosäuren stattfinden, die z.T. feuchtigkeitbindend sind und an der Hautoberfläche als sogenannte „natural moisturizing factors“ wirken (Sandilands et al., 2009; Brown und McLean, 2012).

Hornerin, ein weiteres Protein der Familie, ist Bestandteil des „Cornified Envelope“ (Henry et al., 2011) und in der gesunden menschlichen Haut vorhanden (Wu et al., 2009b). Bei Patienten mit atopischer Dermatitis wird es vermindert exprimiert (Henry et al., 2011).

Weitere in unserer Arbeitsgruppe erforschte Proteine der SFTP-Familie sind Filaggrin-2 (siehe 1.1.4) und Trichohyalin-like 1 (Wu et al., 2011), welches als Substrat der Transglutaminase 1 ebenfalls dem „Cornified Envelope“ zugeschrieben wird (Henry et al., 2012).

Des Weiteren gibt es das Protein Trichohyalin, welches insbesondere als Strukturprotein in den Zellen der inneren Wurzelscheide des Haares und in geringerer Menge in spezialisierten Epithelien mit hoher mechanischer Beanspruchung vorkommt (Tarcsa et al., 1997). Es kommt z. B. in der menschlichen Vorhaut, dem harten Gaumen und dem Nagelbett vor (Tarcsa et al., 1997). Es akkumuliert genau wie Profilaggrin in Keratohyalingranula und führt nach Deimination zur Verstärkung des „Cornified Envelope“. So trägt es im spezialisierten Epithel und der Haarwurzel zu größerer mechanischer Widerstandskraft bei (Tarcsa et al., 1997; Steinert et al., 2003).

## Einleitung

Ein weiteres Protein, Repetin, wird besonders in dem Ausführungsgang von Schweißdrüsen, der inneren Haarwurzelscheide, der Vorhaut und in den Papillen der Zunge gebildet (Huber et al., 2005). Es kommt auch in der Epidermis im *Stratum granulosum* vor und ist stark mit den dortigen Keratohyalingranula assoziiert (Huber et al., 2005).

In der Kopfhaut, der Vorhaut, der inneren Haarwurzelscheide und der Speiseröhre konnte das Protein Cornulin nachgewiesen werden. Im Epithel kommt es in der Peripherie der Zellen des *Stratum granulosum* vor. Es wird angenommen, dass es bei der Bildung des „Cornified Envelope“ eine Rolle spielt und somit ein Marker der späten epidermalen Differenzierung ist (Contzler et al., 2005).

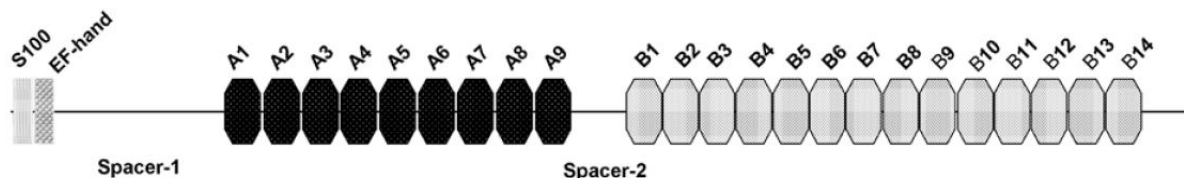
### 1.1.4 Ifapsoriasis / Filaggrin-2

Als ein neues Mitglied der SFTP-Familie wurde in unserer Arbeitsgruppe erstmals Ifapsoriasis identifiziert (Wu, 2005). Bei einer Expressionsstudie, die beteiligte Gene der epidermalen Differenzierung untersuchte, wurde die Expression von Ifapsoriasis ausschließlich in granulären Keratinozyten nachgewiesen (Toulza et al., 2007). Durch eine vollständige molekulare Identifikation und Expressionsanalyse wurde es in unserer Arbeitsgruppe näher beschrieben (Hansmann, 2008; Wu et al., 2009a). Zunächst als Ifapsoriasis benannt wurde es später durch das HUGO/GDB Nomenklatur-Komitee in Filaggrin-2 umbenannt. Die cDNA des *Filaggrin-2*-Gens besteht aus 9147 bp und besitzt den konservierten Aufbau aus drei Exons und zwei Introns (siehe Abb. 1.3).

#### Genstruktur:



#### Proteinstruktur:



#### Abb. 1.3: Schematische Darstellung des humanen *Filaggrin-2*-Gens und *Filaggrin-2*-Proteins

**Genstruktur:** Das *Filaggrin-2*-Gen enthält drei Exons. Die weißen Boxen kennzeichnen nicht-kodierende, schwarze Boxen proteinkodierende Sequenzen des Gens (Wu et al., 2009a).

**Proteinstruktur:** Abgebildet sind N-terminal die S100- und die EF-Hand-Domäne, denen sich nach einem ersten Spacer die repetitiven Domänen Typ A und Typ B anschließen, die durch ein kurzes zweites Spacer-Segment getrennt sind. An das letzte B-Repeat schließt sich der C-Terminus an (aus Wu et al., 2009a).

Das erste kleine Exon (51 bp) enthält eine untranslatierte Region (UTR), die 5'-UTR, das zweite Exon (160 bp) enthält das Translationsstartkodon und kodiert für die S100-Domäne

## Einleitung

und das größte dritte Exon (8907 bp) beinhaltet die restliche kodierende Sequenz und die 3'-UTR (Wu, 2005; Hansmann, 2008). Insgesamt kodiert das Gen ein 2391 Aminosäuren großes Protein. Die theoretische Masse beträgt etwa 248 kDa mit einem pI-Wert von 8,45.

Das Protein enthält N-terminal eine S100-Domäne (Aminosäure 4-46) und eine EF-Hand-Domäne (Aminosäure 53-81), die beide potenziell Calcium binden können (siehe Abb. 1.3). Die zentrale Region besteht aus zwei Arten von Tandemsequenzwiederholungen. Die erste Wiederholung ist die repetitive Domäne Typ A, die neun konservierte Repeats enthält und die zweite ist die repetitive Domäne Typ B mit vierzehn konservierten Repeats. Jedes Repeat ist jeweils 75-77 Aminosäuren groß und unterscheidet sich zwischen der A- und der B-Domäne durch die unterschiedliche Aminosäuresequenz. Vor und zwischen den repetitiven Domänen findet sich jeweils eine Spacer-Sequenz. An das letzte B-Repeat schließt sich der für das Protein spezifische C-Terminus an. Im Vergleich mit den anderen Proteinen der SFTP-Familie zeigen die A-Repeats hohe Ähnlichkeit zu Hornerin (50-77 % identisch) sowie die B-Repeats zu Filaggrin (28-39 % identisch) (Wu et al., 2009a).

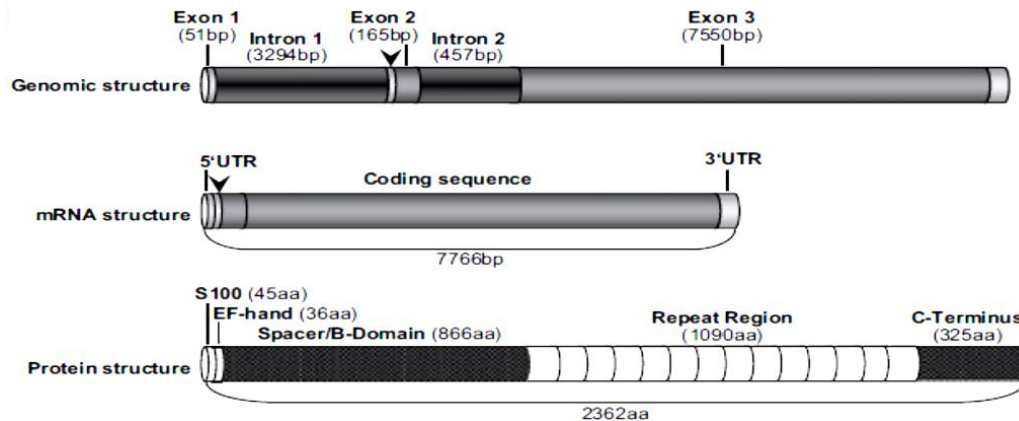
Die mRNA von Filaggrin-2 wurde in verschiedenen Geweben wie der Haut, Thymus, Magen, Tonsillen, Hoden und der Plazenta nachgewiesen (Wu et al., 2009a). In der gesunden Haut kommt es in allen Regionen gleichmäßig vor. Besonders ausgeprägt ist es im *Stratum granulosum* in irregulär geformten Keratohyalin granula und im *Stratum corneum* diffus im Zytoplasma der Zellen vorhanden (Wu et al., 2009a). Die Filaggrin-2-Genexpression wird in kultivierten Keratinozyten durch Calcium-Stimulation hochreguliert (Wu et al., 2009a). Filaggrin und Filaggrin-2 zeigen eine sehr ähnliche, wenn auch nicht komplett identische Kolo-kalisation in der Epidermis, was zu der Annahme führt, dass beide Proteine eine ähnliche Rolle in der Differenzierung der epidermalen Zellen spielen (Wu et al., 2009a). Eine ähnliche Funktion wird ebenfalls angenommen, da Filaggrin-2 reich an Glutaminresten ist, welche als Akzeptorstellen für Glutaminy-Lysin-Verbindungen in Transglutaminase-katalysierten Reaktionen dienen können (Kahlem et al., 1996). So könnte Filaggrin-2 genau wie Filaggrin zur Quervernetzung von Proteinen führen (Wu et al., 2009a). Neben den Glutaminresten enthält das Filaggrin-2-Protein viele Histidinreste, die jeweils als Quelle für „natural moisturizing factors“ dienen könnten (Rawlings und Harding, 2004), so wie es auch für Filaggrin angenommen wird (Wu et al., 2009a).

Filaggrin-2 wird in mehreren Schritten proteolytisch prozessiert. Die initiale(n) Protease(n) ist/sind noch nicht bekannt. Calpain 1, eine Protease, die ebenso bei der Spaltung von Profilaggrin eine wichtige Rolle spielt (Kamata et al., 2009), könnte hierbei jedoch bereits beteiligt sein, da die Proteolyse einer rekombinant hergestellten Filaggrin-2-Proteinteilsequenz durch Calpain 1 *in vivo* gezeigt werden konnte (Hsu et al., 2011). Der frei gewordenen B-Teil enthält viele spezifische Schnittstellen für Calpain 1 und wird in Oligo- und Monomere gespalten. Diese werden durch Peptidylarginin-Deimininasen

## Einleitung

deiminiert und sind so noch empfindlicher für die weitere Proteolyse durch Calpain 1 in kleinere Peptide (Hsu et al., 2011).

Um die Funktion des Proteins besser zu verstehen, wurde murines Filaggrin-2 als Ortholog des humanen Filaggrin-2 in unserer Arbeitsgruppe näher untersucht (Hansmann et al., 2012). Es zeigt die gleiche genomische sowie mRNA-Struktur wie die Mitglieder der humanen SFTP-Familie (siehe Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der genomischen, mRNA- und Proteinstruktur des murinen Filaggrin-2**

Genomische und mRNA-Struktur: Die Pfeile kennzeichnen die Position des Startkodons. Hellgrau: nicht-kodierende Sequenzen, mittelgrau: kodierende Sequenzen, dunkelgrau: Introns, UTR: untranslatierte Region.

Proteinstruktur: Dunkelgrau mit Gitternetz: B-Domäne und C-Terminus, weiß: Repeat-Region mit 14 Repeats. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzlängen sind entsprechend angegeben (aus (Hansmann et al., 2012)).

Die Proteinstruktur des murinen Filaggrin-2 enthält hingegen nur eine Tandemsequenzwiederholung, die der repetitiven Domäne Typ B des humanen Filaggrin-2 ähnelt. Diese Region enthält 14 Repeats, die aus jeweils 73-80 Aminosäureresten bestehen (Hansmann et al., 2012) und in der Lage sind Keratin-Filamente zu bündeln (Listwan und Rothnagel, 2004). Die davor liegende B-Domäne ähnelt der humanen repetitiven Domäne Typ A, ohne jedoch ebenso gleichmäßige Wiederholungen zu haben, und zeigt genau wie diese eine hohe Ähnlichkeit zu Hornerin (Hansmann et al., 2012).

Für humanes Filaggrin-2 wurde bereits gezeigt, dass es eine zusätzliche Funktion in der Abwehrstrategie der Haut gegen Mikroorganismen beinhaltet (siehe 1.3) (Hansmann, 2008). Bestimmte Peptidfragmente des murinen Filaggrin-2 wurden nun in dieser Arbeit hinsichtlich antimikrobieller Aktivität untersucht. Die Abwehrstrategien der Haut werden im Folgenden genauer erläutert.

## 1.2 Abwehrstrategien der Haut

Die Haut ist einem engen Kontakt mit der Umwelt ausgesetzt und so in ihrer Funktion als Barriere ständig gefordert. Sie ist mit einer charakteristischen Mikroflora bedeckt, die aus



residenten Mikroorganismen besteht, die auf und in den obersten Schichten des *Stratum corneum* wachsen und lokalisationsabhängig in einer Konzentration von  $10^2$  bis  $10^7$  Mikroorganismen/cm<sup>2</sup> vorkommen (Schröder und Harder, 2005). Um diese Anzahl einigermaßen stabil zu halten, entwickelten sich in der Haut verschiedene Abwehrstrategien. Zum einen ist eine intakte physikalische Barriere sehr wichtig. Diese wird in der Haut durch das *Stratum corneum* und dessen Lipidbarriere gebildet (Marks, 2004; Elias, 2007). Durch die kontinuierliche Erneuerung des Epithels mit der Desquamation der obersten Schicht, werden Mikroorganismen, die an der Oberfläche von Haut und Schleimhaut anhaften, immer wieder eliminiert (Schröder und Harder, 2005). Zusätzlich befindet sich auf der Haut ein saures Milieu mit einem pH-Wert von 4,5-5,0, das ein Ausbreiten von pathogenen Mikroorganismen, wie z. B. *S. aureus*, verringert, während sich viele der residenten Mikroorganismen, wie z. B. koagulase-negative Staphylokokken, bei diesem pH weiter vermehren können (Übersicht in Elias, 2005). Außerdem hat der pH-Wert Effekte auf die Membranorganisation der Zellen, auf die extrazelluläre Lipidprozession und die Desquamation durch unterschiedlich starke Aktivierung von Enzymen (Elias, 2005). Als weitere Abwehrstrategie ist die Phagozytose von Mikroorganismen durch die Keratinozyten zu nennen, die durch den ultrastrukturellen Nachweis der Phagozytose von *Candida albicans* beschrieben wurde (Csato et al., 1986).

In der Epidermis befinden sich außerdem spezielle Zellen der Immunabwehr, die „Langerhans-Zellen“, die in regelmäßigen Abständen zwischen den Epithelzellen vorkommen und mit langen Ausläufern die Umgebung kontrollieren. Dringt ein unbekanntes Antigen zu ihnen vor, wird es aufgenommen und den Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert (Lüllmann-Rauch, 2006).

Der nächsten Abwehrstrategie kommt in dieser Arbeit besondere Bedeutung zu, es handelt sich um eine „chemische Barriere“. Sie besteht aus antimikrobiellen Lipiden (Drake et al., 2008) und antimikrobiellen Peptiden (AMP), die schon lange bei Pflanzen und wirbellosen Tieren wie der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Tzou et al., 2000) bekannt waren. Im Jahr 1922 wurde eine lösliche antimikrobielle Substanz im menschlichen Nasensekret durch Alexander Fleming erstmals beschrieben und Lysozym genannt (Fleming, 1922). 1987 wurde ein AMP aus der Haut eines nichtmenschlichen Wirbeltieres, nämlich dem afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis*, isoliert und „Magainin“ genannt (Zaslouff, 1987). Seitdem wurden AMP intensiv beforscht und viele weitere gefunden.

### 1.2.1 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) gehören zum angeborenen Immunsystem und bewirken eine sofortige Immunantwort auf eindringende Mikroorganismen. Bisher wurden sie in vier

## Einleitung

Hauptgruppen unterteilt: Defensine, Cathelicidine, S100-Proteine und Ribonukleasen sowie weitere AMP, die keiner dieser Gruppen zugeordnet werden können (Harder et al., 2007). Die AMP kommen in vielen Organsystemen des Menschen und anderer Organismen vor. Auf der Oberfläche der gesunden Haut sind verschiedene AMP vorhanden: Die S100-Proteine Psoriasin (S100A7) (Gläser et al., 2005) und Calprotectin, das aus den beiden Proteinen Calgranulin A (S100A8) und Calgranulin B (S100A9) besteht (Gebhardt et al., 2006). Außerdem RNase 7, das durch Keratinozyten der tieferen Schichten hergestellt wird (Harder und Schröder, 2002), sowie Dermcidin und Lactoferrin, die von Schweißdrüsen produziert werden und an der Hautoberfläche akkumulieren (Schittek et al., 2001; Park et al., 2011). In entzündeter Haut werden die bereits vorhandenen AMP Psoriasin, Calprotectin und RNase 7 vermehrt induziert (Überblick in Harder et al., 2012). Zusätzlich wird die Expression der Gene weiterer, nicht konstitutiv exprimierter AMP in den Keratinozyten induziert: Beta-Defensine, insbesondere hBD-2 und hBD-3 sowie das Cathelicidin LL-37 (Überblick in Harder et al., 2012). Es gibt exogene und endogene Faktoren, die diese Induktion bewirken können. Exogene Faktoren sind zum Beispiel Bestandteile von gramnegativen Bakterien wie Lipopeptide und Flagellin sowie Peptidoglykan-Strukturen von grampositiven Bakterien. Endogene Faktoren können Zytokine wie die Interleukine IL-1, IL-17 und IL-22 und Wachstumsfaktoren wie der „epidermal growth factor“ sein. Die LL-37-Genexpression kann durch die physiologisch aktive Form des Vitamin D-Hormons Calcitriol stark induziert werden, welches bei UV-B Strahlung, Infektionen und Wunden von Keratinozyten hergestellt wird (Überblick in Harder et al., 2012).

AMP sind sehr verschieden, doch einige Eigenschaften haben die meisten gemein: Sie bestehen aus 12-50 Aminosäureresten, sind positiv geladen und haben eine amphipathische Struktur (Lai und Gallo, 2009). Durch die kationischen Ladungen der meisten AMP haben sie eine hohe Affinität zu den negativ geladenen Oberflächen der Bakterien und werden über elektrostatische Wechselwirkungen an diese gebunden. Daraufhin penetrieren die AMP die Bakterienmembran, bilden Poren und zerstören so die Membranintegrität, sodass es zu einem Verlust der Zellbestandteile und zu einer Lyse des Bakteriums kommt (Überblick in Harder et al., 2007). Manche AMP bewirken jedoch auch indirekt eine Elimination von Bakterien, wie zum Beispiel Psoriasin. Dessen angenommene Wirkweise führt durch Bindung von Zink-Ionen, die essentiell für Enzyme von *E. coli* sind, dazu, dass diese sich nicht mehr gegen den oxidativen Stress zur Wehr setzen können (Schröder und Harder, 2005; Gläser et al., 2005). Weitere Mechanismen zur Elimination von Mikroorganismen sind zum Beispiel die Induktion eines nicht-lytischen Verlusts von ATP (Adenosintriphosphat) in aktiv atmenden Pilzzellen durch Histatine, was zum Zelltod führt (Kavanagh und Dowd, 2004) oder die Bindung von bakteriellen Eisentransportern durch Neutrophilengelatinasen-

assoziiertes Lipocalin (NGAL) zur Verhinderung der essentiellen Eisenaufnahme (Goetz et al., 2002).

Neben der direkten antimikrobiellen Abwehr haben die AMP noch viele weitere Funktionen. Einige der AMP sind chemotaktisch aktiv oder können die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen durch Rezeptorbindung induzieren. Auch die Entzündungsreaktion kann durch sie reguliert und modifiziert werden. Bei einer Verletzung bewirken einige AMP eine schnellere Wundheilung und haben eine protektive und regenerative Wirkung, die unabhängig von ihrer Abwehrwirkung bei Infektion ist (Lai und Gallo, 2009).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Eine Reihe von Mitgliedern der humanen SFTP-Familie wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits auf antimikrobielle Aktivität überprüft. Von dem Protein Hornerin zeigten drei Fragmente, jeweils ein Fragment aus einem B-Repeat (B4), einem A-Repeat (A11) und dem C-Terminus, eine unterschiedlich stark ausgeprägte antimikrobielle Aktivität gegenüber dem Hefepilz *C. albicans* ATCC 24433, sowie den gramnegativen Bakterien *E. coli* ATCC 11303 und *P. aeruginosa* ATCC 10145 (Wu, 2005). Ebenso konnte für zwei N-terminale Peptidfragmente des Proteins Profilaggrin antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden (Schulz, 2010; Karsch, 2011). Das in unserer Arbeitsgruppe entdeckte Filaggrin-2 wurde ebenfalls bereits auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Hierbei besaßen ein N-terminales Spacer-Segment, ein C-terminales Protein inklusive des letzten B-Repeat sowie das erste B-Repeat antimikrobielle Wirksamkeit gegen verschiedene Mikroorganismen (Hansmann, 2008; Junge, 2011). Durch Sequenzanalysen anhand des C-terminalen Filaggrin-2-Abschnittes wurden putative Orthologe im Genom anderer Säugetierspezies ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass ein Teilbereich des C-Terminus hochkonserviert in 25 Säugetierspezies vorliegt (Hansmann, 2008). Daraufhin wurde vermutet, dass dieser Teil speziesübergreifend antimikrobielle Aktivität beinhalten und somit nicht nur beim Menschen, sondern auch bei anderen Säugetieren einen Teil der antimikrobiellen Abwehr darstellen könnte (Hansmann, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun, aufbauend auf vorherigen Ergebnissen, zwei weitere Fragmente mit Teilsequenzen des C-Terminus des murinen Filaggrin-2 als Orthologe des humanen Proteins untersucht werden. Die beiden Peptide mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub>, die in dem hochkonservierten Sequenzbereich des C-Terminus liegen, sollten hierfür rekombinant hergestellt und im radialen Plattendiffusionstest gegen verschiedene Keime getestet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Agarose	Bio&Sell
Acetonitril	Merck
Ampicillin	Roth
Clarithromycin	Roth
Chloramphenicol	Roth
dNTPs	ThermoScientific/Fermentas
HCl	Merck
IPTG	Roth
Kanamycin	Roth
Lysozym	Sigma
Tetrazyklin	Sigma
Trifluoressigsäure	Promochem GmbH

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck oder Sigma bezogen.

### 2.2 Geräte

#### Liste der verwendeten Geräte mit Herstellerangabe

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Elektroporator	MicroPulser™ Electroporator	Bio-Rad
FPLC-Anlage	ÄKTApurifier™	GE Healthcare
Geldokumentationssystem	BioDoc II	Biometra
Gelkammern	Horizon® 11.14	Life Technologies
H <sub>2</sub> O- Aufbereitungsanlage	TKA Smart2Pure	Thermo Scientific
Inkubator	CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Scientific
Inkubationsschüttler	Minitron Max Q 6000	INFORS HT Thermo Scientific

## Material und Methoden

Lyophilisator	Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4 LSC	Christ
Laborwaage	Analysewaage	Kern & Sohn GmbH
Massenspektrometer	Waters Micromass QTOF II	Waters Micromass
Photometer	NanoDrop 1000 Spectrophotometer BioPhotometer	Thermo Scientific Eppendorf
Rotationsschüttler	VF II – Vortex-Schüttler Reax 2000 Reagenzglasschüttler	Janke&Kunkel/ IKA® Heidolph
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Spannungsgeber	Power Pac	Biorad
Speedvac	Concentrator 5301	Eppendorf
Thermocycler	peqSTAR 96 Universal Gradient	Peqlab
Ultraschallgerät	Sonopuls GM70	Bandelin
UV-Tisch	Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator TM-20	UVP
Wasserbad		GFL
Zentrifugen	Multifuge X3R Centrifuge Heraeus Fresco 21 Centrifuge Centrifuge 5417 R Centrifuge 5804 R Centrifuge 5415 C HeraeusLabofuge 200	Thermo Scientific Thermo Scientific Eppendorf Eppendorf Eppendorf Thermo Scientific

### 2.3 Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer wurden von der Firma Sigma synthetisiert.

#### Primer für PCR (5'-3'):

mFLG-2-2060-f	AAGGTCTCAAGGTATGAATCATTTTCAATCAACCATTAGTG
mFLG-2-2080-f	AAGGTCTCAAGGTATGGGCAGCTATGGGCC
mFLG-2-2117-r	AATCTAGATCATGTTGCTCTATGTGCAGAACTG

**pJET1.2-System:**

pJET1.2-Forward Sequencing Primer	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2-Reverse Sequencing Primer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

**pE-SUMO3-System**

SUMO-Forward Primer	TCAATGAGGCAGATCAGATT
T7-Reverse Primer	GCCACCGCTGAGCAATAACTA

## 2.4 Vektoren

Für diese Arbeit wurden die zwei Vektoren pJET1.2 (Fermentas) und pE-SUMO3 (LifeSensors) verwendet.

Der Klonierungsvektor pJET1.2/blunt (2974 bp, Ampicillin-Resistenz) wurde benutzt, um die Anzahl der Fragmente zu amplifizieren. Er liegt in linearisierter Form ohne Überhänge vor, sodass „blunt end“-PCR Produkte, deren Enden ebenfalls ohne Überhänge vorliegen, direkt in den Vektor ligiert werden können. Neben der hohen Klonierungseffizienz liegt ein weiterer Vorteil darin, dass die „Multiple Cloning Site“ des Vektors von einem letalen Gen überspannt wird (siehe Abb. 6.1). Dieses wird normalerweise durch die Ligation mit einem DNA-Fragment, das nach der Ligation als Insert vorliegt, unterbrochen. Nach Transformation von rezirkularisierten Vektoren, die kein Insert enthalten, wird ein letales Restriktionsenzym gebildet. So können nur Bakterienklone mit eingefügtem Insert Kolonien bilden und somit auf den Selektionsplatten wachsen (Fermentas pJET Manual).

Der Expressionsvektor pE-SUMO3 (5610 bp, Kanamycin-Resistenz) wurde für die Herstellung der rekombinanten Proteine verwendet. Dieser Vektor enthält in seiner „Multiple Cloning Site“ unter anderem Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Eco31I* (siehe Abb. 6.2). Durch eine Restriktionshydrolyse (siehe 2.6.7) mit *Eco31I*, das zwei unterschiedliche Erkennungs- und Schnittstellen im pE-SUMO3-Vektor hat, wurde der zirkulär vorliegende Vektor linearisiert und Überhänge, sogenannte „sticky ends“ generiert. An den 5'-Enden der komplementären DNA-Stränge des geschnittenen Vektors entstand so ein CTAG-Überhang an dem einen Strang und ein ACCT-Überhang an dem anderen Strang. Die jeweiligen Endabschnitte der murinen Filaggrin-2-DNA-Teilsequenz wurde durch das Primerdesign in der ersten PCR kompatibel gestaltet (siehe 2.6.1.1). Somit wurde die gerichtete Ligation der murinen Filaggrin-2-Fragmente in die „Multiple Cloning Site“ des Vektors ermöglicht.

Der Vektor enthält des Weiteren einen T7-Promotor, unter dessen Kontrolle die DNA-Sequenz für das SUMO3-Tag-Protein steht. So kann die, in das Genom des benutzen Bakterienstamms eingebrachte, T7-RNA-Polymerase die DNA transkribieren. Am Anfang der DNA-Sequenz des SUMO3-Tag-Proteins sind sechs Basentriplets enthalten, die für einen

6fach Histidin-Tag am N-terminalen Ende des Proteins kodieren. Dieser Histidin-Tag ist für die spätere Aufreinigung der Fusionsproteine über die Affinitätschromatographie wichtig (siehe 2.8.2).

## 2.5 Mikroorganismen

Für diese Arbeit wurde die Bakterienart *Escherichia coli* (*E. coli*), ein gramnegatives, stäbchenförmiges und peritrich begeißeltes Bakterium der Familie der Enterobakterien gewählt. *E. coli*-Bakterien sind bewährte Mikroorganismen in der Laborarbeit, die leicht anzüchtbar und kostengünstig sind und für die es bereits viele etablierte Systeme zur Bearbeitung verschiedener Aufgabenstellungen gibt.

Die Vervielfältigung der rekombinanten Vektoren wurde mit dem *E. coli*-Stamm der elektrokompetenten XL1blue Zellen (Stratagene, Tetrazyklin-Resistenz) erreicht, die nach Aufnahme des jeweiligen Vektors auf entsprechend antibiotisch bestücktem Selektionsagar Kolonien formen konnten.

Die Herstellung des rekombinanten Proteins erfolgte im *E. coli*-Stamm der ebenfalls elektrokompetenten BL21(DE3)pLysS Zellen (Promega, Chloramphenicol-Resistenz).

Die antimikrobielle Testung wurde mit den gramnegativen Bakterienstämmen *E. coli* ATCC 11775 und *P. aeruginosa* NCTC 11446 durchgeführt. Diese Stämme wurden freundlicherweise vom Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel bereitgestellt.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion

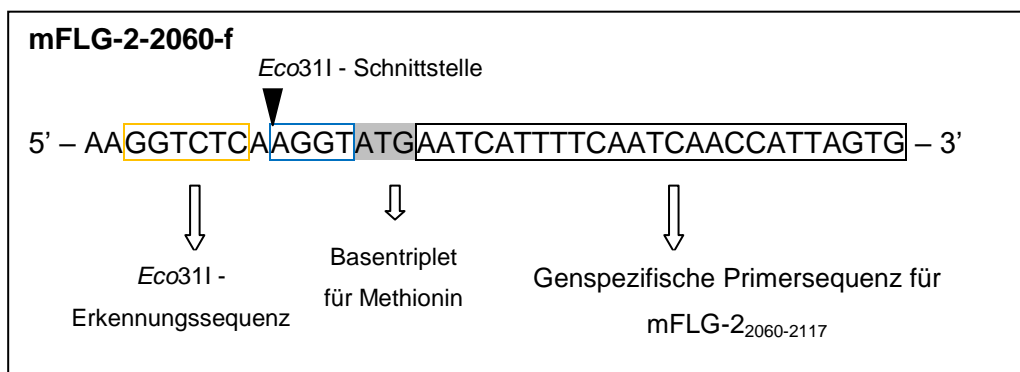
Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung eines definierten Nukleinsäure-Abschnittes. Für diese Reaktion benötigt man die zu amplifizierende DNA-/cDNA-Sequenz als Matrize, zwei aus ca. 15-25 Basen bestehende Oligonukleotide (Primer), die jeweils komplementär zu den 3'-Enden der Nukleinsäurestränge sind, eine hitzestabile DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine Pufferlösung, in deren chemischer Zusammensetzung die jeweilige DNA-Polymerase optimal arbeiten kann. Außerdem ist der Zusatz von Magnesiumionen für die Funktion der DNA-Polymerase essentiell. Eine Reaktion läuft in drei aufeinanderfolgenden Schritten ab. Zuerst wird in der Denaturierungsphase die doppelsträngige DNA bei 94-95 °C aufgeschmolzen. Die Temperatur wird auf eine primerspezifische Temperatur heruntergekühlt, damit sich die Oligonukleotide in der Annealingphase optimal an die

DNA-Stränge anlagern können. In der darauffolgenden Elongationsphase synthetisiert die DNA-Polymerase in ihrer jeweiligen optimalen Arbeitstemperatur den komplementären Strang zur DNA-Matrize, sodass semikonservativ neue DNA-Doppelstränge entstehen. Diese drei Phasen können in aufeinanderfolgenden Zyklen beliebig oft wiederholt und somit das DNA-Material stark (in der Theorie ist die Zunahme exponentiell) vermehrt werden (Mullis et al., 1986).

### 2.6.1.1 Primerdesign für die PCR

Um die - mittels der PCR amplifizierten - murinen Filaggrin-2-DNA-Teilsequenzen im Verlauf mit spezifischen Enzymen in der Restriktionshydrolyse schneiden und in den pE-SUMO3-Vektor ligieren zu können, mussten jeweils Primer mit besonderen Eigenschaften entworfen werden. An die eigentliche Primer-Nukleinsäuresequenz, die komplementär zu den Strängen der Filaggrin-2-DNA-Sequenz ist, wurden zusätzliche Basen angefügt.

In der Abb. 2.1 wird beispielhaft das Primerdesign für den Vorwärtsprimer mFLG-2-2060-f gezeigt.



**Abb. 2.1: Primerdesign am Beispiel des Vorwärtsprimers mFLG-2-2060-f**

Gelb umrandete Basensequenz: Erkennungssequenz für *Eco311*, blau umrandete Basensequenz: Überhang nach der Hydrolyse, grau hinterlegtes Basentriplet: kodiert für die Aminosäure Methionin, schwarz umrandete Basensequenz: Genspezifische Primersequenz für mFLG-2-2060-f. Die Schnittstelle befindet sich eine Base nach der Erkennungssequenz von *Eco311*.

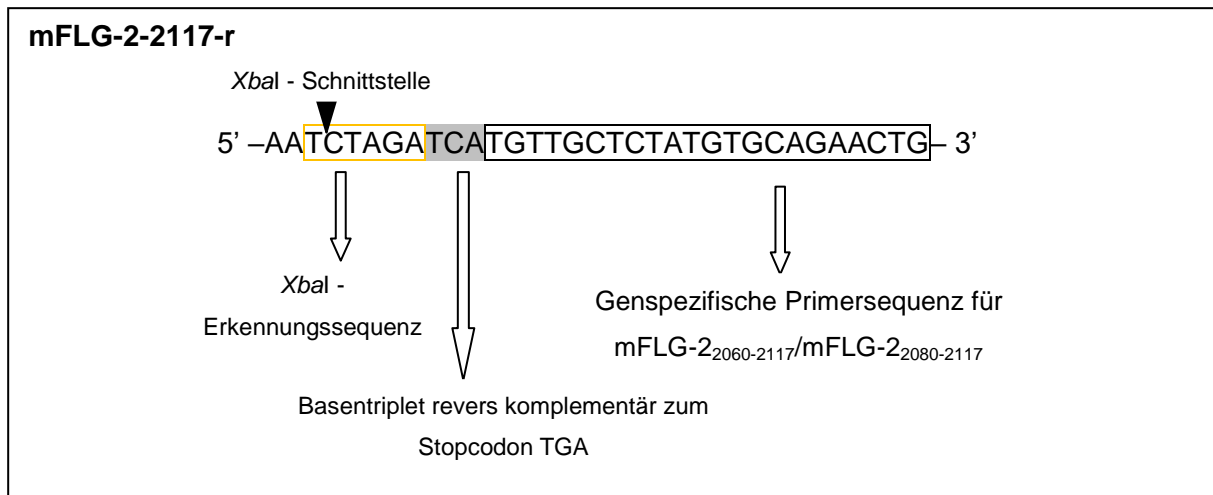
Die Basensequenz **GGTCTC** ist die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Eco311*, welches die DNA nach einer, auf die Erkennungssequenz folgende, beliebigen Base schneidet. Da *Eco311* so schneidet, dass „sticky ends“ entstehen, bleibt durch das Primerdesign nach erfolgter Hydrolyse der Überhang **AGGT** bestehen. Dieser ist komplementär zum 5'-Überhang des einen DNA-Stranges des Expressionsvektors (siehe 2.4). Das Basentriplet **ATG**, welches die Aminosäure Methionin kodiert, wurde direkt vor der genspezifischen Primersequenz eingefügt, damit in der späteren Genexpression ein Methionin vor der gewünschten Aminosäuresequenz exprimiert wird. So kann durch Bromcyan die Aminosäuresequenz hinter dem Methionin abgespalten werden (siehe 2.8.4),



um die gewünschten Filaggrin-2-Proteinfragmente aus den zwischenzeitlich entstandenen Fusionsproteinen zu erhalten. Das Basenpaar AA am Anfang des Primers wurde optional eingefügt und dient der effizienteren Hydrolyse, wobei diese Basen frei gewählt wurden.

Der Forward Primer mFLG-2-2080-f wurde vor der genspezifischen Primersequenz mit denselben Basen ausgestattet.

Der Rückwärtsprimer ist für beide Filaggrin-2-Fragmente identisch. Der Aufbau wird in der Abb. 2.2 gezeigt.



**Abb. 2.2: Primerdesign am Beispiel des Rückwärtsprimers mFLG-2-2117-r**

Gelb umrandete Basensequenz: Erkennungssequenz für XbaI, Schnittstelle darin nach dem ersten T, grau hinterlegtes Basentriplet: revers komplementär zum Stopcodon TGA, schwarz umrandete Basensequenz: Genspezifische Primersequenz für mFLG-2<sub>2060-2117</sub>/mFLG-2<sub>2080-2117</sub>

Die Basensequenz **TCTAGA** ist die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XbaI, welches nach dem ersten T schneidet. Somit entsteht ein 5'-CTAG-Überhang, der komplementär zum 5'-Ende des zweiten DNA-Stranges des Expressionsvektors ist (siehe 2.4). Das Basentriplet **TCA** ist revers komplementär zu dem Stopcodon TGA, sodass gewährleistet ist, dass die Gensequenz nur bis zu der gewünschten Stelle transkribiert und somit als Protein translatiert wird. Die ersten beiden Basen wurden wiederum frei gewählt und optional für eine effizientere Hydrolyse eingesetzt.

### 2.6.1.2 PCR

Für die Produktion der beiden murinen Filaggrin-2-Fragmente wurde Keratinozyten-cDNA von der Haut bzw. dem Ballen einer BALB/c-Maus verwendet. Mithilfe der Pfu-Phusion Polymerase, zwei spezifischen Forward Primern und einem gemeinsamen Reverse Primer wurden die gewünschten doppelsträngigen DNA-Fragmente in mehreren Durchgängen hergestellt. Der Vorteil der Pfu-Polymerase besteht in der 5'-3'-Exonucleaseaktivität, durch

die falsch eingebaute Nukleotide schon während der Synthese erkannt und entfernt werden können, was die Fehlerrate deutlich reduziert.

Für einen Reaktionsansatz à 50µl wurden verwendet:

- 0,2 mM dNTPs
- 0,5 µM Forward Primer: mFLG-2-2060-f bzw. mFLG-2-2080-f
- 0,5 µM Reverse Primer: mFLG-2-2117-r
- cDNA (aus 50 ng RNA)
- 1 U *Pfu*-Phusion Polymerase (2U/µl) (Thermo Scientific/Fermentas)
- 5x Phusion HF Puffer (10µl) (Thermo Scientific/Fermentas)
- H<sub>2</sub>O ad 50 µl

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- |         |        |   |           |
|---------|--------|---|-----------|
| • 98 °C | 30s    |   |           |
| • 98 °C | 8s     | } | 10 Zyklen |
| • 45 °C | 17s    |   |           |
| • 72 °C | 15s    |   |           |
| • 98 °C | 8s     |   |           |
| • 50 °C | 17s    | } | 28 Zyklen |
| • 72 °C | 15s    |   |           |
| • 72 °C | 10 min |   |           |
| • 8 °C  | ∞      |   |           |

Die Aufteilung in die verschiedenen Zyklen wurde durchgeführt, da sich im Verlauf die Matrizenlängen veränderten. In den ersten zehn Zyklen waren die entworfenen Primer nur mit ihrer genspezifischen Teilsequenz komplementär zur Matrize. Nachfolgend entstanden jedoch DNA-Sequenzen, die um die künstlich angefügten Basen z. B. für die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme verlängert waren. So konnten sich die Primer über die gesamte Länge der Matrize anlagern, was die spezifische Schmelztemperatur erhöhte. Dies wurde in den weiteren 28 Zyklen umgesetzt.

### 2.6.1.3 Kolonie-PCR

Nachdem das Fragment als Insert in einen Vektor ligiert (siehe 2.6.4) und der rezirkularisierte Vektor daraufhin in Bakterien transformiert wurde (siehe 2.6.5), diente die Kolonie-PCR zum Nachweis des Plasmids, um eine Kontrolle per Agarose-Gelelektrophorese durchführen zu können (siehe 2.6.2).

Für die Kolonie-PCR mithilfe des pJET1.2-Systems wurden die für den Vektor spezifischen Primer verwendet, weil das Insert nach der „blunt end“-Ligation in beide Richtungen im

Vektor orientiert sein konnte. Ein fragmentspezifischer Primer hätte den Anfang für die DNA-Polymerisation nur in eine Richtung der ligierten Fragmente bilden können.

Bei dem zweiten Vektorsystem, pE-SUMO3, diente vektorspezifisch der SUMO Forward Primer und fragmentspezifisch der Reverse Primer mFLG-2-2117-r der Amplifizierung der Fragmente. Der Einsatz des fragmentspezifischen Reverse Primers war in diesem System durch die „sticky end“-Ligation möglich, in der die Fragmente durch kompatible Überhänge nur in die gewünschte Richtung orientiert eingefügt werden konnten. Gleichzeitig konnte durch die gewählte Primerkombination auch überprüft werden, ob das Insert richtig orientiert vorlag.

Für beide Systeme wurde die Taq E Polymerase (Genaxxon) mit dazugehörigem Puffer verwendet. Zur Bakteriengewinnung wurde jeweils mit einer Pipettenspitze ein kleiner Teil der zu überprüfenden Kolonie abgenommen und dem Reaktionsansatz zugefügt. Am Anfang eines PCR-Laufes wurde die Temperatur für zehn Minuten auf 95 °C gehalten, um die Bakterien thermisch zu lysieren, damit der Vektor frei und zugänglich vorlag.

Die Reaktionsansätze für die beiden unterschiedlichen Systeme beinhalteten:

- | <u>pJET1.2</u>   | <u>pE-SUMO3</u>  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• 0,5 U Taq E Polymerase</li><li>• Puffer 10x (2µl)</li><li>• 0,2 µM pJET1.2-Forward Primer</li><li>• 0,2 µM pJET1.2-Reverse Primer</li><li>• 200 µM dNTPs</li><li>• H<sub>2</sub>O ad 20 µl</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• 0,5 U Taq E Polymerase</li><li>• Puffer 10x (2µl)</li><li>• 0,2 µM SUMO-Forward Primer</li><li>• 0,2 µM mFLG-2-2117-r</li><li>• 200 µM dNTPs</li><li>• H<sub>2</sub>O ad 20 µl</li></ul> |

Die PCR wurde jeweils unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- |   |                 |
|---|-----------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• 95 °C     10 min</li><li>• 95 °C     30s</li><li>• 56 °C     30s</li><li>• 72 °C     30s</li><li>• 72 °C     5min</li><li>• 10 °C     ∞</li></ul> | }     30 Zyklen |
|---|-----------------|

### 2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuresequenzen, wie z. B. Plasmide und DNA-Fragmente, größenabhängig aufgetrennt werden. Durch eine kontinuierlich angelegte Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Durch ein als Molekularsieb wirkendes Agarose-Gel laufen die

DNA-Abschnitte mit geringerer Größe schneller als die längeren Abschnitte, sodass eine räumliche Trennung in Banden stattfindet (Berg et al., 2011).

Abhängig von den Größen der zu trennenden DNA-Fragmente wurde ein 1-1,5 %iges Gel verwendet. Hierfür wurde 1 g bzw. 1,5 g Agarose-Pulver in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) gegeben und aufgeköcht, bis es sich gleichmäßig gelöst hatte. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugefügt, welches später durch Interkalation mit der DNA die Banden unter UV-Licht sichtbar machte. Das flüssige Gel wurde in eine horizontale Elektrophorese-Kammer gegossen und härtete dort bei Raumtemperatur aus. Zu den DNA-Proben wurde jeweils im Verhältnis 6fach Ladebuffer VI (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) dazugegeben und in die Beladungstaschen pipettiert. Als Größenreferenz wurden die Marker TriDye 5 µl (50 µg/ml, New England BioLabs) oder Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder (0,1 µg/µl, ThermoScientific) und für die Plasmide der Marker Smart Ladder 5 µl (720 ng/5 µl, Eurogentec) aufgetragen. Anhand der definierten Bandengrößen dieser Marker ließ sich die Größe der aufgetragenen DNA-Proben schätzen. Bei einer kontinuierlichen Spannung von anfänglich 40-50 Volt, die im Verlauf auf 70-90 Volt erhöht wurde, liefen die Proben durch das in TAE-Puffer eingelagerte Gel. Unter UV-Licht wurden die Banden anschließend detektiert und dokumentiert.

### **2.6.3 Gelextraktion und DNA-Aufreinigung**

Die nach der ersten PCR entstandenen DNA-Sequenzen, bestehend aus den gewünschten murinen Filaggrin-2-Teilsequenzen sowie den durch das Primerdesign in der PCR angefügten Basen, wurden zur weiteren Bearbeitung wieder aus dem Gel extrahiert. Ebenso wurden die im Verlauf aus den pJET1.2-Plasmiden mittels Restriktionshydrolyse (siehe 2.6.7) entfernten Fragmente nach Auftrennung im Gel extrahiert. Hierfür wurden die entstandenen Gelbanden, deren Größe man anhand eines Markers schätzte und mit der theoretisch berechneten Basenpaarlänge abglich, mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht mit geringer Intensität aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Für die Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Gel wurde das GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) genutzt und die Aufreinigung anhand des Hersteller-Protokolls durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5).

### **2.6.4 Ligation**

Um die aufgereinigte DNA in Plasmide einzufügen, die später in Bakterien transformiert wurden, war eine Ligation notwendig. Man unterscheidet zwischen der „blunt end“-Ligation

und der „sticky end“-Ligation. Bei der „blunt end“-Ligation werden zwei DNA-Abschnitte zusammengefügt, deren Enden jeweils glatt sind, d. h. beide DNA-Stränge eines DNA-Abschnitts enden gleichzeitig. Die Orientierung der DNA-Abschnitte ist hierbei unwichtig. Bei der „sticky end“-Ligation haben die zusammenzufügenden DNA-Abschnitte jeweils einen Überhang von Basen an einem der beiden DNA-Stränge. Die Überhänge der jeweiligen DNA-Stränge müssen hierfür komplementär sein. Dadurch wird eine zielgerichtete Ligation möglich.

Das Insert wurde jeweils im achtfachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Die in der ersten PCR produzierten „blunt end“-Produkte wurden mit den Enden des linearisiert vorliegenden Klonierungsvektors pJET1.2 durch eine Ligase in einer „blunt end“-Ligation verbunden. Ein Ansatz enthielt:

- 11,7 ng DNA von mFLG-2<sub>2060-2117</sub> bzw. 7,67 ng DNA von mFLG-2<sub>2080-2117</sub>
- 25 ng pJET1.2-Vektor (Fermentas)
- 2,5 U T4 DNA-Ligase (Fermentas)
- 5 µl 2x Puffer (Fermentas)
- H<sub>2</sub>O ad 10 µl

Die Filaggrin-2-DNA-Fragmente, die durch Restriktionshydrolyse (siehe 2.6.7) aus den pJET-Vektoren mithilfe der Enzyme *Eco31I* und *XbaI* (beide Fermentas) herausgeschnitten wurden, enthielten Basenpaarüberhänge, sogenannte „sticky ends“. Sie wurden in einer „sticky end“-Ligation in den ebenfalls mit *Eco31I* verdauten Expressionsvektor pE-SUMO3 eingefügt. Ein Ansatz enthielt:

- 4,4 ng DNA von mFLG-2<sub>2060-2117</sub> bzw. 2,85 ng DNA von mFLG-2<sub>2080-2117</sub>
- 17,5 ng pE-SUMO3-Vektor (Lifesensors)
- 0,5 U T4 DNA-Ligase (Fermentas)
- 1 µl 10x Puffer (Fermentas)
- H<sub>2</sub>O ad 10 µl

Zur Rezirkularisierungskontrolle, ob der Vektor sich ohne DNA-Fragment schließen kann, wurde eine Leer-Ligation ohne Zugabe eines Inserts angefertigt. Die Ligationsansätze wurden bei 4 °C für zwei Tage inkubiert.

### 2.6.5 Transformation mittels Elektroporation

Bei der Transformation handelt es sich um das Einfügen von DNA in Zellen von Mikroorganismen. In diesem Versuch wurden Plasmide mittels Elektroporation in Bakterien transformiert. Die hierbei verwendeten elektrochemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden

freundlicherweise aus vorhandenen Laborbeständen zur Verfügung gestellt. Zur Zwischenlagerung wurden die Bakterien in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Zunächst wurden Agarplatten zum späteren Ausplattieren und Inkubieren der Bakterien hergestellt. Pro Platte wurden etwa 15 ml LB-Agar verwendet. Um einen entsprechenden Selektionsdruck auf die Bakterien mit den jeweils transformierten Plasmiden auszuüben, wurden die Platten mit entsprechenden Antibiotika versetzt, gegen die die Bakterien Resistenzen aufwiesen und die jeweiligen Plasmide Resistenzgene trugen. Diese sind in Tab. 2.1 dargestellt.

**Tab. 2.1: Antibiotikakombinationen aufgrund der Resistenzen der *E. coli*-Stämme und der Vektoren**

<i>E. coli</i> -Stamm	transformierter Vektor	Antibiotika-Kombination angegeben in der Endkonzentration
<ul style="list-style-type: none"> <li>• XL1blue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pJET1.2</li> </ul>	Tetrazyklin (12,5 µg/ml) + Ampicillin (50 µg/ml)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pE-SUMO3</li> </ul>	Tetrazyklin (12,5 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• BL21(DE3)pLysS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pE-SUMO3</li> </ul>	Chloramphenicol (43 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)

Für die Transformation der pJET1.2-Vektoren wurden zunächst 10 µl Ligationsansatz mit 10 µl Chloroform gemischt, um das im Puffer der „blunt end“-Ligation vorhandene Polyethylenglykol aufzulösen, da es bei der Elektroporation stören würde. Durch Zentrifugation der Mischung entstanden zwei Phasen. Von der oberen Phase wurde jeweils 1 µl verwendet. Bei den Ligationsansätzen der pE-SUMO3-Vektoren war die Zugabe von Chloroform nicht notwendig.

In mehreren Ansätzen wurden jeweils 1 µl des zentrifugierten pJET1.2-Ligationsansatz bzw. 2 µl des pE-SUMO3-Ligationsansatzes mit 50 µl der auf Eis aufgetauten Aliquots der Bakteriensuspension gemischt und wieder auf Eis gestellt, damit die Plasmide sich an die Membranen der Bakterien anlagerten. Daraufhin wurde die Mischung in einer Küvette in den Micropulser gestellt und elektrische Impulse mit einer Spannung von 1,8 kV abgegeben. Durch das entstandene starke elektrische Feld wurde die Membran der Bakterien vorübergehend permeabel und die Plasmide gelangten in die Zellen. Zur optimalen Regeneration der Bakterien wurde die Mischung direkt danach in 300 µl 37 °C-warmes SOC-Medium (2 % Pepton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 20 mM Glukose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) gegeben und für 1 h im Rotationsschüttler bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Aufteilung der Flüssigkulturen mit einer jeweiligen Menge von 50 µl und 300 µl pro Ansatz auf die vorher angefertigten Agarplatten, die dann über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Bei erfolgreicher Koloniebildung wurde eine Kolonie-PCR von einigen

ausgewählten Kolonien durchgeführt, um sie auf die Plasmidaufnahme zu überprüfen (siehe 2.6.1.3).

### 2.6.6 Plasmidisolierung

Nach erfolgreicher Testung der Klone in der Kolonie-PCR wurden sie entnommen und jeweils in Flüssigmedium bestehend aus 3 ml LB-Medium und den entsprechenden Antibiotikakombinationen gegeben (siehe Tab. 2.1). Zur Vermehrung der Bakterien wurde die Flüssigkultur über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert.

Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers. Der Vorgang bestand in einer alkalischen Lyse der Bakterien, einer Zentrifugation, um Zelltrümmer und chromosomale DNA zu pelletieren, und einer Ausfällung der Plasmid-DNA an einer Membran mithilfe von Ethanol. Die Plasmide wurden daraufhin mit 30 µl Elutionspuffer von der Membran eluiert. Die Konzentration der Plasmide im Eluat wurde photometrisch bestimmt.

### 2.6.7 Restriktionshydrolyse

Die ligierten pJET1.2-Plasmide, die aus der Transformation in *E. coli* XL1blue-Zellen (siehe 2.6.5) und nachfolgender Plasmidisolierung (siehe 2.6.6) hervorgegangen waren, wurden in der Restriktionshydrolyse geschnitten. Es wurden zwei verschiedene Restriktionsenzyme benutzt um „sticky ends“ zu generieren, sodass das Fragment in der nachfolgenden Ligation nur in eine Orientierung in das Plasmid, welches entsprechend mit Restriktionsenzymen geschnitten worden war, eingefügt werden konnte. Die verwendeten Restriktionsenzyme *Eco31I* und *XbaI* (beide Fermentas) wurden für das spezifische Herausschneiden der Inserts benutzt, da durch das Primerdesign in der PCR jeweils eine Erkennungsstelle für die beiden Enzyme an die Filaggrin-2-Fragmente angefügt wurden (siehe 2.6.1.1).

Ein 50 µl-Ansatz enthielt:

- 2,5 µl *Eco31I* (10 U/µl)
- 2,5 µl *XbaI* (20 U/µl)
- 5 µl 10x FD Green Buffer
- 1 µg pJET1.2 -Plasmid mit mFLG-2<sub>2060-2117</sub> bzw. 4 µg pJET1.2-Plasmid mit mFLG-2<sub>2080-2117</sub>
- H<sub>2</sub>O ad 50 µl

Die Menge an Plasmid für die Restriktionshydrolyse wurde entsprechend so berechnet, dass etwa 150 ng des Inserts aus dem Vektor geschnitten werden sollte. Da für das Plasmid mit

mFLG-2<sub>2060-2117</sub> nach der Plasmidisolierung keine ausreichende Menge für diese Berechnung vorlag, wurde weniger als bei dem Plasmid mit mFLG-2<sub>2080-2117</sub> für die Restriktionshydrolyse eingesetzt. Die Ansätze wurden für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen DNA-Fragmente der Restriktionsansätze wurden nachfolgend über die Gelelektrophorese voneinander getrennt (siehe 2.6.2).

Von dem pE-SUMO3-Vektor, in den die Filaggrin-2-Fragmente nachfolgend ligiert werden sollten (siehe 2.6.4), wurden 1,5 µg eingesetzt, ebenfalls mit *Eco31I* (30 U) geschnitten und nach Zugabe von Wasser wurde das Gesamtvolumen von 30 µl bei 37 °C für 1 h inkubiert. Hier wurde nur das Restriktionsenzym *Eco31I* benutzt, da es zwei unterschiedliche Erkennungsstellen und Schnittstellen im pE-SUMO3-Vektor besitzt. Die dadurch generierten „sticky ends“ waren nicht untereinander, jedoch mit den Überhängen der murinen Filaggrin-2-Fragmente kompatibel, die in der Restriktionshydrolyse generiert wurden.

### 2.6.8 DNA-Sequenzierung

Die murinen Filaggrin-2-Fragmente wurden in einer „sticky end“-Ligation in pE-SUMO3-Plasmide ligiert (siehe 2.6.4). Diese wurden in *E. coli* XL1blue-Zellen transformiert (siehe 2.6.5), durch Bakterienwachstum vervielfältigt und nachfolgend aus den Bakterien isoliert (siehe 2.6.7). In mehreren Ansätzen wurden jeweils 3 µl Eluat, das unterschiedliche Konzentrationen von 133-142 ng/µl für pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und 24-90 ng/µl für pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> beinhaltete, mit 1 µl T7 Reverse Primer (4,8 µM) gemischt. Die Proben wurden zur Sequenzierung mithilfe der Sanger Methode an das Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gegeben.

## 2.7 Rekombinante Expression der Fusionsgene in *Escherichia coli*

Die Expression der pE-SUMO3-mFLG-2-Gene fand in *E. coli* BL21(DE3)pLysS Bakterien statt, in die zuvor der pE-SUMO3-Vektor, der die Fusionsgene enthielt, transformiert wurde (siehe 2.6.5). Dieser Bakterienstamm ist lysogen für den Bakteriophagen lambda-DE3, der in seinem Genom das T7-Bakteriophagen 1 enthält, welches unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht und für die T7-RNA-Polymerase kodiert. IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) wirkt als Induktor des lac-Operons, indem es den von den Bakterien produzierten lac-Repressor bindet und damit inaktiviert. Daraufhin kann die T7-RNA-Polymerase von den Bakterien gebildet werden. Die Polymerase beginnt die Synthese der Fusionsproteine, deren Gensequenzen im pE-SUMO3-Vektor unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen.



Von den transformierten und durch Kolonie-PCR und Gelelektrophorese als positiv bestimmten Kolonien wurden jeweils Bakterien entnommen und in eine Flüssigkultur, bestehend aus 3 ml LB-Medium (LB-Medium (Lysogenic Broth): 1 % Sojamehlpepton, 0,5 % NaCl, 0,5 % Hefe-Extrakt) mit der entsprechenden Antibiotika-Kombination (siehe Tab. 2.1), gegeben und über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Daraufhin wurde die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) der Bakterienkultur in einer Verdünnung von 1:10 in LB-Medium gemessen. Die optische Dichte verhält sich in einem Bereich von etwa 0,1 bis 1 linear zu der Menge der Bakterienzellen. Die Expressionskulturen enthielten jeweils 250 ml LB-Medium mit der entsprechenden Antibiotika-Kombination und wurden mit entsprechenden Volumina der Übernachtskultur auf eine OD von 0,025 angeimpft. Daraufhin wurden sie bei 37 °C und 160 rpm inkubiert und stündlich kontrolliert, bis die Ziel-OD von 0,6-0,8 erreicht wurde. Nach Induktion der Proteinexpression mit 250 µl IPTG (1M) wurden die Expressionskulturen für 3 h bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Mittels Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C für 10 min wurden die Bakterien pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml NPI-20-Puffer (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) pro 100 ml Expressionskultur wieder resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

## 2.8 Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine

### 2.8.1 Lyse der Bakterien

Für die Gewinnung der Fusionsproteine mussten diese zunächst aus den Bakterien isoliert werden. Um die Bakterien zu lysieren, wurden die Proben kurz aufeinanderfolgend aufgewärmt und wieder eingefroren. Die bei -80 °C gelagerte Bakterien-Puffer-Suspension wurde zunächst für 10 min in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt, bis sie vollständig aufgetaut waren, und daraufhin sofort wieder bei -80 °C eingefroren, bis die Suspension vollständig gefroren war. Dieser Vorgang wurde drei Mal durchgeführt. Durch das wiederholte Einfrieren bildeten sich Eiskristalle, die die Membranen der Bakterien perforierten. Somit erfolgte ein thermischer Zellaufschluss und die Zellbestandteile, unter anderem die Proteine, lagen frei in der Suspension vor.

Zur Verstärkung der Zelllyse und zur Fragmentierung der frei gewordenen DNA, die die Viskosität der Suspension erhöhte, wurde eine Ultraschallbehandlung im Ultraschallgerät durchgeführt. In insgesamt zehn Durchgängen wurde jede Suspension jeweils 30 s beschallt (60 % Puls und 40 % Pause pro Sekunde) und dazwischen für 15 s auf Eis gestellt, um ein Denaturieren der Proteine durch Überhitzen zu verhindern. Durch die Ultraschallwellen wird freie DNA starken Scherkräften ausgesetzt, sodass sie fragmentiert wird. In der nachfolgenden Zentrifugation bei 11500 x g und 4 °C für 45 min wurden die lysierten

Bakterien pelletiert. Der Überstand, der das Zellysate und somit die Fusionsproteine enthielt, wurde sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,45 µm).

### **2.8.2 Nickel-Affinitätschromatographie**

Die Fusionsproteine mussten von den restlichen löslichen bakteriellen Proteinen, die sich ebenfalls im Zellysateüberstand befanden, getrennt werden. Dazu diente die Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie. Hierbei wurde das sterilfiltrierte Proteingemisch nach Protokoll des Herstellers mit Bind & Washbuffer über eine Säule (HisTrap, GE Healthcare Life Sciences) gegeben. Die zuvor stattgefundene Resuspension der Bakterienpellets in Imidazol-haltigem NPI-20-Puffer war dazu erforderlich, um in diesem Schritt unspezifische Bindungen der bakteriellen Proteine an die Säule zu minimieren. Die Säule enthielt in einem oktaedrischen Komplex aus Trägermaterial und Wassermolekülen gebundene und damit immobilisierte zweiwertige Nickelionen. Die Fusionsproteine hatten am N-Terminus den aus sechs Histidinresten bestehenden His-Tag. Jeweils zwei Histidine bildeten mit einem Nickelion unter Verdrängung der Wassermoleküle einen stabilen Chelatkomplex, sodass die Proteine über Bindungen an drei Nickelionen relativ fest an der Säule haften. Dagegen wurden die restlichen Proteine ohne His-Tag, je nach Anteil der proteineigenen Histidine, nicht oder schwächer an die Säule gebunden. Die gebundenen Proteine wurden über einen ansteigenden Gradienten mit einem Imidazol-haltigen Elutionspuffer (500 mM Imidazol) durch kompetitive Verdrängung wieder von der Säule eluiert. Hierbei wurden die Proteine mit einer schwächeren Bindung an der Säule schon bei geringeren Konzentrationen des Puffers und somit früher von der Säule abgetrennt und eluiert als die Fusionsproteine, die den His-Tag enthielten. So fand eine konzentrationsabhängige Auftrennung des Proteingemisches an der Nickelsäule statt. In zwei Durchgängen wurden insgesamt 7 ml der Proteinmischung in eine Schleife eingespritzt und über die Säule gegeben.

### **2.8.3 Entsalzung über Gelfiltrations-Chromatographie**

Den eluierten Proteinmischungen wurden durch die Puffer-Lösungen Salze zugefügt, die für die nächsten Schritte wieder entfernt werden mussten. Dafür wurde das Prinzip der Gelfiltrations-Chromatographie mit einer HiPrep26/10 Säule (GE Healthcare Life Sciences) genutzt und die Entsalzung nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierbei werden Moleküle nach Größe und Molekulargewicht über ein Gel aufgetrennt. Proteine, die größer sind als die Poren des Gels, fließen auf direktem Weg an dem Gel vorbei und werden zuerst eluiert, während kleinere Moleküle wie die Salze, die sich länger in der Säule halten, erst später eluiert werden. Idealerweise sollten die Fusionsproteine so deutlich früher eluiert

werden als das Salz und somit davon getrennt werden. Als Laufmittel wurde Wasser verwendet, sodass die eluierten Proteine nach Entfernung der Salze in Wasser gelöst vorlagen. Die Konzentration der Proteine wurde photometrisch bestimmt und die Proben daraufhin lyophilisiert.

### **2.8.4 Spaltung der Fusionsproteine mit Bromcyan**

Um die Filaggrin-2-Proteinfragmente aus den Fusionsproteinen zu erhalten, müssen diese spezifisch vom pESUMO3-Tag gespalten werden. Bromcyan spaltet ein Protein chemisch immer hinter der Aminosäure Methionin. Das für die Spaltung notwendige Methionin wurde durch entsprechendes Primerdesign in der PCR direkt vor der ersten Aminosäure der Filaggrin-2-Fragmente eingefügt (siehe 2.6.1.1). Die nach dem vorangegangenen Schritt vorliegenden entsalzten und lyophilisierten Fusionsproteine wurden mit 0,25 M HCl in einer Konzentration von 0,1 mM aufgenommen. Dazu wurde Bromcyan in 50-fachen molarem Überschuss gegenüber den vier im Fusionsprotein enthaltenen Methioninen gegeben (20 mM). Da im SUMO3-Protein drei Methionine enthalten sind und vor die beiden Filaggrin-2-Proteinfragmente jeweils ein Methionin eingefügt wurde, wurde das Fusionsprotein bei angenommener vollständiger Spaltung in insgesamt in fünf Teile geteilt. Die Proben wurden über Nacht unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag in der Speed Vac getrocknet.

### **2.8.5 C18-Umkehrphasen-HPLC**

Die C18-Umkehrphasen HPLC ist eine Methode, mit der sich unterschiedliche Proteine und andere Analyten auftrennen lassen. In dieser Arbeit diente die Methode der weiteren Aufreinigung der nach Bromcyanspaltung entstandenen Proteinfragmente mit dem Ziel der Isolierung der gewünschten Filaggrin-2-Proteinfragmente. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie besteht aus einer stationären Phase, in diesem Fall einer Säule, und einer mobilen flüssigen Phase. Mittels Hochdruckpumpe werden die Analyten, hier das in Proteinfragmente gespaltene Fusionsprotein, in einem Laufmittel auf die Säule geleitet. Die getrockneten Proteinproben wurden zuvor in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen und die Säule mit 0,1 % TFA äquilibriert. Die verwendete Säule (Jupiter 5u C18 300Å, 150 x 2 mm, Phenomenex) besitzt an die Säulenmatrix gekoppelte unpolare hydrophobe C18-Alkylketten. Die hydrophoben Aminosäuren der über die Säule fließenden Analyten interagieren mit den Alkylketten und werden über nicht-kovalente Wechselwirkungen an der Säule gehalten. Die Auftrennung erfolgte über einen Gradienten aus Lösung A (0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O) und Lösung B (80 % Acetonitril (ACN) + 0,1 % TFA in

H<sub>2</sub>O). Der Gradient zwischen den beiden verwendeten Lösungen verlief kontinuierlich zwischen den angegebenen Zeitpunkten und die Flussgeschwindigkeit betrug 150 µl/min (siehe Tab. 2.2). Durch die kontinuierliche Erhöhung der Acetonitrilkonzentration verstärkten sich die Wechselwirkungen zwischen Acetonitril und der Säule. Somit wurden die Proteine von der Säule verdrängt und abhängig von der Stärke ihrer Wechselwirkungen mit den Alkylketten zu unterschiedlichen Zeitpunkten eluiert. Die Absorption des Eluats wurde bei den Wellenlängen 215 nm, 254 nm und 280 nm gemessen, wobei die Peptidbindungen von Proteinen bei 215 nm detektiert werden. Die Fraktionierung erfolgte manuell.

**Tab. 2.2: Zeitliche Gradientenänderung der Lösungen A und B bei konstanter Flussgeschwindigkeit**

Zeit t [min]	Lösung A: 0,1 % TFA in H <sub>2</sub> O [%]	Lösung B: 80 % ACN + 0,1 %TFA in H <sub>2</sub> O [%]	Flussgeschwindigkeit [µl/min]
0	100	0	150
1	100	0	
5	75	25	
50	60	40	
60	0	100	

Von den Fraktionen der eluierten Proben wurden jeweils einige Mikroliter entnommen, in der Speed Vac getrocknet und massenspektrometrisch analysiert. Die Fraktionen, in denen die Masse des jeweiligen Proteins enthalten war, wurden daraufhin zusammengegeben und lyophilisiert.

## 2.9 Proteinanalytik

### 2.9.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Um die Menge der hergestellten Proteine quantitativ zu erfassen, wurde eine photometrische Messung der Proteinproben durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Absorption von Licht durch die Proteine in einer Lösung bei einer bestimmten Wellenlänge. Über die gemessene Absorption kann mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes mit der Extinktion (Absorbanz des Materials für Licht der Wellenlänge  $\lambda$ )

$$E_{280nm} = \epsilon_{280nm} \times c \times d$$

( $E$  = Extinktion bei 280 nm,  $\epsilon_{280nm}$  = molarer Extinktionskoeffizient bei 280nm in  $M^{-1} cm^{-1}$ ,  $c$  = Konzentration in M,  $d$  = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers in cm)

die Konzentration der Proteine berechnet werden, da sich Konzentration und Extinktion in einem bestimmten Bereich niedrigkonzentrierter Lösungen proportional zueinander verhalten. Um den Extinktionskoeffizienten der Proteine zu ermitteln, wurde das ProtParam

Programm der ExPASy Bioinformatics Resource Portal Website (<http://web.expasy.org/protparam/>) genutzt, welches anhand der Aminosäuresequenz des Proteins einige von dessen chemischen und physikalischen Eigenschaften berechnet. Das Photometer wurde jeweils mit der Lösung, in der das Protein in den weiteren Proben vorliegt, auf den Nullwert eingestellt. Daraufhin wurden die entsprechenden Proteinlösungen auf die Messfläche gegeben und die Messung gestartet.

### 2.9.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie dient der analytischen Ermittlung der genauen Masse von Molekülen durch Ionisierung und nachfolgender Detektion der ionisierten Moleküle in einem Hochdruckvakuumssystem (Berg et al., 2011). Ein Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus drei Abschnitten. Im ersten Abschnitt, der Ionenquelle, werden die Moleküle ionisiert, im sich anschließenden Analysator werden die ionisierten Moleküle durch ein elektrisches Feld beschleunigt und trennen sich aufgrund ihres unterschiedlichen Massen-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) auf. Im Detektor werden die elektrischen Signale der Moleküle gemessen und daraus eine Masse errechnet. In dieser Arbeit wurden die im Folgenden genannten Proteine auf diese Weise untersucht.

Die Fusionsproteine, die nach der Auftrennung durch die Nickel-Affinitätschromatographie und der Entsalzung vorlagen, sowie die murinen Filaggrin-2-Proteinfragmente, die nach Auftrennung über der C18-HPLC vorlagen, wurden mithilfe der Elektronenspray-Ionisations-Methode (ESI-MS) im „*hybrid quadrupole orthogonal time offlight*“ Massenspektrometer analysiert. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mit einer Natriumlösung (40 µg/ml in 50 % 2-Propanol) in einem Bereich von 80-2000  $m/z$  (Masse/Ladungsverhältnis). Die getrockneten Proteinproben wurden in 80-100 µl Laufmittel (50 % Acetonitril, 50 % H<sub>2</sub>O, 0,2 % Ameisensäure) aufgenommen und mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 20 µl/min eingespritzt. Die Messung erfolgte im Positiv-Ionen-Modus.

Die Rohdaten wurden durch das MassLynxV4.0 Programm (Waters Micromass) kombiniert, das Massen-Ladungsverhältnis mit der MaxEnt1-Funktion in die Masse umgerechnet, der Hintergrund subtrahiert und die Peaks zentriert. Anhand der Ergebnisse wurden die im Massenspektrometer gemessenen Massen mit den theoretischen Massen der Proteine verglichen.

## 2.10 Antimikrobielle Testung

Die rekombinant hergestellten Proteine Filaggrin-2<sub>2060-2117</sub> und Filaggrin-2<sub>2080-2117</sub> wurden mittels des radialen Plattendiffusionstests auf eine eventuelle antimikrobielle Aktivität

getestet. Hierfür wurden die gramnegativen Bakterienstämme *E. coli* ATCC 11775 und *P. aeruginosa* NCTC 11446 gewählt, da das in einer früheren Arbeit getestete C-terminale Fragment des humanen Filaggrin-2 gegen diese Stämme wirksam war (Hansmann, 2008). Der radiale Plattendiffusionstest wurde freundlicherweise von Frau Silvia Voss, Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel, durchgeführt.

### 2.10.1 Radialer Plattendiffusionstest

Die Durchführung des radialen Plattendiffusionstests erfolgte aufbauend auf der entwickelten Methode von Steinberg und Lehrer (Steinberg und Lehrer, 1997). Für diesen Test wurden jeweils 8 ml TSB („Tryptic Soy Broth”)-Medium (Sigma) mit den entsprechenden Bakterien (*E. coli* und *P. aeruginosa*) beimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Es wurden jeweils 50 µl der Übernachtskulturen in 8 ml TSB-Medium überimpft und 2-2,5 h als Standkultur inkubiert. Ein Underlay (1 % (w/v) Agarose, 20 % (v/v) Tween 20, 1 % (v/v) TSB-Medium, 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2)) wurde erhitzt, auf 46 °C heruntergekühlt und jeweils 10 ml davon mit 50 µl der Bakteriensuspensionen vermischt und in Petrischalen gegeben. Nach Abkühlung wurden 3 mm Löcher in zuvor angefertigte Rasterfelder gestanzt. In diese Stanzlöcher wurden jeweils 5 µl Testlösung der Proteine (in 0,01 % Essigsäure gelöst) sowie die Positiv- und Negativkontrolle gegeben. Die Positivkontrolle enthielt 500 ng humanes Lysozym (100 ng/µl), ein Enzym, das erwiesen antibakteriell wirksam gegen die Testbakterien ist. Als Negativkontrolle diente 0,01 % Essigsäure. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das Overlay (1 % (w/v) Agarose, 3,4 % (w/v) Caseinpepton, 0,6 % (w/v) Sojamehlpepton, 0,5 % (w/v) D+ - Glukose-Monohydrat, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Kaliumhydrogenphosphat) wurde verflüssigt, auf 46 °C abgekühlt und jeweils 10 ml davon auf das mit Proteinen befüllte Underlay in der Petrischale gegossen und diese noch einmal bei 37 °C für 3-4 h inkubiert.

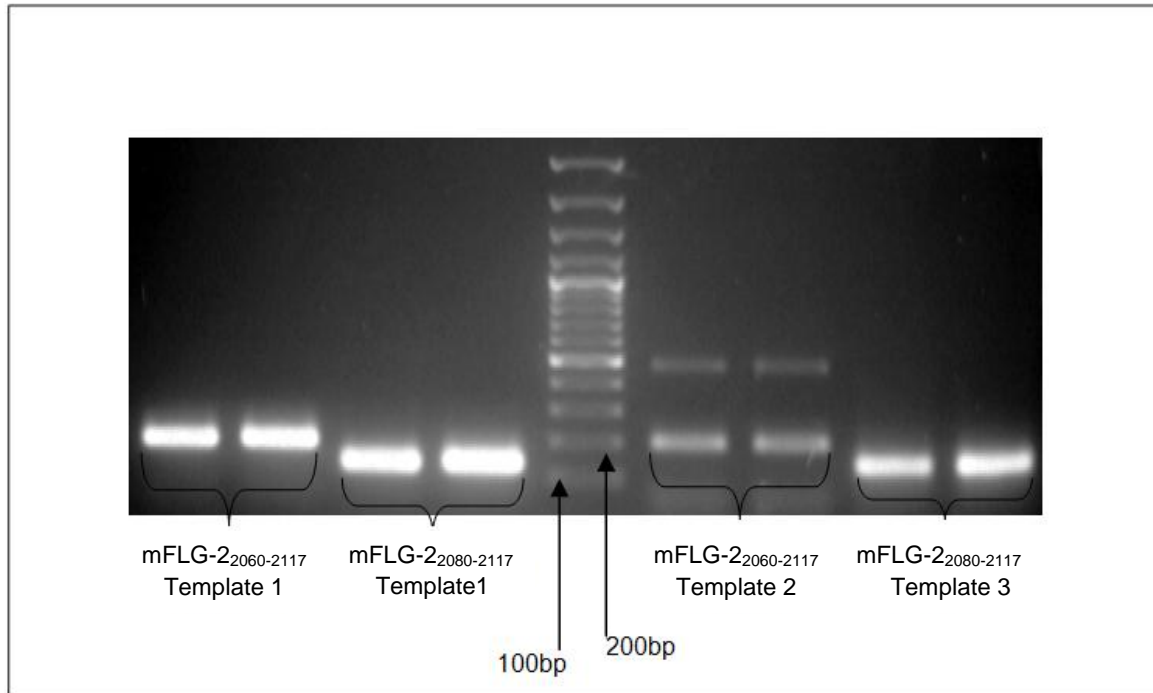
Die Bakterien als Testorganismen liegen gleichmäßig verteilt in dem Agarose-Underlay vor, während die Testlösungen im Idealfall radial aus den Löchern in die Agarose diffundieren. Wenn die Proteine antimikrobiell wirksam sind, entsteht um die Testlösungen in den Stanzlöchern ein Hemmhof, in dem keine Bakterienkolonien wachsen können. Der Durchmesser des Hemmhofes wird bestimmt und beurteilt. Hieraus kann die MEK (minimale effektive Konzentration) bestimmt werden, die als Maß für die antimikrobielle Wirksamkeit gilt (Steinberg und Lehrer, 1997).

### 3 Ergebnisse

Für verschiedene Fragmente des humanen epidermalen Proteins Filaggrin-2 wurde in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. Der antimikrobiell wirksame C-Terminus des Proteins enthält einen hochkonservierten Bereich, der spezieübergreifend vorhanden ist. Die Aufgabe dieser Arbeit war es nun zu ermitteln, ob dieser hochkonservierte Bereich oder ein Teil davon spezifisch für die antimikrobielle Aktivität verantwortlich ist. Dafür wurden zwei entsprechende murine Filaggrin-2-Proteinfragmente rekombinant hergestellt und hinsichtlich möglicher antimikrobieller Aktivität untersucht.

#### 3.1 Amplifizierung der Gensequenzen von mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub>

Zwei ausgewählte Abschnitte der Gensequenz des murinen Filaggrin-2-Proteins, die im Weiteren näher beschrieben sind, wurden zu Beginn vervielfältigt. Als Vorlage diente cDNA von der Haut bzw. vom Ballen einer BALB/c-Maus. Sie wurde freundlicherweise von der Arbeitsgemeinschaft unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Proksch zur Verfügung gestellt. Für das Protein mFLG-2<sub>2060-2117</sub> kodiert eine Nukleotidsequenz von 174 Basenpaaren die Aminosäuren 2060 bis 2117 des murinen Filaggrin-2. Das Protein mFLG-2<sub>2080-2117</sub> ist ein kürzeres Fragment, dessen Nukleotidsequenz 114 Basenpaare umfasst und entsprechend die Aminosäuren 2080 bis 2117 kodiert. Mithilfe der cDNA, den entsprechenden spezifischen Primern mFLG-2-2060-f, mFLG-2-2080-f und mFLG-2-2117-r sowie der *Pfu*-Phusion-Polymerase wurden diese Sequenzen in einer PCR amplifiziert (siehe 2.6.1.2). In einem mit Ethidiumbromid-gefärbten 1,5 %igen Agarose-Gel wurden die PCR-Proben elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.6.2) und unter UV-Licht sichtbar gemacht (siehe Abb. 3.1). Der Vergleich mit dem Marker Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder zeigte, dass die Banden im Bereich zwischen 100 und 200 bp lagen, wobei sich die beiden Fragmente innerhalb dieses Bereiches deutlich voneinander unterschieden. Die Banden, die dasselbe PCR-Produkt enthielten, wurden aus dem Gel extrahiert, zusammengefügt und mit 30 µl Tris-HCl-Puffer (10 mM) eluiert (siehe 2.6.3). Die Konzentration der DNA-Fragmente im Eluat wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.9.1).



**Abb. 3.1: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel mit PCR-Produkten unter UV-Licht**

Die PCR-Produkte sind elektrophoretisch aufgetrennt. Mittig ist der Größenstandard aufgetragen (mit Banden in 100 bp-Abständen bis 1000 bp, dann 1200 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp). Zu beiden Seiten finden sich die Banden der von unterschiedlichen Templates amplifizierten DNA von mFLG-2<sub>2060-2117</sub> (174 bp) und mFLG-2<sub>2080-2117</sub> (114 bp). Template 1: cDNA vom Ballen einer BALB/c-Maus, Template 2: cDNA vom Ballen einer BALB/c-Maus, Template 3: cDNA von der Haut einer BALB/c-Maus.

### 3.2 Klonierung im pJET1.2-System

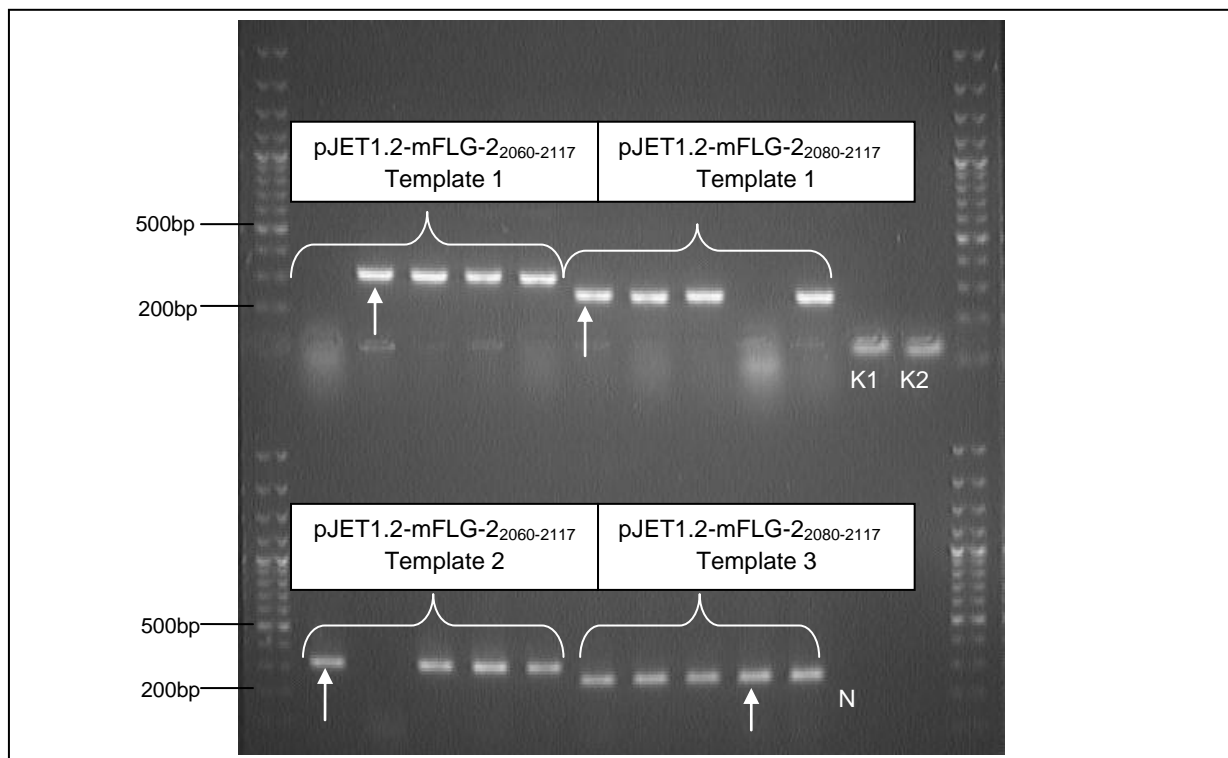
Um die DNA-Fragmente aus der PCR weiter vervielfältigen zu können, wurden sie mithilfe der T4-Ligase in den Klonierungsvektor pJET1.2 ligiert (siehe 2.6.4). Der Ligationsansatz wurde per Elektroporation in *E. coli* XL1blue-Zellen transformiert (siehe 2.6.5). Nach Inkubation im SOC-Medium für 1 h bei 37 °C wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, die entsprechend der Antibiotika-Resistenzgene des Klonierungsvektors und des Bakterienstammes mit Tetrazyklin und Ampicillin versetzt wurden (siehe Tab. 2.1). Als Negativkontrolle wurden auf einer der Antibiotika-haltigen Platten untransformierte XL1blue-Zellen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten auf Koloniebildung überprüft. Auf der Negativkontroll-Platte wuchsen keine Kolonien. Somit wurde sichergestellt, dass die Bakterien ohne Vektor nicht die notwendigen Resistenzen hatten, um sich auf dem Antibiotika-Agar zu vermehren. Von den Platten der transformierten Bakterien wurden pro Elektroporationsansatz jeweils fünf Klone gewählt, um sie mithilfe der Kolonie-PCR auf das Vorhandensein von Vektor inklusive Insert zu überprüfen (siehe 2.6.1.3). Für die PCR wurden die spezifischen pJET1.2-Primer genutzt, welche jeweils einige Basenpaare vor und nach der eingefügten DNA-Sequenz im Plasmid binden, sodass die PCR-Produkte jeweils 120 Basenpaare länger



## Ergebnisse

waren, als die in der ersten PCR generierten mFLG-2-DNA-Sequenzen (siehe 2.6.1.2). Des Weiteren wurden zwei Positivkontrollen, bestehend aus jeweils einem Teil des vorangegangenen Ligationsansatzes pro Filaggrin-2-Fragment benutzt. Eine Negativkontrolle, bestehend aus einem PCR-Ansatz ohne Template, wurde ebenfalls eingesetzt. Die PCR-Produkte sowie die Kontrollansätze wurden auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1,5 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Abb. 3.2 zeigt das Ergebnis. Mit einem Pfeil sind die Banden gekennzeichnet, deren positiv getestete Kolonien für eine Plasmidisolierung weiter verwendet wurden.



**Abb. 3.2: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel mit Kolonie-PCR-Produkten unter UV-Licht**

Die PCR-Produkte sind elektrophoretisch aufgetrennt. Randständig ist jeweils der Größenstandard aufgetragen. Die PCR-Produkte pJET1.2-mFLG-2<sub>2060-2117</sub> (294 bp) zeigen jeweils vier scharfe Banden und pJET1.2-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> (234 bp) zeigt bei Template 1 vier Banden, sowie fünf Banden bei Template 3. Mit einem Pfeil sind die Banden gekennzeichnet, deren Kolonien für eine Plasmidisolierung weiter verwendet wurden. N: Negativkontrolle. K1 und K2: Positivkontrollen.

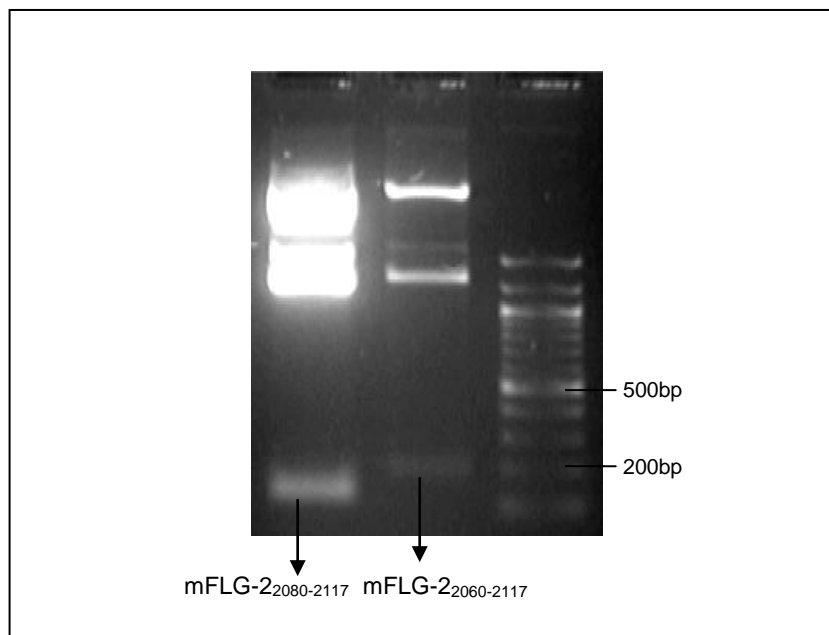
Es zeigten sich im Vergleich mit dem aufgetragenen Marker DNA-Fragmente mit einer ungefähren Größe von 300 bp, welche mit der errechneten Anzahl der Basenpaare von pJET1.2-mFLG-2<sub>2060-2117</sub> (294 bp) übereinstimmten und DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 200 und 300 bp, die die Sequenz von pJET1.2-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> (234 bp) darstellten. Die Negativkontrolle zeigte keine Bande. Die Positivkontrollen zeigten zwar jeweils eine Bande, deren Größe jedoch nicht mit den DNA-Fragmenten übereinstimmte. Es ist zu vermuten, dass die Kontrollansätze Vektoren enthielten, in die die murinen FLG-2 Fragmente nicht ligiert wurden, sodass nach der Kolonie-PCR nur wesentlich kleinere Plasmidfragmente

## Ergebnisse

vorhanden waren. Einige Spuren zeigten keine Bande, was darauf schließen ließ, dass in der getesteten Probe keine Bakterien mit Plasmid vorhanden waren.

Von den getesteten Kolonien mit positiver Bande wurden jeweils zwei Klone pro Fragment und Template ausgewählt, die über Nacht in einer Flüssigkultur mit jeweils 3 ml LB-Medium und der Antibiotikakombination Ampicillin und Tetrazyklin im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert wurden. Daraufhin wurde pro Fragment und Template eine Flüssigkultur ausgewählt, von der eine Plasmidisolierung durchgeführt wurde (siehe 2.6.6). Die Konzentration der Plasmide in 30 µl Elutionspuffer wurde photometrisch bestimmt. Für den nachfolgenden Schritt wurden die Plasmide pJET1.2-mFLG-2<sub>2060-2117</sub> (Template 2) und pJET1.2-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> (Template 1) ausgewählt.

Die eingefügten DNA-Fragmente sollten wieder aus dem pJET1.2-Plasmid entfernt werden, da dieser lediglich zur Vervielfältigung der Gensequenzen, jedoch nicht zur Expression der Proteine geeignet war. Zu diesem Zweck wurde eine Restriktionshydrolyse mit den Enzymen *Eco31I* und *XbaI* vorgenommen (siehe 2.6.7). Dadurch entstanden von der Sequenz her unterschiedliche „sticky ends“, die bei der Ligation in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor dazu führten, dass die Gensequenz nur in einer bestimmten Orientierung in den Vektor ligiert werden konnte und somit im späteren Verlauf richtig abgelesen wurde. Die Restriktionsansätze wurden für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und dann auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 1,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert (siehe Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel der Restriktionshydrolyse-Produkte**

Die Restriktionshydrolyse-Produkte sind elektrophoretisch aufgetrennt. Rechts ist der Größenstandard TriDye aufgetragen. Links im Bereich zwischen 100 und 200 bp zeigen sich die Produkte mFLG-2<sub>2060-2117</sub> (174 bp) und mFLG-2<sub>2080-2117</sub> (114 bp). Die Banden im oberen Bereich stellen die weiteren Restriktionshydrolyse-Produkte dar.

Durch die Restriktionshydrolyse entstanden sowohl die gewünschten murinen Filaggrin-2-DNA-Fragmente als auch die geschnittenen Plasmide (2974 bp), die sich in der Gelelektrophorese deutlich im höheren Basenpaarbereich zeigten. Die markierten Banden wurden aus dem Gel geschnitten, die DNA-Fragmente extrahiert und mit 20 µl Elutionspuffer eluiert (siehe 2.6.3) sowie die Konzentration photometrisch bestimmt.

### **3.3 Klonierung im pE-SUMO3-System**

Um die murinen Filaggrin-2-DNA-Fragmente in den Expressionsvektor pE-SUMO3 einfügen zu können, musste dieser zuerst ebenfalls über eine Restriktionshydrolyse mit dem Enzym *Eco31I* geschnitten werden. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde der Vektoransatz in einem mit Ethidiumbromid angefärbten 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt, der Vektor aus dem Gel extrahiert und mit 30 µl Elutionspuffer eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

#### **3.3.1 Transformation in *E. coli* XL1blue-Zellen**

Die Ligation der DNA-Fragmente mit dem pE-SUMO3-Vektor erfolgte mit achtfachem molarem Überschuss des Inserts zum Vektor (siehe 2.6.4). Zusätzlich wurde eine Kontroll-Ligation ohne Inserts angefertigt um zu überprüfen, ob der Vektor ohne Insert rezirkularisiert werden würde. Die ligierten Vektoren wurden per Elektroporation in *E. coli* XL1blue-Zellen transformiert (siehe 2.6.5). Nachdem die transformierten Bakterien auf Kanamycin- und Tetrazyklin-haltigen LB-Agarplatten Kolonien gebildet hatten, wurden einige Kolonien pro DNA-Fragment ausgewählt und mithilfe einer erneuten Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des Inserts überprüft (siehe 2.6.1.3). Die Platten mit Bakterien, die mit dem Kontroll-Ligationsansatz elektroporiert worden waren, zeigten keine Kolonien. Das ließ darauf schließen, dass der Vektor sich ohne entsprechendes Insert nicht rezirkularisieren ließ. Von den Kolonie-PCR-Produkten wurde eine mit Ethidiumbromid gefärbte 1 %ige Agarose-Gelelektrophorese angefertigt. Da die Kolonie-PCR mit dem fragmentspezifischen Reverse Primer und dem Sumo-Forward Primer durchgeführt wurde, welcher an eine Stelle im Plasmid 116 Basenpaare vor dem Fragment bindet, musste diese Anzahl an Basenpaaren dazugerechnet werden. Alle getesteten Kolonien zeigten im Gel Banden mit der jeweiligen korrekten Fragmentgröße. Es wurden pro Fragment jeweils zwei Kolonien ausgewählt und in Flüssigkulturen mit je 3 ml LB-Medium sowie den entsprechenden Antibiotika (Tetrazyklin und Kanamycin) über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die Plasmide aus der Flüssigkultur isoliert und mit 30 µl Elutionspuffer eluiert (siehe 2.6.6). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

### 3.3.2 DNA-Sequenzierung

Es wurden jeweils isolierte Plasmide von pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und von pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> zur Sequenzierung gegeben (siehe 2.6.8). Ein Plasmidansatz von pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> zeigte aufgrund der geringen Menge der DNA in der Sequenzierung kein verwertbares Ergebnis. Die Ergebnisse der anderen drei Plasmide wurden mit den Datenbanksequenzen des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) für murines Filaggrin-2 verglichen. Die in der Datenbank verwendete Sequenz stammt von dem Mausstamm 129/SvJ. Der Vergleich der Basensequenzen für mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub> ist in Abb. 3.4 gezeigt.

129/SvJ	AATCATTTC AATCAACCATTAGTGGTAACCA <u>G</u> TATGATTC CAGTCAATCCTCGAGACAT	60
BALB/c	AATCATTTC AATCAACCATTAGTGGTAACCA <u>A</u> TATGATTC CAGTCAATCCTCGAGACAT	60
	*****.*****	
129/SvJ	GGCAGCTATGGGCCTCAAGACTATGACTATGGTCA <u>G</u> TCTGGGTATGGACCTTCTGGAAGG	120
BALB/c	GGCAGCTATGGGCCTCAAGACTATGACTATGGTCA <u>T</u> TCTGGGTATGGACCTTCTGGAAGG	120
	*****↑*****	
129/SvJ	TTGAGAAGTAACAGCCAGAGTTCTATTCCTTTCAGTTCTGCACATAGAGCAACA	174
BALB/c	TTGAGAAGTAACAGCCAGAGTTCTATTCCTTTCAGTTCTGCACATAGAGCAACA	174
	*****	

**Abb. 3.4: DNA-Sequenzvergleich für mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub>**

Die Abb. zeigt den Vergleich zwischen der DNA-Sequenz des Mausstamms 129/SvJ der NCBI-Datenbank für mFLG-2<sub>2060-2117</sub> (jeweils in der oberen Zeile) und der sequenzierten DNA-Sequenz des Proteins mFLG-2<sub>2060-2117</sub> von dem Mausstamm BALB/c (jeweils in der unteren Zeile). Die unterstrichene DNA-Sequenz stellt die kodierende DNA-Sequenz des kürzeren Proteins mFLG-2<sub>2080-2117</sub> dar. Die Sternchen kennzeichnen übereinstimmende Basen. Der Punkt kennzeichnet eine stumme Mutation. Der Pfeil kennzeichnet eine Mutation, die sich durch Änderung der Aminosäure äußert. Verglichen mithilfe des Programms ClustalW der Website The European Bioinformatics Institute.

Bei dem DNA-Sequenzvergleich fiel an der Base 2033 der murinen Filaggrin-2-DNA-Sequenz im Basentriplett CAG eine stumme Mutation zu CAA auf. Diese führte allerdings zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz. Die Base an der Stelle 2096 war ebenfalls verändert. Das kodierende Basentriplett CAG war hier ersetzt durch CAT. Dies führte zu einer Änderung der Aminosäure. Der Aminosäurenvergleich von mFLG-2<sub>2060-2117</sub> zur Datenbanksequenz ist in Abb. 3.5 dargestellt.

129/SvJ	NHFQSTISGNQYDSSQSSRHGSYGPQDYDY <u>G</u> SGYGPSGRLRSNSQSSIPFSSAHRAT	58
BALB/c	NHFQSTISGNQYDSSQSSRHGSYGPQDYDY <u>H</u> SGYGPSGRLRSNSQSSIPFSSAHRAT	58
	*****:*****	

**Abb. 3.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen für mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub>**

In der oberen Zeile ist die Proteinsequenz des Mausstamms 129/SvJ der NCBI-Datenbank für mFLG-2<sub>2060-2117</sub> zu sehen. Darunter ist die Aminosäuresequenz für das rekombinant herzustellende Protein zu sehen. Das Sternchen kennzeichnet übereinstimmende Aminosäuren. Der Doppelpunkt zeigt an, dass die Aminosäuren nicht übereinstimmen, aber einander in Bezug auf ihre biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind. Die unterstrichenen Aminosäuren stellen das kürzere Protein mFLG-2<sub>2080-2117</sub> dar, das dieselbe Mutation aufweist.

Die Translation der Nukleinsäuresequenz in die Aminosäuresequenz und der Vergleich der Sequenzen erfolgten mit dem Programm ClustalW2 der Website The European Bioinformatics Institute.

## Ergebnisse

Im Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Mausstämme fiel bei der Aminosäure an der Stelle 2091 die Mutation der Aminosäure Glutamin zur Aminosäure Histidin auf. In ihren biochemischen Eigenschaften ähneln sich die beiden Aminosäuren. Diese Veränderung war in allen sequenzierten Ansätzen gleich. Es wurde zusätzlich von vier weiteren Kolonien eine Sequenzierung durchgeführt, die dasselbe Ergebnis zeigte.

Da zuerst angenommen wurde, dass nur die Maus, von der die cDNA stammte, die Mutationen aufwies, wurde der gesamte Ablauf wie in 3.1 bis 3.3 dargestellt mit neuer cDNA aus der Haut einer anderen BALB/c-Maus wiederholt. Sie wurde freundlicherweise ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Proksch zur Verfügung gestellt. In jeweils zwei weiteren Sequenzierungsansätzen pro DNA-Fragment zeigten sich dieselben Mutationen wie in der ersten Sequenzierung. Bei einem weiteren, den C-Terminus des murinen Filaggrin-2 umfassenden Fragment, das im Rahmen einer anderen Arbeit in der Arbeitsgruppe sequenziert worden war, zeigte sich ebenfalls die gleiche stumme Mutation. So lässt sich vermuten, dass die unterschiedlichen Mausstämme eine stammspezifische Veränderung der DNA-Sequenz besitzen.

Daraufhin wurde mit den zuerst sequenzierten DNA-Fragmenten weitergearbeitet.

### **3.3.3 Transformation in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen**

Es wurden die drei Plasmide ausgewählt, deren Sequenzen in der Sequenzierung erfolgreich analysiert werden konnten. Per Elektroporation wurden die Plasmide in die *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen transformiert und die Bakterien auf LB-Agarplatten mit der Antibiotikakombination Kanamycin und Chloramphenicol über Nacht bei 37 °C inkubiert (siehe 2.6.5). Nach Durchführung einer Kolonie-PCR (siehe 2.6.1.3) zeigte sich bei der Gelelektrophorese auf Ethidiumbromid-haltigem 1,5 %igen Agarose-Gel, dass alle geprüften Kolonien die Plasmide aufgenommen hatten.

Da sich nun die murinen Filaggrin-2-DNA-Sequenzen korrekt eingefügt im Expressionsvektor befanden und dieser wiederum erfolgreich in Bakterien transformiert wurde, in denen eine Proteinherstellung mittels Genexpression induzierbar war, konnte diese eingeleitet werden.

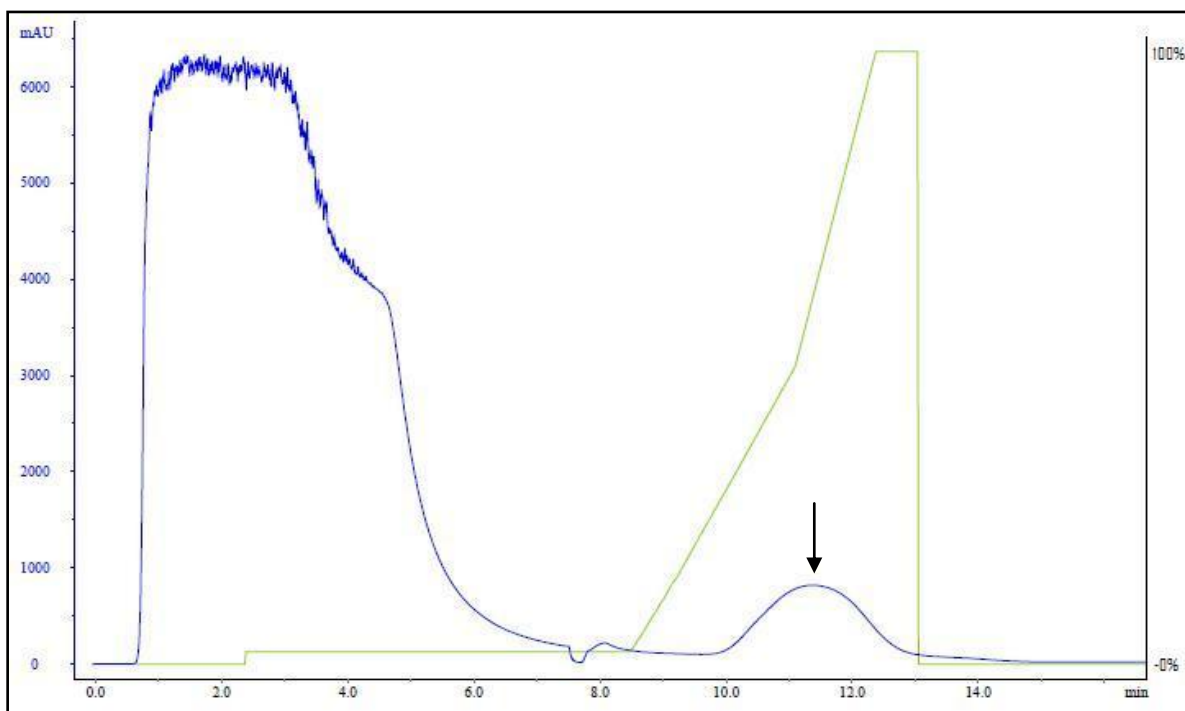
## **3.4 Herstellung und Aufreinigung der Fusionsproteine**

Pro Fragment wurde jeweils eine positiv getestete Kolonie ausgewählt und in einer LB-Flüssigkultur mit der Antibiotikakombination Chloramphenicol und Kanamycin im Schüttelinkubator bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit IPTG induziert (siehe 2.7). Durch Lyse der Bakterien wurde der Zellinhalt mitsamt den produzierten Proteinen freigesetzt und die bakterielle DNA durch Einsatz von Ultraschall fragmentiert

## Ergebnisse

(siehe 2.8.1). Mittels Zentrifugation wurde das Zellysate von den pelletierbaren Zelltrümmern getrennt und der Überstand sterilfiltriert, um die hergestellten Proteine, die zunächst noch im Proteingemisch vorlagen, zu erhalten.

Die Abtrennung des rekombinanten pE-SUMO3-mFLG-2-Fusionsproteins von den restlichen bakteriellen Proteinen wurde mithilfe der Nickelsäulen-Affinitätschromatographie durchgeführt (siehe 2.8.2). In der Abb. 3.6 ist exemplarisch die Auftrennung des pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> zu sehen, bei der zuerst die ungebundenen Proteine ohne His-Tag durchflossen und dann die gebundenen Fusionsproteine durch Konzentrationsanstieg des Imidazols im Elutionspuffer von der Säule eluiert wurden. Nach ca. zehn Minuten wurde das Fusionsprotein pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> eluiert.

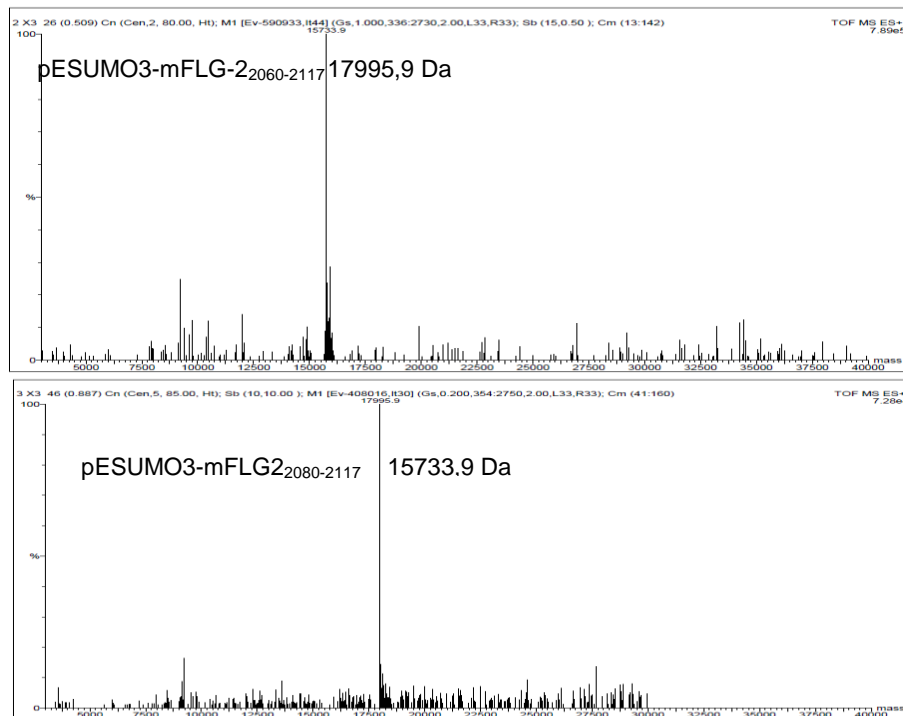


**Abb. 3.6: Chromatogramm der Nickelsäulen-Affinitätschromatographie des Fusionsproteins pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2080-2117</sub>**

In dem Chromatogramm ist die Absorption bei 215 nm in mAU (blaue Linie) sowie der Konzentrationsanstieg des Imidazol-haltigen Elutionspuffers in Prozent (grüne Linie) in Abhängigkeit von der Zeit in min dargestellt. Der UV-Peak zu Beginn beinhaltet die ungebundenen Proteine. Der mit Pfeil gekennzeichnete UV-Peak ab 10 min beinhaltet das Fusionsprotein.

Nach dieser Auftrennung des Fusionsproteins wurde eine Entsalzung des Nickelsäulen-Eluats mithilfe der Gelfiltrationschromatographie durchgeführt (siehe 2.8.3). Die Entsalzung war notwendig um die nachfolgenden Schritte, wie die Bromcyanspaltung, durchführen zu können. Die Fusionsproteine lagen nach der Entsalzung in Wasser gelöst vor.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den eluierten Proteinen um die erwarteten Fusionsproteine handelte, wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt und ausgewertet (siehe 2.9.2). Die nachfolgende Abb. 3.7 zeigt das Ergebnis.



**Abb. 3.7: Massenspektren der Fusionsproteine**

Die Intensität der massenspektrometrisch analysierten Proteine in Prozent des höchsten Peaks ist in Abhängigkeit der Masse in Da dargestellt.

Das Fusionsprotein pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2060-2117</sub> mit einer theoretisch errechneten Masse von 17995,5 Da zeigte sich in der Messung mit einer Masse von 17995,9 Da. Das Fusionsprotein pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2080-2117</sub> mit theoretischer Masse von 15733,2 Da war in dem Peak mit 15733,9 Da wiederzufinden. Die Abweichung von 0,4 Da und 0,7 Da ist vermutlich auf die Kalibrierung des MS-Gerätes sowie auf kleine Messungenauigkeiten, die sich durch die Berechnung im Gerät potenzieren, zurückzuführen.

Die Eluate der gelchromatographischen Auftrennung wurden lyophilisiert, sodass die Proteine für den nächsten Schritt in lyophilisierter Form vorlagen.

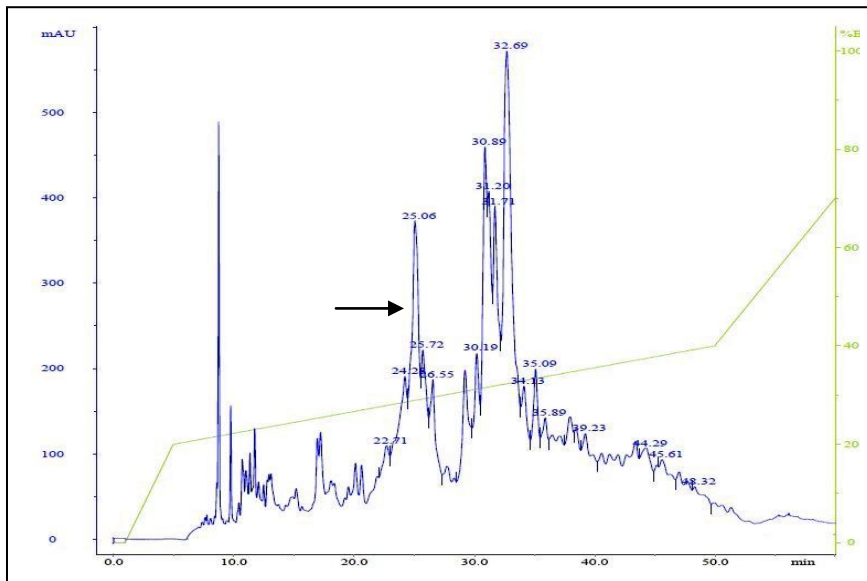
### 3.5 Spaltung und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Die Fusionsproteine, bestehend aus dem SUMO-Protein inklusive His-Tag und dem gewünschten Protein, wurden in 0,25 M HCl-Lösung aufgenommen und nachfolgend mit Bromcyan gespalten (siehe 2.8.4). Die Proben wurden nach der Spaltung in der Speed Vac getrocknet, um das Bromcyan wieder zu entfernen.

Es wurden jeweils 100 µg gespaltenes Fusionsprotein in 0,1 % TFA-H<sub>2</sub>O gelöst. Mithilfe der C18-Umkehrphasen-HPLC wurden die durch die Spaltung entstandenen Proteine voneinander getrennt (siehe 2.8.5). Da durch die Spaltung mit Bromcyan hinter jedem einzelnen Methionin des Fusionsproteins gespaltenen wurde, entstanden bei theoretischer vollständiger Trennung jeweils fünf Proteinabschnitte. Bei zusätzlich vorliegender unvollständiger Spaltung gab es noch viele weitere Spaltungsprodukte unterschiedlicher

## Ergebnisse

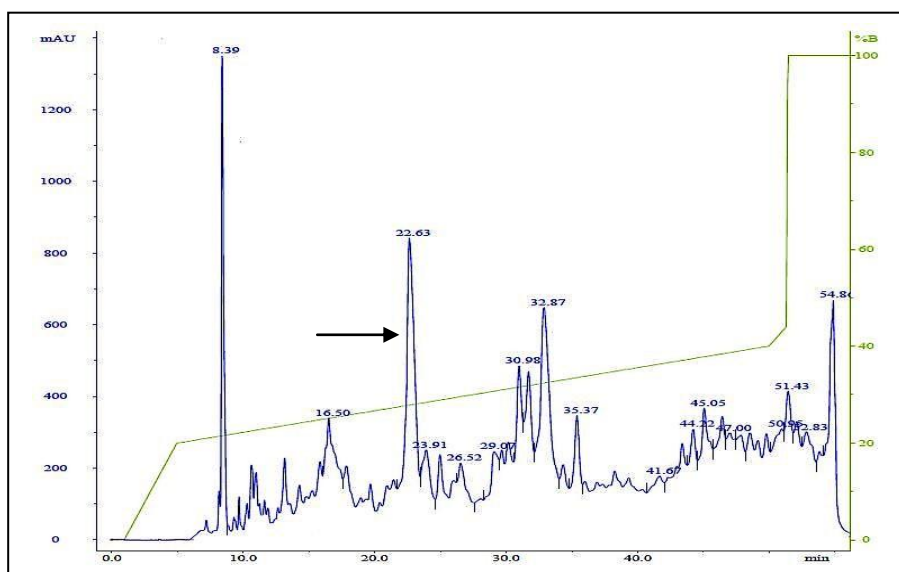
Größe. Bei dem zunächst verwendeten Standard-Gradienten folgten die UV-Peaks der Peptide dicht aufeinander und sie wurden somit direkt hintereinander eluiert. In den anschließenden MS-Messungen, war das gewünschte Protein zwar jeweils vorhanden, jedoch zu viele zusätzliche Peptide. Um die Proteine besser voneinander trennen zu können, musste der Gradient angepasst und eine geringere Steigung entwickelt werden, als bei dem zuerst verwendeten Standard-Gradienten. Ein repräsentatives Chromatogramm des Proteins mFLG-2<sub>2060-2117</sub> wird in der Abb. 3.8 gezeigt. Nach ca. 25 min wurde das Protein eluiert.



**Abb. 3.8: HPLC-Chromatogramm der Bromcyanspaltung des Proteins mFLG-2<sub>2060-2117</sub>**

Dargestellt ist die Absorption bei 215 nm in mAU (blaue Linie) sowie die Konzentration der Lösung B (80 % ACN/0,1 % TFA) in Prozent (grüne Linie) in Abhängigkeit von der Zeit in min. Der Pfeil markiert den Peak, der das Protein mFLG-2<sub>2060-2117</sub> beinhaltet.

Ein repräsentatives Chromatogramm für das Protein mFLG-2<sub>2080-2117</sub> ist in der Abb. 3.9 dargestellt. Hier wurde das Protein nach ca. 22,5 min eluiert.



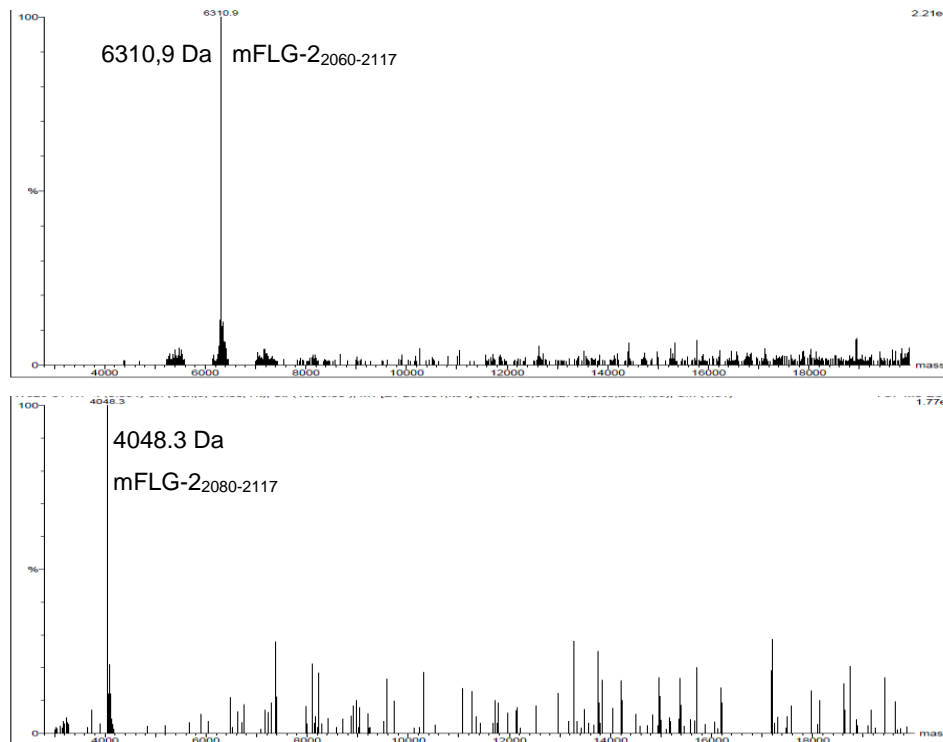
**Abb. 3.9: HPLC-Chromatogramm der Bromcyanspaltung des Proteins mFLG-2<sub>2080-2117</sub>**

Dargestellt ist die Absorption bei 215 nm in mAU sowie die Konzentration der Lösung B (80 % ACN/0,1 % TFA) in Prozent (grüne Linie) in Abhängigkeit von der Zeit in min. Der Pfeil markiert den Peak des Proteins mFLG-2<sub>2080-2117</sub>.



## Ergebnisse

Die massenspektrometrische Analyse beider Proteine wird in der folgenden Abb. 3.10 dargestellt.



**Abb. 3.10: Massenspektrometrisches Ergebnis der rekombinanten murinen Filaggrin-2-Abschnitte**

Die Intensität der massenspektrometrisch analysierten Proteine in Prozent des höchsten Peaks ist in Abhängigkeit der Masse in Da dargestellt.

### 3.6 Ergebnisse der antimikrobiellen Testung

Nachdem die rekombinanten murinen Filaggrin-2-Proteinabschnitte nach der HPLC-Auftrennung isoliert vorlagen, wurden die Proben der einzelnen HPLC-Läufe, die das eluierte gewünschte Protein enthielten, vereinigt und der antimikrobiellen Testung mittels des radialen Plattendiffusionstests zugeführt (siehe 2.10.1).

Beim Plattendiffusionstest wurde die antimikrobielle Aktivität der Proteine mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub> gegen die Bakterienstämme *E. coli* ATCC 11775 und *P. aeruginosa* NCTC 11446 gemessen, wobei die Konzentration der Proteine in den Testlösungen 1 µg/µl betrug. Die antimikrobielle Aktivität wurde anhand der Hemmhöfe mittels der daraus ableitbaren MEK beurteilt. Die Ergebnisse des Plattendiffusionstest sind in der Tab. 3.1 dargestellt.

**Tab. 3.1: Ergebnisse des radialen Plattendiffusionstest**

	<i>E. coli</i> ATCC 11775 Hemmhofdurchmesser	<i>P. aeruginosa</i> NCTC 11446 Hemmhofdurchmesser
mFLG-2 <sub>2060-2117</sub> (5 µg)	∅	∅
mFLG-2 <sub>2080-2117</sub> (5 µg)	∅	∅
Positivkontrolle mit Lysozym (500 ng)	2,5-3 mm	4,5 mm

## Ergebnisse

Bei dreimaliger Testung zeigten sich bei beiden Proteinen keine messbaren Hemmhöfe. Die Positivkontrolle mit Lysozym hatte hingegen jeweils einen klaren Hemmhof. Somit ist davon auszugehen, dass die ausgewählten murinen Filaggrin-2-Proteinabschnitte keine antimikrobielle Aktivität gegen die ausgewählten Bakterienstämme aufweisen. Das in einer früheren Arbeit in unserer Forschungsgruppe getestete C-terminale Fragment des humanen Filaggrin-2 war gegen die ausgewählten Stämme wirksam, weswegen sie für diese Arbeit verwendet wurden (Hansmann, 2008). Auf die Testung mit weiteren Bakterienstämmen, gegen die das C-terminale Fragment des humanen Filaggrin-2 bereits keine antimikrobielle Aktivität zeigte, wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Normalerweise wäre auch eine Testung in verschiedenen Verdünnungen der Proteinlösungen durchgeführt worden. Da die Herstellung größerer Mengen der Proteine jedoch sehr aufwendig war, wurde in diesem Fall bei bereits bestehender Unwirksamkeit der hergestellten Proteine in unverdünnter Lösung auf weitere Verdünnungsreihen verzichtet.

## 4 Diskussion

Die Haut ist, als flächenmäßig sehr großes Barriereorgan zwischen Mensch und Umwelt, ständig verschiedenen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen und Viren ausgesetzt. Zwischen  $10^2$  und  $10^7$  Mikroorganismen/cm<sup>2</sup> besiedeln lokalisationsabhängig die Haut (Schröder und Harder, 2005). Residente Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren und Protozoen bilden eine Gemeinschaft auf der Haut, die als Mikroflora bekannt ist. Mehr als 1000 Bakterienspezies gehören zu der humanen Mikroflora der Haut, wobei die am häufigsten vorkommenden residenten Bakterien an der Hautoberfläche die Staphylokokken, Propionibakterien, Mikrokokken und Corynebakterien sind (Christensen und Brüggemann, 2014). Viele weitere Mikroorganismen können transient und im Rahmen von Erkrankungen die Haut besiedeln. Doch trotz dieses engen Kontakts mit einer großen Menge an Bakterien kommt es nur selten zur Infektion, da der Körper effektive Abwehrmechanismen bereithält. Neben einer physikalischen Barriere und einem sauren pH wurde in den letzten Jahren eine weitere chemische Barriere zunehmend erforscht (Übersicht in Schröder und Harder, 2005). Diese besteht aus antimikrobiellen Lipiden (Übersicht in Drake et al., 2008) und antimikrobiellen Peptiden (Übersicht in Harder et al., 2007). Viele der antimikrobiellen Peptide sind kleine kationische Peptide, die Effektormoleküle der angeborenen Immunabwehr sind. Sie werden in der Haut hauptsächlich von den obersten Epithelzellen, den Keratinozyten, gebildet und lassen sich bisher in die vier Hauptgruppen der Defensine, Cathelicidine, S100-Proteine und Ribonukleasen unterteilen, sowie weitere Proteine, die keiner dieser Klassen zugeordnet werden können (Übersicht in Harder et al., 2007). Diese Peptide sind entweder direkt oder indirekt bakterizid oder bakteriostatisch, indem sie die Bakterien durch Zerstörung der Membranintegrität abtöten oder ihnen wichtige, essentielle Spurenelemente entziehen (Übersicht in Gläser et al., 2005; Schröder und Harder, 2005; Harder et al., 2007).

Nachdem bei rekombinant hergestellten Fragmenten von humanem Hornerin, einem Mitglied der „S100 fused-type“-Proteinfamilie, antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden konnte (Wu, 2005), wurden in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen an weiteren Proteinen der Familie durchgeführt. Bei verschiedenen Peptidfragmenten des N-terminalen Bereiches von humanem Profilaggrin konnte ebenfalls antimikrobielle Wirksamkeit ermittelt werden (Schulz, 2010; Karsch, 2011). Auch das humane Filaggrin-2-Protein zeigte in verschiedenen Bereichen N-terminal und C-terminal (Hansmann, 2008), sowie in einem B-Repeat (Junge, 2011) antimikrobielle Aktivität. Da des Weiteren anhand des Vergleichs mit vorhandenen Sequenzdaten herausgefunden wurde, dass eine C-terminale Aminosäuresequenz des Filaggrin-2-Proteins hochkonserviert in mindestens 25 verschiedenen Säugetierspezies vorkommt (Hansmann, 2008), sollte in dieser Arbeit erforscht werden, ob die beiden murinen

C-terminalen Peptide mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub>, die innerhalb dieser konservierten Sequenz liegen, ebenfalls antimikrobielle Aktivität enthalten.

#### **4.1 Problematik bei der Herstellung und Aufreinigung der murinen C-terminalen Filaggrin-2-Fragmente**

Nachdem die Keratinozyten-cDNA der beiden herzustellenden murinen Filaggrin-2-Fragmente in Plasmide ligiert und diese in *E. coli*-Zellen vervielfältigt und danach wieder isoliert wurden, wurden sie sequenziert (siehe 3.3.2). Hierbei stellte sich heraus, dass in beiden DNA-Sequenzen, die in mehreren Ansätzen von der cDNA einer BALB/c-Maus amplifiziert wurden, im Vergleich zu der Sequenz des Filaggrin-2 von dem Mausstamm 129/SvJ aus der Datenbank des NCBI zwei Punktmutationen vorhanden waren. Die Punktmutation der Base 6210 veränderte die Aminosäuresequenz nicht. Dagegen führte die Mutation der Base 6273 zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin zu Histidin und somit zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Glutamin hat eine Molmasse von 146,15 g/mol, einen isoelektrischen Punkt bei 5,65 und die Seitenkette ist hydrophil, geladen und polar. Histidin hat eine ähnliche Molmasse von 155,16 g/mol, der isoelektrische Punkt liegt jedoch höher bei 7,6 und die Seitenkette ist basisch. In einem sauren Milieu wie z. B. dem pH von ca. 5,5 der Haut liegen beide Aminosäuren hauptsächlich als Kationen vor. Steigt der pH-Wert jedoch an, liegt Glutamin durch den deutlich niedrigeren pI-Wert eher als Anion vor als Histidin und würde somit eine gegensätzliche Ladung besitzen, was durch Änderung von Wasserstoffbrückenbindungen Auswirkungen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins haben könnte. Da Histidin erst bei einem pH-Wert von über 7,6 die Ladung ändern würde, könnte vermutet werden, dass diese Aminosäure zu einer höheren Stabilität der Proteinstruktur beiträgt.

Da alle vier sequenzierten Ansätze dieselbe Mutation aufwiesen, hätte diese entweder in einem frühen Vervielfältigungsstadium wie z. B. den ersten Zyklen der ersten PCR stattfinden können. Dies ist jedoch unwahrscheinlich da verschiedene Templates und verschiedene PCR-Ansätze benutzt wurden. Oder aber die Maus, deren cDNA verwendet wurde, hätte diese Mutation als einzelnes Exemplar in sich tragen können. Daraufhin wurde zur Überprüfung dieses Ergebnisses von einer anderen BALB/c-Maus cDNA verwendet und die beiden DNA-Sequenzen wieder vervielfältigt und sequenziert. Es wurden auch bei diesen Sequenzierungen dieselben Mutationen gefunden wie zuvor. In unserer Arbeitsgruppe fiel nun noch ein weiteres Sequenzierungsergebnis einer zuvor rekombinant hergestellten murinen Filaggrin-2 DNA-Sequenz im Rahmen einer anderen nicht veröffentlichten Arbeit auf, die ebenfalls diese veränderte Aminosäuresequenz enthielt. Diese Sequenz stammte von einer weiteren Maus des BALB/c-Stammes und wies ebenfalls dieselben Mutationen auf.

Anhand dieser Ergebnisse wurde die Vermutung aufgestellt, dass die beiden unterschiedlichen Mausstämme BALB/c und 129/SvJ eine stammspezifische Veränderung ihrer DNA-Sequenz besitzen. Es wurde daraufhin mit den zuerst sequenzierten DNA-Fragmenten weitergearbeitet.

Die beiden DNA-Fragmente wurden in Vektoren ligiert und im Verlauf durch *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen als Fusionsproteine hergestellt. Diese Fusionsproteine wurden aufgereinigt und anschließend mit Bromcyan gespalten. Die nun entstandenen Filaggrin-2-Peptide sollten durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von den anderen Peptiden, die zum Fusionsprotein gehörten, getrennt werden (siehe 3.5.). Die Peptide (inklusive des Filaggrin-2-Peptids) entstanden durch die Spaltungsmethode mit Bromcyan, das jeweils hinter einem Methionin spaltet (siehe 2.8.4). Im SUMO3-Protein sind drei Methionine enthalten, ein weiteres Methionin wurde durch das Primerdesign vor das murine Filaggrin-2-Fragment eingefügt, um diese Aufspaltungsmethode nutzen zu können (siehe 2.6.1.1). Insgesamt enthielt das Fusionsprotein somit vier Methionine, sodass verschiedene Variationen von Peptiden als Spaltungsprodukte möglich waren. Normalerweise wird der SUMO3-Tag für eine Spaltung mit der SUMO Protease 2 verwendet. In vorangegangenen Dissertationen unserer Arbeitsgruppe wurde diese Spaltungsmethode verwendet, führte jedoch zu unvollständigen Spaltungen und Verlusten von Protein (Babian, 2010; Schulz, 2010; Karsch, 2011). In dieser Arbeit wurde die Bromcyan-Methode gewählt, da eine hohe Effizienz mit Proteinspaltungen von 90-100 % beschrieben ist (Andreev et al., 2010). Die Auftrennung des abgespaltenen Filaggrin-2-Proteins von den übrigen Tag-Fragmenten erwies sich allerdings als problematisch. Die Aufreinigung erfolgte zunächst in kleinerem Maßstab über eine Mikro-C18-Säule. Bei der ersten Auftrennung unter Nutzung eines gängigen Standardgradienten zeigte nur das kleinere Peptid mFLG-2<sub>2080-2117</sub> einen klar abzugrenzenden Peak, in dem das Peptid von der Säule eluiert wurde. Für mFLG-2<sub>2060-2117</sub> gab es hingegen keinen abgrenzbaren Peak. Der Gradient wurde daraufhin verändert, indem die Steigerung der eluierenden Lösung im Gradienten langsamer verlief (siehe 2.8.5). Daraufhin wurden beide Peptide mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub> ausreichend von den übrigen Fragmenten abgetrennt (siehe Abb. 3.8 und Abb. 3.9). Um nun größere Mengen der gespaltenen Fusionsprotein-Proben aufzureinigen zu können, sollte die Auftrennung statt mit einer Mikro-C18-HPLC (150 x 2 mm) mit einer größeren C18-Säule stattfinden. Zwei Auftrennungsversuche über eine größere C18-Säule (150 x 4,6 mm) führten allerdings nicht zu einer ausreichenden Abtrennung der gewünschten Proteine, ebenso wenig wie ein weiterer Versuch, die Auftrennung mittels einer C4-Säule durchzuführen. Des Weiteren wurde getestet, ob die beiden gewünschten Filaggrin-2-Peptide über eine Kationenaustauscher-Säule (Mini S PC 3.2/3, GE Healthcare) getrennt werden können, da die Peptide jeweils einen theoretisch berechneten hohen pI-Wert hatten und somit im

verwendeten Laufmittel (Tris 50 mM) über eine positive Nettoladung verfügen sollten. Im Gegensatz dazu müssten die restlichen Peptidfragmente, die theoretisch nach einer vollständigen Bromcyan-Spaltung entstanden waren und die einen theoretisch errechneten niedrigeren pI-Wert hatten, eine negative Nettoladung enthalten. Die gewünschten Peptide sollten daher zunächst an die aus Anionen gebildete Säulenmatrix binden und bei steigendem Salzgradienten von der Säule eluiert werden. Im Gegensatz dazu sollten die restlichen Peptide des Fusionsproteins aufgrund der geringer vorhandenen positiven Ladungen weniger stark an die Säule binden und früher eluiert werden, sodass eine zeitliche Auftrennung möglich wäre. Allerdings führte auch dieser Versuch zu keiner klaren Auftrennung der Peptide. Die Auftrennung der verbliebenen Proben aus der Bromcyanspaltung wurde daher weiterhin über die C18-Mikrosäule durchgeführt, um so genügend Material für die antimikrobielle Testung zu gewinnen. Um Verunreinigungen durch die im Rahmen der Auftrennung entstandenen Seitenpeaks insbesondere bei mFLG-2<sub>2060-2117</sub> (siehe Abb. 3.8) zu minimieren, wurde nur ein schmaler Hauptbereich des Peaks, der das gewünschte Protein enthielt, aufgefangen. Deshalb musste die Auftrennung aufgrund der geringen Säulenkapazität in vielen Durchgängen durchgeführt werden. Insgesamt erwies sich daher die Auftrennung der aus der Bromcyan-Spaltung der Fusionsproteine entstandenen Peptide mit sonst standardmäßig in der Arbeitsgruppe durchgeführten Aufreinigungsmethoden als schwierig und war nur unter größerem Aufwand möglich.

## 4.2 Antimikrobielle Aktivität von murinem Filaggrin-2

Nachdem Filaggrin-2 in unserer Arbeitsgruppe als neues Mitglied der „S100 fused-type“-Proteinfamilie (SFTP) identifiziert wurde (Wu, 2005) und bereits bei untersuchten Fragmenten weiterer Mitglieder dieser Proteinfamilie, wie Hornerin (Wu, 2005) und Profilaggrin (Schulz, 2010; Karsch, 2011), antimikrobielle Aktivität nachgewiesen wurde, erfolgte eine Genexpressionsanalyse sowie Funktionsuntersuchung des neu entdeckten Proteins (Hansmann, 2008; Wu et al., 2009a). Im Rahmen dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass bestimmte rekombinant hergestellte Abschnitte des humanen Filaggrin-2 ebenfalls antimikrobielle Aktivität besitzen. Im Radialdiffusionstest wurde durch Verdünnungsreihen und Messungen der Hemmhöfe die jeweilige Minimale Effektive Konzentration (MEK) als Maß für die antimikrobielle Aktivität bestimmt. Je niedriger die MEK ist, desto stärker ist das jeweilige Fragment antimikrobiell wirksam. Dabei zeigte eine Teilsequenz des N-terminalen Spacers mit einer MEK von 14,8 µM eine sehr geringe antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* ATCC 11303 (Hansmann, 2008). Ein weiteres Filaggrin-2-Fragment, welches das letzte B-Repeat und den C-Terminus enthielt, zeigte im Radialdiffusionstest mit einer MEK von 5,9 und 4,3 µM eine geringe Aktivität gegen *E. coli*

ATCC 11303 und *E. coli* ATCC 11775 sowie mit einer MEK zwischen 3,5 und 0,4  $\mu\text{M}$  eine moderate bis hohe Aktivität gegenüber diversen Pseudomonaden-Stämmen (Hansmann, 2008). Bei einer weiteren Analyse dieses Fragmentes, in der das letzte B-Repeat und der C-Terminus getrennt rekombinant hergestellt wurden, zeigte sich, dass lediglich der C-Terminus die antimikrobiellen Eigenschaften enthielt, da es nur bei seiner Testung im Radialdiffusionstest gegen die gleichen Bakterienstämme wie zuvor zu einer Hemmung des Bakterienwachstums kam (Hansmann, 2008). Die Hemmung durch den C-Terminus fiel allerdings mit einer höheren MEK geringer aus als die Hemmung durch das gesamte Fragment. Interessant war außerdem, dass ein zufällig entstandenes verkürztes C-terminales Fragment zwar auch noch antimikrobielle Aktivität aufwies, diese jedoch noch geringer war als die des C-Terminus allein (Hansmann, 2008). In einer weiteren Arbeit in unserer Forschungsgruppe wurde für ein rekombinant hergestelltes B1-Repeat des humanen Filaggrin-2 ebenfalls antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. Es zeigte mit einer MEK von 2,9  $\mu\text{M}$  eine moderate Aktivität gegen *E. coli* ATCC 11775 während die Aktivität gegen *P. aeruginosa* und *C. albicans* mit MEKs von 8,2 und 9,1  $\mu\text{M}$  eher gering war (Junge, 2011). Der C-Terminus des humanen Filaggrin-2 enthält einen spezieübergreifenden hochkonservierten Bereich, von dem aufgrund der hohen Konservierung vermutet wurde, dass er nicht nur im Menschen, sondern auch in vorkommenden anderen Säugetierarten eine wichtige Funktion einnehmen könnte (siehe Abb. 4.1 a) (Hansmann, 2008). Von den zwei in dieser Arbeit rekombinant hergestellten C-terminalen murinen Filaggrin-2-Fragmenten umfasst das längere Peptid die gesamte konservierte Region, das zweite kürzere Peptid beginnt in einem sehr stark konservierten Abschnitt der Region. Beide Filaggrin-2-Abschnitte wurden in der antimikrobiellen Testung gegen *E. coli* ATCC 11775 und *P. aeruginosa* NCTC 11446 getestet, zeigten jedoch keine antimikrobielle Wirksamkeit (siehe Tab. 3.1). Im Gegensatz dazu zeigten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass ein synthetisch hergestelltes murines Filaggrin-2-Fragment, das aus den Aminosäuren 2055 bis 2109 besteht (siehe Abb. 4.1b) im Radialdiffusionstest (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) eine Wirksamkeit mit Hemmhofbildung gegen *E. coli* (0,7 mm), *P. aeruginosa* (1,8 mm), *P. stutzeri* (3,3 mm) und *S. aureus* (1 mm) besitzt (Teders et al., 2014). Bei dem synthetisch hergestellten murinen Filaggrin-2-Fragment sind N-terminal im Vergleich zu FLG-2<sub>2060-2117</sub> zusätzlich die polaren neutralen Aminosäuren Glycin und Tyrosin sowie die basischen Aminosäuren Arginin und Histidin vorhanden, die im pH-Wert der Haut protoniert vorliegen, sodass sich eventuell Wasserstoffbrückenbindungen bilden können und die Proteinstruktur sich verändert. Somit ließe sich vermuten, dass die weiter N-terminal gelegenen Aminosäuren vor der hochkonservierten Region die Aktivität verbessern oder eventuell die Proteinstruktur verändern, sodass eine antimikrobiell aktive Struktur entstehen kann. Eine andere Vermutung wäre, dass die C-terminale Verkürzung eine Rolle spielt, da das synthetisch

hergestellte murine Filaggrin-2-Fragment im Vergleich zu mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub> C-terminal acht Aminosäuren weniger enthält. Diese acht Aminosäuren sind vorwiegend neutral (Serin 2x, Alanin 2x, Threonin, Phenylalanin) und nur wenige davon sind basisch (Arginin, Histidin). Somit könnte es sein, dass sich eine antimikrobielle Struktur, zum Beispiel durch Wasserstoffbrückenbindungen, besser ausbilden kann, wenn die neutralen Aminosäuren am C-terminalen Ende nicht mehr vorhanden sind.

Mensch	... SSRASHFQSHSERQRHGSSQVWKHGSGYPAEYDYGHTGYGPGSGSRKSI SNHLSWSTDSTANKQLSRH
Schimpanse	... SSRTSHFQSHSERQRHGSSQVWKHGSGYPAEYDYGHTGYGPGSGSRKSI SNHLSWSTDSTANKQLSRH
Orang-Utan	... SSRTSHFQSHSERQRHGSSQVWKHGSGYPAEYDYGHTGYGPGSGSRKSI SNHLSWSTDSTANKQLSRH
Rhesusaffe	... STRTSHFQSRSERQRHGSHVWKHGSGYPAEYDYGHTGYGPGSGRRKSI CNHLSWSTDSATNEQLSRH
Buschbaby	..... WTKTRVKSQWTHGSGYRAGYDYGQSGYGPAGAAEQKPFQAFWRFHRGKEQTWVPH
Spitzhörnchen	... QSESHFQSHNNRRSRHGSSQVWKHGSGYRSEYDYGHTGYGPGSGDRSSNYNSPLRSTYFTISKLDSIY...
Fledermaus	... QSGDTYKHGQAAGRQNRSSQRWRHGSGYCAEYDYGQSGYGPSSGSRSSSHNSPVRPRNRTENKQVSVH...
Igel	... RVPTAHNSQIHRRSRSSNEGWRHGSGYADYDYGQYGFPSGSGSRTSSRNPPFRSADTSTNKHVRRAHA
Igeltanrek	... QSRASHQSLLGGVQRHGSGQRWRHGSGYNSAYDYGQSGYGPSSGDKQTRNHNSSHEQMSYSSH
Spitzmaus	... GVGKTNHSES SGGHTHGSSWRHGSGYRAEYDYGQHGYPSSGSRANSRNPSPFRSDFRFTSQRFVSGQ...
Katze	... RSRVSHSQSLSGRQRHGSSQVWKHGSGYSAEYDYGQSGYGPSSGSRSSSHNSPFRSTERAANNQVSTHG
Hund	... HQSRVHSQSQHSQKQRHGSDQGWKHGSGYSAEYDYGQSGYGPSSGSRSSRNSSPFRSLDRAENNQVSTH...
Rind	... HFGKSHSTQISGRQRHRSQAWRHGSGYSAEYDYGQSGYGPSSGSRSSSHNSPFRSTDQAATKRASHH...
Schaf	..... RHSTQISGRQRHRSQAWRHGSGYSAEYDYGQSGYGPSSGSRSSRNSSPFRSTDRATTKRASHH...
Schwein	... QSGIGHSTHISKRQRNISQGWKHGSGYREYDYGQSGYGPSSGDISSQSESSDSEHSGASQRHSHAS...
Pferd	... QSGISHSQSLTGRQRHGSSQVWKHGSGYSAEYDYGQSGYGPSSGDRSSRNSSPFRSTERVANKQVSRH...
Elefant	... QPGANHSQSWSSQRQRHGSSQGWKHGSGYRAAYDYGESGYGPSSGSRASNHNNSQEQRCYFFD
Maus	... HYGRNHFS-TISGNQYDSSQSRHGSGYQDYDYGQSGYGPSSGRLRNSQSSIPFSSAHRATNMEVLP...
Ratte	... QSGTKHFQS-PISGNQYDSSQWRHGSGYREDYDYGQTYGPGSGSGTSNHNSSPMRSTHSATNMQASQR...
Meerschweinchen	... QYGSKHSQFNNGKHKHGSSQGWKHGSGYSEYDYGQSGYAPSAASRTNSQNSSSLRSPDITSTETS...
Kaninchen	... PSGTRHFHSQSSGRQRHGSSQVWKHGSGYQAEYDYGQSGYGPSSGSRSSNHNIPVRTTLVSVTQVYRHA
Pfeifhase	... QSGSRHFQSHSTGRQRHGSSQVWKHGSGYNSAYDYGHGFGYGPSSAGSRSSRNSSPEQQTDLASNKQMCIH...
Gürteltier	... XXXXNHSQSWVSEKQRHGSSQGWTHGSGYNTAYDYGQSGYGPSSRGSQ
Spitzmausbeutelratte	... AYGTROGHSLSEKQYGSYGNWKHGSGYGNADYDYGQTYGHSRDNRTSNNSPFPDQITFSLSRHG...
Schnabeltier	... QSGTSTYVQTGGRGRQRSSQVWKHGSGYGLAYDYGESGFGQSGHSTGSRNSPFGSSGRTGRQSSH...

4.1a

Mm (2055-2109) ...GHYGRNHFS-TISGNQ-YDSSQSRHGSGYQDYDYGQSGYGPSSGRLRNSQSSIPFSSAHRAT...  
 Mm (2060-2117) ...NHFS-TISGNQ-YDSSQSRHGSGYQDYDYGQSGYGPSSGRLRNSQSSIPFSSAHRAT...  
 Mm (2080-2117) ...GSYGPQDYDYGQSGYGPSSGRLRNSQSSIPFSSAHRAT...

4.1 b

Abb. 4.1: a) Vergleich von C-terminalen Sequenzabschnitten in putativen Orthologen von Filaggrin-2, b) Vergleich der murinen C-terminalen Filaggrin-2-Sequenzen

a) Die Sequenzen der putativen Orthologen des C-terminalen Filaggrin-2-Abschnittes, die mithilfe des BLAST-Programms von NCBI gesucht wurden, zeigen in einem Bereich von 53 Aminosäuren (schwarz umrahmt) eine hohe Konservierung. Aminosäuren, die in 13-23 Sequenzen identisch sind, sind hellgrau markiert; Aminosäuren, die in 24 oder allen 25 Sequenzen identisch sind, sind dunkelgrau markiert. Der Bindestrich steht für eine nicht vorhandene Aminosäure. (modifiziert aus (Hansmann, 2008))

b) Gezeigt sind die verschiedenen murinen C-terminalen Sequenzabschnitte von Filaggrin-2. Murin: Mm, Mus musculus. Mm (2060-2117) und Mm (2080-2117) stellen die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Abschnitte ohne antimikrobielle Aktivität dar, während Mm (2055-2109) einen weiteren synthetisch hergestellten Abschnitt darstellt, der jedoch antimikrobielle Aktivität aufweist. Die Bedeutung der Markierungen entspricht 4.1a.

Das C-terminale Fragment von humanem Filaggrin-2 wurde in immunhistochemischen Untersuchungen mithilfe eines Antikörpers in ekkrinen Schweißdrüsen, Zellen der Ausführungsgänge und im Lumen angefärbt. Diese Schweißdrüsen kommen in höchster Dichte an Hand- und Fußflächen vor, die häufiger mit Bodenflächen in Kontakt kommen. So wurde vermutet, dass die antimikrobielle Aktivität des C-Terminus gegen den bodentypischen Keim *Pseudomonas* eine wichtige Ergänzung der bereits bekannten



schweißtypischen antimikrobiellen Peptide (AMP) darstellt (Hansmann, 2008). Bei diesen AMP, die in ekkrinen Schweißdrüsen vorkommen, handelt es sich einerseits um Dermcidin-Peptide, die gegen *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* und *C. albicans* wirksam sind (Steffen et al., 2006) und andererseits um das Cathelicidin LL-37, das gegen *S. aureus* und *E. coli* bakterizid wirkt (Murakami et al., 2002). Beide wirken nicht oder in nur sehr geringem Ausmaß gegen Pseudomonaden. Zusätzlich wurde 2011 Lactoferrin im Schweiß nachgewiesen (Park et al., 2011), welches gegen *E. coli* (Tomita et al., 1991), Salmonellen, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* und *C. albicans* (Yamauchi et al., 1993) wirksam ist. So könnte vermutet werden, dass Filaggrin-2 und Lactoferrin in Bezug auf die Wirksamkeit gegen Pseudomonaden eine besondere Bedeutung zukommt.

Der murine Filaggrin-2-C-Terminus ließ sich mit demselben Antikörper wie beim humanen Filaggrin-2-C-Terminus (gerichtet gegen das letzte B-Repeat und den C-Terminus des humanen Filaggrin-2) in immunhistochemischen Untersuchungen verschiedener Epithelien der Maus detektieren. Es bestand ein gleiches epitheliales Vorkommensmuster im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*, zusätzlich wurde der C-Terminus in den filiformen Papillen der Zunge von Mäusen nachgewiesen. Dies unterstützte die Vermutung über den antimikrobiellen Schutz vor dem Bodenkeim *Pseudomonas*, da die Zunge der Maus bei Nahrungssuche und -aufnahme ständig im Kontakt mit dem Boden steht (Hansmann, 2008).

Filaggrin-2 scheint aber auch noch in anderen Körperregionen eine Rolle zu spielen, denn bei einer Analyse der Proteine in der humanen Zervikal- und Vaginalflüssigkeit wurden verschiedene Peptidfragmente gefunden. Diese Fragmente stammten sowohl aus der S100-Domäne als auch aus dem Bereich der B-Repeats sowie des C-Terminus des humanen Filaggrin-2 (Shaw et al., 2007).

Auch von anderen antimikrobiellen Peptiden wurde über antimikrobielle Aktivität des C-Terminus berichtet. So wurde für ein kurzes C-terminales Peptid von Calgranulin C (S100A12) aus der S100-Proteinfamilie im Sekret der Atemwege antimikrobielle Aktivität gefunden. Es weist antimikrobielle Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien wie *E. coli*, *P. aeruginosa* und dem Pilz *C. albicans* auf (Cole et al., 2001). Somit hat es in Bezug auf die gramnegativen Bakterien das gleiche Wirkspektrum wie das C-terminale Protein von Filaggrin-2.

Ein weiteres antimikrobielles Protein ist das Cathelicidin LL-37, ein kationisches C-terminales Protein, das nach Spaltung von hCAP18 entsteht (Sørensen et al., 2001). Es kommt im Sekret ekkriner Schweißdrüsen vor und wird in noch kleinere Peptide mit antimikrobieller Wirkung prozessiert (Murakami et al., 2004). So scheinen die C-Termini einiger Proteine eine Funktion im Rahmen der antimikrobiellen Abwehr einzunehmen.

### 4.3 Antimikrobieller Wirkmechanismus des C-Terminus von Filaggrin-2

Der genaue antimikrobielle Wirkmechanismus des C-Terminus von Filaggrin-2 ist derzeit noch nicht bekannt. In unserer Forschungsgruppe wurde jedoch ein Vergleich des C-Terminus mit Lasso-artigen Bacteriocinen erstellt. Es wurden Sequenzmotive der Präkursorproteine von Lasso-artigen Bacteriocinen (Maksimov et al., 2012) mit dem hochkonservierten Bereich des Filaggrin-2-C-Terminus verglichen. Beispielhaft ist dies in Abb. 4.2 zu sehen, in der Microcin J25 aus *E. coli* als klassisches Lariat mit einem C-terminalen Abschnitt von humanem Filaggrin-2 verglichen wird. Microcine werden von diversen Stämmen der Enterobakterien, insbesondere von *E. coli* gebildet (Baquero und Moreno, 1984). Einige *E. coli* besitzen Plasmide, die das Gencluster für das Präkursorprotein McjA enthalten (Salomón und Farías, 1992). Das im Verlauf hieraus hergestellte Microcin J25 besteht aus 21 Aminosäuren und bildet eine Lasso-Ringstruktur aus (Blond et al., 1999). Seine antimikrobielle Aktivität richtet sich gegen die gramnegativen Bakterien *E. coli* (die das kodierende Plasmid für McjA nicht enthalten), Salmonellen und Shigellen (Salomón und Farías, 1992). Es nutzt den Eisen-Aufnahmetransporter FhuA um über die äußere Bakterienmembran empfindlicher Bakterienstämme zu gelangen (Salomón und Farías, 1993). Nachfolgend gelangt das Peptid über den TonB-Weg und das SbmA-Protein durch die innere Bakterienmembran (Salomón und Farías, 1995). In der Zelle blockiert es die bakterielle RNA-Polymerase (Yuzenkova et al., 2002). Zusätzlich wird angenommen, dass es die bakterielle Atmungskette unterbricht und somit einen bakteriostatischen Effekt hat (Vincent et al., 2004).

<u>Molekül</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Spezies</u>
Microcin J 25	GGAGHVPEYFVIGITPISFYG	<i>E. coli</i>
Filaggrin-2 (2342- 2369)	... QVWKHGSYGPAEYDYGHTGYGPGGSRK...	Mensch

**Abb. 4.2: Sequenzvergleich von Microcin J25 und einem C-terminalen Abschnitt von Filaggrin-2**

Gezeigt ist ein Sequenzvergleich des Lasso-Peptids Microcin J25 mit einem Abschnitt des C-Terminus von Filaggrin-2. Für die Struktur und Funktion des Lariats wichtige Aminosäuren und deren potenzielles Äquivalent sind farblich markiert. Rosa bzw. blau: Aminosäuren, die an der Ringbildung beteiligt sind; grün: Aminosäuren zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies; lila: Aminosäuren, die an der Erkennung durch ein Transmembranprotein beteiligt sind; orange: voluminöse Aminosäuren, die den C-Terminus im Lasso-Ring verankern.

Für die Ausbildung einer Lasso-Ringstruktur im Lariat sind die Aminosäuren Glycin und Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure essentiell (siehe Abb. 4.2) und kommen in den Sequenzmotiven von Lasso-artigen Bacteriocinen mit einem Abstand von acht bis neun Aminosäuren vor (Maksimov et al., 2012). Auch im hochkonservierten C-Terminus von Filaggrin-2 sind diese Aminosäuren vorhanden. Im Lariat sind die voluminösen Aminosäuren

Phenylalanin und Tyrosin für die Arretierung des C-terminalen Schwanzes im Lasso-Ring wichtig (Maksimov et al., 2012). Diese befinden sich zum Teil ebenfalls im hochkonservierten C-Terminus von Filaggrin-2. Außerdem ist die für den Wirkmechanismus wichtige Aminosäure Tyrosin hinter der Glutaminsäure und der Asparaginsäure vorhanden (Chalon et al., 2009).

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Filaggrin-2-C-Terminus nach Aufnahme durch gramnegative Bakterien durch die oben genannte Ähnlichkeit der Sequenzabschnitte mit den Lasso-Peptiden als alternatives Substrat der Synthese von Präkursorproteinen von Lasso-Microcinen dienen könnte. Mittels der bakterieneigenen Enzyme könnte es in ein Lasso-Microcin-Analogon umgesetzt werden, welches nachfolgend die Bakterien abtötet. Diese Hypothese wurde überprüft, indem die für die Ausbildung der Lassostruktur wichtigen Aminosäuren im Filaggrin-2-C-Terminus durch rekombinant hergestellte Mutationen zu Alanin ersetzt wurden. Dadurch hätte sich ein eventuell bestehender Ring nicht mehr bilden können und der Filaggrin-2-C-Terminus hätte seine antimikrobielle Aktivität verloren. Da der antimikrobielle Wirkverlust jedoch nicht eintrat, konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse sind bislang noch nicht veröffentlicht.

In einer neueren Arbeit wurde die antimikrobielle Aktivität rekombinant hergestellter Proteinfragmente von humanem Filaggrin-2 im Radialdiffusionstest gemessen (Hansmann et al., 2015). Hierbei zeigte der C-Terminus eine hohe Wirksamkeit in der Abtötung von *P. aeruginosa* ATCC 33354. Ein längeres Fragment, bestehend aus dem B-Repeat 14 und dem C-Terminus, hatte eine geringere minimale effektive Konzentration zur Abtötung der Bakterien als der alleinige C-Terminus, was auf eine Wirkverstärkung durch das zusätzliche Repeat schließen lässt (Hansmann et al., 2015). Nach Inkubation des B-Repeat 14/C-Terminus-Proteins mit *P. aeruginosa* wurde mittels Immunfluoreszenz die Aufnahme des Fragments in die Bakterienzellen nachgewiesen. Ebenso wurde nach Inkubation eine Blasenformation mit nachfolgender Lyse der Bakterien in der Transmissionselektronenmikroskopie beobachtet (Hansmann et al., 2015). Die Blasenbildung bei *P. aeruginosa* wird als Zeichen der Zerstörung der bakteriellen Zellhülle (Sawyer et al., 1988) oder DNA-Schädigung (Macdonald und Kuehn, 2013) beschrieben. Im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurde eine Anreicherung des Fragments an und in der Bakterienmembran sowie den Blasen gesehen (Hansmann et al., 2015). Eine Zerstörung der Integrität der äußeren Bakterienmembran durch das Filaggrin-2-Fragment wurde mittels eines Lysozym-Assays getestet, war jedoch nicht vorhanden (Hansmann et al., 2015). Mittels eines Electromobility Shift Assays wurde gezeigt, dass sowohl der B-Repeat 14/C-Terminus als auch der alleinige C-Terminus mit linearisierter und ebenso mit ringförmiger Plasmid-DNA interagiert (Hansmann et al., 2015). In einer Dot Blot Analyse

konnte die Bindung des B-Repeat 14/C-Terminus an die DNA der *P. aeruginosa*-Bakterien mithilfe eines gegen das Fragment gerichteten Antikörpers nachgewiesen werden (Hansmann et al., 2015). Nachfolgend wurde die Inhibition einer Plasmid-Replikation in *E. coli*-Bakterien durch den B-Repeat 14/C-Terminus nachgewiesen (Hansmann et al., 2015). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das untersuchte Filaggrin-2-Fragment mit dem Membran-assoziierten bakteriellen Replikationskomplex interagiert und durch Inhibition der Replikation zum Zelltod führt (Hansmann et al., 2015).

### **4.4 Rolle von antimikrobiellen Peptiden und Filaggrin-2 in Hauterkrankungen**

Das Vorkommen von antimikrobiellen Peptiden (AMP) in den beiden häufigen chronischen Hauterkrankungen Psoriasis und atopische Dermatitis wurde bereits in einigen Studien untersucht. Dabei zeigte sich zunächst in läsionaler psoriatischer Haut eine erhöhte Expression von diversen antimikrobiellen Peptiden im Vergleich zu läsionaler atopischer Haut, die dagegen eine verminderte Menge an AMP enthielt (Übersicht in Harder et al., 2007). Eine später erfolgte große Studie, die die Bildung und die *in vivo*-Sekretion von AMP in der Haut von Patienten mit Psoriasis bzw. atopischer Dermatitis im Vergleich mit gesunder Haut systematisch maß, zeigte jedoch, dass die konstitutiv gebildeten AMP RNase 7 und Psoriasin sowie die induzierbaren AMP hBD-2 und hBD-3 im Vergleich zur gesunden Haut bei beiden Hauterkrankungen vermehrt gebildet und sezerniert wurden (Harder et al., 2010). Übereinstimmend mit den vorherigen Studien zeigte sich, dass die absolute Menge an AMP in atopischer Haut geringer war im Vergleich zur absoluten Menge in psoriatischer Haut (Harder et al., 2010).

Für das Protein Filaggrin-2 gibt es einige wenige Untersuchungen zu dessen Vorkommen in den beiden Hauterkrankungen. Im Vergleich zwischen Menschen mit gesunder Haut und Menschen mit atopischer Dermatitis wurde das Protein Filaggrin-2 bei atopischer Dermatitis vermindert gebildet (Pellerin et al., 2013). Auch innerhalb der Krankheit gab es Unterschiede zwischen läsionalen Regionen und nicht betroffenen Regionen atopischer Haut: in den Hautläsionen war die Expression von Filaggrin-2 nochmal geringer ausgeprägt (Broccardo et al., 2011; Pellerin et al., 2013). Bei Patienten mit der Hautkrankheit Psoriasis zeigte sich eine verminderte Bildung in läsionaler Haut im Gegensatz zu den nicht betroffenen Regionen (Wu et al., 2009a). In derselben Studie fanden sich in der Bildung von Filaggrin-2 keine Unterschiede zwischen läsionaler Haut und nicht betroffenen Regionen der Haut bei Patienten mit atopischer Dermatitis ebenso wie im Vergleich zu gesunden Probanden, allerdings war die untersuchte Gruppe, bestehend aus drei Patienten, nicht groß und somit eventuell nicht repräsentativ (Wu et al., 2009a).

Um weitere Erkenntnisse über die Rolle von Filaggrin-2 in epithelialer Barrieredysfunktion zu erhalten, wurde das murine Filaggrin-2 als mögliches Ortholog zum humanen Filaggrin-2 in einem EFAD(essential fatty acid deficiency)-Maus-Modell untersucht. In diesem Modell, das zu einer metabolisch induzierten Barrieredysfunktion der Haut ähnlich einem Ekzem führt, wurde eine Verminderung von Filaggrin-2-mRNA gefunden (Hansmann et al., 2012). Gleichzeitig stieg die Bildung der mRNA des verwandten Proteins Filaggrin im EFAD-Maus-Modell an. Diese gegensätzliche Regulation führte zu der Hypothese, dass Filaggrin *in vivo* eine kompensatorische Rolle gegenüber Filaggrin-2 einnimmt (Hansmann et al., 2012).

Viele Studien haben eine hohe Assoziation zwischen Mutationen in der DNA von Filaggrin und dem Ekzem bei der atopischen Dermatitis festgestellt und sind bereits metaanalysiert worden (Übersicht in Rodriguez et al., 2009). Es wäre vorstellbar, dass das Protein Filaggrin-2, das in Teilen eine homologe Struktur zu Filaggrin aufweist und ähnliche Funktionen haben könnte (siehe 1.1.4) ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere inne hat (Broccardo et al., 2011). In einer relativ neuen Studie, in der das Vorkommen von den verwandten Proteinen Filaggrin, Filaggrin-2 und Hornerin bei Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu gesunden Probanden untersucht wurde, zeigte sich für alle drei Proteine ein vermindertes Vorkommen in läsionaler und nicht-läsionaler Haut der Patienten mit atopischer Dermatitis (Pellerin et al., 2013). Proinflammatorische Moleküle wie IL-4, IL-13 und IL-25 verminderten sowohl das Vorkommen von Profilaggrin als auch von Hornerin und Filaggrin-2 in einer Keratinozytenkultur, sodass angenommen wurde, dass die inflammatorische Antwort der Haut bei Patienten mit atopischer Dermatitis die Bildung dieser Proteine vermindert (Pellerin et al., 2013). Diese Studie zeigte somit im Rahmen der Erkrankung eine gleichartige Veränderung der drei strukturverwandten Proteine, die zu einer verminderten terminalen Differenzierung der Keratinozyten und somit zu einer gestörten Barrierefunktion der Haut führt (Pellerin et al., 2013). Für Filaggrin-2 und Hornerin wurden mittlerweile wie bei Filaggrin Mutationen gefunden, die in einem statistischen Zusammenhang mit der Krankheit stehen könnten (Greisenegger et al., 2013; Elias und Wakefield, 2014). Bei afrikanischen Patienten mit atopischer Dermatitis wurden Mutationen im *Filaggrin-2*-Gen gefunden, die mit einer stärkeren Persistenz der Krankheit assoziiert sind (Margolis et al., 2014).

Insgesamt sind allerdings erst relativ wenige Studien zu dem SFTP-Familienmitglied Filaggrin-2 veröffentlicht worden, sodass verschiedene Funktionen angenommen werden, aber noch nicht bewiesen sind. So muss in der Zukunft die genaue Funktion von Filaggrin-2 als epidermales Barriereprotein und die Wirkweise der antimikrobiellen Aktivität genauer erforscht und untersucht werden. Auch der Zusammenhang zwischen der veränderten Expression des Proteins und verschiedenen Hauterkrankungen bedarf noch genauerer Beleuchtung.

## 4.5 Antimikrobielle Peptide als Therapeutika

Die genaue Erforschung der Struktur, Funktion und Wirkweise der antimikrobiellen Peptide (AMP) gegenüber Mikroorganismen ist sehr wichtig, da diese eine Option für neue Behandlungsalternativen zu herkömmlichen Antibiotika gegenüber Infektionen darstellen können. Seitdem das Antibiotikum Penicillin von Alexander Flemming entdeckt wurde, sind sehr viele weitere Antibiotika entwickelt worden und werden im klinischen Alltag in großer Menge eingesetzt. Doch schnell entstanden Resistenzen der Bakterien gegenüber den eingesetzten Antibiotika durch den häufigen direkten Kontakt. Gerade der Einsatz von Antibiotika in geringen, subletalen Dosen führte zu einer verstärkten Mutationsrate und somit zu diversen Kreuzresistenzen in den Mikroorganismen, die Bakterien mit den Eigenschaften einer „Multiple Drug Resistance“ (MDR) entstehen ließen (Kaufmann und Hung, 2010). Zudem wurden in den letzten Jahrzehnten nur wenige neue Antibiotikaklassen auf den Markt gebracht. Besonders neue Antibiotika für die Behandlung der gramnegativen Bakterien fehlen (Marr et al., 2006).

Als nun die AMP gefunden und bekannt wurden, wurden sie auch als alte evolutionäre Waffen bezeichnet, da sie vielfältig in der gesamten Pflanzen- und Tierwelt vorhanden sind und vermutlich eine fundamentale Rolle in der Entwicklung von multizellulären Organismen gespielt haben (Zasloff, 2002). Als Mitglieder der angeborenen Immunabwehr können sie Infektionen durch Mikroorganismen abwehren, ohne vorher schon mit den fremden Pathogenen in Kontakt getreten zu sein (Brown und Hancock, 2006). Ihre große Vielfalt wird unter anderem durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen erreicht, die verschiedene Sekundär-Strukturen bilden. Die kationischen AMP lassen sich in vier Strukturklassen unterteilen lassen: die  $\alpha$ -Helices, die  $\beta$ -Faltblatt Peptide, „loop-structured“ Peptide und die „extended“ Peptide (Oyston et al., 2009). Den meisten kationischen AMP ist jedoch die Tertiärstruktur gemein, in der sie amphipathische Moleküle bilden, deren meist positiv geladener hydrophiler Bereich mit der negativen geladenen Bakterienmembran interagieren kann, während der lipophile Bereich die Penetration in die Lipidphase der Bakterienmembran erleichtert (Baltzer und Brown, 2011).

Es gibt nun verschiedene Vorteile, die aus der therapeutischen Nutzung der AMP hervorgehen können: Man kann sie potenziell auf verschiedene Arten applizieren, entweder als alleinigen antimikrobiell wirksamen Stoff, in Kombination mit anderen bereits existierenden Antibiotika, um einen synergistischen Effekt zu erzielen und deren Potenz zu verstärken oder als immunmodulatorische bzw. Endotoxin-neutralisierende Komponenten (Zasloff, 2002). Außerdem beinhalten die meisten AMP eine Breitspektrum-Aktivität gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien, sowie teilweise ebenfalls gegenüber Pilzen und Viren. Die Potenz gegenüber diesen Mikroorganismen ist zwar nicht so stark wie die von herkömmlichen Antibiotika, aber der entscheidende Vorteil ist, dass die AMP

gegenüber MDR-Bakterien in normalen Konzentrationen trotzdem wirksam sind (Marr et al., 2006). Gezeigt wurde diese Wirksamkeit schon gegen MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) und Pseudomonaden, die resistent gegenüber verschiedenen Antibiotika waren; sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einem Ratten-Lungen-Modell, das die Krankheit Zystische Fibrose widerspiegelt, wurden gute Ergebnisse erzielt (Zhang et al., 2005). Im Vergleich mit den Antibiotika zeigen AMP eine sehr schnelle bakterizide Wirksamkeit im Minutenbereich. Ebenso wie herkömmliche Antibiotika haben sie verschiedene Ziele an und in den Bakterien, die sie angreifen können. Sie können an die Membran binden, deren Integrität verändern und Poren bilden, an Autolysine binden und so die Lyse der Zielzelle initiieren oder sie translozieren durch die Membran und führen intrazellulär zur Inhibition zahlreicher intrazellulärer Vorgänge, ohne die ein Bakterium nicht überleben kann (Übersicht in Brogden, 2005). Ein weiterer großer Vorteil ist die Möglichkeit der Neutralisierung von Endotoxinen bei einer Sepsis. Zusätzlich können einige AMP die Antwort des angeborenen Immunsystems weiter stimulieren und gleichzeitig die überschießende inflammatorische Reaktion des Körpers etwas dämpfen (Marr et al., 2006). Der Einsatz von Antibiotika war durch eine relativ schnelle Resistenzentwicklung gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu scheint die Resistenzentwicklung bei AMP sehr viel seltener und langsamer zu erfolgen und Kreuzresistenzen sind aufgrund der großen Vielfalt der Peptide sehr selten (Marr et al., 2006). Einige Resistenzmechanismen sind allerdings bereits bekannt. So haben grampositive Bakterien die Möglichkeit entwickelt, AMP durch Proteasen zu degradieren und damit zu inaktivieren oder Proteine zu produzieren, die gebunden an der Zellmembranoberfläche oder extrazellulär frei vorkommend AMP binden und somit den Zugang zur Membran des Bakteriums verhindern (Nawrocki et al., 2014). Des Weiteren gibt es Resistenzmechanismen, die durch eine Verminderung der negativen Nettoladung der äußeren Bakterienmembran dazu führen, dass die kationischen AMP nicht mehr elektrostatisch angezogen werden und so der Kontakt zur Bakterienmembran nicht mehr zustande kommt (Nizet, 2006). In ein paar Fällen scheinen aktive Efflux-Pumpen AMP wieder hinauszuschleusen und so deren intrazelluläre Wirkung zu verhindern (Nizet, 2006). Auch die Möglichkeit einer Störung der Induktionswege für die Expression von AMP oder im Gegenzug die Aktivierung von Signalwegen zur Herunterregulierung der AMP-Produktion scheint zu bestehen (Nizet, 2006). Experimentell konnte demonstriert werden, dass nach wiederholtem Kontakt Resistenzen gegenüber einem AMP in *E. coli*- und *P. fluorescens*-Stämmen entstanden, die an die nachfolgenden Generationen vererbt wurden (Perron et al., 2006). So muss weiterhin intensive Forschung über die Wirkweise der AMP und Resistenzmechanismen der Bakterien betrieben werden, bevor AMP als neue Therapeutika großflächig eingesetzt werden, da sonst Gefahr besteht, dieselbe Problematik der Resistenzentwicklung von Antibiotika auf die AMP zu übertragen (Baltzer und Brown, 2011).

Da viele AMP humanen Ursprungs sind, wäre es sehr gefährlich, wenn eine Resistenzentwicklung stattfände. Bisher durch den menschlichen Körper bekämpfbare Bakterien könnten dann viel einfacher in den Körper eindringen und großen Schaden anrichten.

Es wurden jedoch bereits schon einige AMP zur therapeutischen Nutzung entwickelt. Ein synthetisch hergestelltes Analogon zu Magainin, dem AMP des Frosches (Zasloff, 1987), genannt Pexiganan, wurde entwickelt. Es sollte für die Behandlung von infizierten diabetischen Fußulzera benutzt werden, zeigte eine gute Wirksamkeit und wurde allein deswegen von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) nicht zugelassen, weil es im Vergleich zu den schon vorhanden antibiotischen Behandlungsmöglichkeiten keine höhere Effektivität zeigte (Moore, 2003). Weitere AMP befinden sich in verschiedenen Phasen der Testung (Zasloff, 2002; Zhang und Falla, 2006). Einige wenige AMP haben jedoch die Zustimmung des FDA erhalten und sind schon seit längerer Zeit auf dem Markt und in klinischer Benutzung: Die aus Bakterien stammenden AMP Polymyxine und Gramicidin S werden topisch bei Infektionen mit *P. aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* appliziert und sind klinisch sicher und effektiv mit bislang nur geringer Resistenzentwicklung. Für den systemischen Gebrauch sind sie in klinisch genutzten Dosen allerdings zu toxisch für den menschlichen Körper (Marr et al., 2006). Colistin, oder auch Polymyxin E genannt, wird hingegen sogar intravenös gegeben um Lungeninfektionen bei Cystische Fibrose-Patienten zu behandeln (Conway et al., 1997). Ein vielversprechendes synthetisches AMP, das von dem bovinen Indolicidin abstammt und Omiganan genannt wird, befindet sich in der klinischen Testung als topische Anwendung gegen Akne und Katheter-assoziierte Infektionen (Übersicht in Wiesner und Vilcinskas, 2010). Derzeit wird die Sicherheit und Effektivität der Applikationsform als Gel bei Akne in einer Phase III-Studie getestet (ClinicalTrials.gov.). Eine weitere Phase III-Studie untersucht derzeit die Sicherheit in der topischen Langzeitanwendung von Omiganan als Gel bei Patienten mit Rosazea (ClinicalTrials.gov.). Bei Katheter-assoziierten Infektionen zeigte sich in einer Phase III-Studie mit 1400 Patienten bereits eine gute Wirkung mit Reduktion der Katheterkolonisation und der Katheter-assoziierten lokalen Infektionen im Vergleich zu Povidon-Iod (Übersicht in Wiesner und Vilcinskas, 2010). Als sehr wirksam im Breitspektrumbereich gegen resistente Bakterien und Pilze zeigte sich das Derivat des humanen Lactoferrins hLF1-11 *in vitro* und in Maus- sowie Kaninchenmodellen (Übersicht in Wiesner und Vilcinskas, 2010). Es wurde entwickelt, um bakterielle und Pilzinfektionen bei Patienten nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation zu behandeln und in einer klinischen Phase I-Studie zeigte es ein sehr geringes Nebenwirkungsprofil bei einer guten Verträglichkeit sowohl bei gesunden Probanden als auch bei stammzelltransplantierten Patienten (van der Velden et al., 2009). Zwei Phase IIa-Studien wurden begonnen um hLF-11 bei Patienten mit systemischer



Candidose und mit Bakteriämie durch *S. epidermidis* zu testen. Diese Studien wurden jedoch 2014 und 2015 aufgrund nicht ausreichend rekrutierbarer Patientenzahlen zurückgezogen (ClinicalTrials.gov.; ClinicalTrials.gov.).

Der Herstellung und Verbreitung der AMP als therapeutische Mittel stehen noch einige Schwierigkeiten im Weg. Einige eingesetzte AMP sind toxisch gegenüber humanen Zellen, lösen allergische Reaktionen aus oder sie verlieren ihre Wirkung unter den physiologischen Eigenschaften salziger Körperflüssigkeiten und des humanen Serums. Die geringe Stabilität und die Anfälligkeit für Proteasen müssen ebenso noch verbessert werden. Nicht zuletzt sind die Kosten der Herstellung zurzeit noch sehr hoch und verhindern so eine Massenanfertigung. Um die Kosten zu vermindern, müssen einerseits Systeme angefertigt werden, in denen die AMP in reiner Form in großer Menge angefertigt werden können, andererseits müssen die Peptide möglichst klein sein, um kostengünstig produziert werden zu können (Marr et al., 2006; Baltzer und Brown, 2011).

Insgesamt ist in der Forschung und der industriellen Herstellung noch viel Arbeit zu leisten, um die neuen antimikrobiell wirksamen Substanzen klinisch erfolgreich einsetzen zu können. Doch sie bieten bereits jetzt eine gute Aussicht auf einen alternativen Weg für die Behandlung der mit immer mehr Resistenzen gegen herkömmliche Antibiotika behafteten Mikroorganismen.

## 5 Zusammenfassung

Die Haut ist als flächenmäßig großes Organ ständig mit der Umwelt und den darin vorkommenden Mikroorganismen in Kontakt. Damit der Organismus den Umwelteinflüssen nicht schutzlos ausgeliefert ist, hat die Haut eine Abwehrfunktion inne, die durch eine physikalische und eine chemische Barriere gebildet wird. Zu der chemischen Barriere gehören auch die antimikrobiellen Peptide (AMP). Diese werden zum Teil von wichtigen Strukturproteinen der Haut abgespalten. Von den AMP wird vermutet und in Studien erforscht, dass sie an der Hautoberfläche durch verschiedene Mechanismen bakterio- statisch, bakterizid und/oder fungizid wirken.

Zu den Strukturproteinen der Haut gehört unter anderem die im „Epidermalen Differenzierungskomplex“ des humanen Chromosoms 1q21 kodierte Proteinfamilie der „S100 fused-type“-Proteine. Diese Proteinfamilie beinhaltet das in unserer Arbeitsgruppe neu entdeckte Protein Filaggrin-2. Neben verschiedenen Funktionen in der epidermalen Differenzierung enthält Filaggrin-2 mehrere Bereiche, die antimikrobiell aktiv sind. So zeigten ein in unserer Arbeitsgruppe rekombinant hergestelltes N-terminales Protein, das B1-Repeat und der C-Terminus antimikrobielle Aktivität insbesondere gegen gramnegative Bakterien. Des Weiteren wurde im C-Terminus eine Aminosäuresequenz entdeckt, die hochkonserviert in 25 verschiedenen Säugetierspezies vorhanden war.

In dieser Arbeit wurde nun die antimikrobielle Aktivität von zwei Proteinfragmenten des C-Terminus vom murinen Filaggrin-2 als Ortholog zum humanen Filaggrin-2 untersucht. Diese Proteine mFLG-2<sub>2060-2117</sub> und mFLG-2<sub>2080-2117</sub> lagen innerhalb des hochkonservierten Abschnitts des C-Terminus. Sie wurden rekombinant hergestellt und im Radialdiffusionstest gegen *E. coli* und *P. aeruginosa* auf antimikrobielle Aktivität getestet. Im Gegensatz zu einem synthetisch hergestellten, weiter N-terminal beginnenden und C-terminal verkürzten murinen C-Terminus-Fragment zeigten sie jedoch keine antimikrobielle Wirksamkeit gegen die getesteten gramnegativen Bakterien. Dieses Ergebnis führte zu der Erkenntnis, dass die alleinige, hochkonservierte Aminosäuresequenz offensichtlich nicht oder nicht allein für die antibakterielle Wirkung verantwortlich ist, sondern dafür zusätzliche N-terminal gelegene Aminosäuren oder die C-terminale Verkürzung von Bedeutung sind. Es kann spekuliert werden, dass die zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren an der Ausbildung einer Struktur beteiligt sind oder Eigenschaften besitzen, die für die antimikrobielle Aktivität des C-Terminus essentiell sind.

Weitere intensive Forschung in Bezug auf das Protein Filaggrin-2 ist nötig, um zu verstehen welche Aminosäuren zusätzlich zu den getesteten C-terminalen Proteinfragmenten notwendig sind, damit die antimikrobielle Wirkung erzielt werden kann.

## 6 Anhang

### 6.1 Symbole

#### 6.1.1 Symbole für den Nukleinsäurecode:

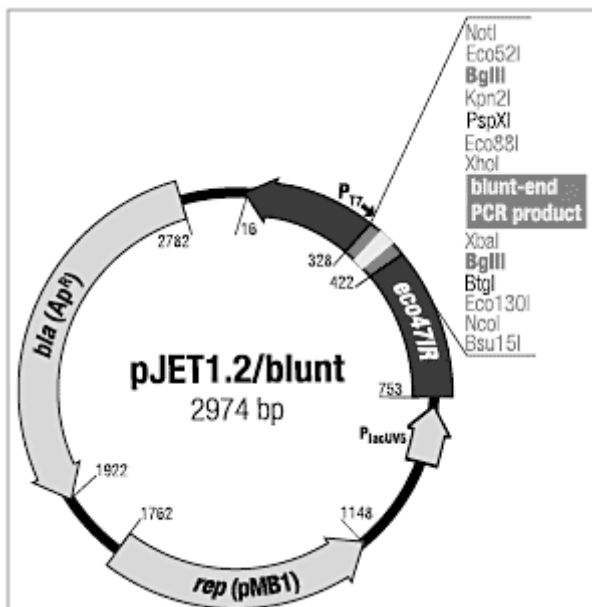
A Desoxyadenin      C Desoxycytidin  
G Desoxyguanosin    T Desoxythymidin

#### 6.1.2 Symbole des Einbuchstabencodes für kanonische Aminosäuren:

A Alanin	G Glycin	M Methionin	R Arginin	W Tryptophan
C Cystein	H Histidin	N Asparagin	S Serin	Y Tyrosin
D Asparaginsäure	I Isoleucin	O Pyrrolysin	T Threonin	
E Glutaminsäure	K Lysin	P Prolin	U Selenocystein	
F Phenylalanin	L Leucin	Q Glutamin	V Valin	

### 6.2 Vektorkarten

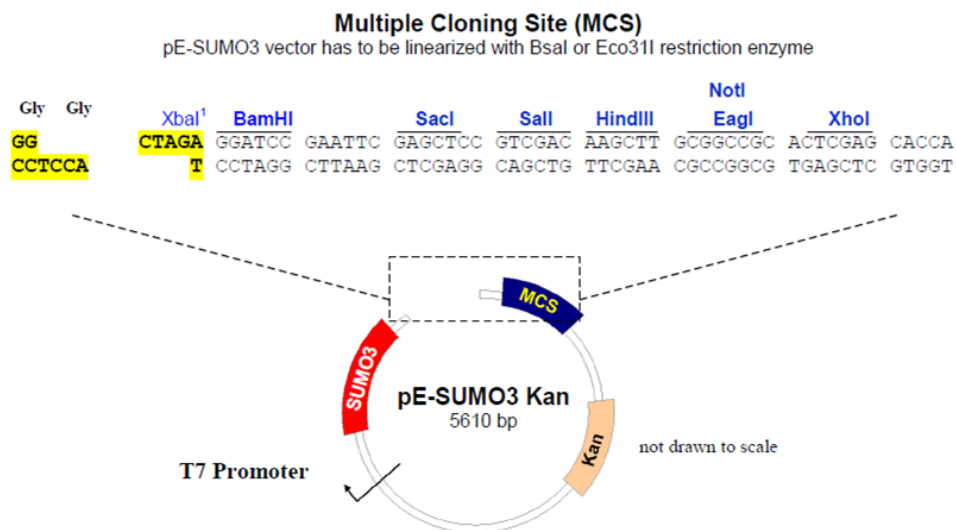
#### 6.2.1 pJET1.2/blunt-Vektor



**Abb. 6.1: Schematische Darstellung des pJET1.2/blunt-Klonierungsvektors**

Abgebildet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Wichtige Gensequenzabschnitte sind in grauen Kästen markiert (aus Map and Features of pJET1.2/blunt Cloning Vector, ThermoScientific).

## 6.2.2 pE-SUMO3-Vektor



**Abb. 6.2: Schematische Darstellung des pE-SUMO3-Expressionsvektors**

Abgebildet sind Schnittstellen für Restriktionsenzyme und als farbige Kästen wichtige Gensequenzabschnitte des Vektors. Kan: Gen für die Kanamycin-Resistenz, SUMO3: Gen für das SUMO3-Protein, MCS: „Multiple Cloning Site“ (aus Polylinker Map (pE-SUMO3-Vektor, T7, Kan), LifeSensors).

## 6.3 Proteinsequenzen und -daten

### 6.3.1 Daten für mFLG-2<sub>2060-2117</sub>

**Fusionsprotein: pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2060-2117</sub>**

Aminosäuresequenz:

GHHHHHHGSLQEEKPKEGVKTENDHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRF  
RFDGQPINETDTPAQLMEDEDTIDVFQQQTGGMNHFQSTISGNQYDSSQSSRHGSYGPQDYDYGHS  
YGPSRLRSNSQSSIPFSSAHRAT

Die rot markierte Aminosäure ist durch eine Punktmutation im kodierenden Basentriplet entstanden. In der Proteinsequenz des Mausstamms 129/SvJ aus der Datenbank des NCBI ist an dieser Stelle die Aminosäure Glutamin vorhanden. Die schwarze Aminosäure M steht für das zusätzlich eingefügte Methionin, das für die Abspaltung der mFLG<sub>2060-2117</sub>-Sequenz vom Fusionsprotein wichtig ist.

Anzahl der Aminosäuren:	160
Molekulargewicht [Da]:	17995.5
Theoretischer pI:	6.62
Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]	8940

**Proteinsequenz: mFLG-2<sub>2060-2117</sub>**

Aminosäuresequenz:

NHFQSTISGNQYDSSQSSRHGSYGPQDYDYG<sup>H</sup>SGYGPSGRLRSNSQSSIPFSSAHRAT

Anzahl der Aminosäuren	58
Molekulargewicht [Da]:	6310.5
Theoretischer pI:	8.41
Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]:	7450

**6.3.2 Daten für mFLG-2<sub>2080-2117</sub>**

**Fusionsprotein: pE-SUMO3-mFLG-2<sub>2080-2117</sub>**

Aminosäuresequenz:

GHHHHHGSLSLQEEKPKKEGVKTENDHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRF  
RFDGQPINETDTPAQLEMEDEDTIDVFQQQTGG<sup>M</sup>SGYGPQDYDYG<sup>H</sup>SGYGPSGRLRSNSQSSIPFSSA  
HRAT

Die rot markierte Aminosäure ist durch eine Punktmutation im kodierenden Basentriplet entstanden. In der Proteinsequenz des Mausstamms 129/SvJ aus der Datenbank des NCBI ist an dieser Stelle die Aminosäure Glutamin vorhanden. Die schwarze Aminosäure M steht für das zusätzlich eingefügte Methionin, das für die Abspaltung der mFLG<sub>2080-2117</sub>-Sequenz vom Fusionsprotein wichtig ist.

Anzahl der Aminosäuren:	140
Molekulargewicht [Da]:	15733.2
Theoretischer pI:	6.54
Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]:	7450

**Proteinsequenz: mFLG-2<sub>2080-2117</sub>**

Aminosäuresequenz:

GSYGPQDYDYG<sup>H</sup>SGYGPSGRLRSNSQSSIPFSSAHRAT

Anzahl der Aminosäuren:	38
Molekulargewicht [Da]:	4048.2
Theoretischer pI:	8.44
Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]:	5960

## 7 Literaturverzeichnis

- Alonso, L.; Fuchs, E. (2003): Stem cells of the skin epithelium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 Suppl 1, S. 11830–11835. DOI: 10.1073/pnas.1734203100.
- Andreev, Y.; Kozlov S.; Vassilevski A.; V. Grishin E. (2010): Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions, zuletzt geprüft am 09.01.2019.
- Babian, S. (2010): Untersuchungen zur Rolle des Profilaggrin-Proteins FLG3605-3879 in der antimikrobiellen Hautabwehr.
- Baltzer, S.; Brown, M. (2011): Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* 20 (4), S. 228–235. DOI: 10.1159/000331009.
- Baquero, F.; Moreno, F. (1984): The microcins. In: *FEMS microbiology letters* 23 (2-3), S. 117–124. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb01046.x.
- Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L.; Häcker, B. (2011): Biochemie. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Blond, A.; Péduzzi, J.; Goulard, C.; Chiuchiolo, M. J.; Barthélémy, M.; Prigent, Y. et al. (1999): The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. In: *European journal of biochemistry* 259 (3), S. 747–755.
- Broccardo, C.; Mahaffey, S.; Schwarz, J.; Wruck, L.; David, G.; Schlievert, P. et al. (2011): Comparative proteomic profiling of patients with atopic dermatitis based on history of eczema herpeticum infection and *Staphylococcus aureus* colonization. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (1), 186-193.e11. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.10.033.
- Brogden, K. A. (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? In: *Nature reviews. Microbiology* 3 (3), S. 238–250. DOI: 10.1038/nrmicro1098.
- Brown, K. L.; Hancock, R. (2006): Cationic host defense (antimicrobial) peptides. In: *Curr Opin Immunol* 18 (1), S. 24–30. DOI: 10.1016/j.coi.2005.11.004.
- Brown, S.; McLean, I. (2012): One remarkable molecule: filaggrin. In: *The Journal of investigative dermatology* 132 (3 Pt 2), S. 751–762. DOI: 10.1038/jid.2011.393.
- Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G. (2005): The cornified envelope: a model of cell death in the skin. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (4), S. 328–340. DOI: 10.1038/nrm1619.
- Chalon, M. C.; Bellomio, A.; Solbiati, J. O.; Morero, R. D.; Farias, R. N.; Vincent, P. A. (2009): Tyrosine 9 is the key amino acid in microcin J25 superoxide overproduction. In: *FEMS microbiology letters* 300 (1), S. 90–96. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01770.x.

Christensen; Brüggemann, H. (2014): Bacterial skin commensals and their role as host guardians. In: *Benef Microbes* 5 (2), S. 201–215. DOI: 10.3920/BM2012.0062.

Clausen, B. E.; Kel, J. M. (2010): Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? In: *Immunology and cell biology* 88 (4), S. 351–360. DOI: 10.1038/icb.2010.40.

ClinicalTrials.gov.: A Study on the Tolerability and Early Efficacy of hLF1-11 in Patients With Bacteremia Due to *S. Epidermidis* (LIST) (NCT00509847). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00509847?cond=Lactoferrin+hLF1-11&rank=3>.

ClinicalTrials.gov.: A Study on the Tolerability and Early Efficacy of hLF1-11 in Patients With Proven Candidaemia (SLIC) (NCT00509834). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00509834?cond=Lactoferrin+hLF1-11&rank=2>.

ClinicalTrials.gov.: Study to evaluate the long-term safety of a once-daily omiganan topical gel (NCT02576847). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02576847>.

ClinicalTrials.gov.: Study to Evaluate the Safety and Efficacy of a Once-Daily CLS001 Topical Gel Versus Vehicle (NCT02547441). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02547441?term=NCT02547441&rank=1>.

Cole, A. M.; Kim, Y. H.; Tahk, S.; Hong, T.; Weis, P.; Waring, A. J.; Ganz, T. (2001): Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions. In: *FEBS Lett* 504 (1-2), S. 5–10.

Contzler, R.; Favre, B.; Huber, M.; Hohl, D. (2005): Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. In: *The Journal of investigative dermatology* 124 (5), S. 990–997. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23694.x.

Conway, S. P.; Pond, M. N.; Watson, A.; Etherington, C.; Robey, H. L.; Goldman, M. H. (1997): Intravenous colistin sulphomethate in acute respiratory exacerbations in adult patients with cystic fibrosis. In: *Thorax* 52 (11), S. 987–993.

Csato, M.; Bozoky, B.; Hunyadi, J.; Dobozy, A. (1986): *Candida albicans* phagocytosis by separated human epidermal cells. In: *Arch Dermatol Res* 279 (2), S. 136–139.

Drake, D. R.; Brogden, K. A.; Dawson, D. V.; Wertz, P. W. (2008): Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. In: *J Lipid Res* 49 (1), S. 4–11. DOI: 10.1194/jlr.R700016-JLR200.

Eckert, R. L.; Broome, A.-M.; Ruse, M.; Robinson, N.; Ryan, D.; Lee, K. (2004): S100 proteins in the epidermis. In: *The Journal of investigative dermatology* 123 (1), S. 23–33. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.22719.x.

Eckhart, L.; Lippens, S.; Tschachler, E.; Declercq, W. (2013): Cell death by cornification. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (12), S. 3471–3480. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.010.

Elias, P. M. (2005): Stratum corneum defensive functions: an integrated view. In: *The Journal of investigative dermatology* 125 (2), S. 183–200. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23668.x.

Elias, P. M. (2007): The skin barrier as an innate immune element. In: *Seminars in immunopathology* 29 (1), S. 3–14.

Elias, P. M.; Wakefield, J. S. (2014): Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. In: *J Allergy Clin Immunol* 134 (4), 781-791.e1. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.05.048.

Fermentas pJET Manual: COA: cloneJET PCR Cloning Kit, #K1231, zuletzt geprüft am 22.06.2014.

Fleming, A. (1922): On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 93 (653), S. 306–317. DOI: 10.1098/rspb.1922.0023.

Fuchs, E.; Green, H. (1980): Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. In: *Cell* 19 (4), S. 1033–1042.

Gebhardt, C.; Nemeth, J.; Angel, P.; Hess, J. (2006): S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. In: *Biochem Pharmacol* 72 (11), S. 1622–1631. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.05.017.

Gläser, R.; Harder, J.; Lange, H.; Bartels, J.; Christophers, E.; Schröder, J.-M. (2005): Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. In: *Nat Immunol* 6 (1), S. 57–64. DOI: 10.1038/ni1142.

Goetz, D. H.; Holmes, M. A.; Borregaard, N.; Bluhm, M. E.; Raymond, K. N.; Strong, R. K. (2002): The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. In: *Molecular cell* 10 (5), S. 1033–1043.

Greisenegger, E. K.; Zimprich, F.; Zimprich, A.; Gleiss, A.; Kopp, T. (2013): Association of the chromosome 11q13.5 variant with atopic dermatitis in Austrian patients. In: *European journal of dermatology : EJD* 23 (2), S. 142–145. DOI: 10.1684/ejd.2013.1955.

Hansmann, B. (2008): Proteinexpressionsanalysen und Funktionsuntersuchungen von Ifapsoriasin in der menschlichen Haut. Kiel: Universitätsbibliothek Kiel.

Hansmann, B.; Ahrens, K.; Wu, Z.; Proksch, E.; Meyer-Hoffert, U.; Schröder, J.-M. (2012): Murine filaggrin-2 is involved in epithelial barrier function and down-regulated in metabolically induced skin barrier dysfunction. In: *Experimental Dermatology* 21 (4), S. 271–276. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01449.x.



- Hansmann, B.; Schröder, J.-M.; Gerstel, U. (2015): Skin-Derived C-Terminal Filaggrin-2 Fragments Are *Pseudomonas aeruginosa*-Directed Antimicrobials Targeting Bacterial Replication. In: *PLoS pathogens* 11 (9), e1005159. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005159.
- Harder, J.; Dressel, S.; Wittersheim, M.; Cordes, J.; Meyer-Hoffert, U.; Mrowietz, U. et al. (2010): Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. In: *The Journal of investigative dermatology* 130 (5), S. 1355–1364. DOI: 10.1038/jid.2009.432.
- Harder, J.; Gläser, R.; Schröder, J.-M. (2007): Review: Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. In: *Journal of Endotoxin Research* 13 (6), S. 317–338. DOI: 10.1177/0968051907088275.
- Harder, J.; Schröder, J.-M. (2002): RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (48), S. 46779–46784. DOI: 10.1074/jbc.M207587200.
- Harder, J.; Schröder, J.-M.; Gläser, R. (2012): The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks. In: *Experimental Dermatology* 22 (1), S. 1–5. DOI: 10.1111/exd.12046.
- Henry, J.; Hsu, C.-Y.; Haftek, M.; Nachat, R.; Koning, H. D. de; Gardinal-Galera, I. et al. (2011): Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (5), S. 1567–1576. DOI: 10.1096/fj.10-168658.
- Henry, J.; Toulza, E.; Hsu, C.-Y.; Pellerin, L.; Balica, S.; Mazereeuw-Hautier, J. et al. (2012): Update on the epidermal differentiation complex. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 17, S. 1517–1532.
- Houben, E.; Paepe, K. de; Rogiers, V. (2007): A keratinocyte's course of life. In: *Skin pharmacology and physiology* 20 (3), S. 122–132. DOI: 10.1159/000098163.
- Hsu, C.-Y.; Henry, J.; Raymond, A.-A.; Mechin, M.-C.; Pendaries, V.; Nassar, D. et al. (2011): Deimination of Human Filaggrin-2 Promotes Its Proteolysis by Calpain 1. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (26), S. 23222–23233. DOI: 10.1074/jbc.M110.197400.
- Huber, M.; Siegenthaler, G.; Mirancea, N.; Marenholz, I.; Nizetic, D.; Breitkreutz, D. et al. (2005): Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. In: *The Journal of investigative dermatology* 124 (5), S. 998–1007. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23675.x.
- Jackson, B.; Tilli, C.; Hardman, M. J.; Avilion, A. A.; MacLeod, M. C.; Ashcroft, G. S.; Byrne, C. (2005): Late cornified envelope family in differentiating epithelia--response to calcium and

ultraviolet irradiation. In: *The Journal of investigative dermatology* 124 (5), S. 1062–1070. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23699.x.

Junge, A.-K. (2011): Untersuchungen zur Rolle von Ifapsoriasin-, Filaggrin-2-Peptiden in der antimikrobiellen Hautabwehr. Kiel: Universitätsbibliothek Kiel.

Kahlem, P.; Terre, C.; Green, H.; Djian, P. (1996): Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (25), S. 14580–14585.

Kamata, Y.; Taniguchi, A.; Yamamoto, M.; Nomura, J.; Ishihara, K.; Takahara, H. et al. (2009): Neutral Cysteine Protease Bleomycin Hydrolase Is Essential for the Breakdown of Deiminated Filaggrin into Amino Acids. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (19), S. 12829–12836. DOI: 10.1074/jbc.M807908200.

Karsch, D. (2011): Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG91-122 und FLG87-197 in der kutanen Abwehr. Kiel: Universitätsbibliothek Kiel.

Kaufmann, B. B.; Hung, D. T. (2010): The fast track to multidrug resistance. In: *Molecular cell* 37 (3), S. 297–298. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.01.027.

Kavanagh, K.; Dowd, S. (2004): Histatins. Antimicrobial peptides with therapeutic potential. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 56 (3), S. 285–289. DOI: 10.1211/0022357022971.

Kypriotou, M.; Huber, M.; Hohl, D. (2012): The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. In: *Experimental Dermatology* 21 (9), S. 643–649. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01472.x.

Lai, Y.; Gallo, R. L. (2009): AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. In: *Trends Immunol* 30 (3), S. 131–141. DOI: 10.1016/j.it.2008.12.003.

Listwan, P.; Rothnagel, J. A. (2004): Keratin bundling proteins. In: *Methods in cell biology* 78, S. 817–827.

Lüllmann-Rauch, R. (2006): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 2., komplett überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

Macdonald, I. A.; Kuehn, M. J. (2013): Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of bacteriology* 195 (13), S. 2971–2981. DOI: 10.1128/JB.02267-12.

Maksimov, M. O.; Pan, S. J.; James Link, A. (2012): Lasso peptides. Structure, function, biosynthesis, and engineering. In: *Natural product reports* 29 (9), S. 996–1006. DOI: 10.1039/c2np20070h.

Marenholz, I.; Volz, A.; Ziegler, A.; Davies, A.; Ragoussis, I.; Korge, B. P.; Mischke, D. (1996): Genetic analysis of the epidermal differentiation complex (EDC) on human chromosome 1q21: chromosomal orientation, new markers, and a 6-Mb YAC contig. In: *Genomics* 37 (3), S. 295–302. DOI: 10.1006/geno.1996.0563.

Margolis, D. J.; Gupta, J.; Apter, A. J.; Ganguly, T.; Hoffstad, O.; Papadopoulos, M. et al. (2014): Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic dermatitis in African American subjects. In: *J Allergy Clin Immunol* 133 (3), S. 784–789. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.09.015.

Marks, R. (2004): The stratum corneum barrier: the final frontier. In: *J Nutr* 134 (8 Suppl), 2017S-2021S.

Marr, A. K.; Gooderham, W. J.; Hancock, R. E. (2006): Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. In: *Curr Opin Pharmacol* 6 (5), S. 468–472. DOI: 10.1016/j.coph.2006.04.006.

Mischke, D.; Korge, B. P.; Marenholz, I.; Volz, A.; Ziegler, A. (1996): Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. In: *The Journal of investigative dermatology* 106 (5), S. 989–992.

Moore, A. (2003): The big and small of drug discovery. Biotech versus pharma: advantages and drawbacks in drug development. In: *EMBO Rep* 4 (2), S. 114–117. DOI: 10.1038/sj.embor.embor748.

Moseley, W. S.; Seldin, M. F. (1989): Definition of mouse chromosome 1 and 3 gene linkage groups that are conserved on human chromosome 1: evidence that a conserved linkage group spans the centromere of human chromosome 1. In: *Genomics* 5 (4), S. 899–905.

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, S. 263–273.

Murakami, M.; Lopez-Garcia, B.; Braff, M.; Dorschner, R. A.; Gallo, R. L. (2004): Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. In: *J Immunol* 172 (5), S. 3070–3077.

Murakami, M.; Ohtake, T.; Dorschner, R. A.; Schitteck, B.; Garbe, C.; Gallo, R. L. (2002): Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the

skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 119 (5), S. 1090–1095. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.19507.x.

Nawrocki, K. L.; Crispell, E. K.; McBride, S. M. (2014): Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. In: *Antibiotics (Basel)* 3 (4), S. 461–492. DOI: 10.3390/antibiotics3040461.

Nemes, Z.; Steinert, P. M. (1999): Bricks and mortar of the epidermal barrier. In: *Exp Mol Med* 31 (1), S. 5–19. DOI: 10.1038/emm.1999.2.

Nizet, V. (2006): Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. In: *Curr Issues Mol Biol* 8 (1), S. 11–26.

Oyston, P.; Fox, M. A.; Richards, S. J.; Clark, G. C. (2009): Novel peptide therapeutics for treatment of infections. In: *J Med Microbiol* 58 (Pt 8), S. 977–987. DOI: 10.1099/jmm.0.011122-0.

Park, J.-H.; Park, G.-T.; Cho, I. H.; Sim, S.-M.; Yang, J.-M.; Lee, D.-Y. (2011): An antimicrobial protein, lactoferrin exists in the sweat: proteomic analysis of sweat. In: *Experimental Dermatology* 20 (4), S. 369–371. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01218.x.

Pellerin, L.; Henry, J.; Hsu, C.-Y.; Balica, S.; Jean-Decoster, C.; Méchin, M.-C. et al. (2013): Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (4), S. 1094–1102. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.12.1566.

Perron, G. G.; Zasloff, M.; Bell, G. (2006): Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. In: *Proc Biol Sci* 273 (1583), S. 251–256. DOI: 10.1098/rspb.2005.3301.

Potten, C. S. (1975): Epidermal transit times. In: *The British journal of dermatology* 93 (6), S. 649–658.

Rawlings, A. V.; Harding, C. R. (2004): Moisturization and skin barrier function. In: *Dermatologic therapy* 17 Suppl 1, S. 43–48.

Rodriguez, E.; Baurecht, H.; Herberich, E.; Wagenpfeil, S.; Brown, S. J.; Cordell, H. J. et al. (2009): Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. In: *J Allergy Clin Immunol* 123 (6), 1361-70.e7. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.03.036.

Salomón, R. A.; Farías, R. N. (1992): Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 174 (22), S. 7428–7435.

Salomón, R. A.; Farías, R. N. (1993): The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. In: *Journal of bacteriology* 175 (23), S. 7741–7742.

Salomón, R. A.; Farías, R. N. (1995): The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. In: *Journal of bacteriology* 177 (11), S. 3323–3325.

Sandilands, A.; Sutherland, C.; Irvine, A. D.; McLean, I. (2009): Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. In: *J Cell Sci* 122 (Pt 9), S. 1285–1294. DOI: 10.1242/jcs.033969.

Sawyer, J. G.; Martin, N. L.; Hancock, R. E. (1988): Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Infection and immunity* 56 (3), S. 693–698.

Schittek, B.; Hipfel, R.; Sauer, B.; Bauer, J.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S. et al. (2001): Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. In: *Nat Immunol* 2 (12), S. 1133–1137. DOI: 10.1038/ni732.

Schröder, J. M.; Harder, J. (2005): Antimicrobial skin peptides and proteins. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (4), S. 469–486. DOI: 10.1007/s00018-005-5364-0.

Schulz, C. F. (2010): Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG87-122 und FLG123-200 in der kutanen Abwehr.

Serre, G.; Mils, V.; Haftek, M.; Vincent, C.; Croute, F.; Reano, A. et al. (1991): Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. In: *The Journal of investigative dermatology* 97 (6), S. 1061–1072.

Shaw, J.; Smith, C. R.; Diamandis, E. P. (2007): Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid. In: *Journal of proteome research* 6 (7), S. 2859–2865. DOI: 10.1021/pr0701658.

Simpson, C. L.; Patel, D. M.; Green, K. J. (2011): Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (9), S. 565–580. DOI: 10.1038/nrm3175.

Sørensen, O. E.; Follin, P.; Johnsen, A. H.; Calafat, J.; Tjabringa, G. S.; Hiemstra, P. S.; Borregaard, N. (2001): Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. In: *Blood* 97 (12), S. 3951–3959.

Steffen, H.; Rieg, S.; Wiedemann, I.; Kalbacher, H.; Deeg, M.; Sahl, H-G et al. (2006): Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. In: *Antimicrob Agents Chemother* 50 (8), S. 2608–2620. DOI: 10.1128/AAC.00181-06.

Steinberg, D. A.; Lehrer, R. I. (1997): Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. In: *Methods Mol Biol* 78, S. 169–186. DOI: 10.1385/0-89603-408-9:169.

Steinert, P. M.; Parry, D.; Marekov, L. N. (2003): Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (42), S. 41409–41419. DOI: 10.1074/jbc.M302037200.

Tarcsa, E.; Marekov, L. N.; Andreoli, J.; Idler, W. W.; Candi, E.; Chung, S. I.; Steinert, P. M. (1997): The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (44), S. 27893–27901.

Teders, K.; Hansmann, B.; Schröder, J.-M. (2014): Mammalian C-terminal filaggrin-2 peptides are soil-bacteria-killing antimicrobial peptides. In: *Experimental Dermatology* 23 (3), e9. DOI: 10.1111/exd.12314.

Tomita, M.; Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Kawase, K. (1991): Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. In: *Journal of dairy science* 74 (12), S. 4137–4142. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78608-6.

Toulza, E.; Mattiuzzo, N. R.; Galliano, M-F.; Jonca, N.; Dossat, C.; Jacob, D. et al. (2007): Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. In: *Genome Biol* 8 (6), R107. DOI: 10.1186/gb-2007-8-6-r107.

Tzou, P.; Ohresser, S.; Ferrandon, D.; Capovilla, M.; Reichhart, J. M.; Lemaitre, B. et al. (2000): Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. In: *Immunity* 13 (5), S. 737–748.

van der Velden, W.; van Iersel, T.; Blijlevens, N.; Donnelly, J. P. (2009): Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11). In: *BMC Med* 7, S. 44. DOI: 10.1186/1741-7015-7-44.

Vincent, P. A.; Delgado, M. A.; Farías, R. N.; Salomón, R. A. (2004): Inhibition of *Salmonella enterica* serovars by microcin J25. In: *FEMS microbiology letters* 236 (1), S. 103–107. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.05.027.

Wiesner, J.; Vilcinskis, A. (2010): Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. In: *Virulence* 1 (5), S. 440–464. DOI: 10.4161/viru.1.5.12983.

Wu, Z. (2005): Analysis of two human gene clusters involved in innate immunity.

Wu, Z.; Hansmann, B.; Meyer-Hoffert, U.; Gläser, R.; Schröder, J.-M.; Egles, C. (2009a): Molecular Identification and Expression Analysis of Filaggrin-2, a Member of the S100

Fused-Type Protein Family. In: *PLoS ONE* 4 (4), e5227. DOI: 10.1371/journal.pone.0005227.

Wu, Z.; Latendorf, T.; Meyer-Hoffert, U.; Schröder, J. M. (2011): Identification of trichohyalin-like 1, an s100 fused-type protein selectively expressed in hair follicles. In: *The Journal of investigative dermatology* 131 (8), S. 1761–1763. DOI: 10.1038/jid.2011.71.

Wu, Z.; Meyer-Hoffert, U.; Reithmayer, K.; Paus, R.; Hansmann, B.; He, Y. et al. (2009b): Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 129 (6), S. 1446–1458. DOI: 10.1038/jid.2008.370.

Yamauchi, K.; Tomita, M.; Giehl, T. J.; Ellison, R. T. 3rd (1993): Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. In: *Infection and immunity* 61 (2), S. 719–728.

Yuzenkova, J.; Delgado, M.; Nechaev, S.; Savalia, D.; Epshtein, V.; Artsimovitch, I. et al. (2002): Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin j25. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (52), S. 50867–50875. DOI: 10.1074/jbc.M209425200.

Zasloff, M. (1987): Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (15), S. 5449–5453.

Zasloff, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. In: *Nature* 415 (6870), S. 389–395. DOI: 10.1038/415389a.

Zhang, L.; Falla, T. J. (2006): Antimicrobial peptides: therapeutic potential. In: *Expert Opin Pharmacother* 7 (6), S. 653–663. DOI: 10.1517/14656566.7.6.653.

Zhang, L.; Parente, J.; Harris, S. M.; Woods, D. E.; Hancock, R.; Falla, T. J. (2005): Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (7), S. 2921–2927. DOI: 10.1128/AAC.49.7.2921-2927.2005.

## 8 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung bedanken. Vielen Dank ebenfalls an Herrn Prof. Dr. med. T. Schwarz für die freundliche weitere Betreuung meiner Dissertation.

Ebenso ein großes Dankeschön geht an das gesamte Laborteam der Hautklinik. Vielen Dank Britta, Jan, Jutta, Claudia, Ties und Uli für die einladende Atmosphäre, die große Hilfsbereitschaft, die arbeitsamen und auch lustigen Momente, die ich bei euch erleben durfte. Insbesondere vielen Dank auch für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der HPLC und der Bromcyan-Spaltung. Ohne euch wäre ich nie in die biochemischen und technischen Tiefen vorgestoßen, die für diese Arbeit notwendig waren. Vielen Dank auch an die weiteren nicht namentlich erwähnten Laborteam-Mitarbeiter, die jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen Dank an Frau Silvia Voss aus dem mikrobiologischen Institut des UKSH Campus Kiel für die Unterstützung bei den Durchführungen der antimikrobiellen Testungen.

Der besondere Dank gilt Dr. Britta Hansmann, meiner direkten Betreuerin und Ansprechpartnerin. Liebe Britta, vielen Dank für die unermüdlichen und ebenso unerschöpflichen Erklärungen, Hilfestellungen und Denkanstöße, die du mir jederzeit gegeben hast. Wenn Plan A nicht funktionierte, konnte ich mir sicher sein, dass du noch einen Plan B bis Z hattest. Du bist eine vorbildliche und begeisterungsfähige Wissenschaftlerin, der man nur nacheifern kann. Vielen Dank auch für die vielen gemeinschaftlichen Stunden mit dem Team außerhalb des Labors, in denen ich ebenso auf Entdeckungsreise z. B. kulinarischer Art ging. Und zuletzt ein großes Dankeschön für die ausdauernde Korrekturarbeit. Du bist eine großartige Betreuerin.

Vielen Dank an Angela Schmidt und Kristin Garske, meine Doktoranden-Kommilitoninnen und Freundinnen für die schönen gemeinsamen Stunden und die gegenseitige Hilfsbereitschaft. Insbesondere Angela auch vielen Dank für die Diskussionen über Publikationen im Rahmen von Motivations-Tee-Runden.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie, die mich jederzeit unterstützt. Insbesondere vielen Dank an meine Eltern, die mich auf meinem Lebensweg, dem Studium und der Arbeit bekräftigen, stärken und in schwierigen Momenten immer ein offenes und mitfühlendes Ohr



## Erklärung

haben. Vielen Dank auch an meine Patentante Kerstin und meinen Onkel Carsten, die mich ebenso stark unterstützen und ein „Auge darauf geworfen haben“, dass die Doktorarbeit fertig gestellt wird. Des Weiteren vielen Dank meinem Mann Malte Metzner, mit dem zusammen das gemeinschaftliche Schreiben der jeweils eigenen Doktorarbeit durch viele Grüntee-Stunden hindurch sehr viel angenehmer wurde.

## 9 Erklärung

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

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

Kiel, den 05.04.2019

---

Katharina Metzner

### **Bisher erfolgte Veröffentlichungen:**

Teders, K., Hansmann, B., Schröder, J.-M. (2014): Mammalian C-terminal filaggrin-2 peptides are soil-bacteria-killing antimicrobial peptides. In: *Experimental Dermatology* 23 (3), e9. DOI: 10.1111/exd.12314