

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

**Untersuchungen zur Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors  
(EGFR) für die Expression kutaner antimikrobieller Peptide**

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

vorgelegt von  
**Martha Ruth Maximiliane Klee**  
aus Bergisch Gladbach  
Kiel 2020

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Jürgen Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz- Dr. Andreas Bayer, Anatomisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel den 03.08.2021

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Hila Emmert

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis Abkürzungen .....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Haut: Erste Linie der Abwehr .....	1
1.2 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor.....	2
1.2.1 PI(3)/Akt-Signalweg .....	4
1.2.2 MAPK-Signalweg.....	5
1.2.3. STAT-Signalweg.....	5
1.2.4. PLC-Signalweg.....	5
1.3. EGFR-Inhibition.....	6
1.3.1 Cetuximab.....	6
1.3.2. Panitumumab .....	7
1.4. EGFR-Inhibitor-assoziierte dermatologische Toxizität .....	7
1.5. Staphylococcus aureus .....	8
1.6 Antimikrobielle Peptide.....	9
1.6.1 Aufbau und Funktion .....	9
1.6.2 Ausblick.....	10
1.6.3 Defensine .....	10
1.6.4 Ribonuklease 7.....	11
1.7 Ziel der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	14
2.1.2 Geräte .....	15
2.1.3 Medien.....	16
2.1.4 Primer .....	16
2.1.5 Antikörper.....	17

2.1.6 Zellen .....	17
2.1.7 Bakterien.....	17
2.1.8 Sonstige Materialien .....	17
2.2 Zellkultur.....	18
2.2.1 Anzucht und Kultivierung primärer Keratinozyten .....	18
2.2.2 Subkultivierung primärer Keratinozyten .....	19
2.2.3 Kryokonservierung primärer Keratinozyten .....	19
2.3 Stimulationen mit Bakterien .....	20
2.4 Stimulation 3D-Hautäquivalent.....	21
2.5 Molekularbiologische Methoden .....	21
2.5.1 mRNA-Isolation .....	21
2.5.2 cDNA-Synthese .....	22
2.5.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....	22
2.6 Hautspülungen .....	23
2.7 Herstellung eines 3D-Hautäquivalents.....	24
2.8 Immunhistochemische Färbungen .....	26
2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	27
3 Ergebnisse.....	29
3.1 S. aureus 8325-4 Dosiskinetik auf Keratinozyten .....	29
3.2 Ermittlung der optimalen Einsatz-Konzentration von Cetuximab .....	29
3.3 Einfluss des EGFR auf die SA-induzierte AMP-Expression.....	31
3.4 3D-Hautäquivalent .....	33
3.4.1 Untersuchung der Expression von AMPs im 3D-Hautäquivalent bei Stimulation mit SA und CTX .....	33
3.4.3 Immunhistochemie.....	35
3.5 Auswertung der Hautspülungen .....	37
3.6 Einfluss sezernierter Faktoren von SA auf die Expression von AMPs .....	38
4 Diskussion .....	40

4.1 Antimikrobielle Peptide in der kutanen Abwehr.....	40
4.2 Induktion von AMPs nach Stimulation mit SA.....	40
4.3 Der EGFR und seine Rolle bei der Induktion Antimikrobieller Peptide durch SA.....	41
4.3.1 hBD3 .....	41
4.3.2 hBD2 .....	42
4.3.3 RNase 7 .....	44
4.4 Beobachtungen am 3D-Hautäquivalent .....	44
4.5 Schlussfolgerung.....	45
4.6 Ausblick.....	45
4.7 Arbeit mit biologischen Materialien.....	47
4.7.1 Zellkultur .....	47
4.7.2 Limitationen des 3D-Hautäquivalents .....	48
4.8 Hautspülungen .....	49
5 Zusammenfassung.....	50
6 Literaturverzeichnis.....	52

## Verzeichnis Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung (engl.)	Übersetzung
5-FU	5-Fluoruracil	Chemotherapeutikum
°C	Grad Celsius	
μ	Mikro	
AK	Antikörper	
AMPs	<i>antimicrobial peptides</i>	Antimikrobielle Peptide
bspw.		beispielsweise
CTX	Cetuximab	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	Medium Zellkultur
cDNA	<i>complementary DNA</i>	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	<i>colony forming units</i>	Koloniebildende Einheiten
dNTPs	<i>Desoxynucleotide triphosphate</i>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DANN	<i>desoxyribonucleic acid</i>	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetic acid</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	Epidermaler Wachstumsfaktor- Rezeptor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	Enzymbasiertes immunologisches Nachweisverfahren
FCS	<i>fetal calf serum</i>	fetales Kälberserum
G	Erdbeschleunigung	
Genta	Gentamycin	
H	Stunde	
HE	Hämatoxylin-Eosin	
HER	Human epidermal growth factor receptor	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
hBD-2	Humanes beta-Defensin 2	
hBD-3	Humanes beta-Defensin 3	
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor</i>	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G	
IAK	Isotop-Kontrollantikörper	
JAK	Janus-Kinase	
KGM2	<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i>	Medium Zellkultur Keratinozyten
KO-ÜS	Kontroll-Überstand	
L	Liter	
M	Mili	
M	Molar	
MDR	<i>multidrug-resistant</i>	Multiresistent
MRSA	<i>methicillin resistant S. aureus</i>	Methicillin-resistenter S. aureus
N	Nano	
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain- enhancer' of activated B-cells</i>	
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten	
Ns	nicht signifikant	
OD	optische Dichte	
Oligo (dT)	Desoxythymidine	

P	Phosphat	
PAMPS	<i>pathogen associated molecular patterns</i>	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PRGF	<i>Platelet-released growth factor</i>	von Thrombozyten exprimierte Wachstumsfaktoren
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>	Mustererkennungs-Rezeptoren
qPCR	<i>quantitative polymerase-chain-reaction</i>	quantitative Polymerasekettenreaktion
Rcf	<i>Relative centrifugal force</i>	relative Zentrifugationsbeschleunigung
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	Ribonukleinsäure
RNase 7	Ribonuklease 7	
mRNA	<i>messenger RNA</i>	Botschafter-RNA
RP38	Ribosomales Protein 38	
RT-PCR	<i>reverse-transcription-polymerase-chain-reaction</i>	Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
S. aureus, SA	Staphylococcus aureus	
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	kleine eingreifende RNA
SKDM	<i>supplemented keratinocyte defined medium</i>	Serum-freies Keratinozyten-Differenzierungs-Medium
TLR	<i>toll-like receptor</i>	Toll-ähnlicher Rezeptor
TSB	<i>tryptic soy broth</i>	Tryptische Soja Bouillon
UKSH	Universitäts-Klinikum Schleswig-Holstein	
ÜS	Überstand	
VRE	<i>vancomycin resistant enterococci</i>	Vancomycin-resistente Enterokokken

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Haut: Erste Linie der Abwehr

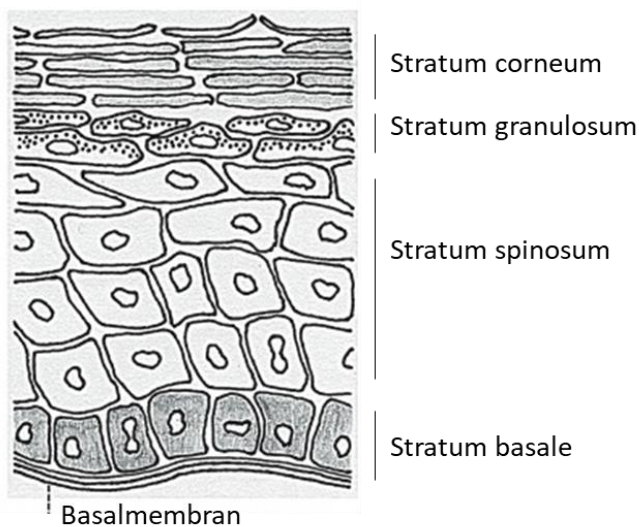
Als eines der größten Organe unseres Körpers stellt die Haut ein wichtiges Schutz- und Abwehrsystem dar. Zu ihren Hauptaufgaben zählt die Bewahrung der darunter liegenden Gewebe und der inneren Organe vor physikalischen und chemischen Verletzungen, Strahlung und Dehydratation sowie die Regulierung der Körpertemperatur. Des Weiteren stellt sie die erste Linie der Abwehr gegen sich in der Umwelt befindliche pathogene Mikroorganismen wie Viren und Bakterien dar (Edalat, 2012).

Die Haut besteht aus den drei Schichten Epidermis und Dermis, die zusammen die Cutis ergeben, und der darunter liegenden Subcutis.

Die Epidermis gliedert sich wiederum in vier verschiedene Abschnitte, welche gemeinsam ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel bilden. Ihre oberste Schicht ist das *Stratum corneum*, dessen kernlose Keratinozyten durch *tight junctions* fest miteinander verbunden und durch eine Lipidschicht versiegelt sind und somit eine wasserfeste mechanische Barriere formen (Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, 2009). Des Weiteren finden sich in der Epidermis die von Keratinozyten bei Exposition mit pathogenen Mikroorganismen produzierten antimikrobiellen Peptide, wie humane  $\beta$ -Defensine, Cathelicidine und RNasen (Mann, 2014).

Die kernhaltigen Keratinozyten der darunter liegenden Schichten (*Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale*) sind ein wichtiger Bestandteil der chemischen Abwehr der Haut. Durch die Expression von Mustererkennungsrezeptoren (PRR, engl.: *pattern recognition receptors*) können auf den Oberflächen der eindringenden Mikroorganismen befindliche PAMPs (eng.: *pathogen-associated molecular patterns*) erkannt werden und durch Auslösen unterschiedlicher Signalkaskaden eine verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine, Interferone und Chemokine getriggert werden (Takeuchi and Akira, 2010).





**Abbildung 1 Schematischer Aufbau der Epidermis, modifiziert nach (Senoo, 2013)**

Unter der Epidermis gelegen befindet sich die Dermis. Histologisch teilt sich diese in das *Stratum reticulare* und das *Stratum papillare*. Bestehend aus kollagenfaserreichem Bindegewebe verleiht sie der Haut ihre charakteristische Elastizität und sorgt durch ihren subpapillären Gefäßplexus für die Versorgung der nicht vaskularisierten Epidermis. Zudem finden sich dort immunkompetente Zellen wie Mastzellen, Monozyten und Lymphozyten.

Die unterste Schicht der Haut ist die Subcutis, auch Hypodermis oder Panniculus adiposus genannt. Durch bindegewebsartige Septen stellt sie das Verbindungsglied zwischen der unter ihr liegenden Körperfaszie und der sich über ihr befindlichen Dermis dar. Zum Großteil besteht sie jedoch aus Fettzellen, welche zur Isolation, als Schutz vor externem Druck und als Energiereserven dienen (Shimizu, 2007).

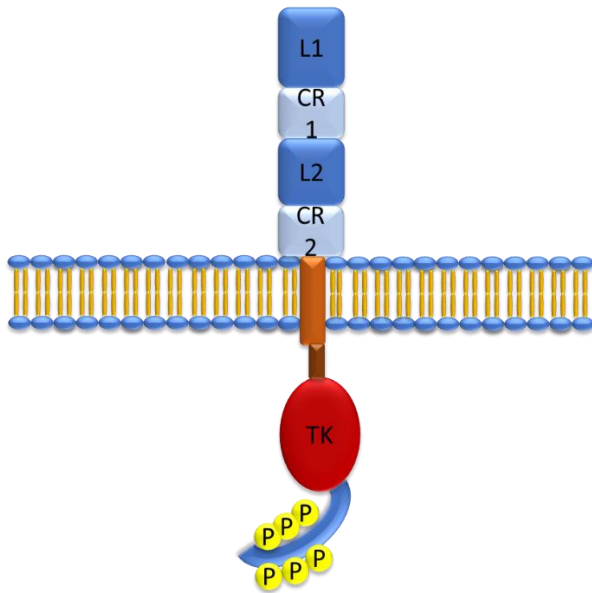
## 1.2 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, engl.: Epidermal growth factor receptor), oder auch HER1 (engl.: *human epidermal growth factor receptor 1*)(ErB-1), gehört zusammen mit HER2/c-neu (ErB-2), HER3 (ErB-3) und HER4 (ErB-4) zur ErB-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Seine essentiellen Aufgaben liegen in der Regulation von Proliferation, Wachstum, Überleben und Differenzierung von Säugetierzellen (Oda *et al.*, 2005).

Im inaktiven Zustand stellt sich der EGFR als Monomer auf der Zellmembran dar. Er besteht aus einer extrazellulären Ektodomäne, einer kurzen transmembranen  $\alpha$ -Helix, einem zytoplasmatischen Teil mit der Tyrosinkinase, einer juxtamembranären Domäne und dem regulatorischen C-terminalen Ende. Die extrazelluläre Domäne besteht charakteristisch aus zwei cystinreichen Abschnitten und zwei

homologen, ligandenbindenden Domänen. Kommt es zur Bindung eines Liganden an die Ektodomäne, führt dies zur Homo- oder Hetero-Dimerisierung des Rezeptors. Daraus resultiert die Phosphorylierung des C-terminalen Endes und die Aktivierung der Tyrosinkinase. Das durch die Autophosphorylierung entstehende Phosphotyrosin setzt daraufhin eine regulatorische Signalkaskade in Gang (Wieduwilt and Moasser, 2008).

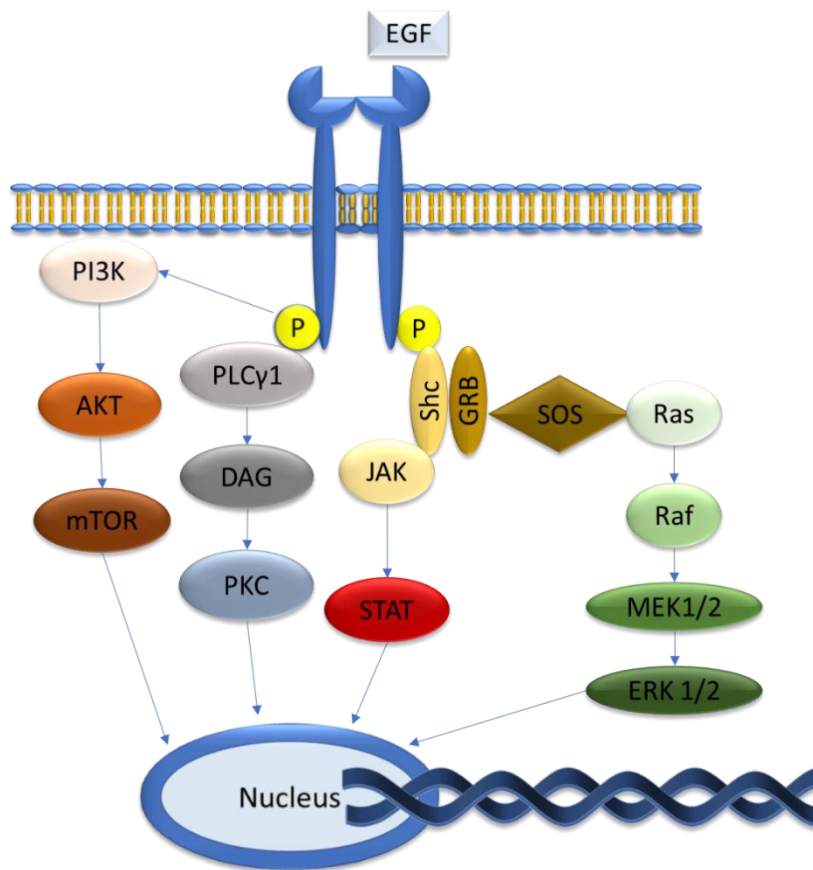


**Abbildung 2 Aufbau des EGFRs:** Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors. Extrazellulär liegt die Ektodomäne mit ihren alternierenden cystinreichen (CR1, CR2) und ligandenbindenden (L1, L2) Abschnitten. Die Verbindung ins Zellinnere erfolgt über eine transmembranäre  $\alpha$ -Helix, die über eine juxtamembranäre Domäne an die Tyrosinkinase (TK) gekoppelt ist. Am C-terminalen Ende liegen Tyrosin-Reste (P), welche durch Autophosphorylierung verschiedene Signalwege in Gang setzen können.

Es gibt mehrere bekannte Liganden, welche den EGFR aktivieren können. Zu ihnen zählen TGF- $\alpha$  (engl.: *transforming growth factor  $\alpha$* ), Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, engl.: *epidermal growth factor*), Heparin-bindender Wachstumsfaktor (HB-EGF, engl.: *heparin-binding EGF-like growth factor*), Betacellulin, Epiregulin und Amphiregulin (Sibilia *et al.*, 2007).

Die Aktivierung des EGFR kann verschiedene Signalkaskaden auslösen. Allen voran stehen dabei der PI(3)K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)/Akt (Proteinkinase B), der PLC $\gamma$ 1/PKC (Phospholipase C), der STAT3 (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) und der Ras/Raf/MAPK (Mitogen-Aktivierte-Proteinkinasen)-Weg (Wieduwilt and Moasser, 2008). Über diese Signalkaskaden reguliert er verschiedene zelluläre Mechanismen, wie Zellproliferation und -differenzierung. Zudem ist er verantwortlich für Angiogenese und beeinflusst die Apoptose-Regulation. Auch Zellmigration und demzufolge mögliche Metastasierungen bei kanzerogenen Prozessen unterliegen der Kontrolle des EGFR.

Alle diese Signalwege sind von besonderer Bedeutung in der onkologischen Forschung und Therapie, da es bei Mutationen in Komponenten der Kaskaden zur Entstehung bestimmter Krebsformen kommen kann.



**Abbildung 3 Signalwege des EGFR:** Darstellung des EGFR mit Übersicht der Signalwege von PI(3)K/Akt, MAPK, STAT und PLC.

### 1.2.1 PI(3)/Akt-Signalweg

Dieser komplexe Signalweg ist noch nicht vollständig erforscht und verstanden. Fest steht jedoch, dass es nach der Dimerisierung des EGFRs und dessen Autophosphorylierung anschließend über einige Zwischenschritte zur Phosphorylierung von PI(3)K kommt. Die aktive PI(3) verfügt über die Fähigkeit wiederum andere Membranlipide zu phosphorylieren. So wandelt sich PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) in den Botenstoff PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat) um, welches die Serin/Threonin-Kinase Akt aktiviert (Fayard, 2005).

Akt verfügt unter anderem über eine anti-apoptotische Wirkung und kann über mTOR (engl. *Mechanistic Target of Rapamycin*) die Proteintranslation induzieren. Zudem stimuliert es die Zellproliferation (Zimmermann and Moelling, 1999).

### 1.2.2 MAPK-Signalweg

Der MAPK-Signalweg ist ein wichtiger Bestandteil der Krebsforschung. Bei ca. 30% aller malignen Tumoren des Menschen liegt eine Hyperaktivierung dieses Weges vor (Garnett and Marais, 2004). Die MAPK-Phosphorylierungskaskade trägt wesentlich zur Regulierung der Mechanismen von Zellwachstum, -differenzierung und -proliferation bei.

Nach Bindung eines extrazellulären Liganden an den EGFR kommt es zur Rekrutierung von SOS (engl. *Son of sevenless*) mit Hilfe des Adapterproteins Grb2 (engl. *Growth-factor-receptor-bound*). Die darauffolgende Konversion von GDP (Guanin-Biphosphat) zu GTP (Guanin-Triphosphat) initiiert die Aktivierung von Ras. Zu den von Ras (engl. *Rat sarcoma*) aktivierten Effektorproteinen gehört auch Raf (engl. *Rapidly accelerated fibrosarcoma*), welches durch eine Konformationsänderung zur Phosphorylierung von MEK 1/2 und dadurch auch von MAPK führen kann (Mebratu and Tesfaigzi, 2009). Diese serin/threonin-spezifischen Proteinkinasen können ERK1/2 aktivieren, welche eine Vielzahl von regulatorischen Molekülen und Transkriptionsfaktoren überwachen (Roskoski, 2012).

### 1.2.3. STAT-Signalweg

Der JAK-STAT-Signalweg ist ebenfalls ein Mechanismus eukaryotischer Zellen zur Regulierung der Proliferation über extrazelluläre Liganden. Durch die Phosphorylierung von JAKs (Janus-Kinase) kommt es zu einer Aktivierung der STATs, welche eine Homo- bzw. Hetero-Dimerisierung der als inaktive Monomere vorliegenden STATs initiiert. Diese binden nach ihrer Translokation in den Zellkern direkt an die DNA und regulieren die Genexpression (Shea *et al.*, 2017). Abhängig von Gewebe und zellulärem Hintergrund werden Zellwachstum, Apoptose, Zellmigration und -überleben moduliert (Harrison *et al.*, 2013).

### 1.2.4. PLC-Signalweg

Die Phospholipase C zählt zu den Phosphodiesterasen und spaltet nach Aktivierung die Membrankomponente PIP2 zu Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG).

IP3 führt nach Bindung an seinen speziellen IP3-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum zu einem Einstrom von Calcium in die Zelle. Daraus resultiert die Aktivierung verschiedener calciumabhängiger Proteinkinasen (Putney and Tomita, 2011).

Bei dem ebenfalls entstandenen DAG handelt es sich um einen Botenstoff, welcher in der Zellmembran verbleibt und im Zusammenspiel mit Calcium die PKC (Proteinkinase C) aktiviert (Kaphingst, Persky and Lachance, 2010). Zu den Aufgaben der PKC gehören ebenfalls die Regulierung von Transkription und Zellwachstum, sowie die Desensibilisierung bestimmter Rezeptoren und eine Mediatorenfunktion innerhalb des Immunsystems (Newton, 1995).

## 1.3. EGFR-Inhibition

### 1.3.1 Cetuximab

Wie bereits erwähnt, spielt der EGFR eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Therapie verschiedener Krebsarten. Man hat herausgefunden, dass der Rezeptor bei einer Vielzahl epithelialer Tumoren übermäßig exprimiert wird (Scaltriti and Baselga, 2006). Dank intensiver Forschung und der fortschreitenden Entschlüsselung des EGFR-Signalweges konnten an verschiedenen Stellen Mutationen entdeckt werden, die zur Entstehung eines malignen Tumors führen können. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde nach Möglichkeiten gesucht, durch die man den überaktiven Rezeptor inhibieren kann (Roberts and Der, 2007).

Cetuximab (Erbix®) ist ein monoklonaler Antikörper vom IgG1-Typ, welcher sich gegen den EGFR richtet. Es handelt sich um einen Mensch-Maus chimären Antikörper, der kompetitiv an die Ektodomäne des EGFR bindet und somit die Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors verhindert (K A Blick, Stephanie & J Scott, 2007).

Zu den antikanzerogenen Effekten gehören unter anderem die Inhibition der Zellproliferation und Angiogenese, die Induktion von Apoptose und die Herunterregulierung der Expression des EGFR. Zudem erhöht es die Sensibilität bei Strahlentherapie (Bou-Assaly and Mukherji, 2010).

Cetuximab ist zugelassen zur intravenösen Behandlung von lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches in Kombination mit Strahlentherapie. Bei metastasierten oder lokal rezidierten Tumoren kann es als Erstlinientherapie mit Platin-basierter Chemotherapie mit 5-Fluoruracil verwendet werden, oder als alternative Therapie bei Progress unter alleiniger Platin-basierter Chemotherapie.

Des Weiteren besteht eine Therapiezulassung für metastasierte EGFR-positive Kolorektalkarzinome vom KRAS Wild-Typ. In Erstlinientherapien ist Cetuximab mit dem FOLFIRI-Protokoll (Folinsäure, 5-FU, Irinotecan) zu kombinieren. Alleinige Verwendung ist nur indiziert nach Progress der Tumorerkrankung unter Irinotecan und Oxaliplatin, oder bei Patienten, bei denen der Einsatz von Irinotecan aufgrund von Unverträglichkeiten kontraindiziert ist (Angaben des Herstellers).

Wie die meisten anderen Krebstherapien ist auch Cetuximab nicht frei von Nebenwirkungen. Zu den Schwerwiegenderen zählen dabei Nierenversagen, kardiopulmonales Versagen und Sepsis. Am häufigsten sind dermatologische Nebenwirkungen zu verzeichnen, die sich meistens als papulopustulöser Rash manifestieren (Rothschild *et al.*, 2019). Bei 3-10% der Patienten kommt es zum Abbruch der Therapie nach Auftreten von unerwünschten Effekten (Bou-Assaly and Mukherji, 2010). Es können auch Dosisreduktionen vorgenommen werden.

### 1.3.2. Panitumumab

Auch Panitumumab (VECTIBIX®) zählt zur Gruppe der EGFR-inhibierenden monoklonalen Antikörper. Im Gegensatz zu Cetuximab handelt es sich jedoch um einen komplett humanen Antikörper vom IgG2-Typ. Die Abwesenheit von körperfremden Proteinen steigert die Verträglichkeit der Therapie und verhindert die Bildung von Antikörpern, welche bei einer Behandlung mit Cetuximab zu allergischen und anaphylaktoiden Reaktionen führen können (Cohenuram and Saif, 2007). Zudem zeichnet sich Panitumumab durch seine sehr hohe Spezifität und Affinität zum EGFR sowohl normaler, als auch tumorveränderter Zellen aus (Keating, 2010).

Die Indikation von Panitumumab beschränkt sich derzeit auf Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen und KRAS- Wildtyp. Die Therapie erfolgt in Kombination mit dem FOLFOX Chemotherapie Schema (Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin). 90% aller behandelten Patienten entwickeln Hautausschläge „Rash“ und andere kutane Reaktionen in Form von Erythemen, Pruritus und Schuppung (Angaben des Herstellers).

### 1.4. EGFR-Inhibitor-assoziierte dermatologische Toxizität

Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind die dermatotoxischen Auswirkungen einer Anti-EGFR Therapie, die vor allem während der ersten zwei Wochen nach der initialen Gabe auftreten. Papulopustulöse Ausschläge „Rash“ an Gesicht und Rumpf, Xerose und Juckreiz sind am häufigsten vertreten, aber es kann auch zu Haar- und Nagelveränderungen kommen (Eilers *et al.*, 2010).

Lokalisation	Manifestation
Haut	Akneiformer Ausschlag „Rash“ (papulopustulös) Xerosis Erytheme Photosensitivität Rhagaden Hyperpigmentierung Teleangiektasien Pruritus
Nägel	Paronychie Nagelverfärbungen
Haare	Trichomegalie der Wimpern Hypertrichose in Wimpern, Augenbrauen und Bart Alopezie der Kopfhaut

**Tabelle 1 Nebenwirkungen der Anti-EGFR Therapie**, modifiziert nach (Kozuki, 2016)

Insbesondere das Auftreten des „Rash“ nimmt in der Therapie eine wichtige Sonderposition ein. Nach Empfehlungen des amerikanischen National Cancer Institute wird der Ausschlag in verschiedene Schweregrade, von I bis V reichend, eingeteilt. Diese richten sich nach dem Vorhandensein von Papeln und Pusteln, der prozentual betroffenen Körperoberfläche sowie lokalen Infektionen und

psychosozialer Belastung (Gutzmer *et al.*, 2012). Entsprechend des Schweregrades können verschiedene Begleittherapien verwandt werden. Generell wird die tägliche Verwendung von Cremes mit hohem Lichtschutzfaktor, sowie die regelmäßige Hautpflege mit alkoholfreien, befeuchtenden und rückfettenden Produkten empfohlen. Ab Grad II kann der Einsatz topischer Antibiotika indiziert sein, in Extremfällen auch der von systemischen Kortikosteroiden und Retinoiden. Durch ihre erhöhte Suszeptibilität sind die Läsionen ein häufiger Manifestationsort von Infektionen, vor allem mit *Staphylococcus aureus* (Pinto *et al.*, 2011).

Die Ausprägung des „Rash“ korreliert nicht nur mit der verabreichten Dosis des Antikörpers, sondern auch mit dem Erfolg der Therapie. Studien zufolge lässt sich das Auftreten des Ausschlages als Marker für ein positives *Outcome* verwenden (Pérez-Soler *et al.*, 2005; Kozuki, 2016).

Nicht zu vernachlässigen sind ferner die psychosozialen Belastungen eines ausgeprägten „Rash“. Diese können weitreichende Folgen in Form von verminderter *Compliance* des Patienten bis hin zum Abbruch der Therapie nach sich ziehen. Durch konsequente Hautpflege und eine dermatologische Fachberatung kann in vielen Fällen jedoch eine Besserung des Hautbefundes erreicht werden.

## 1.5. Staphylococcus aureus

*Staphylococcus aureus* ist ein grampositives, kokkoides und fakultativ anaerobes Bakterium, welches meist in traubenförmigen Haufen lagert. Die durchschnittliche Größe liegt bei 0,7-1,2 µm und es ist sowohl Koagulase-, als auch Katalase-positiv. Auf Nährmedien gezogene Kolonien erscheinen charakteristisch gelb-gold. Schätzungen zufolge kolonisieren die fakultativ pathogenen Kokken bis zu 50% der erwachsenen Bevölkerung, bevorzugt auf Haut und Schleimhäuten (Taylor TA, 2009).



**Abbildung 1** *Staphylococcus aureus* in einer Vergrößerung von 10.000x. Aufgenommen mittels Scanning electron micrograph (M. Janice Haney Carr/CDC)

Im Regelfall verbleibt das Bakterium durch den effizienten Barrieremechanismus der Haut lediglich auf deren Oberfläche. Ist diese Barriere jedoch geschwächt oder verletzt, gelingt es SA in tiefer gelegene

Schichten einzudringen und seine pathogene Wirkung zu entfalten. Dabei widersteht der Keim sowohl den antimikrobiellen Proteinen, als auch den phagozytosefähigen Leukozyten (DeLeo, Diep and Otto, 2009). Bei Anschluss an Blutgefäße oder das Lymphsystem kann sich der Keim in den gesamten Körper ausbreiten.

Dieser Umstand macht SA zu einer der häufigsten Ursachen humaner Infektionen von Haut und Weichteilen, des respiratorischen Traktes, sowie von Endokarditis und Sepsis (DeLeo, Diep and Otto, 2009; Otto, 2011).

Einen zusätzlichen Virulenzfaktor stellt die Bildung verschiedener Toxine dar. Dazu zählen sowohl verschiedene hitzebeständige Enterotoxine, welche Auslöser von Lebensmittelvergiftungen mit Erbrechen und Durchfall sein können, als auch das Superantigen TSST (engl.: *toxic shock syndrome toxin*). Letzteres führt zur Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Interleukine und zum lebensgefährlichen Krankheitsbild des Toxic Shock Syndroms (Otto, 2015).

Durch seine teilweise stark ausgeprägten Antibiotikaresistenzen und den daraus resultierenden Problemen in der Therapie der ausgelösten Erkrankungen, gewinnt SA in der Medizin immer weiter an Bedeutung. Impfversuche und die Weiterentwicklung derzeitiger Antibiotika sind Hauptthemen der heutigen Forschung (Rasigade and Vandenesch, 2014).

## 1.6 Antimikrobielle Peptide

### 1.6.1 Aufbau und Funktion

Antimikrobielle Peptide und Proteine (AMPs) sind kleine kationische Proteine bzw. Oligopeptide, deren Länge zwischen 5 bis 100 Aminosäuren betragen kann. Sie kommen in einer Vielzahl von Lebensformen vor. Man findet sie sowohl bei Prokaryonten (bspw. Bakterien), als auch bei Eukaryonten (Pflanzen, Insekten, Pilze, Tiere und Menschen). Aufgrund ihrer Präsenz in niederen Organismen wird angenommen, dass AMPs zu den am frühesten entwickelten protektiven Mechanismen von Lebewesen gehören (Raj and Dentino, 2002; Ageitos *et al.*, 2017). Über 5000 verschiedene AMPs wurden bisher beschrieben (Zhao *et al.*, 2013).

Durch Unterschiede ihres sekundären Aufbaus können AMPs in verschiedene Klassen unterteilt werden. Dabei unterscheidet man zwischen AMPs mit einer  $\alpha$ -Helix-Struktur, wie dem humanen Cathelicidin LL-37, und AMPs mit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, zu denen Defensine und RNasen zählen (Zhang and Gallo, 2016).

In Säugetieren werden AMPs vor allem bei Kontakt mit potentiell pathogenen Mikroorganismen, unmittelbar auf Oberflächen, wie der Haut bzw. Schleimhaut und den Epithelien des gastrointestinalen und respiratorischen Trakts, exprimiert (Wiesner and Vilcinskas, 2010). Sie sind ein wichtiger



Bestandteil des angeborenen Immunsystems und stellen die erste Instanz der Abwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze dar (Herman and Herman, 2019). Deshalb werden sie auch als körpereigene Antibiotika bezeichnet. Ihre Aufgabe ist es, Infektionen in frühesten Stadien aufzuhalten, noch bevor es zur Entwicklung von Symptomen kommt. Dabei formen sie jedoch nicht nur einen chemischen Schutzschild, sondern es wird angenommen, dass sie auch Komponenten der angeborenen und adaptiven Abwehr koordinieren und triggern können (Schauber *et al.*, 2009). Einige AMPs werden dafür kontinuierlich von den für sie jeweils spezifischen Zellen produziert, während die Expression Anderer wiederum durch inflammatorisch- oder pathogen-induzierte Prozesse initiiert werden kann (Bahar and Ren, 2013). Auch der EGFR und seine Liganden haben Einfluss auf die Regulation der Induktion von AMPs (Johnston *et al.*, 2011).

### 1.6.2 Ausblick

Durch multiresistente (MDR, engl. *Multidrug-resistant*) „Superkeime“ wie dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) ausgelöste Infektionen stellen die heutige Medizin vor große Probleme (León-Buitimea *et al.*, 2020). Durch den zu hohen und teilweise ungerechtfertigten Gebrauch vieler Antibiotika führt der Einsatz gängiger Substanzen in vielen Fällen nicht mehr zu befriedigenden Ergebnissen in der Therapie. Auch die Zahl der potenten Reserveantibiotika schrumpft immer weiter (Kloß and Gerbach, 2018).

Aufgrund des rapiden Anstiegs einfacher und multipler Antibiotikaresistenzen stellen nun AMPs für viele einen vielversprechenden Lösungsansatz dar (Rončević, Puizina and Tossi, 2019). Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen wendet man sich wieder den Grundlagen der humanen Abwehrmechanismen zu und versucht die Wirkmechanismen der AMPs detailliert zu entschlüsseln. Denn sowohl durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften, als auch durch ihre potente Fähigkeit zur Modulation und Regulierung des Immunsystems, könnten AMPs in Zukunft eine große Rolle in der Bekämpfung von MDRs spielen (Park, Park and Hahm, 2011).

### 1.6.3 Defensine

Defensine zählen zu einer der beiden Hauptgruppen antimikrobieller Peptide. Sie werden vor allem von epithelialen Zellen von Wirbeltieren in hoher Quantität exprimiert. Ihr charakteristischer Aufbau besteht aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur. An sechs verschiedenen Stellen liegt die Aminosäure Cystein, welche wiederum durch drei intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Ganz, 2003). Je nach Konfiguration dieser Brücken werden die Defensine in drei verschiedene Gruppen unterteilt:  $\alpha$ -Defensine,  $\beta$ -Defensine und  $\theta$ -Defensine.



**Abbildung 5 Schematische Zeichnung mammalischer Defensin Präkursoren**, modifiziert nach A. Patil *et al*

Von besonderer Wichtigkeit für diese Arbeit sind die  $\beta$ -Defensine (engl. Human Beta-Defensines), von denen bisher sechs (hBD-1 bis hBD-6) beim Menschen identifiziert wurden (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). HBD-1 und hBD-2 wurden bisher in menschlicher Haut, Plasma und Speichel, Lunge sowie im Urogenitaltrakt nachgewiesen. Auch hBD-3 wird in der Haut exprimiert. Zudem findet es sich in Herz- und Skelettmuskelzellen, Trachea, Ösophagus und gingivalen Keratinozyten (Raj and Dentino, 2002). Die Expression von gewebespezifischen hBD-4 beschränkt sich hingegen vor allem auf Hoden, Uterus, Lunge und Thymus (García *et al.*, 2001). Synthese und Expression werden unter anderem über mikrobielle und neuroendokrine Signalwege und über Zytokine gesteuert. Aus diesem Grund können die Defensine hBD-2, -3 und -4 individuell induziert werden, während hBD-1 kontinuierlich exprimiert wird (Ageitos *et al.*, 2017).

Ihre Funktion besteht hauptsächlich – wie bei allen AMPs – in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen. Dabei kristallisiert sich im Laufe der aktuellen Forschungen immer weiter heraus, dass die Defensine jeweils auf ein bestimmtes Spektrum an Erregern spezialisiert sind.

So zeigte sich, dass hBD-2 vor allem gegen Gram-negative Bakterien und Hefen effektiv ist, während seine antimikrobielle Potenz gegenüber Gram-positiven Keimen, wie *Staphylococcus aureus*, eher gering ist. Es wird lokal in Keratinozyten bei inflammatorischen Hautläsionen (beispielweise in Form von Psoriasis) exprimiert (Schröder and Harder, 1999). Zudem wurden hBD-2 fördernde Eigenschaften im Rahmen intestinalen Wundheilung und Induktion von Angiogenese nachgewiesen (Rothschild *et al.*, 2019)

HBD3 hingegen weist ein breiteres Wirkspektrum auf, zu dem auch multiresistente Keime wie SA und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) zählen (Dhople, Krukemeyer and Ramamoorthy, 2006). Es gilt als aktivstes Defensin und ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage Bakterien abzutöten (Boniotto *et al.*, 2003).

#### 1.6.4 Ribonuklease 7

Die Ribonuklease 7 (RNase 7) gehört zur Ribonuklease A Superfamilie, von denen bisher dreizehn verschiedene klassifiziert wurden (RNase 1-13) (Zhang, Dyer and Rosenberg, 2003). Charakteristisch für RNase A (engl. *Bovine pancreatic ribonuclease*) ist ihr mit Disulfidbrücken versehener

dreidimensionaler Aufbau. Enzyme dieser Gruppe sind in der Lage Ribonukleinsäure hydrolytisch zu spalten und tragen somit zu deren Abbau bei (Rosenberg, 2009). Dies spielt nicht nur beim RNase-Verdau eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Prozessierung zelleigener RNA im Rahmen der Proteinbiosynthese. Zudem sind RNasen Teil des angeborenen Immunsystems, da sie auch fremde RNA im Genom zerlegen können.

RNase 7 wird in verschiedenen menschlichen epithelialen Geweben, wie dem respiratorischen, dem Urogenital- und dem Gastrointestinal-Trakt exprimiert. Ferner konnte sie aus dem *Stratum corneum* gesunder Haut isoliert werden (Harder and Schröder, 2002). Dabei ist die Konzentration von der Körperlokalisierung abhängig (Rademacher, Simanski and Harder, 2016). Zusätzlich zur vorhandenen kontinuierlichen Expression, kann RNase 7 durch verschiedene Stimuli induziert werden. Dazu zählen sowohl proinflammatorische Zytokine, als auch Mikroorganismen wie Bakterien (z.B. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Enterococcus faecium*) (Köten *et al.*, 2009). Sowohl die Induzierbarkeit als auch die konstitutive Expression, sprechen für eine Partizipation von RNase 7 in der kutanen Abwehr.

RNase 7 weist eine potente antimikrobielle Aktivität sowohl gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien wie *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *Enterococcus faecium*, als auch gegen die Hefe *Candida albicans* und den Dermatophyten *Trichophyton rubrum*, auf (Harder and Schröder, 2002; Fritz, Beck-Jendroschek and Brasch, 2012; Rademacher, Simanski and Harder, 2016).

Somit zählt RNase 7 zu den konstitutiv exprimierten AMPs.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Wie bereits erläutert spielen AMPs eine herausragende Rolle bei der kutanen Abwehr. Sie befähigen die Haut zur Regulation und Eliminierung fakultativ pathogener und pathogener Keime. Folglich kann es bei einer gestörten Expression von AMPs zu Störungen dieses Verteidigungsmechanismus kommen.

Im Rahmen von Krebstherapien kommen Substanzen wie Cetuximab und Panitumumab zum Einsatz, welche Inhibitoren des EGFR sind. Es wurde beobachtet, dass Patienten nach Gabe des Inhibitors/Antikörpers eine starke kutane Infektionsanfälligkeit entwickeln. *Staphylococcus aureus* ist dabei ein wesentlicher Auslöser dieser Infektionen.

Des Weiteren ist bekannt, dass die Expression einiger AMPs über den EGFR reguliert werden kann. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass es durch die Blockade des EGFR zu Dysregulation auf der Expressionsebene von AMPs in Keratinozyten kommen kann.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Experimente *in vivo* und *in vitro* durchgeführt. *In vitro* wurden kultivierte, primäre Keratinozyten mit und ohne den Anti-EGFR-

Antikörper CTX inkubiert und anschließend mit SA stimuliert. Die anschließende Analyse der Quantität von AMPs mittels ELISA und Echtzeit PCR sollten Aufschluss über eine Veränderung der Expression geben. Selbiges Vorgehen wurde auch an einem 3D-Hautäquivalent durchgeführt.

*In vivo* sollte bei einem Kollektiv an Patienten einer Anti-EGFR-Therapie die verschiedenen Konzentrationen von AMPs im Verlauf der Behandlung gemessen werden. Dazu wurden mithilfe einer Pufferlösung nicht-invasive Hautspülungen an verschiedenen Körperstellen vorgenommen. Die anschließende Auswertung erfolgte durch ELISA.

Diese Arbeit diene der Analyse der Rolle des EGFR für die Expression kutaner antimikrobieller Peptide.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller	
2- Propanol	Roth	Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	Deutschland
Blut-Agar-Platten	BioMérieux	Deutschland
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	PromoCell	Deutschland
Caso Broth	Sigma-Aldrich	Deutschland
cDNA-Synthese Kit (PrimeScript™)	Takara Bio Europe/Clontech	Frankreich
Chloroform ≥99%	Sigma-Aldrich	Deutschland
Citratpuffer 10 mM	Eigene Herstellung Labor	
Collagen G	Biochrom	Deutschland
Crystal RNAmagic	Biolabproducts	Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose	Biowest	Frankreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth	Deutschland
Einfriermedium CryoSFM	PromoCell	Deutschland
Ethanol ≥98,8%	Carl Roth	Deutschland
Eukitt®	O. Kindler	Deutschland
Formalin	Sigma-Aldrich	Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco	Deutschland
Gentamicin	Carl Roth	Deutschland
Hämalaun-Lösung	Eigene Herstellung Labor	
<i>Hank's Balanced Salt Solution HBSS</i>	Gibco	Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich	Deutschland
Keratinocyte Growth Medium (KGM2)	PromoCell	Deutschland
KGM2 Supplement Mix	PromoCell	Deutschland
KGM2 Supplement Pack	PromoCell	Deutschland
Natriumcarbonatpuffer 0,05M	Eigene Herstellung Labor	
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck	Deutschland
Natriumphosphatpuffer (NaPP) 10mM	Eigene Herstellung Labor	

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biowest	Frankreich
- PBS/1% BSA		
- PBS/T (+TWEEN®) (Waschpuffer)		
Penicillin/Streptomycin	Gibco	Deutschland
RPMI1640	Gibco	Deutschland
siRNA + Negativkontrolle	Ambion	Deutschland
<i>SYBR-Green Premix Ex Taq™</i>	Takara Bio Europe/Clontech	Deutschland
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	Eigene Herstellung Labor	
- TBS-T (+ TWEEN®)		
- TBS/1% BSA		
- TBS /12% BSA		
Triton X-100 1%	Sigma-Aldrich	Deutschland
Trypsin/EDTA 0,05%	Gibco	Deutschland

**Tabelle 1 Chemikalien und Reagenzien**

### 2.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller	
Absaugsystem BVC professional	Vacuubrand	Deutschland
Bio-Photometer	Eppendorf	Deutschland
Brutschrank CO <sub>2</sub> CB150I™	Binder	Deutschland
Flüssigstickstoff-Tank Arpege70	Air Liquide	Deutschland
Gefrierschrank Sanyo Ultra low™ MDF-19 (-80°C)	Panasonic	Japan
Kolonienzählgerät ProtoCol	Symbiosis	Deutschland
Kühlschränke/Gefrierschränke (+4°C/-20°C)	Liebherr	Deutschland
Mikroplattenreader Sunrise™	Tecan	Deutschland
Mikroplattenwasher ELx50™	BioTek	Deutschland
Mikroskope		
- Leitz DiaVert™	Leica	Deutschland
- Mikroskop Wilovert™ 30	Hund	Deutschland
Präzisionswaage KERN 822-33	Kern und Sohn	Deutschland
Realtime-Time PCR-System	Applied Biosystems	USA
StepOne Plus™		
Spectrophotometer NanoDrop™100	Peqlab	Deutschland
Thermocycler T3™	Biometra	Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf	Deutschland

Vortexer Vortex Genie2™

Scientific Industries USA

#### Zentrifugen

- Eppendorf Zentrifuge 5810R, Eppendorf Deutschland  
5804R, 5424, 5417R
- Heraeus Megafuge™ 1.0R
- Heraeus Multifuge™ X3R Heraeus Deutschland  
Heraeus Deutschland

---

### Tabelle 2 Geräte

#### 2.1.3 Medien

---

Medien	
KGM2 (+++)	- 500 ml KGM2 Basismedium - Supplement Mix - 5ml Penicillin/Streptomycin
KGM2 (++-)	- 500 ml KGM2 Basismedium - Supplement Mix
KGM2 (-+-)	- 500 ml KGM2 Basismedium
Serum-freies-Keratinocyten-Differenzierungs-Medium (SKDM)	- 500 ml KGM2 Basismedium - Supplement Pack (kein Rinderhypophysenextrakt/ Epinephrin) - 25mg Ascorbinsäure - 500mg BSA - 575µl 1M CaCl <sub>2</sub> Filtration 0,22µm Sterilfilter
TSB Medium	- 30g Caso Broth - 1l demineralisiertes Wasser

---

### Tabelle 3 Medien

#### 2.1.4 Primer

---

Primer	Sequenz (5'→ 3')
hBD2 forward	GCCTCTCCAGGTGTTTTTG
hBD2 reverse	GAGACCACAGGTGCCAATTT
hBD3 forward	TGTTTGCTTTGCTCTTCCTGT
hBD3 reverse	CGCCTCTGACTCTGCAATAA
RP38 forward	TCAAGGACTTCCTGCTCACA
RP38 reverse	AAAGGTATCTGCTGCATCGAA
S2-31 (RNase 7 forward)	GGAGTCACAGCACGAAGACCA
S-33rev (RNase 7 reverse)	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA

---

#### Tabelle 4 Primer

##### 2.1.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller	
RNase 7 (polyklonal, Ziege)	ZIKA-Kaninchenbetrieb	Deutschland
Isotop Kontroll-Antikörper (Ziege, IgG, Normalserum)	ZIKA-Kaninchenbetrieb	Deutschland
Cetuximab (Erbix <sup>®</sup> ) (EGFR-AK, monoklonal, IgG)	Merck	Deutschland
<i>Anti-Human BD-2</i> , (polyklonal, Ziege)	PeproTech	Deutschland
RNase 7 (biotinyliert, polyklonal, Ziege)	ZIKA-Kaninchenbetrieb	Deutschland
<i>Anti-Human BD-2</i> (biotinyliert, polyklonal, Ziege)	PeproTech	Deutschland
<i>Human BD-3 ELISA Kit</i> OmniKine <sup>™</sup>	Acris	Deutschland

#### Tabelle 5 Antikörper

##### 2.1.6 Zellen

Zellen	Hersteller
NHEK	PromoCell (Deutschland)
Fibroblasten	Isoliert aus Spender-Dermis

#### Tabelle 6 Zellen

##### 2.1.7 Bakterien

Bakterien	
<i>S. aureus</i> 8325-4	Laborstamm

#### Tabelle 7 Bakterien

##### 2.1.8 Sonstige Materialien

Sonstige Materialien	Hersteller	
12-Loch-Flachbodenplatten	Corning	Deutschland
96-Loch-Flachbodenplatten NUNC <sup>™</sup>	Thermo Scientific	Deutschland
Biopsie-Kassetten	Medite	Deutschland



Biopsie-Stanzen versch. Größen	pfm medical	Deutschland
Deep-Well Platten	Corning incorporated Costar	USA
Einfrierhilfe Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific	Deutschland
Inserts 6-Well	Corning incorporated Costar	USA
Küvetten	Sarstedt	Deutschland
Petrischalen	Sarstedt	Deutschland
Pipettenspitzen + FilterTip	Sarstedt	Deutschland
Röhrchen Zentrifuge (2, 15, 50 ml)	Sarstedt	Deutschland
qPCR 8er Streifen + Deckel + Folie	Applied Biosystems	USA
qPCR 96-Well-Platten Halbrand	Sarstedt	Deutschland
Serologische Einmalpipetten	Sarstedt	Deutschland
Skalpelle	pfm medical	Deutschland
Sterilfilter 0,22µm	Sarstedt	Deutschland
Zellkultureinsätze 6-Well	BD Bioscience	Deutschland
Zellkultur-Flaschen (T75)	Sarstedt	Deutschland
Zellschaber CellScraper™	Sarstedt	Deutschland
Zellsiebe	BD Bioscience	Deutschland

---

**Tabelle 8 sonstige Materialien**

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Anzucht und Kultivierung primärer Keratinozyten

Für sämtliche durchgeführte Versuche wurden primäre Keratinozyten verwendet. Dabei handelt es sich um „*Normal Human Epidermal Keratinocytes*“ (NHEK) aus juvenilen Vorhäuten, die von der Firma PromoCell (Deutschland) bezogen wurden.

Die Kultivierung fand in T75 Zellkulturflaschen in wasserdampfgesättigter Umgebung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Da es sich bei den NHEKs um adhärente Zellen handelt, wachsen sie auf kollagenbeschichtetem Untergrund.

Zur Kollagenisierung wurden die Flaschen zunächst mit 1%iger Rattenschwanz-Kollagen Typ I Lösung in 0,02 M Chlorwasserstoff bei 37°C für mindestens 2 h inkubiert. Danach wurde jede Flasche zweimalig mit 10 ml PBS ausgewaschen, trockengelegt und anschließend bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Als Medium wurde KGM2 verwendet, welches durch verschiedene Zusätze je nach Bedarf ergänzt wurde:

<b>KGM2 (-+-)</b>	0,06 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>KGM2 (++-)</b>	0,06 mM CaCl <sub>2</sub> + definierter Supplement Mix
<b>KGM2 (+++)</b>	0,06 mM CaCl <sub>2</sub> + definierter Supplement Mix + 50 U/ml Penicillin-Streptomycin

**Tabelle 9 Medien Zellkultur**

Die Fütterung mit frischem Medium erfolgte alle zwei Tage und die Entwicklung der Zellen wurde mittels eines Mikroskops kontrolliert.

### 2.2.2 Subkultivierung primärer Keratinozyten

Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-100% wurden die Keratinozyten subkultiviert.

Im ersten Schritt wurde das verbrauchte Medium vollständig entfernt und die Zellen einmalig mit 10 ml PBS gewaschen.

Anschließend folgte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden. Hierzu wurden 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Nach 5-7 Minuten Inkubation bei 37°C wurde per Mikroskop die Ablösung der Zellen überprüft und durch leichtes Abklopfen vervollständigt. Abschließend wurde die enzymatische Reaktion mit 10 ml FCS haltigem Medium (DMEM) abgestoppt.

Mittels einer serologischen Pipette wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 200 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810R, Rotor A-4-62).

Die flüssige Phase wurde entfernt und das Pellet in KGM2 resuspendiert. Die Zelllösung stand nun zur weiteren Verwendung auf Zellkulturplatten oder Zellkulturflaschen zur Verfügung.

### 2.2.3 Kryokonservierung primärer Keratinozyten

Die Kryokonservierung (aus dem Griechischen *krýos* „Kälte“ und dem Lateinischen *conservare* „bewahren“) beschreibt die Einlagerung von organischen Materialien in flüssigem Stickstoff (LN<sub>2</sub>). Die entsprechende Temperatur liegt bei < -195°C.

Mithilfe dieses Verfahrens kann die Vitalität von Zellen für einen nahezu unbegrenzten Zeitraum aufrechterhalten werden.

Nach Anzucht der Keratinozyten in Kultur wurde mit diesen, wie bei der Subkultivierung der Zellen beschrieben, verfahren. Abweichend davon erfolgte die Resuspension in 1 ml Einfriermedium pro Inhalt einer T75 Flasche. Das Einfriermedium bestand aus einer Lösung von Kryoprotektiva und Kulturmedium.

Nach Überführung in ein spezielles Kryokonservierungsröhrchen wurde dieses mittels der Einfrierhilfe Mr. Frosty™ bei -80°C eingelagert. Zur Vermeidung intrazellulärer Schäden wurden die Zellen über Nacht mit einem Fortschritt von ca. 1°C pro Minute bis zum Erreichen der -80°C heruntergekühlt.

Am Folgetag konnten die Röhrchen in die LN<sub>2</sub>-Tanks umgelagert werden.

## 2.3 Stimulationen mit Bakterien

Für Stimulationen mit Bakterien wurde am vorherigen Tag zunächst der benötigte Keim aus einem bei -80°C eingefrorenen Glycerinstock in 8 ml TSB angeimpft.

Nach Übernachtskultivierung wurden 250 µl der Keimlösung in 8 ml TSB überimpft. Die Inkubation erfolgte bis eine optische Dichte OD<sub>600</sub> von ≤ 1,0 erreicht war.

Die Bakteriensuspension wurde bei 2500 g 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor F34-6-38). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 8 ml PBS gewaschen, gevortext und erneut bei gleicher Geschwindigkeit und Dauer zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit KGM2(-/-) resuspendiert und eine OD<sub>600</sub> von 0,2 SA eingestellt (entspricht für SA 8325-4 ca. 5x10<sup>7</sup> CFU („colony forming units“)).

Die Keratinozyten für die Lebendstimulation befanden sich in 12-Loch-Platten. Vor Verwendung wurde das Medium vollständig entfernt und jede Vertiefung mit 300 µl PBS gewaschen.

Anschließend wurde in jedes Well 300 µl Bakteriensuspension zugefügt. Von diesem Schritt ausgenommen wurden Kontrollen, welche nur das Ursprungsmedium KGM2(-/-) enthielten.

Abschließend wurden die Bakterien bei 350 g für 5 Minuten auf die Zellen zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Eine genaue Bestimmung der CFUs erfolgte über die Herstellung von T<sub>0</sub>-Platten. Für jede im Versuch verwendete Verdünnung wurden dafür zwei TSB-Agar-Platten angelegt.

Hierfür wurde die Bakterienlösung im Verhältnis 1:500 verdünnt und anschließend jeweils 50 µl pro Platte ausgestrichen. Diese Platten wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die finale Auswertung erfolgte mittels eines Koloniezählgeräts.

Zum Beenden der Stimulation wurden die Keratinozyten mikroskopisch begutachtet und die Überstände abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und entweder bei -80°C bis zur Weiterverwendung eingefroren, oder es wurde direkt mit der RNA-Isolierung begonnen.

Die Überstände wurden bei -20°C gelagert.

## 2.4 Stimulation 3D-Hautäquivalent

Für die Stimulation der gezüchteten 3D Häute wurde der benötigte Keim ebenfalls mit KGM2(++) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt. Die so erhaltene Suspension wurde mittig auf die Haut pipettiert. Je nach Aussehen und Größe der Haut wurden entweder 20 µl oder 40 µl verwendet.

Zuvor fand eine Vorinkubation im Unterstand statt. Hierbei wurde das vorherige Medium des Unterstandes gegen die gewünschte Mixtur aus SKDM und Inhibitoren bzw. Kontrollen ersetzt. Nach einstündiger Vorinkubation wurde zusätzlich die Bakterienlösung auf die Häute gegeben. Die finale Inkubation in diesem Zustand verlief über 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 mRNA-Isolation

Der gesamte Prozess der RNA-Isolation wurde unter einem Abzug durchgeführt. Die verwendete Single-Step-Methode basiert auf einem von Chomczynski und Sacchi 1987 etablierten Verfahren (Chomczynski, 1987).

Die zu verarbeitenden Keratinozyten wurden zunächst mit 300 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 300 µl phenolhaltigen RNA-Isolationsreagenz „Crystal RNAmagic“ lysiert. Das in Crystal RNAmagic enthaltene Guanidiniumthiocyanat ist in der Lage, zusätzlich zur Lysefunktion, RNasen und andere Enzyme zu inaktivieren. Der Bestandteil Phenol dient zur Extraktion der enthaltenen RNA.

Nach der Lyse wurde die Suspension in eine Schraubdeckeltube überführt, 60 µl Chloroform hinzugegeben und durch ca. 15 Sekunden langes Überkopfwenden vermischt. Danach erfolgte eine Inkubation von 3 Minuten bei Raumtemperatur. Daraufgehend wurden die Gefäße bei 4°C und 12.000 g 15min lang zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R, Rotor F45-30-11). Nach Abschluss der Zentrifugation war eine deutliche dreischichtige Phasenbildung erkennbar. Die unteren Inter- und Phenol-Phasen enthielten hierbei Proteine und DNA, während die obere Phase aus RNA bestand. Die klare RNA wurde vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden 150 µl Isopropanol hinzugefügt und durch erneutes Überkopfwenden mit der RNA-Phase vermenget. Es folgten eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000 g. Das hierbei entstandene RNA-haltige Zellpräzipitat wurde danach zweimal mit 300 µl 75% Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft für 5-10 min getrocknet. Abschließend erfolgte die endgültige Resuspension mit 12 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die gewonnene RNA bei -80°C eingelagert werden.

### 2.5.2 cDNA-Synthese

Zur weiteren Verarbeitung der isolierten mRNA wurde diese zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde im ersten Schritt die Reinheit und Konzentration der RNA mithilfe des NanoDrop1000 Spektrophotometers bei 250 nm bestimmt. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte über das Verhältnis von E260 zu E280 und lag zwischen 1,7 und 2.

Für die reverse Transkription von 0,5 µg RNA wurde folgender Lösungsansatz pro Probe benötigt:

- 2 µl 5x PrimeScriptPuffer (TAKARA)
- 10 mM dNTPs
- RNase Inhibitor (40 U/µl),
- 0,5 µl 20 µM Oligo (dt) Primer
- 0,125 µl PrimeScript Reverse Transkriptase

Als Reaktionsvolumen wurden 10 µl verwendet, welches durch Auffüllung mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O erreicht wurde.

Die Synthese erfolgte in einem T3 Thermocycler, der das Programm mit einer 5-minütigen Inkubation bei 65°C startete. Anschließend folgte der Syntheseschritt bei 42°C für 30 Minuten. Hierbei lagert sich der oligo (dt) Primer an den isolierten RNA-Strang an und startet die Synthese eines komplementären cDNA-Stranges. Durch das Enzym RNase H wird die RNA-Matrize abgebaut.

Zum Abschluss erfolgte eine erneute Inkubation bei 85°C für 5 Minuten.

Nach Beendigung des Zyklus wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und anschließend bei -20°C gelagert.

### 2.5.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Das Prinzip der qPCR beruht im Grundsatz auf dem gleichen System wie die reguläre Polymerasekettenreaktion. Sie dient ebenfalls zur Vervielfältigung vorhandener kurzer Nukleinsäuresequenzen und zusätzlich zu deren Quantifizierung. Der gesamte Prozess wird dabei aber durch Einlagerung eines Fluoreszenz-Farbstoffes in Echtzeit aufgezeichnet.

Benötigt wurden pro Probenansatz:

- 1,0 µl zu vervielfältigende cDNA-Lösung (Template)
- 5,2 µl SYBR® Premix Ex Taq™ inklusive ROX
- 400nM (0,4 µl) des forward Primers
- 400nM (0,4 µl) des reverse Primers
- 3 µl H<sub>2</sub>O

Es wurde mit 96-Loch-Platten gearbeitet, welche pro Well einen Reaktionsansatz von 10 µl Volumen enthielten.

Vor Beginn der qPCR wurde die Platte mit einer Plastikfolie abgeklebt und für 1 min bei 200 g und RT zentrifugiert.

Es wurde das „StepOnePlus Real-Time PCR System“ verwendet, welches nach folgendem Protokoll verfuhr:

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

Für die Markierung der PCR-Endprodukte wurde der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR GREEN II verwendet. Dieser zeigt bei Interkalation an Doppelstrang-DNA eine Fluoreszenz bei 520 nm auf.

## 2.6 Hautspülungen

Der gesamte Prozess der Verarbeitung der gewonnen Proben wurde unter einer Sterilwerkbank ausgeführt, um eine mögliche Kontamination zu vermeiden. Während der Spülungen wurde ebenfalls unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet. Probanden und der Durchführende durften während der Prozedur nicht sprechen und Fenster und Türen wurden geschlossen gehalten.

Die für die Spülungen benutzten Plastikzylinder wurden manuell aus 15 ml Plastikgefäßen (Falcon) hergestellt. Vor Ersteinsatz und eventueller Wiederbenutzung wurden diese, zur Sicherstellung der Sterilität, für min. 48 h in 80 % Ethanol verwahrt und anschließend autoklaviert.

Diese Zylinder wurden stichprobenartig in Wasser und Puffer gespült. Mit dieser Spüllösung wurde eine PCR durchgeführt, um eine bakterielle Kontamination auszuschließen.

Die für die Hautspülungen verwendete Lösung bestand aus einem 10 mM Natriumphosphatpuffer mit einem Anteil von 0,1 % Triton-X. Pro gespültem Hautareal wurden hiervon 1000 µl benötigt.

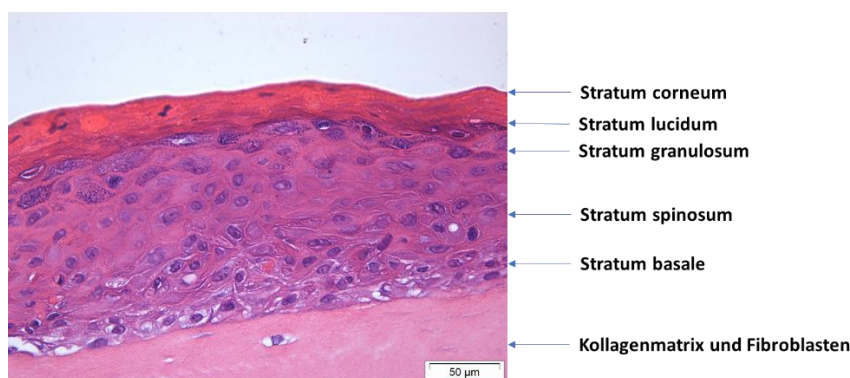
Bei den ausgesuchten Arealen handelte es sich um die talgige Stirn und den trockenen Unterarm auf der Hohlhandseite, ca. 5 cm distal der Ellenbeuge, und die Ellenbeuge selbst. Die untersuchte Stelle hatte jeweils eine Fläche von 1,77 cm<sup>2</sup>.

Der Prozess der Spülung bestand aus 15-maligem Auf- und Abpipettieren der Lösung innerhalb des Zylinders. Zudem wurde mit der Pipettenspitze die Hautoberfläche mit leichtem Druck berührt. Anschließend wurde die Lösung in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Gefäße 10 min bei 120 g zentrifugiert. Dieser Prozess führte zu einer Auftrennung zwischen Bakterien und AMPs. Die Bakterien bildeten das feste Pellet, während sich die AMPs oben in der flüssigen Phase wiederfanden. Das Pellet wurde direkt bei -80°C bis zur Weiterverwendung eingefroren, während der die AMPs enthaltenden Phase vorher 10 % BSA zugesetzt wurde. Die AMPs wurden später mithilfe eines ELISAs analysiert.

## 2.7 Herstellung eines 3D-Hautäquivalents

Die Arbeit mit Keratinozyten *in vitro* hat viele Vorteile, aber auch einige Beschränkungen. Sie repräsentiert die Funktion der Haut als Ganzes nur auf einer sehr eingeschränkten Ebene. Weder die fortschreitende Differenzierung der Keratinozyten während ihrer Wanderung durch die Zellschichten, noch das Vorhandensein anderer Zellen werden berücksichtigt. Um die physiologische Einbettung der Keratinozyten in die humane Haut besser imitieren zu können, wurde das 3D-Hautäquivalent entwickelt. Auf einem Grundgerüst aus Fibroblasten werden Keratinozyten hochgezüchtet und zur Proliferation angeregt. Das entstehende artifizielle Hautäquivalent gleicht in Aufbau und Struktur der regulären Haut. Dadurch ergibt sich eine naturgetreuere Basis für Versuche (Klicks *et al.*, 2017).



**Abbildung 6 Aufbau der Epidermis in HE-Färbung**

Die Herstellung des 3D-Hautäquivalents erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von sieben Tagen, anschließend erfolgte eine entsprechende Stimulation über Nacht. Zum Anlegen eines 3D-Hautäquivalents wurden zunächst NHEK Keratinozyten (maximal Passage 4, niedrigere Passagen wurden bevorzugt) und Fibroblasten verwendet. An Tag eins wurde als Basis für die Haut eine Kollagenmatrix mithilfe der Fibroblasten angelegt. Diese wurde in 3,0 µm Corning Zellkultureinsätze auf einer speziellen 6-Loch „BioCoat“ Platte vorbereitet. Für jede der Polyethylen-Zellkultureinsätze wurde insgesamt ein Lösungsvolumen von 2,5 ml benötigt. Als Gesamtvolumen wurden 16,25 ml (1/2 Zellkultureinsatz zusätzlich berechnet) angesetzt, welches sich aus 13 ml Collagen, 1,625 ml HBSS (10x) und 1,625 ml FCS inklusive des Inhaltes von 1,5 T75 Flaschen ca. 100% konfluenter Fibroblasten (ca. 100.000) zusammensetzte. Dabei wurde das Kollagen in ein 50 ml Falcon vorgelegt und anschließend das HBSS vorsichtig hinzugegeben. Das Falcon musste dabei beständig geschwenkt werden. Anschließend wurde die saure Lösung mit 1M NaOH neutralisiert, bis es zu einem roten Farbumschlag kam (ca. 300 µl). Danach konnte sie bei 4°C gelagert werden. Die Fibroblasten wurden einmalig mit PBS gewaschen, mit 4 ml Trypsin/EDTA abgedaut und der Vorgang anschließend mit der doppelten Menge FCS-haltigem DMEM abgestoppt. Nach kompletter Entfernung des Mediums wurde das Zellpräzipitat mit FCS resuspendiert und anschließend gleichmäßig mit der Kollagenlösung vermischt.

Anschließend wurden jeweils 2,5 ml in jedes Insert pipettiert und die Platte für ca. 2 h bei 37°C ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Zeit ist die Kollagenmatrix erhärtet und es wurden innen 2 ml KGM2 (+++) und außen 14 ml KGM2 (+++) hinzugegeben. Danach erfolgte die Inkubation der Platte über Nacht bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Am zweiten Tag fand die Aussaat der Keratinozyten statt. Für 6 Zellkulturinserts wurden 3 T75 Flaschen mit 100 % konfluenten NHEK Keratinozyten benötigt. Diese wurden jeweils mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst, mit 7 ml KGM2 (+++) abgestoppt und anschließend herunterzentrifugiert. Das entstandene Präzipitat wurde vor Weiterverwendung in 4 ml KGM2 (++-) aufgenommen und anschließend 4x durch einen Cell Strainer (40 µm Nylon) gesiebt. Das KGM2 (+++) innerhalb der Inserts musste vorsichtig und ohne die Kollagenmatrix zu beschädigen abgenommen werden, bevor 2 ml der Keratinozytensuspension mittig darauf pipettiert werden konnten. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Am dritten Tag wurde die Kollagenmatrix „entspannt“. Dabei wurde mit einer Pipettenspitze die Grenze zwischen Matrix und innerem Einlagenrand entlanggefahren, damit sich das Kollagen ablösen konnte und die Oberflächenspannung verringert wurde. Dieser Vorgang dient zur Förderung der Interaktion zwischen Fibroblasten und Keratinozyten, sowie zur Förderung des Wachstums und der Differenzierung. Am vierten Tag wurde der „Air Lift“ durchgeführt, das Trockenlegen der Einlagen. Dafür wurde ein spezielles Nährmedium SKDM (engl. *supplemented keratinocyte defined medium*) benötigt. Das KGM (++) wurde außen und innen aus den Inserts entfernt. Hierbei war vor allem wichtig, dass die Matrix am Ende komplett trocken lag und kein Restmedium mehr vorhanden war. Außen wurden abschließend 10 ml SKDM hinzugefügt. Die Keratinozyten waren ab diesem Zeitpunkt luftexponiert und wurden ausschließlich per Diffusion von unten versorgt. Bis zum siebten Tag nach dem „Air Lift“ wurden die Zellen alle zwei Tage mit jeweils 10 ml SKDM pro Zellkulturinsert gefüttert und in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Die vorgesehenen Stimulationen wurden über Nacht am siebten Tag in 6-Loch Flachbodenplatten vorgenommen. Dazu wurden die Inserts aus den „BioCoat“ Platten transferiert und entsprechende Stimuli, außen oder direkt auf das Hautäquivalent, zugesetzt. Am Tag sieben war das 3D-Hautäquivalent fertig und wurde beendet. Pro Insert wurde hierzu eine Einbettkassette mit zwei in Formalin getränkten Schaumstoffeinlagen und ein Schraubdeckeltube mit 500 µl Crystal RNAmagic benötigt. Die Inserts wurden mit einer Pinzette entnommen und auf einer Plastikunterlage platziert. Mit einer 5 mm Stanze (variabel je nach Größe der gewachsenen Haut) wurde mittig ein Stück herausgestanzt. Dieses wurde mittels eines scharfen Skalpells halbiert und die eine Hälfte vorsichtig auf die Schaumstoffeinlage der Kassette gebettet. Der Vorgang wurde mit einem Randstück wiederholt und die Einbettkassette anschließend verschlossen und in Formalin eingelegt. Von den restlichen Stücken wurde die Epidermis vorsichtig mit der Pinzette abgelöst und in Crystal RNAmagic zur RNA-Isolierung überführt. Das in den Vertiefungen zurückgebliebene Medium konnte in Eppendorf Gefäße aufgenommen und bis zur weiteren Analyse



via ELISA o.ä. bei -20°C gelagert werden. Die Einbettkassetten mit den Hautstanzen wurden an das Histologische Routinelabor der Hautklinik des UKSH zur weiteren Verarbeitung übergeben.

## 2.8 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie wird verwendet, um bestimmte Strukturen im Gewebe mithilfe von Antikörpern sichtbar zu machen. Es handelt sich um die eindeutige Identifizierung von Gewebeeigenschaften durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen. Die Antikörper zeichnen sich durch eine Affinität zu einer speziellen Gewebeeigenschaft aus, dem sogenannten Epitop. Die dabei entstehende Bindung wird durch ein gekoppeltes Detektionssystem sichtbar gemacht (Lang, 2013).

In diesem Fall wurden in Paraffin eingebettete Schnitte des vorher hergestellten und stimulierten 3D-Hautäquivalents verwendet und diese nach der von Hsu et al. etablierten IBRAB-Methode (*indirect bridged avidin-biotin*) gefärbt. Diese beruht auf der Bindung des Primärantikörpers an das Epitop, welcher wiederum die Bindungsstelle für einen biotinylierten Sekundärantikörper und den dazu gehörigen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bildet.

Zunächst wurden die ausgewählten Präparate 45 min bei 63°C im Trockenschrank vorgewärmt um das Wachs zu erweichen. Zur endgültigen Entfernung des Paraffins wurden die Präparate anschließend zweimal für jeweils 10 min in Xylol getaucht und über eine absteigende Alkoholreihe (96 % Ethanol, 80 % Ethanol und 70 % Ethanol) für jeweils zwei Minuten rehydriert. Daraufhin wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser für 10 min gespült und anschließend mit einem Citratpuffer im Dampfgerar 20 min lang hoch erhitzt und langsam wieder abgekühlt. Der Citratpuffer dient zur Demaskierung von Antikörper-Bindungsstellen, die durch die vorherige Paraffineinbettung und Formalinfixierung gegebenenfalls nicht mehr zugänglich gewesen sind. Es folgte ein kurzer Waschvorgang mit Aqua dest. und TBS-Tween (TBS-T) für 5 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Dako Pen zur Fixierung der Lösungen eingekreist und mit TBS/12 % BSA zur Verhinderung unspezifischer Bindungen blockiert. Danach wurde der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in TBS+1% BSA aufgetragen und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Präparate ein weiteres Mal mit TBS-Tween gewaschen und über Nacht bei 4°C belassen. Am nächsten Tag erfolgte ein weiterer Waschvorgang und die Auftragung des 1:300 in TBS+1% BSA verdünnten Sekundärantikörpers. Während der 30minütigen Inkubation wurde der ABC-Komplex nach Herstellerangaben angesetzt und nach zweimaliger erneuter Spülung der Schnitte mit TBS-Tween auf die Träger gegeben. Es erfolgte eine erneute halbstündige Inkubation. Im Anschluss wurden die Präparate erneut dreimalig mit TBS-T gespült und mit Vector NovaRED Peroxidase wenige Minuten lang benetzt. Vor der Kernfärbung mit Hämalaun erfolgte ein weiterer Waschschriff mit TBS-T und dest. Wasser für 10 min. Danach erfolgte das Bläuen für 7 min in Leitungswasser und die Dehydrierung

über die aufsteigende Alkoholreihe. Die abschließende Auswertung und Dokumentation erfolgte mittels inversem Mikroskop mit integrierter Kamera. Zu jedem durchgeführten Färbedurchlauf wurde zusätzlich eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle angefertigt. Dies dient zur Überprüfung der Validität der Färbung.

## 2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Quantifizierung der Proteinmengen von RNase 7 in wurde der „Sandwich“-ELISA verwendet. Sowohl die Überstände aus den 3D-Hautäquivalent-Versuchen als auch die gewonnen Hautspülungen wurden über dieses Verfahren ausgewertet. Das antikörperbasierte Nachweisverfahren erfolgt über einen enzymatischen photometrisch messbaren Farbumschlag. Das nachzuweisende Antigen wird durch eine Antigen-Antikörper Reaktion von zwei verschiedenen Antikörpern detektiert. Der sogenannte „Capture“-Antikörper (Verdünnung 1:3000) wurde hierzu auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgebracht. Pro Vertiefung wurden 50 µl des primären Antikörpers zur Beschichtung der Platte benötigt. Anschließend erfolgten eine ca. einstündige Inkubation bei 37°C und ein Waschschrift mit einer Pufferlösung nach dem Verwurf der Flüssigkeit aus den Vertiefungen. Wahlweise konnte die Inkubation auch über Nacht bei 4°C erfolgen. Zur Blockade von freien Bindungsstellen wurde die Platte anschließend mit einer PBS/1% BSA-haltigen Lösung erneut für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit Waschpuffer, wurden jeweils 50 µl der zu messenden Proben aufgetragen. Es erfolgte eine weitere Inkubation für ca. eine Stunde bei 37°C. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer folgte die Zugabe des zweiten, biotinylierten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:7500. Dieser „Detection“-Antikörper bindet spezifisch das in den Proben vorhandene Antigen und bildet mit diesem zusammen einen Antikörper-Antigen-Komplex. Die Mikrotiterplatte wurde erneut bei gleicher Temperatur und für eine Stunde inkubiert und anschließend der überflüssige Detektionsantikörper ausgewaschen. Daraufhin wurde ein 1:10000fach verdünntes Streptavidin-Konjugat aufgetragen, welches einen an den zweiten Antikörper gebundenen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bildet. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C erfolgte ein finaler Waschvorgang. Das Auftragen des Substrats (Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)) initiierte, in Verbindung mit dem enzymgekoppelten Antikörper, den farbigen Umschlag. Durch eine photometrische Messung der Extinktion, bei einer Wellenlänge von 620 nm, wurde die Quantität des zu bestimmenden Endproduktes ermittelt. Der RNase 7-ELISA wurde von der Arbeitsgruppe Harder in diesem Labor etabliert.

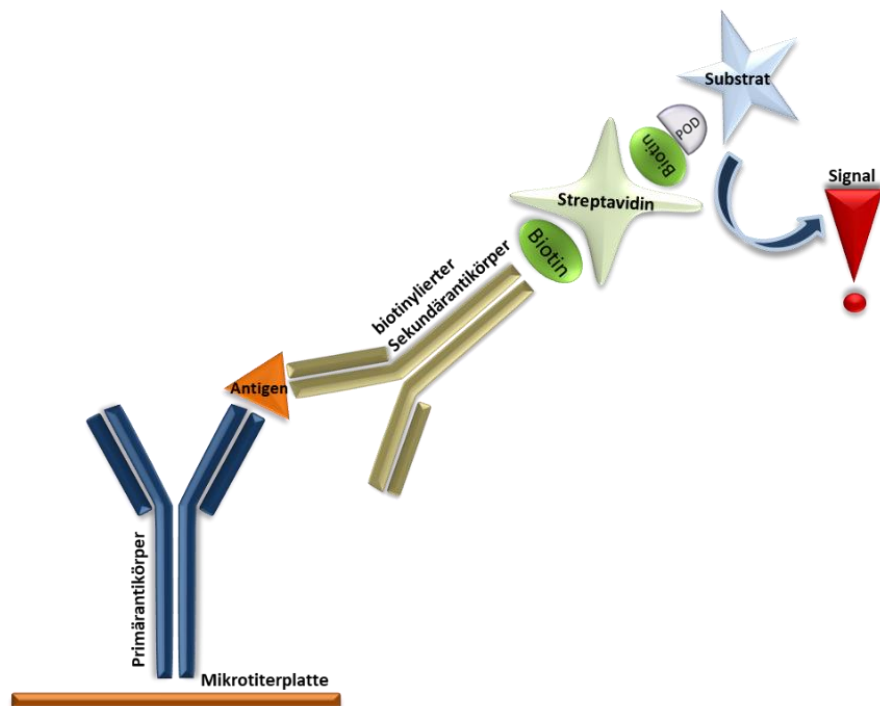
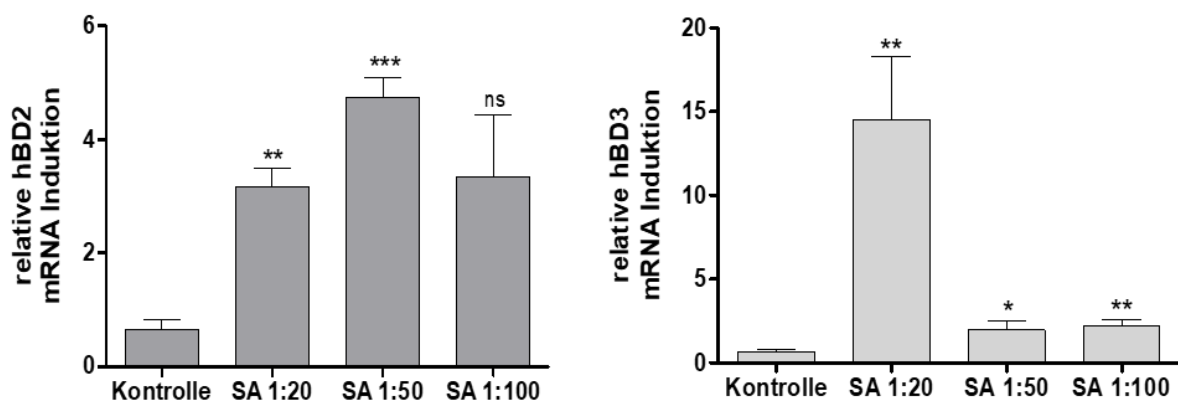


Abbildung 7 Modell eines „Sandwich“-ELISA

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *S. aureus* 8325-4 Dosiskinetik auf Keratinozyten

Für die Arbeit mit *S. aureus* (SA) 8325-4 war es wichtig, zunächst die optimale Konzentration für den Einsatz des Keimes auf den Keratinozyten zu ermitteln. Ziel war es, eine möglichst hohe und konstante Induktion der mRNA der untersuchten AMPs hBD2, hBD3 und RNase 7 zu erzielen. In zu hoher Konzentration eingesetzt kann SA die Keratinozyten stark schädigen bzw. abtöten, sodass diese nicht adäquat auf den Keim reagieren können. Um dies zu ermitteln, wurden Keratinozyten mit SA in den Konzentrationen 1:20, 1:50 und 1:100 inkubiert. Dabei zeigte sich bei hBD3 die quantitativ höchste Induktion (14fach) bei einer Verdünnung von 1:20. Die höchste hBD2-Induktion lag bei 1:50 (4fach). Der Unterschied zur 1:20 Verdünnung war jedoch gering. Um zu überprüfen, ob die Induktion noch stärker wird, wurde mit der Konzentration 1:10 stimuliert. Diese Stimulation resultierte in einer starken Schädigung der Keratinozyten und einem signifikanten Abfall der relativen hBD3-mRNA Induktion; bzw. einer großen Standardabweichung für die hBD2-Induktion (Abb. 8). Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen bei einer Konzentration größer als 1:20 von SA zu stark geschädigt werden, um die mRNA-Expression der AMPs zu induzieren. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden die folgenden Experimente mit einer Verdünnung von 1:20 durchgeführt.



**Abbildung 8 Dosiskinetik von SA auf Keratinozyten:** 100% konfluente NHEKs wurden mit verschiedenen SA-Konzentrationen (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) über Nacht inkubiert. Nach RNA-Isolation und reverser \*99Transkription wurde die Expression der AMPs mittels qPCR ermittelt. Die Abbildung zeigt die relative mRNA-Induktion von hBD3 und hBD2. Es wurden Dreifachwerte aus vier identisch ausgeführten Versuchen ausgewertet. Die dargestellten Signifikanzen wurden jeweils im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. (\*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05, ns = nicht signifikant, Student's t-Test).

#### 3.2 Ermittlung der optimalen Einsatz-Konzentration von Cetuximab

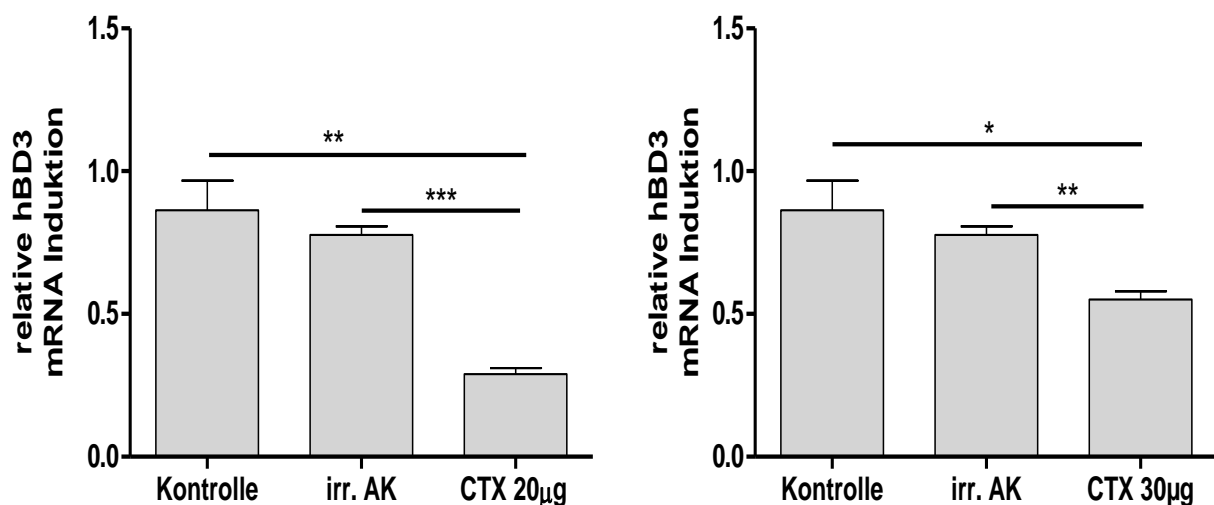
Um den Einfluß des EGFR auf die Grundexpression der AMPs in humanen Keratinozyten zu überprüfen, wurden diese über einen Zeitraum von 24 h mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab (CTX) inkubiert. Ziel des Versuchs war es, herauszufinden welche AMPs in ihrer Grundexpression durch die Blockade des

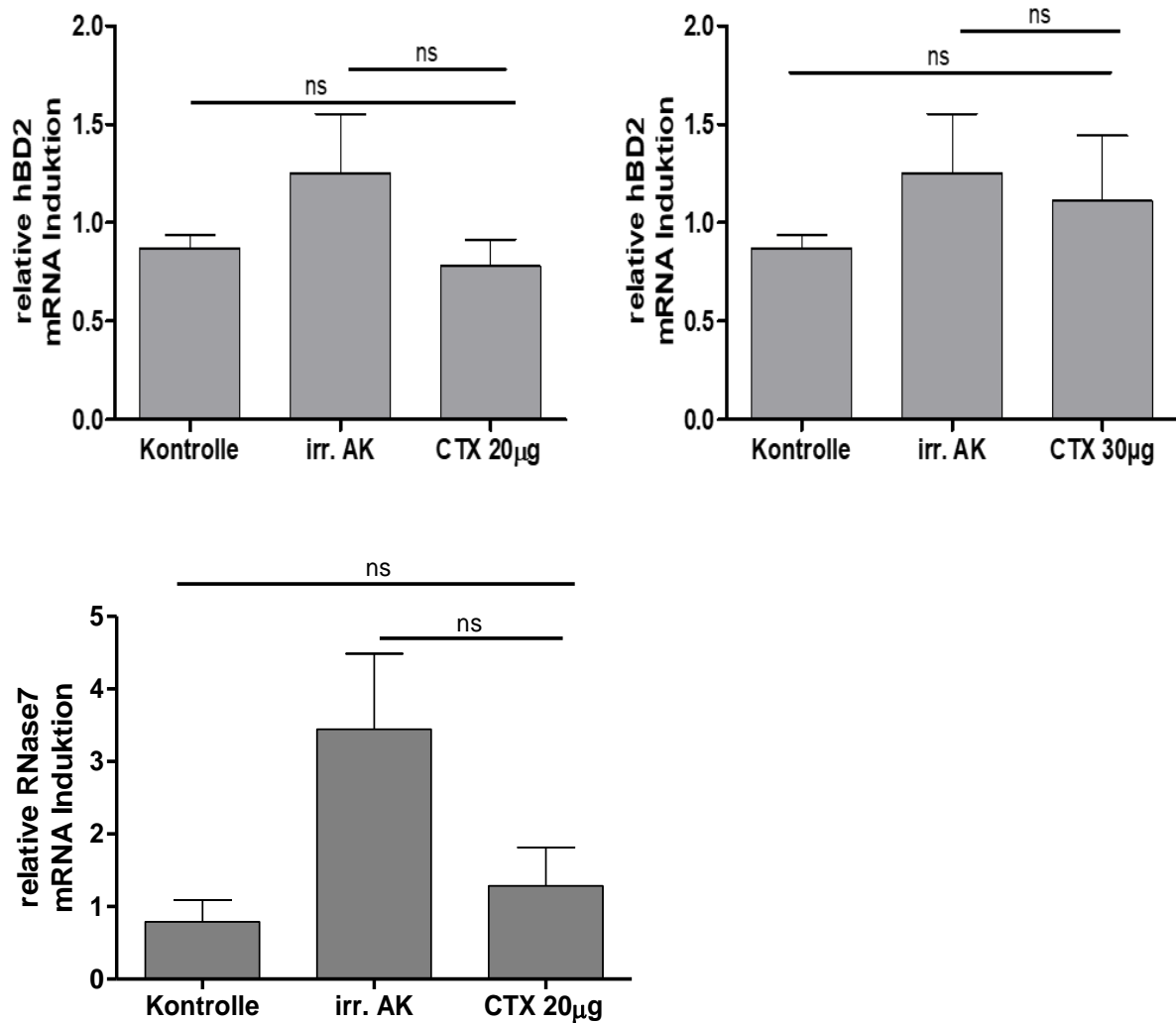
EGFRs herunterreguliert werden und welche davon unbeeinflusst bleiben. Bereits bekannt ist, dass unter den AMPs insbesondere hBD3 nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren, wie dem IGF-I und dem PRGF verstärkt exprimiert wird (Sorensen *et al.*, 2003; Bayer *et al.*, 2017). Daraus ließ sich eine potentielle Korrelation zwischen dem EGFR, zu dessen Induktoren diese Wachstumsfaktoren zählen, und der Induktion von AMPs schließen. Demzufolge war anzunehmen, dass die Expression von hBD3 unter Einsatz eines Antikörpers gegen den EGFR sinkt. Zur Überprüfung dieser Theorie wurden Keratinozyten mit zwei verschiedenen Konzentrationen von CTX (20 µg/ml und 30 µg/ml) über Nacht inkubiert.

In der anschließenden Auswertung zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die Grundexpression von hBD3 (Abb. 9). Die beiden eingesetzten Konzentrationen von CTX führten zu einer signifikanten Reduktion der relativen hBD3 mRNA-Expression. Zur Etablierung des weiteren Vorgehens wurde ein Vergleich zwischen den beiden Konzentrationen gezogen. Dabei wurde festgestellt, dass die höhere Signifikanz beim Einsatz einer Konzentration von 20 µg CTX pro ml erzielt werden konnte. Folglich wurde bei anschließenden Versuchsreihen der Anti-EGFR Antikörper in der Konzentration von 20 µg/ml verwendet.

Bei Auswertung der mRNA-Daten von hBD2 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Expression mit und ohne Einsatz von CTX. Bei beiden eingesetzten Konzentrationen konnten keine Herunterregulation der Grundexpression detektiert werden (Abb. 9).

Auch für RNase 7 ist eine Abhängigkeit vom EGFR beschrieben (Walter *et al.*, 2017). Es zeigte sich ein deutlicher Abfall der RNase 7 Grundexpression nach Inkubation mit CTX im Gegensatz zur Kontrolle mit einem irrelevanten Antikörper, dieser ist jedoch nicht signifikant im Rahmen des regulären Student's t-Tests (Abb.9).



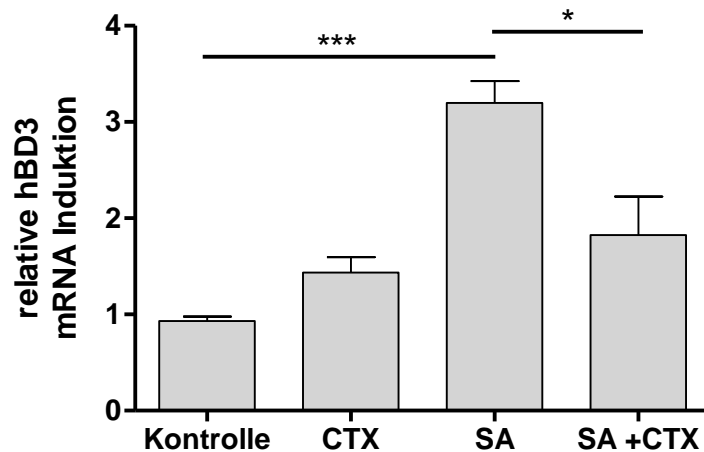


**Abbildung 9 Einfluss einer EGFR Blockade auf die AMP Grundexpression.** 2d postkonfluente NHEKs wurden mit Cetuximab in den Konzentrationen von 20 µg/ml und 30 µg/ml KGM (-/-) stimuliert. Als Kontrolle wurde ein irrelevanter Antikörper mit NaCl als Vehikel eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in humider Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> über Nacht. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription erfolgte die Auswertung mittels qPCR. Die Werte ergeben sich aus drei im Aufbau identischen Experimenten. (\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*p<0,05, ns = nicht signifikant, Student's t-Test).

### 3.3 Einfluss des EGFR auf die SA-induzierte AMP-Expression

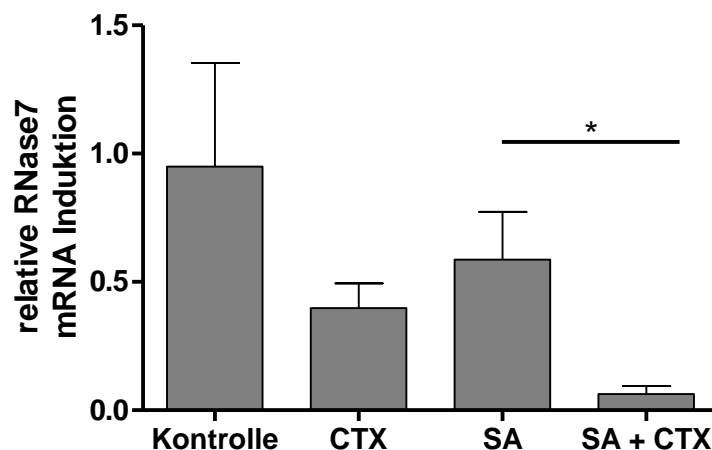
In den Folgeversuchen wurden die vorangegangenen Versuchsreihen kombiniert, um zu untersuchen, ob die SA-induzierte Expression von hBD2, hBD3 und RNase 7 in den Keratinozyten einer partiellen Abhängigkeit vom EGFR unterliegt. NHEK wurden dazu mit SA und CTX allein und zusammen inkubiert. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine besonders schnelle Reaktion auszuschließen, wurden die Zellen für 30-60 min mit Cetuximab vorinkubiert. Als Kontrolle dienten NHEK ohne Cetuximab und ohne SA („Kontrolle“). Bei hBD3 zeigte sich deutlich eine nach der Stimulation mit SA ausgelöste verstärkte mRNA-Expression im Gegensatz zur Kontrolle. Bei gleichzeitigem Einsatz von CTX zeigte sich,

dass diese Expression signifikant herunterreguliert wurde (Abb. 10).



**Abbildung 10 Die SA-vermittelte hBD3-Expression wird durch Cetuximab signifikant inhibiert.** 100% konfluente NHEK wurden mit 20 µg/ml CTX 45min vorinkubiert und anschließend für 3h mit SA und CTX inkubiert. Als Kontrolle dienten NHEK ohne SA und/oder ohne CTX. Die Auswertung der mRNA-Expression für hBD3 erfolgte nach RNA-Isolation und reverser Transkription mittels qPCR. Die Werte ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Experimenten (\*\*p<0,001, \*p<0,05 Student's t-Test).

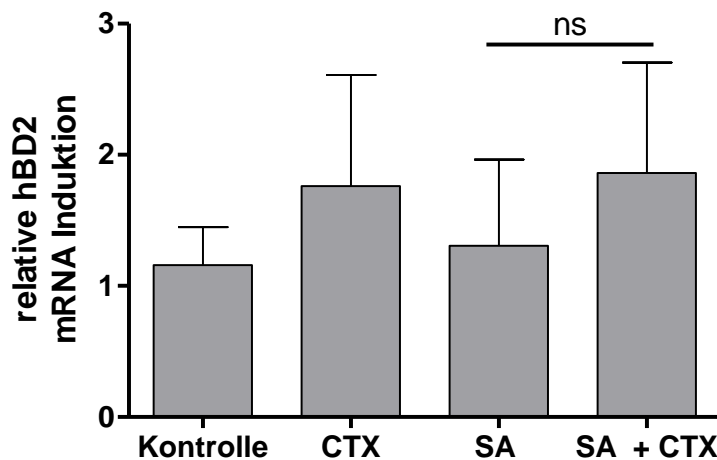
Bei der Messung der mRNA-Expression von RNase 7 konnte keine Induktion verzeichnet werden. Trotzdem zeigte sich bei Inkubation mit Cetuximab eine geminderte Konzentration von RNase 7 (Abb. 11).



**Abbildung 11 RNase 7 nach Stimulation mit SA und CTX** 1d postkonfluente NHKEs wurden mit 20 µg/ml CTX 30-60 min vorinkubiert und anschließend mit einer 1:20 verdünnten Bakteriensuspension von SA stimuliert. Die Übernachtinkubation erfolgte bei 37°C und CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Zur Auswertung wurde nach RNA-Isolation und reverser Transkription eine qPCR verwendet. Dargestellt sind Werte aus zwei unabhängigen und im Versuchsaufbau identischen Experimenten, die als Triplikate durchgeführt wurden (\*p<0,05 Student's t-Test).

Auch bei der Auswertung der mRNA-Daten von hBD2 konnte keine gesteigerte Genexpression bei Stimulation mit SA aufgezeigt werden. Der Vergleich zwischen den Kontrollwerten und den mit SA

stimulierten Keratinozyten ergab keine aussagekräftige Differenz der Expression. Bei simultanem Einsatz von CTX und SA stieg die Konzentration von hBD2 leicht aber nicht signifikant an (Abb. 12).



**Abbildung 12 hBD2 nach Stimulation mit SA und CTX** 100 % konfluente NHEKs wurden mit CTX (20 µg/ml) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit SA 1:20 verdünnt über Nacht im Brutschrank. Die Auswertung mittels qPCR fand nach vorangegangener RNA-Isolation und reverser Transkription statt. Die dargestellte Abbildung zeigt Werte aus drei verschiedenen Experimenten (ns = nicht signifikant, Student's t-Test)

### 3.4 3D-Hautäquivalent

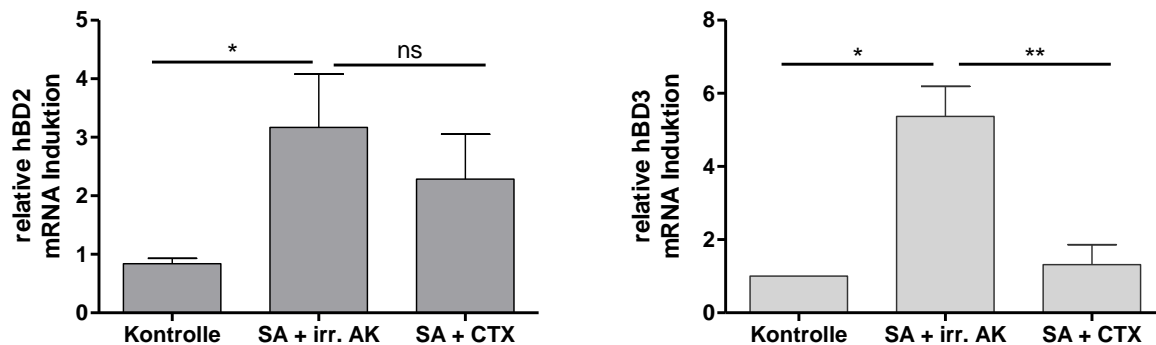
#### 3.4.1 Untersuchung der Expression von AMPs im 3D-Hautäquivalent bei Stimulation mit SA und CTX

Zur Analyse der veränderten Expression von hBD3 nach Blockade des EGFR wurde eine Versuchsreihe mit 3D-Hautäquivalenten zusätzlich zum „Monolayer“-Modul verwendet. Zur erhöhten Induktion von hBD3 wurden die 3D-Hautäquivalente zunächst mit SA in den Verdünnungen 1:50 bzw. 1:20 stimuliert. Der Keim wurde in 20-40 µl Volumen auf die Oberfläche des Äquivalents aufgetragen, während die Stimulation mit CTX von der Unterseite der Matrix erfolgte. Als Kontrolle wurde ein irrelevanter Antikörper eingesetzt. Bei der abschließenden Analyse mittels qPCR zeigte sich eine deutliche Steigerung der relativen hBD3 mRNA-Induktion nach Stimulation mit SA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mit NaCl (Abb. 13). Dies belegt deutlich, dass die Expression von hBD3 durch SA induzierbar ist.

Vergleicht man die Konzentration von hBD3 nach Stimulation mit dem Keim mit und ohne Einsatz von CTX, ergibt sich ein relevanter Unterschied. Bei simultaner Zugabe von CTX zeigte sich ein signifikanter Abfall der gemessenen hBD3 Expression (Abb. 13). Es konnte somit auch im Versuch mit dem Hautäquivalent gezeigt werden, dass die Genexpression von hBD3 durch die Blockade des EGFR gehemmt wird. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die durch SA induzierte Expression dieses AMPs partiell vom EGFR abhängig ist.



Die Auswertung der hBD2 mRNA zeigte, gegenüber der Kontrolle, eine signifikante Induktion der Genexpression bei Stimulation mit SA. Beim zusätzlichen Einsatz des Anti-EGFR Antikörpers zeigte sich zwar ein leichter Abfall der Konzentration, aber ohne jegliche Signifikanz (Abb. 13). Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass der EGFR in der Signalkaskade zur Induktion von hBD2 keine Rolle spielt.



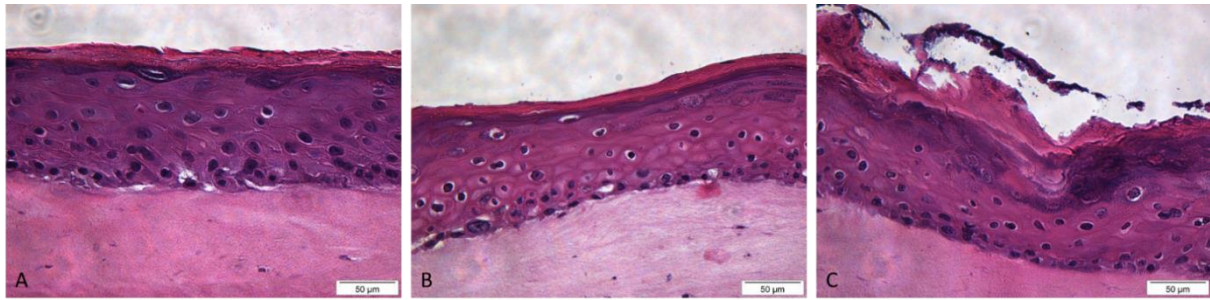
**Abbildung 13 SA-vermittelte AMP Expression im 3D-Hautäquivalent.** Die verwendeten Hautäquivalente wurden mit CTX (20 µg/ml) oder einem irrelevanten Antikörper vorinkubiert und anschließend erfolgte die Stimulation mit SA 1:20 verdünnt über Nacht. Die finale Auswertung nach RNA-Isolation und reverser Transkription erfolgte mittels qPCR. Die dargestellten Daten ergeben sich aus zwei unabhängigen Versuchen (\*\*p<0,01, \*p<0,05, ns = nicht signifikant, Student's t-Test).

### 3.4.2 Histologie

In der mikroskopischen Auswertung der histologischen Schnitte ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen stimulierten Hautäquivalenten. In der Kontrolle (Abb. 14A) stellte sich der Aufbau der artifiziellen Haut erwartungsgemäß dar. Die Gliederung der einzelnen Schichten der Epidermis war gut definiert und die Keratinozyten ihrer Schicht entsprechend ausdifferenziert.

Nach Inkubation mit SA (Abb. 14B) zeigte sich weiterhin eine intakte Gesamtstruktur. Oberhalb des *Stratum corneums* waren einzelne, oder in kleinen Haufen angeordnete, Bakterien zu erkennen. Einzelne Anlagerungen des Keimes auf der Oberfläche waren ebenfalls stellenweise zu verzeichnen. Die Hornhaut blieb jedoch in ihrer Integrität unversehrt.

Bei simultanem Einsatz von Cetuximab und SA (Abb. 14C) war eine deutliche Destruktion der Oberfläche des Hautäquivalents erkennbar. Es kam zu größeren Ansammlungen von SA auf dem unmittelbar exponierten Areal. Aufgrund der invasiven Aktivität des Keimes kam es zu teilweise großflächigen Ablösungen des *Stratum corneums*, welches von den grampositiven Kokken unterwandert und aus dem Zellverband gelöst wurde. Das Eindringen des Keimes war an manchen Stellen bis in das *Stratum lucidum* und das *Stratum granulosum* nachvollziehbar. Es zeigte sich eine insgesamt stark geschädigte Epidermis mit hoher Keimbelastung.

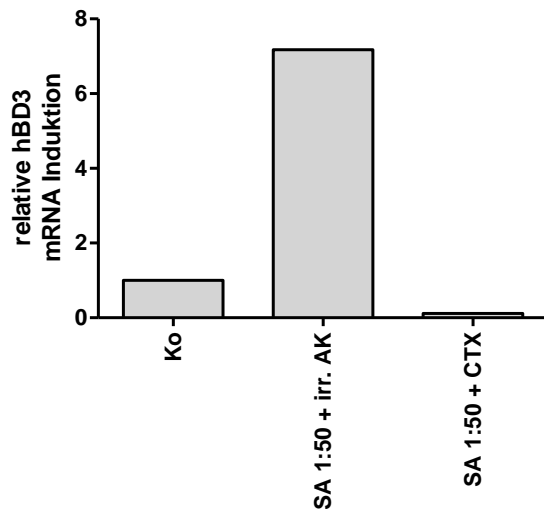


**Abbildung 14 Physische Auswirkungen der Stimulation mit SA und CTX auf das 3D-Hautäquivalent**  
 Die 3D-Hautäquivalente für die Versuchsreihe wurden nach gängigem Protokoll angelegt. Nach Abschluss der Anzucht und vor Stimulation präsentierten sich die Äquivalente als „gut gewachsen“, mit ebener Oberfläche und vereinzelt randständigen Löchern unter dem Mikroskop. Nach Fixierung im Paraffin-Block und HE-Färbung zeigte die Kontrolle (A) eine regelgerecht ausgebildete Struktur mit klarer Ausdifferenzierung der einzelnen Schichten. Die Stimulation mit SA 8325-4 (B) erfolgte über Nacht in einer Verdünnung von 1:50. Grafik (C) zeigt das Präparat nach simultaner Stimulation mit SA und CTX (20 µg/ml). Die Aufnahmen wurden mittels inversem Mikroskop mit integrierter Kamera aufgenommen.

### 3.4.3 Immunhistochemie

Zusätzlich zu der regulären HE-Färbung der histologischen Präparate des 3D-Hautäquivalents wurden mit einem immunhistochemischen Verfahren AMPs angefärbt. Bei den bereits erläuterten, mit HE gefärbten Schnitten wurde der Fokus auf die Morphologie der 3D Hautäquivalente und die Beurteilung der Hautintegrität gelegt. Im Gegensatz dazu diente die Immunhistochemie zur Darstellung der Expression verschiedener Antigene. In der für diese Arbeit durchgeführten Versuchsreihe wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch hBD3 detektiert.

Bei dem ausgewählten Hautäquivalent wurde vor Beginn der immunhistochemischen Färbung mittels qPCR die relative mRNA-Expression von hBD3 ermittelt. Dabei zeigte sich eine geringe Grundexpression von hBD3 bereits in der unstimulierten Kontrolle. Nach Inkubation mit SA konnte ein deutlicher Anstieg dieser Expression beobachtet werden. Bei simultaner Stimulation mit SA und Cetuximab sank der gemessene Wert von hBD3 deutlich unter den in der Kontrolle vorhandenen Ausgangswert ab (Abb. 15). Ziel der Immunhistochemie war es, die in den RNA-Auswertungen aufgezeigten Schwankungen der Induktion des AMPs zusätzlich optisch darzustellen.

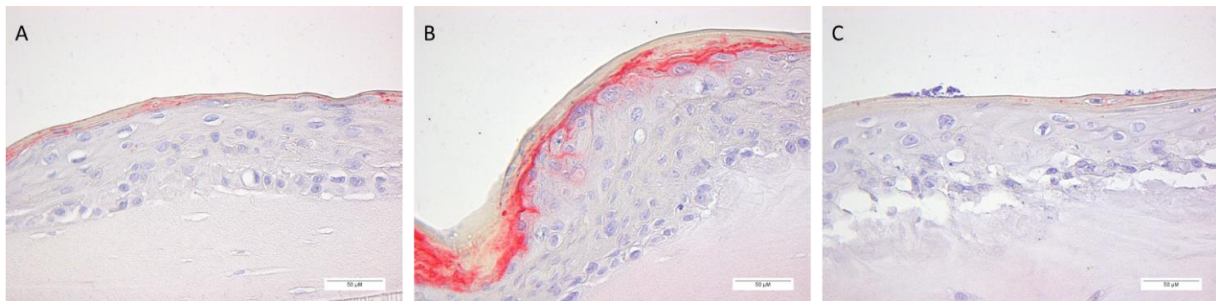


**Abbildung 15 hBD3 RNA-Analyse im 3D-Hautäquivalent** Das 3D-Hautäquivalent wurde nach gängigem Protokoll mit NHEKs angelegt. Die Vorinkubation mit 20 µg/ml CTX erfolgte über einen Zeitraum von 2h durch den Unterstand. Die Stimulation mit SA erfolgte in einer Verdünnung des Keims von 1:50 in einem 40 µl großen Tropfen auf der Oberfläche des Präparates. Die finale Inkubation belief sich auf einen Zeitraum von ca. 24h bei 37°C im Brutschrank. Zur Auswertung wurde nach RNA-Isolation und reverser Transkription eine qPCR herangezogen, zusätzlich erfolgte die Einbettung von Teilen der entsprechenden 3D Hautäquivalente und anschließend die histologische Begutachtung und immunhistochemische Färbung.

In der Kontrolle (Abb. 16A) zeigt sich ein reguläres Wachstum des 3D Hautäquivalents. Die Ausdifferenzierung der Schichten ist deutlich nachvollziehbar und die Oberfläche aus kernlosen Keratinozyten ebenmäßig ausgebildet. Im Stratum corneum finden sich leichte Anfärbungen von hBD3, welche mit der ausgewerteten mRNA-Expression des AMPs konkordant sind.

Nach Stimulation des 3D-Hautäquivalents mit SA (Abb. 16B) konnte ein deutlicher Anstieg der Expression von hBD3 verzeichnet werden. Die entsprechenden rötlichen Färbungen sind deutlich intensiver und ausgeprägter als in der zugehörigen Kontrolle (Abb. 16A). Hauptsächlich sind diese innerhalb des Stratum corneums und in denen sich unmittelbar darunter befindlichen Schichten lokalisiert. Die Oberfläche der Haut erscheint weiterhin intakt und in ihrer Integrität, trotz der Exposition mit SA, unbeeinträchtigt.

Im Versuchsabschnitt C wurde das Hautäquivalent zusätzlich zur Stimulation mit SA einer Inkubation mit Cetuximab unterzogen (Abb. 16C). Auf dem Schnitt ist eine deutliche Ansammlung von SA auf der Oberfläche des Präparates zu erkennen. Das Stratum corneum erscheint angegriffen. Auffallend ist die fast vollständige Abwesenheit der hBD3 anzeigenden rötlichen Färbung. Trotz massiven Keimbefalls reagieren die Keratinozyten nicht mit der in (B) nachgewiesenen erhöhten Expression von hBD3.



**Abbildung 16 Die SA-vermittelte hBD3 Expression in 3D Hautäquivalenten wird durch Blockade des EGFR gehemmt.** Zur Darstellung kommt das nach Protokoll und bereits erläuterten Verfahren hergestellte 3D-Hautäquivalent. Die Grafik zeigt die unstimulierte Kontrolle (A) im Vergleich zu einem Präparat nach Stimulation mit SA (B) und simultaner Inkubation mit SA und CTX (20 µg/ml) (C). Es erfolgte eine histologische Aufarbeitung durch eine Paraffin-Einbettung und die Herstellung von mikroskopisch auswertbaren Schnitten. Abschließend wurden die Präparate einem immunhistochemischen Verfahren zur Detektion von hBD3 unterzogen. Als Kernfärbung kam Hämalaun zum Einsatz, während sich die Expression von hBD3 rötlich darstellt.

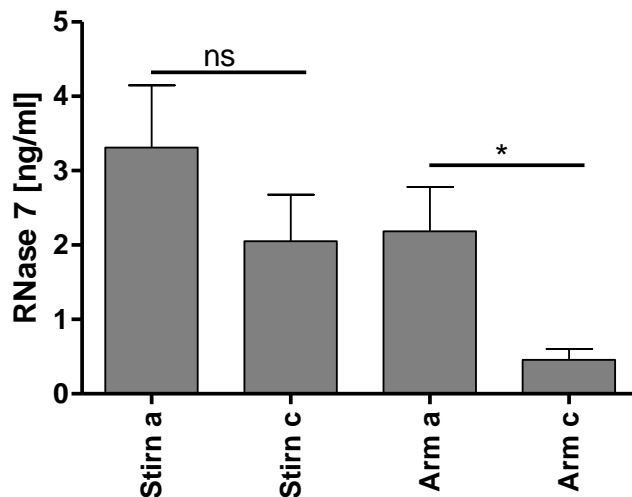
Als Fazit der Versuchsreihe mit dem 3D-Hautäquivalent bei Stimulation mit SA und Einsatz von CTX lässt sich zusammenfassen, dass die Blockade des EGFR zu einer deutlichen Absenkung der SA-induzierten Expression von hBD3 führt.

### 3.5 Auswertung der Hautspülungen

Die Auswertung des im Rahmen der Hautspülungen gewonnenen Materials wurde mittels ELISA durchgeführt. Insgesamt wurden Proben von acht Patienten unterschiedlichen Alters, Geschlechts und mit verschiedenen Tumorentitäten untersucht. Die Hautspülungen wurden jeweils an der Stirn, der Innenseite des Unterarms und der Armbeuge durchgeführt. Als erster Spülungszeitpunkt (a) wurde der Moment unmittelbar vor der intravenösen Erstapplikation der Antikörper angesetzt. Die Verlaufskontrolle (c) erfolgte im Abstand von zwei Wochen, vor der zweiten Anwendung der Therapie.

Eine adäquate Quantifizierung von hBD2 in den Proben war allerdings aufgrund der geringen Konzentration des AMPs in den Messungen nicht möglich. Diese lag bei einer deutlichen Mehrzahl der Proben unterhalb der Nachweisgrenze.

Bei der Auswertung des RNase 7 ELISAs konnte jedoch ein signifikantes Ergebnis erzielt werden (Abb. 17). Vor Beginn der Therapie zeigten sich Konzentrationen von >2 ng/ml RNase 7 auf der Innenseite des Unterarms. Zum Kontrollzeitpunkt (c) ließ sich eine auf deutlich unter 1 ng/ml erniedrigte Konzentration des AMPs nachweisen. Aus diesem Ergebnis lässt sich eine verminderte Expression von RNase 7 *in vivo* als Folge einer Therapie mit einem Anti-EGFR-Antikörper ableiten.



**Abbildung 17** Auswertung des mittels Hautspülungen gewonnenen Materials nach beschriebenen Protokoll des RNase 7 ELISA. Die Bezeichnungen Stirn a und Arm a stehen für die beschriebenen Lokalisationen zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn. Der Kontrolltermin zwei Wochen nach Beginn der Therapie wird mit c gekennzeichnet. (\* $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant, Student's t-Test).

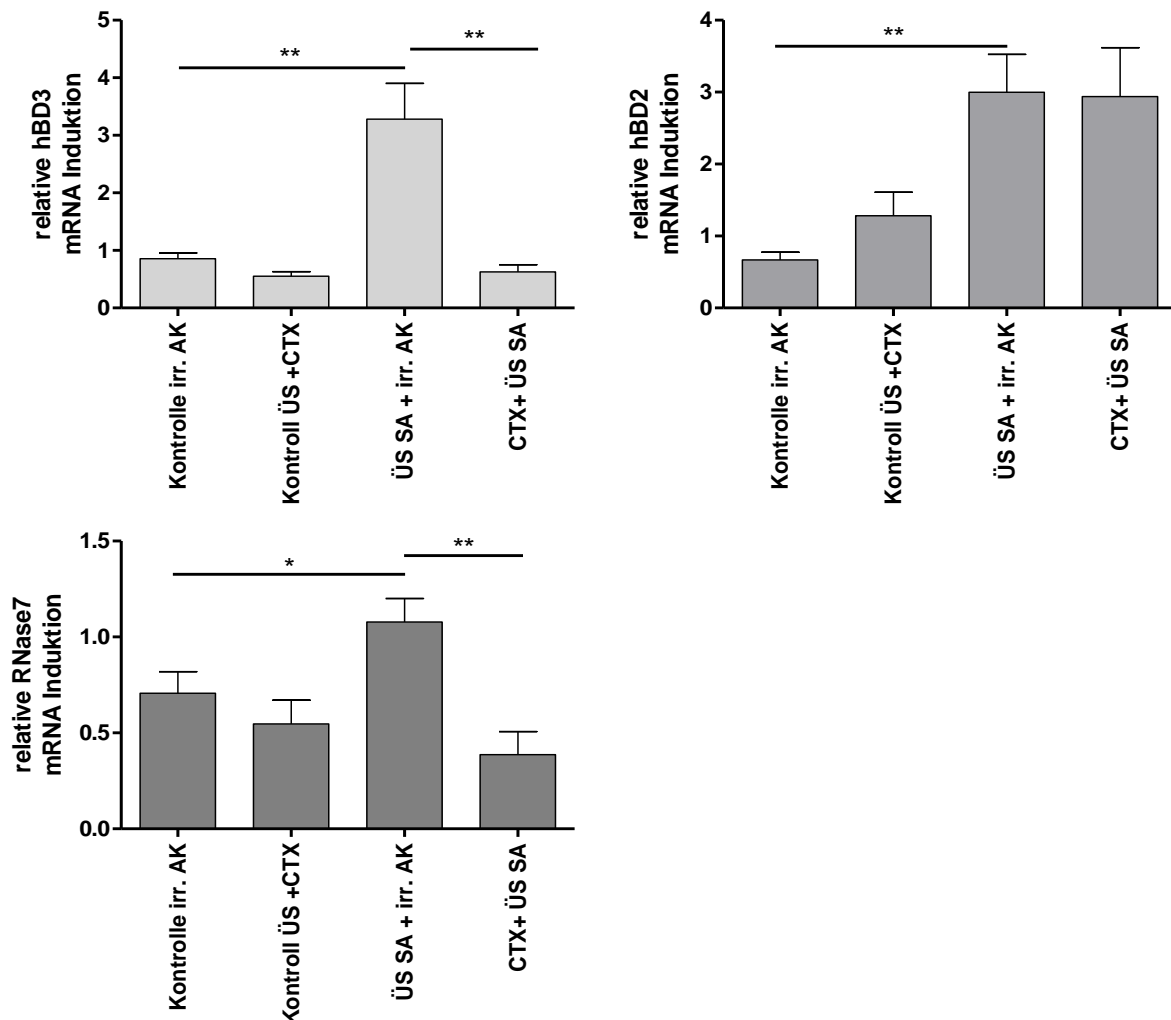
### 3.6 Einfluss sezernierter Faktoren von SA auf die Expression von AMPs

Insbesondere bei der Arbeit mit den 3D-Hautäquivalenten hat sich gezeigt, dass SA in der Lage ist die Integrität der Haut bzw. der Keratinozyten stark zu schädigen. Dies spiegelte sich in teilweise stark variierenden Werten von RP38 und im Rahmen der mikroskopischen Kontrollen der Zellen wider. Ebenso zeigte die HE Färbung der 3D Hautschnitte starke Deformationen der Epidermis durch SA. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde eine weitere Versuchsreihe mit Kultur-Überständen von SA auf NHEKs durchgeführt. Dadurch wurde die Wirkung von SA auf die von ihm sezernierten Faktoren beschränkt, welches zu einer geringeren Schädigung der Keratinozyten führte.

Besonders bei der Auswertung der relativen mRNA Induktion von hBD3 konnten signifikante Induktionen beobachtet werden (Abb. 18). Die Potenz des Überstandes konnte durch die deutlich gesteigerte Expression von hBD3 im Vergleich zu der des Kontrollüberstandes gezeigt werden. Konkordant zu den Ergebnissen im Versuch mit lebenden Bakterien konnte auch eine signifikante Senkung der hBD3 Konzentration nach Einsatz von CTX protokolliert werden (Abb. 18). Daraus lässt sich herleiten, dass die von SA sezernierten und sich im Überstand befindlichen Substanzen zur Induktion des Defensins beitragen und deren Auswirkungen über eine Blockade des EGFR herunterreguliert werden können.

Die Analyse der mRNA Ergebnisse von RNase 7 zeigte die gleiche Tendenz. Nach Stimulation der Zellen mit dem SA-Überstand konnte eine Induktion der RNase 7 Expression nachgewiesen werden. Bei simultanem Einsatz von SA und CTX sank die Expression des AMPs hingegen wieder (Abb. 17). Auch

bei hBD2 konnte eine gesteigerte Expression der mRNA bei Einsatz des SA-Überstandes im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Bei zusätzlicher Zugabe von CTX zeigte sich keine Veränderungen dieser Konzentration (Abb. 17).



**Abbildung 18 Die SA Überstand (ÜS) SH1000 vermittelte AMP-Expression in Keratinozyten wird zum Teil über den EGFR reguliert.** Vitale NHEKs wurden bei 100 % Konfluenz in den für die Stimulation mit CTX vorgesehenen Wells einer einstündigen Vorinkubation mit CTX in einer Konzentration von 20 µg/ml unterzogen. Kongruent wurde der irrelevante Antikörper als Kontrollantikörper eingesetzt. Anschließend wurden diese mit Kontroll-Überständen und den SA-Überständen über Nacht im Brutschrank bei 37°C mit CO<sub>2</sub> stimuliert und inkubiert. Die Überstände wurden in einer Verdünnung von 1:10 in KGM (+/-) eingesetzt. Als Vehikel für den Einsatz der Antikörper diente NaCl. Die abschließende Auswertung der Daten für hBD2, hBD3 und RNase 7 erfolgte nach RNA-Isolation und reverser Transkription mittels qPCR. Die dargestellten Ergebnisse resultieren aus drei voneinander unabhängigen und identisch aufgebauten Versuchen (\*\*p<0,01, \*p<0,05 Student's t-Test).

## 4 Diskussion

### 4.1 Antimikrobielle Peptide in der kutanen Abwehr

Es ist bekannt, dass antimikrobielle Peptide und Proteine (AMPs) einen der wichtigsten Abwehrmechanismen der menschlichen Haut darstellen. Sie fungieren als „körpereigene Antibiotika“ und schützen die epithelialen Barrieren vor potenziell schädlichen Umwelteinflüssen. Nachgewiesen wurden sowohl eine antibakterielle Wirkung im gramnegativen und im grampositiven Bereich als auch antivirale und antifungale Effekte (Yamasaki, 2008). Zudem gibt es Hinweise, dass verschiedene rekurrente Hautinfektionen mit einer Dysregulation in der Expression von AMPs in Verbindung stehen (Schitteck, 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der Expression der Defensine hBD2 und hBD3, sowie der Ribonuklease RNase 7 genauer zu beleuchten. Mit Hilfe des Einsatzes spezifischer Antikörper konnte eine Beteiligung des EGFR an der Induktion von hBD3 und RNase 7 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eine Induzierbarkeit der AMPs durch Stimulation mit SA, sowohl in Monolayer-Anzucht als auch im 3D-Hautäquivalent, aufgezeigt werden.

### 4.2 Induktion von AMPs nach Stimulation mit SA

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AMPs eine wichtige Rolle beim Schutz der Haut vor Keimen spielen. Deutliche Hinweise darauf lieferte bereits die Tatsache, dass alle drei untersuchten AMPs (hBD2, hBD3 und RNase 7) durch die Präsenz von SA induziert wurden. Dabei zeigten vor allem hBD2 und hBD3 eine starke Induzierbarkeit durch SA. Reproduzierbar konnte in Monolayer-Versuchen mit Keratinozyten nachgewiesen werden, dass diese nach Kontakt mit SA vermehrt die beiden untersuchten Defensine ausschütteten. Auch die Auswertung der mRNA-Daten des 3D-Hautäquivalents bestätigten diese Beobachtung.

Im Gegensatz dazu zeigten sich deutlich variablere Ergebnisse bei der Induktion von RNase 7. In der Gesamtzusammenfassung aller Versuche konnte auch für dieses AMP eine gesteigerte Induzierbarkeit durch SA nachgewiesen werden, welche jedoch deutlich geringer war als die von hBD2 und hBD3. Auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stellte eine Problematik dar und war nicht in allen Versuchen erfolgreich.

In diesem Fall zu diskutieren sind die unterschiedlichen Expressionsformen der AMPs. Die beiden Defensine zählen bekanntermaßen zu den induzierbaren Peptiden, während RNase 7 physiologisch konstitutiv exprimiert wird (Zanger, 2010). Konkordant dazu zeigten sich bei den unstimulierten Kontrollen der Versuche niedrige Ausgangswerte für hBD2 und hBD3, während RNase 7 meist bereits

in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorzufinden war. Besonders bei der Arbeit mit den Überständen von SA konnte diese Beobachtung gemacht werden. Die Expression der Defensine war durch Stimulation mit SA-Überständen steigerbar, während die der RNase 7 bei einem Großteil der Experimente auf einem gleichbleibenden Niveau verblieb bzw. nicht signifikant anstieg.

Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die konstitutive Expression von RNase 7 zu einer Limitierung beim Versuch der Induktionssteigerung durch Bakterienstimulation in Keratinozyten führen könnte.

Es konnte außerdem beobachtet werden, dass eine gesteigerte Induktion der AMPs hBD2 und hBD3 bereits bei niedrigen Konzentrationen des Bakteriums zu verzeichnen waren (Daten nicht gezeigt). Für hBD2 und hBD3 lagen die optimalen Bedingungen für die Stimulation durch SA bei höheren Keimbelastungen, weshalb mit Verdünnungen von 1:20 gearbeitet wurde. Diese optimale Konzentration wurde im Rahmen multipler Titrationsversuche ermittelt. Bei sehr starken Verdünnungen (z.B. 1:100) konnte keine signifikante Steigerung der Expression der AMPs verzeichnet werden, während bei niedrigeren Verdünnungen (z.B. 1:2, 1:10) die Keratinozyten zu stark geschädigt wurden, um die Expression der AMPs bewerten zu können.

Auch diese Tatsache könnte ein Grund für eine nicht konstante Induktion von RNase 7 darstellen, da eine Verdünnung von 1:20 nicht die optimale Basis für eine maximale Induktion dieses AMPs darstellen könnte.

### 4.3 Der EGFR und seine Rolle bei der Induktion Antimikrobieller Peptide durch SA

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag in der Untersuchung der Rolle des EGFR bei der Induktion kutaner AMPs durch SA. Die Basis-Hypothese fundierte dabei auf Beobachtungen im Rahmen spezieller Krebstherapien, bei denen EGFR-Inhibitoren therapeutisch zum Einsatz kommen. Wegweisend waren dabei dermatologische Nebenwirkungen nach Applikation der EGFR-inhibierenden Substanzen, die auf eine erhöhte Suszeptibilität der Haut gegenüber pathogenen Organismen schließen lassen. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine potentielle Verbindung zwischen der Blockade des EGFR und dem Auftreten der Nebenwirkungen vermutet, welche auf eine verminderte Expression von AMPs bei Blockade des Rezeptors zurückzuführen sein könnte.

#### 4.3.1 hBD3

Das antimikrobielle Peptid hBD3 hat vielfältige Funktionen im Rahmen der angeborenen Immunabwehr. Dazu zählen die Fähigkeit zur Induktion der Zytokin- und Chemokinexpression in Keratinozyten; Chemotaxis und eine antimikrobielle Komponente (Boniotto *et al.*, 2003; Van Kilsdonk *et al.*, 2017). hBD3 wurde unter anderem eine hohe antibakterielle Potenz im Rahmen der Bekämpfung von SA nachgewiesen (Schibli *et al.*, 2002). Zudem konnten Sorensen *et al.* (Sorensen *et al.*, 2005)



aufzeigen, dass bestimmte Liganden des EGFR (TGF- $\alpha$ , EGF und Amphiregulin) in der Lage sind die Expression von hBD3 in Keratinozyten zu stimulieren.

Auch in dieser Arbeit konnte *in vitro* ein Zusammenhang zwischen der Induktion von hBD3 und der Blockade des EGFR nachgewiesen werden. Nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten im *Monolayer* mit SA konnte nach einer simultanen Inkubation mit Cetuximab ein signifikanter Abfall der mRNA-Expression des AMPs nachgewiesen werden. Da Cetuximab exklusiv mit einer bestimmten Domäne des EGFR interagiert und den Rezeptor blockiert, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte auf die Blockade zurückzuführen sind (Li *et al.*, 2005). Zur möglichst genauen Imitation der *in vivo* gegebenen Umstände wurde eine weitere Versuchsreihe mit einem 3D-Hautäquivalent durchgeführt. Die Resultate dieser Experimente untermauerten die Ergebnisse aus der Keratinozytenkultur im *Monolayer*. Auch bei der Stimulation der artifiziellen Haut konnte durch Einsatz des EGFR-Antikörpers eine verminderte Induktion von hBD3 nachgewiesen werden. Bei der Auswertung der Relevanz dieser Ergebnisse muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass es sich bei dem 3D-Hautäquivalent lediglich um eine Annäherung an die Verhältnisse auf der humanen Haut *in vivo* handelt. Dieser Aspekt wird im Verlaufe dieser Diskussion noch weitergehend erläutert.

Insgesamt unterstreichen die in dieser Arbeit ausgewerteten Daten die vermutete Korrelation zwischen einer Blockade des EGFR und der erniedrigten Expression von hBD3.

Die verminderte Ausschüttung von hBD3 könnte demzufolge einer der Gründe für die erhöhte kutane Infektanfälligkeit von onkologischen Patienten im Rahmen einer Anti-EGFR Therapie sein.

#### 4.3.2 hBD2

Auch hBD2 ist ein AMP und zählt zu der Untergruppe der Defensine. Die erste Isolation von hBD2 erfolgte aus Psoriasis-Läsionen, woraus sich seine Funktion im Rahmen der kutanen Abwehr und als Mediator von Entzündungen ableiten lässt (Liu *et al.*, 2002). Das Defensin zeigt eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien und in geringerem Maße auch gegen Gram-positive (Borja-Cacho and Matthews, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte, sowohl in der *Monolayer* Zellkultur als auch im 3D-Hautäquivalent, gezeigt werden, dass bei Hautzellen nach Inkubation mit SA eine höhere Induktion der mRNA-Expression von hBD2 erfolgte. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von hBD2 in Keratinozyten *in vitro* nach Exposition mit dem Keim hochreguliert wird (Midorikawa *et al.*, 2003). Allerdings konnten antimikrobielle Tests in unserem Labor dem AMP keine Fähigkeit zur potenten Bekämpfung der Gram-positiven Staphylokokken nachweisen (Daten nicht gezeigt). Daher ist zu diskutieren, inwieweit die antibakterielle Aktivität von hBD2 überhaupt zur Relevanz des Defensins beiträgt. So konnte gezeigt werden, dass das AMP seinen chemotaktischen Einfluss auf dendritische Zellen und T-Gedächtniszellen bereits in viel geringeren Konzentrationen entfaltet (Yang, D. Chertov, O. Bykovskaia, 1999; Liu *et al.*, 2002). Folglich könnte hBD2 im Rahmen der

kutanen Abwehr eher die Aufgabe des Mediators der Immunantwort zufallen, als die der aktiven Bakterienabtötung.

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob der EGFR an der Induktion von hBD2 beteiligt ist, wurde der EGFR-Antikörper Cetuximab eingesetzt. Im gleichen Verfahren wie bei hBD3 wurden die Keratinozyten mit Cetuximab inkubiert, mit SA stimuliert und abschließend mittels PCR die mRNA Expression von hBD2 bestimmt. Im Gegensatz zu den Experimenten mit hBD3, zeigte sich jedoch beim simultanen Einsatz von CTX und SA kein signifikanter Abfall der Konzentration des AMPs im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit dem Erreger. Die gemessenen Werte präsentierten sich als sehr variabel innerhalb der verschiedenen Versuchsreihen. Daraus lässt sich schließen, dass die Blockade des EGFR keinen relevanten Einfluss auf die Induktion von hBD2 hatte. Diese Folgerung ist auch mit dem derzeitigen Standpunkt der Forschung konkordant. Diese geht davon aus, dass die Induktion von hBD2 über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR, engl.: *toll-like receptor*) reguliert wird und nicht, wie hBD3 beispielsweise, über den MAPK-Signalweg des EGFRs (Romano Carratelli *et al.*, 2009; Steubesand *et al.*, 2009). Zusätzlich ist bekannt, dass die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu einer verminderten Expression von hBD2 führt (O'Neil *et al.*, 1999; Steubesand *et al.*, 2009). Die Abhängigkeit von NF- $\kappa$ B unterstreicht dabei die Verbindung zu den TLRs, da deren Signalkaskaden mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B (engl.: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) in Zusammenhang stehen (Kawai and Akira, 2007). Auch das antibakterielle Wirkspektrum von hBD2 liefert Hinweise in diese Richtung, da es sich insbesondere auf Gram-negative Erreger wie *Helicobacter pylori* beschränkt, welche dazu in der Lage sind, NF- $\kappa$ B in epithelialen Zellen zu aktivieren (Naumann, 2000).

Allerdings konnten Park *et al.* in ihrer Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Inhibition des EGFRs und der von *S. epidermidis* induzierten Expression von hBD2 in humanen Keratinozyten herstellen (Park *et al.*, 2014). Dabei ist jedoch ein wesentlicher Unterschied in der Methodik der Experimente zu verzeichnen. Neben der Verwendung eines anderen Stamms, wurde auch mit einer anderen Form der EGFR-Blockade gearbeitet. Während es sich bei CTX um einen EGFR-Antikörper handelt, kamen bei Park *et al.* die Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib zum Einsatz. Die Aufgabe des Antikörpers besteht dabei in der Blockade der extrazellulären Bindungsstelle möglicher Liganden, während die Tyrosinkinase-Inhibitoren die intrazelluläre Signalübertragung verhindern (Borja-Cacho and Matthews, 2008). Ob die unterschiedlichen Ansatzpunkte der verwendeten Inhibitoren tatsächlich zu verschiedenen Resultaten bei der Auswertung der Expression von hBD2 führen, müsste in einem direkten Vergleichs-Experiment bei identischen Versuchsbedingungen überprüft werden. Insgesamt konnte in dieser Arbeit jedoch keine Verbindung zwischen dem EGFR und der Induktion von hBD2 nachgewiesen werden.

#### 4.3.3 RNase 7

RNase 7 ist ein in gesunden Keratinozyten konstitutiv exprimiertes AMP mit einer breitgefächerten antimikrobiellen Aktivität gegen multiple pathogene Organismen (Harder and Schröder, 2002). Zanger *et al.* postulierten bereits 2009, dass die konstitutive Expression von RNase 7 als schützender Faktor bei der Prävention von Infektionen mit SA einzuordnen sei. Bei ihrer Analyse von SA -positiven Entzündungen fiel auf, dass vormals gesunde Individuen mit niedrigeren RNase 7 Expressionsleveln deutlich häufiger betroffen waren als Patienten mit einer hohen Expression (Zanger *et al.*, 2009). Darauf aufbauend konnten Simanski *et al.* für RNase 7 unter anderem eine wachstumshemmende Wirkung auf SA nachweisen und zeigen, dass mit dem Erreger infizierte humane Haut mit einer erhöhten Ausschüttung des AMPs reagiert (Simanski *et al.*, 2010). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diesen Nachweis. Insbesondere bei den Experimenten mit Überständen von SA konnte eine deutliche Induktion von RNase 7 im Rahmen der Stimulation nachgewiesen werden. Bei den *Monolayer*-Versuchen zeigten sich jedoch stark variable Expressionsniveaus im Vergleich zwischen den Kontrollen und den mit dem Keim stimulierten Zellen. Auffällig war eine geringere oder nicht vorhandene Induktion nach der Stimulation, wenn bereits in den Kontrollen große Mengen an RNase 7 nachgewiesen werden konnte. Wie bereits diskutiert, könnte dies auf die konstitutive Expression von RNase 7 zurückzuführen sein. Deutlich nachzuweisen war jedoch eine Korrelation mit der Blockade des EGFRs. Sowohl im *Monolayer* mit lebenden Bakterien und Überständen als auch in den 3D-Hautäquivalenten konnte eine Herunterregulierung der Expression von RNase 7 bei Einsatz von CTX nachgewiesen werden. Auch im Rahmen der Patientenstudie konnte ein signifikanter Abfall der kutanen RNase 7-Expression zwei Wochen nach Ersttherapie mit CTX und im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt vor Beginn der Therapie festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass RNase 7, genau wie hBD3, über den EGFR reguliert werden könnte.

#### 4.4 Beobachtungen am 3D-Hautäquivalent

Im Rahmen dieser Arbeit kommt dem 3D-Hautäquivalent eine besondere Bedeutung zu. Unter anderem brachte die 3D-Haut den Vorteil einer optischen Komponente der Auswertung. Anhand der lichtmikroskopischen Beurteilung der Paraffinschnitte der stimulierten Hautäquivalente, konnten die von SA angerichteten Schäden am Epithel dargestellt werden. In der Abbildung 14 war deutlich der Unterschied zwischen der lediglich mit dem Keim inkubierten Haut und dem mit CTX und SA simultan stimulierten Hautäquivalent zu erkennen. Beim Einsatz von CTX kam es zu einem stark destruierten Epithel mit hoher Keimbelastung, während bei alleiniger Stimulation mit dem Bakterium die Hautoberfläche weiterhin intakt erschien. Bei Mitbetrachtung der fallenden Expression der AMPs nach Inkubation mit dem Antikörper, ergibt sich daraus, dass die Peptide einen wesentlichen Schutzfaktor für die Haut darstellen, dessen Relevanz auch im 3D-Hautäquivalent optisch nachvollziehbar war. Auch

die Immunhistochemie zur Anfärbung von hBD3 konnte die in der mRNA-Auswertung gewonnenen Daten zur Expression des AMPs optisch untermauern.

#### 4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass der EGFR eine wichtige Rolle im Rahmen der kutanen Immunabwehr spielt. Nachgewiesen werden konnte die Relevanz eines funktionsfähigen EGFRs, insbesondere für die Regulierung der Expression des Defensins hBD3 und der RNase 7, nach Konfrontation von Keratinozyten mit dem Erreger SA. Allerdings bietet diese Arbeit keinen Aufschluss über den exakten molekularen Mechanismus zwischen der Stimulation mit dem Keim und der konsekutiven Expression der AMPs. Besonders im Hinblick auf mögliche Differenzen bei Anwendung extra- bzw. intrazellulärer Inhibitoren des EGFRs müssten Folgestudien zur näheren Entschlüsselung des Signalwegs angestrebt werden.

Zudem konnte festgestellt werden, dass die Abwesenheit bzw. die verringerte Quantität von AMPs nach Inhibition des EGFRs zu einer verstärkten Vulnerabilität der Haut bei Exposition mit SA führt. Daraus lässt sich schließen, dass auch die erhöhte Inzidenz kutaner Infektionen bei onkologischen Patienten im Rahmen einer Anti-EGFR-Therapie im Zusammenhang mit einer verringerten Expression von AMPs stehen könnte. Ein letztendlicher Beweis dieser Hypothese müsste durch eine breiter angelegte *in vivo* Studie mit klar definierten Therapie-Schemata erbracht werden.

#### 4.6 Ausblick

Patienten, die im Rahmen ihrer onkologischen Therapie mit Anti-EGFR Therapeutika behandelt werden, leiden in vielen Fällen unter dermatologischen Nebenwirkungen. Eine besondere Stellung nimmt dabei ein papulopustulöser „Rash“ ein, der bei 50-100% der behandelten Patienten in seborrhoischen Arealen auftritt (Segaert, 2005). Die entzündliche Komponente des Ausschlags lässt sich dabei häufig auf bakterielle Infektionen, insbesondere mit SA, zurückführen (Eilers *et al.*, 2010). Folgen sind eine zusätzliche physische Beeinträchtigung durch die Entzündung und eine generelle Abnahme der Lebensqualität. Eine große Rolle spielt dabei auch die psychosoziale Belastung, da insbesondere durch Läsionen im Gesichtsbereich die Compliance der Patienten sinken kann (Gutzmer *et al.*, 2011). Als Resultat folgt ein insgesamt schlechteres Outcome der Therapie.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Blockade des EGFRs zu einem signifikanten Abfall einiger von Keratinozyten exprimierter AMPs führen kann. Anhand der optischen Auswertung der 3D-Hautäquivalente konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen einer erniedrigten Expression von AMPs und einer erhöhten Subzeptibilität der Haut gegenüber SA beschrieben werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits im Rahmen der Forschung bei Atopischer Dermatitis festgestellt (Hata

and Gallo, 2008). Dies bestätigt die antimikrobielle Potenz der AMPs. Daraus lässt sich folgern, dass die unerwünschten dermatologischen Effekte der Anti-EGFR Therapie auf eine verminderte Ausschüttung von AMPs zurückzuführen sein könnten.

In den letzten Jahrzehnten konnte eine zunehmende Resistenz von Bakterien gegenüber gängigen Antibiotika beobachtet werden. Multiresistente Keime wie MRSA (Methicillin-resistenter SA) und VRE (Vancomycin-resistente Enterococci) rücken immer weiter in den Vordergrund und bedrohen die Leben von Millionen von Patienten, da kaum noch wirksame Substanzen auf dem Markt vorhanden sind (Ventola, 2015). Daher richtet die Forschung ihr Augenmerk auf potenzielle Alternativen, wie zum Beispiel die AMPs.

Wegweisende Vorteile der AMPs sind hierbei ihre natürliche Herkunft und ihr breites Wirkungsspektrum gegen multiple Organismen. Zusätzlich zu ihrer Eigenschaft pathogene Erreger auf direktem Wege zu attackieren, greifen AMPs modulierend in entzündliche Prozesse und die Homöostase ein (Wang *et al.*, 2016). Ein besonderes Merkmal stellt dabei ihre hohe antimikrobielle Potenz dar. Zhang *et al.* konnten unter anderem eine wachstumsinhibierende Wirkung auf MRSA und *Pseudomonas aeruginosa* nachweisen (Zhang *et al.*, 2005). Ihre Fähigkeit zur Penetration von bakteriellen Membranen macht AMPs einzigartig effektiv im Abtöten von multiresistenten Bakterien (Zapotoczna *et al.*, 2017). Desweiteren bietet dieser Angriffspunkt den Vorteil, dass die Entwicklung von Resistenzen gegen AMPs nur sehr langsam voranschreitet (Mwangi *et al.*, 2019). Veränderungen in den durch die AMPs angesteuerten Angriffspunkten der Bakterienmembran sind ein langwieriger Prozess und treten selten spontan auf (Hiroshi Tamura, Johannes Reich, 2016). Dies stellt auch den zentralen Unterschied zu herkömmlichen Antibiotika dar. Diese fokussieren sich meist auf ein einzelnes Zielprotein in der Bakterienmembran und können so leichter durch geringe Mutationen ausgeschaltet werden. AMPs hingegen zeigen eine geringe Affinität zu spezifischen Angriffspunkten und zeichnen sich durch ihre multilokalen Auswirkungen am Bakterium aus (Lai Y, 2009). Ein weiterer Faktor zur Vermeidung von Resistenzen könnte in der Induzierbarkeit der meisten AMPs liegen. Sie werden nicht dauerhaft auf der Haut exprimiert und bieten Erregern dadurch weniger Zeit und Möglichkeit sich anzupassen. Peschel *et al.* beschrieben jedoch eine mögliche Resistenzentstehung bei der Co-Entwicklung von AMPs und Bakterien (Peschel and Sahl, 2006).

In der Theorie würden sich AMPs demzufolge als hervorragende Alternative zum Ersatz marktüblicher Antibiotika anbieten. Allerdings steht die Entwicklung von zur Therapie einsetzbaren künstlichen AMPs noch ganz am Anfang. Stabilität, Zytotoxizität und Produktionskosten stellen eine noch zu überwindene Problematik dar (Hiroshi Tamura, Johannes Reich, 2016). Als potentielle Applikationsstrategien werden derzeit beispielsweise die Nutzung von Prodrugs und genetisch veränderten probiotischen Bakterien diskutiert (Mishra *et al.*, 2017). Bei Prodrugs handelt es sich um

eine Form von Medikamenten, die erst nach der Metabolisierung innerhalb eines Organismus ihre aktiven Metaboliten entfalten. Des Weiteren ist bisher kaum etwas über mögliche Nebenwirkungen eines intensivierten Einsatzes von AMPs bekannt. Jedoch wurde in Verbindung mit den Hautkrankheiten Rosazea und Psoriasis bereits von einer überschießenden inflammatorischen Immunantwort bei Exzess bestimmter AMPs berichtet (Schauber *et al.*, 2009). Ob solche oder ähnliche Reaktionen auch bei externer Darreichung von AMPs zu verzeichnen sind, müsste in einer weiterreichenden Studie untersucht werden.

Die in dieser Arbeit gelieferten Ergebnisse weisen in die Richtung, dass Patienten im Rahmen einer Anti-EGFR Therapie möglicherweise von einem Therapieansatz mit AMPs profitieren könnten. Allerdings gibt es zurzeit noch zu viele Faktoren, die einen gezielten Einsatz von AMPs nicht ermöglichen. Auch im Hinblick auf Resistenzentwicklungen bei Antibiotika bieten AMPs potentiell eine effektive Alternative, deren Potential noch nicht zur Gänze evaluiert werden konnte. Zusammenfassend stellt der therapeutische Einsatz von AMPs eine zukunftsweisende Alternative zu herkömmlichen Antibiotika dar und könnte zu einer Verbesserung der Lebensqualität von Patienten einer Anti-EGFR Therapie beitragen.

## 4.7 Arbeit mit biologischen Materialien

### 4.7.1 Zellkultur

Trotz möglichst exakter Reproduktion der Konditionen einzelner Versuche und Wiederholungsversuchen, ergab sich in vielen Fällen dennoch eine erkennbare Varianz. Die Keratinozyten reagierten nicht jedes Mal in gleicher Ausprägung, trotz gleicher Charge und gleichem Bakterienstamm. Bereits 1986 wurde von Real *et al.* nachgewiesen, dass die Dichte des Besatzes einer Zelle mit EGFR nicht nur von der Zelllinie abhängig ist, sondern auch von spezifischen Stadien der Zelldifferenzierung (Real *et al.*, 1986). Diese Tatsache könnte der Grund für die sich herauskristallisierten Unterschiede bei der Auswertung der Versuche sein.

Die Konfluenz der verwendeten Keratinozyten wurde vor Beginn der Stimulationen lichtmikroskopisch überprüft. Angestrebt wurde eine Konfluenz von ca. 100%. Trotz gleicher Wachstumscondition und -dauer zeigten sich minimale Unterschiede bei der visuellen Bewertung der Zellen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Differenzierung der Keratinozyten in den einzelnen Versuchen unterschiedlich vorangeschritten und somit auch die Expression des Wachstumsfaktorrezeptors nicht identisch ausgeprägt war.

Von besonderer Bedeutung war diese Problematik bei der Versuchsreihe des 3D-Hautäquivalents. Durch den mehrschichtigen Aufbau und die lange Dauer der Entwicklung der artifiziellen Haut zeigte sich diese besonders anfällig für minimale Veränderungen, die im Lauf der Zeit zu größeren Varianzen

im Endprodukt geführt haben könnten. Dies spiegelte sich in unterschiedlichen Größen des Äquivalents, oder auch an kleineren Löchern oder Unebenheiten der Oberfläche wider.

Einen weiteren möglichen Störfaktor stellte die Arbeit mit SA dar. Der Keim konnte trotz angestrebter exakter Reproduktion von Kultivierungsschritten und Stimulation nicht in jedem Versuch die gleiche Induktion der AMP-Expression generieren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei SA um einen lebenden Organismus handelt, der bereits auf minimale Abweichungen im Kultivierungsvorgang reagieren kann. Eine mögliche Folge wäre eine verringerte Ausbildung von Virulenzfaktoren, welche wiederum die unterschiedliche Stimulation der Keratinozyten erklärt.

Zusammenfassend ergibt sich die beobachtete Varianz der Expression von AMPs in der finalen Versuchsauswertung aus einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren. Vor allem ist dabei immer zu berücksichtigen, dass es sich sowohl bei den Keratinozyten als auch bei SA um lebende Organismen handelt, die trotz gleicher Versuchsbedingungen immer eine Variable darstellen.

#### 4.7.2 Limitationen des 3D-Hautäquivalents

Die Experimente mit dem 3D-Hautäquivalent stellten ein wichtiges Element dieser Arbeit dar. Ziel war es, mithilfe des Äquivalents eine Annäherung des Versuchsrahmens an die physiologische Situation in der humanen Haut zu schaffen. Von besonderer Relevanz ist dabei im Unterschied zur *Monolayer* Zellkultur, dass die Keratinozyten in der künstlichen Haut zur Differenzierung angeregt wurden und eine mehrschichtige Epidermis ausbildeten. Es ist zu vermuten, dass die verschieden ausdifferenzierten Zellen auch über unterschiedliche Potenz zur Expression von AMPs verfügen. Für die Expression von hBD2 konnte bereits ein Zusammenhang mit dem Differenzierungsstadium von Keratinozyten nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2002). Auch der Einsatz von Fibroblasten und Kollagen zur Generierung eines Grundgerüsts könnte einen Einfluss auf die Hautzellen dargestellt haben. Trotzdem bleibt die Arbeit mit dem 3D-Hautäquivalent nur ein Schritt in die Richtung der Imitation der *in vivo* Verhältnisse. So wird zum Beispiel von Kisich *et al.* der Einsatz eines artifiziell hergestellten Wachstumsmediums als möglicher Grund für unterschiedliche Differenzierungen von Keratinozyten bei *in vivo* und *in vitro* Versuchen diskutiert (Kisich *et al.*, 2007). Die Versorgung des Äquivalents könnte auch eine Rolle spielen, da in der humanen Haut die Zellen durch Gefäße aus unteren Schichten mit frischen Nährstoffen versorgt werden, während die kultivierte Haut durch reine Diffusion versorgt wird. Zudem besteht die humane Haut normalerweise nicht nur aus Keratinozyten und Fibroblasten. Keratinozyten bilden zwar den Hauptbestandteil der Epidermis, aber es finden sich auch Merkelzellen, Melanozyten und Langerhans-Zellen in ihren Schichten (Kretzschmar and Watt, 2014). Dabei ist für Langerhans-Zellen bereits bekannt, dass diese als Teil der adaptiven Immunantwort durch hBD3 beeinflusst werden können (Ferris *et al.*, 2013). Auch die manuelle Manipulation des Hautmodells während der Wachstumsphase könnte zu einer Verzerrung der Ergebnisse beitragen, da mechanischer

Stress zur Phosphorylierung und Aktivierung des EGFRs führen kann (Yano *et al.*, 2004). Bekannt ist unter anderem eine Induktion von hBD2 über eine Aktivierung des EGFRs bei Verletzungen (Roupé *et al.*, 2010). Dies könnte zu einer erhöhten Expression von AMPs geführt haben, welche nicht exklusiv auf die Stimulation mit SA zurückzuführen ist.

Somit stellt das 3D-Hautäquivalent zwar insgesamt einen Fortschritt im Hinblick auf die Imitation biophysiologicaler Verhältnisse im Rahmen der *in vitro* Forschung dar, aber es kann nicht als Ersatz für *in vivo* Studien gelten.

## 4.8 Hautspülungen

Die durchgeführten Hautspülungen wurden mittels eines vorher festgelegten Prozederes gewonnen. Trotz des standardisierten Verfahrens waren multiple Störfaktoren nicht auszuschließen, welche die allgemeine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Proben mindern können. Von besonderer Relevanz ist hierbei die Anwendung individueller Hautpflegeprodukte und präventiver Maßnahmen der jeweiligen Patienten. Wie bereits in dieser Arbeit erläutert, kommen, abhängig vom Ausprägungsgrad der dermatologischen Nebenwirkungen, verschiedene Therapeutika zum Einsatz. Bei der Auswertung der angewandten Medikamente zeigten sich erhebliche Differenzen innerhalb der untersuchten Gruppe. Diese lassen sich darauf zurückführen, dass derzeit noch keine festen Leitlinien zur Behandlung der Nebenwirkungen der Anti-EGFR Therapie etabliert sind und die Patienten neben ihren behandelnden Onkologen auch von verschiedenen Hausärzten mitbetreut wurden. Daraus resultiert eine erhebliche Variabilität der einzelnen Therapieansätze. Von Bedeutung ist dabei auch die Lokalisation der Läsionen. Der „Rash“ manifestiert sich bevorzugt auf seborrhoischen Arealen, wie der Stirn (Segaert, 2005). Neben dem Unterarm und der Ellenbeuge zählt die Stirn zu denen in dieser Arbeit für die Hautspülungen ausgewählten Lokalisationen, weshalb die Ergebnisse aus diesem Körperbereich durch lokale Antibiotika-Therapien oder Pflegemittel beeinflusst sein könnten. Um diese Problematik zu umgehen, müssten weitere Studien betrieben werden, bei denen die Behandlung der dermatologischen Nebenwirkungen nach standardisierten Therapie-Schemata verläuft.

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellen die biophysiologicalen Differenzen innerhalb des Patientenkollektivs dar. Weder die unterschiedlichen Geschlechter noch die Altersunterschiede der Probanden wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Dabei könnte man die Vermutung anstellen, dass das Patientenalter die Induktions- bzw. Expressionsfähigkeit der Keratinozyten beeinflussen könnte. Auch konnte bereits bei Käfern eine geschlechtsspezifische Ausschüttung bestimmter AMPs nachgewiesen werden (Jacobs *et al.*, 2016).

Ebenfalls in Betracht zu ziehen sind die unterschiedlichen diagnostizierten Krebsarten. Cetuximab ist nicht nur beim metastasierten Kolonkarzinom zugelassen, sondern auch in der Therapie von



Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches. Beide Krebslokalisationen sind im untersuchten Patientenkollektiv vertreten und werden bei der Auswertung nicht differenziert betrachtet. Dabei wurde zwar bei allen Patienten eine Mutation des EGFR nachgewiesen, woraus sich jedoch nicht zwangsläufig schlussfolgern lässt, dass es sich jeweils um identische Mutationen handelt. So sind EGFR-Antikörper beispielsweise in den USA auch zur Therapie von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zugelassen, bei denen bereits verschiedene EGFR-Mutationsformen detektiert wurden (Chen *et al.*, 2017). Dabei bleibt zu untersuchen, ob die einzelnen Variationen der mutierten EGF-Rezeptoren auch unterschiedliche Resonanzlevel im Rahmen der AMP-Induktion aufweisen.

Insgesamt sind die dargestellten Versuche nur ein erster Einblick in potenzielle Zusammenhänge zwischen einer Anti-EGFR Therapie und der Expression von AMPs. Um eine differenzierte Aussage treffen zu können, müsste in zukünftigen Studien ein wesentlich größeres Patientenkollektiv untersucht werden. Dabei wäre eine Einteilung nach Geschlecht, Alter und Krebsform bzw. analysierter Mutation sinnvoll.

## 5 Zusammenfassung

Die Haut ist als wichtiger Bestandteil unseres Immunsystems ständig einem potenziell pathogenen Umfeld ausgesetzt und schützt uns effektiv vor Krankheitserregern. Doch bei Patienten, die im Rahmen einer Krebserkrankung mit einer Antikörper-Therapie gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) behandelt werden, scheint dieser Schutz nicht ausreichend zu funktionieren. Neben weiteren kutanen Nebenwirkungen konnte vor allem eine erhöhte Infektanfälligkeit gegenüber dem Bakterium *Staphylococcus aureus* (SA) beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass bestimmte antimikrobielle Peptide und Proteine (AMPs) die Fähigkeit besitzen, SA abzutöten. Des Weiteren kann die Expression diverser kutaner AMPs in Keratinozyten durch Kontakt mit SA induziert werden. Aufgrund dessen konnte die These aufgestellt werden, dass bei Patienten mit anti-EGFR-Therapie eine mangelnde Expression kutaner AMPs für die erhöhte Suszeptibilität der Haut gegenüber pathogenen Keimen, vor allem SA, verantwortlich sein könnte.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, bei denen die keratinozytäre Expression von AMPs in Abhängigkeit von SA untersucht wurde. Zudem wurde der Einfluss des EGFR auf die Zellen durch eine entsprechende Zugabe des EGFR-Antikörpers Cetuximab (CTX) überprüft. Der Fokus dieser Arbeit lag dabei auf den AMPs hBD2, hBD3 und der RNase 7.

Es konnte im Rahmen verschiedener *in vitro* Experimente nachgewiesen werden, dass insbesondere für RNase 7 und hBD3 eine Abhängigkeit der Expression von der Aktivität des EGFRs existiert. Nach einer Blockade des Rezeptors konnten signifikante Verminderungen des Expressionslevels durch

Analyse von mRNA-Daten nachgewiesen werden. Optisch unterstrichen wurde dieses Ergebnis durch die Auswertung immunhistochemisch präparierter Schnittbilder eines 3D-Hautäquivalents. Auch in weiteren histologischen Untersuchungen zeigte sich eine vermehrte Vulnerabilität der Epidermis durch SA nach Inhibition des Rezeptors durch CTX. *In vivo* konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der Expression von RNase 7 und einer anti-EGFR Therapie nachgewiesen werden. Auf dem untersuchten Hautareal auf dem Arm der Patienten konnte ein signifikanter Abfall der RNase 7 Konzentration im Vergleich zwischen dem Startzeitpunkt vor Erstgabe von CTX und zwei Wochen nach Therapiebeginn festgestellt werden. Für die Expression von hBD2 hingegen konnte keine EGFR-abhängige Regulation nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die konstitutive Expression und die SA-vermittelte Induktion einiger kutaner AMPs über den EGFR vermittelt wird und dass eine Blockade des Rezeptors zu erniedrigten Expressionsniveaus selbiger führt. Dies könnte mit erklären, warum Patienten mit einer anti-EGFR Therapie eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber kutanen Infektionen, insbesondere durch SA verursacht, aufweisen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ageitos, J. M. *et al.* (2017) 'Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 133, pp. 117–138. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.018.
- Bahar, A. A. and Ren, D. (2013) 'Antimicrobial peptides', *Pharmaceuticals*, 6(12), pp. 1543–1575. doi: 10.3390/ph6121543.
- Bayer, A. *et al.* (2017) 'The Antimicrobial Peptide Human Beta-Defensin-3 Is Induced by Platelet-Released Growth Factors in Primary Keratinocytes', *Mediators of Inflammation*, 2017. doi: 10.1155/2017/6157491.
- Boniotto, M. *et al.* (2003) 'A study of host defence peptide beta-defensin 3 in primates.', *The Biochemical journal*, 374(Pt 3), pp. 707–714. doi: 10.1042/BJ20030528.
- Borja-Cacho, D. and Matthews, J. (2008a) 'Combining Erlotinib and Cetuximab is Associated with Activity in Patients with Non Small Cell Lung Cancer (including Squamous Cell Carcinomas) and Wild-Type EGFR or Resistant Mutations', *Nano*, 6(9), pp. 2166–2171. doi: 10.1021/nl061786n.Core-Shell.
- Borja-Cacho, D. and Matthews, J. (2008b) 'Human  $\beta$ -Defensin-2: A natural anti-microbial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity', *Nano*, 6(9), pp. 2166–2171. doi: 10.1021/nl061786n.Core-Shell.
- Bou-Assaly, W. and Mukherji, S. (2010) 'Cetuximab (Erbix)', *American Journal of Neuroradiology*, 31(4), pp. 626–627. doi: 10.3174/ajnr.A2054.
- Chen, K. *et al.* (2017) 'Uncommon mutation types of epidermal growth factor receptor and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in Chinese non-small cell lung cancer patients', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 80(6), pp. 1179–1187. doi: 10.1007/s00280-017-3464-9.
- Chomczynski, P. (1987) 'Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction', 159, pp. 156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.
- Cohenuram, M. and Saif, M. W. (2007) 'Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: From the bench to the clinic', *Anti-Cancer Drugs*, 18(1), pp. 7–15. doi: 10.1097/CAD.0b013e32800feecb.
- DeLeo, F., Diep, B. and Otto, M. (2009) 'Host Defense and Pathogenesis in Staphylococcus aureus Infections', *Infectious disease clinics of North America*, 23(1), pp. 17–34. doi: 10.1016/j.idc.2008.10.003.Host.
- Dhople, V., Krukemeyer, A. and Ramamoorthy, A. (2006) 'The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), pp. 1499–1512. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.07.007.
- Edalat, F. (2012) 'The emerging role of peptides and lipids as antimicrobial epidermal barriers and modulators of local inflammation', 40(6), pp. 1301–1315. doi: 10.1007/s10439-011-0452-9.Engineering.
- Eilers, R. E. *et al.* (2010) 'Dermatologic infections in cancer patients treated with epidermal growth factor receptor inhibitor therapy', *Journal of the National Cancer Institute*, 102(1), pp. 47–53. doi: 10.1093/jnci/djp439.
- Fayard, E. (2005) 'Protein kinase B/Akt at a glance', *Journal of Cell Science*, 118(24), pp. 5675–5678. doi: 10.1242/jcs.02724.
- Ferris, L. K. *et al.* (2013) 'Human Beta Defensin 3 induces maturation of human langerhans cell like

dendritic cells: An antimicrobial peptide that functions as an endogenous adjuvant', 133(2), pp. 460–468. doi: 10.1038/jid.2012.319.Human.

Fritz, P., Beck-Jendroschek, V. and Brasch, J. (2012) 'Inhibition of dermatophytes by the antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensin-2, ribonuclease 7 and psoriasin', *Medical Mycology*, 50(6), pp. 579–584. doi: 10.3109/13693786.2012.660203.

Ganz, T. (2003) 'Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity', *Nature Reviews Immunology*, 3(9), pp. 710–720. doi: 10.1038/nri1180.

García, J.-R. C. *et al.* (2001) 'Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity.', *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(10), pp. 1819–1821. doi: 10.1096/fj.00-0865fje.

Garnett, M. J. and Marais, R. (2004) 'Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene', *Cancer Cell*, 6(4), pp. 313–319. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.022.

Guaní-Guerra, E. *et al.* (2010) 'Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease', *Clinical Immunology*. Elsevier Inc., 135(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.clim.2009.12.004.

Gutzmer, R. *et al.* (2011) 'Management of cutaneous side effects of EGFR inhibitors: recommendations from a German expert panel for the primary treating physician', *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(3), pp. 195–202. doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07561.x.

Gutzmer, R. *et al.* (2012) 'Kutane Nebenwirkungen von neuen medikamentösen Tumorthérapien: Klinik und Management', *Deutsches Arzteblatt International*, 109(8), pp. 133–140. doi: 10.3238/arztebl.2012.0133.

Harder, J. and Schröder, J. M. (2002) 'RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin', *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), pp. 46779–46784. doi: 10.1074/jbc.M207587200.

Harrison, D. A. *et al.* (2013) 'The JAK / STAT Pathway The JAK / STAT Pathway', pp. 1–4. doi: 10.1101/cshperspect.a011205.

Hata, T. R. and Gallo, R. L. (2008) 'Antimicrobial Peptides, Skin Dermatitis, Infections and Atopic Dermatitis', *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 27(2), pp. 144–150. doi: 10.1016/j.sder.2008.04.002.Antimicrobial.

Herman, A. and Herman, A. P. (2019) 'Antimicrobial peptides activity in the skin', *Skin Research and Technology*, 25(2), pp. 111–117. doi: 10.1111/srt.12626.

Hiroshi Tamura, Johannes Reich, I. N. (2016) 'Bacterial Endotoxin Assays Relevant to Host Defense Peptides HIROSHI', *Juntendo Medical Journal*, 62(2), pp. 132–140. doi: 10.14789/jmj.

Jacobs, C. G. C. *et al.* (2016) 'Sex, offspring and carcass determine antimicrobial peptide expression in the burying beetle', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6, pp. 2–9. doi: 10.1038/srep25409.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. I. T. I. S. in H. and D. 5th edition. N. Y. G. S. 2001. T. front line of host defense. A. from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27105>. (2009) 'The front line of host defense.', *Search*, pp. 1–9.

Johnston, A. *et al.* (2011) 'EGFR and IL-1 signaling synergistically promote keratinocyte antimicrobial defenses in a differentiation-dependent manner', 131(2), pp. 329–337. doi: 10.1038/jid.2010.313.EGFR.

K A Blick, Stephanie & J Scott, L. (2007). C. A. review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. D. 67. 2585-607. (2007) 'Cetuximab: A review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer'.

Kaphingst, K. A., Persky, S. and Lachance, C. (2010) 'Phospholipase C- $\gamma$ 1 is Required for the Epidermal

- Growth Factor Receptor-induced Squamous Cell Carcinoma Cell Mitogenesis', 14(4), pp. 384–399. doi: 10.1080/10810730902873927. Testing.
- Kawai, T. and Akira, S. (2007) 'Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors', *Trends in Molecular Medicine*, 13(11), pp. 460–469. doi: 10.1016/j.molmed.2007.09.002.
- Keating, G. M. (2010) 'Panitumumab: A review of its use in metastatic colorectal cancer', *Drugs*, 70(8), pp. 1059–1078. doi: 10.2165/11205090-000000000-00000.
- Van Kilsdonk, J. W. J. *et al.* (2017) 'The Effects of Human Beta-Defensins on Skin Cells in vitro', *Dermatology*, 233(2–3), pp. 155–163. doi: 10.1159/000477346.
- Kisich, K. O. *et al.* (2007) 'The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on  $\beta$ -defensin 3', *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS, 127(10), pp. 2368–2380. doi: 10.1038/sj.jid.5700861.
- Klicks, J. *et al.* (2017) 'In vitro skin three-dimensional models and their applications', *Journal of Cellular Biotechnology*, 3(1), pp. 21–39. doi: 10.3233/JCB-179004.
- Kloß, F. and Gerbach, S. (2018) 'Hürden und Aussichten neuer antimikrobieller Konzepte in Forschung und Entwicklung', *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 61(5), pp. 595–605. doi: 10.1007/s00103-018-2725-z.
- Köten, B. *et al.* (2009) 'RNase 7 contributes to the cutaneous defense against *Enterococcus faecium*', *PLoS ONE*, 4(7). doi: 10.1371/journal.pone.0006424.
- Kozuki, T. (2016) 'Skin problems and EGFR-tyrosine kinase inhibitor', *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 46(4), pp. 291–298. doi: 10.1093/jjco/hyv207.
- Kretzschmar, K. and Watt, F. M. (2014) 'Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(10), pp. 1–14. doi: 10.1101/cshperspect.a013631.
- Lai Y, G. R. (2009) 'AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune Defense', *Trends Immunol*, 30(3), pp. 131–141. doi: 10.1016/j.it.2008.12.003. AMPed.
- Lang, G. (2013) *G. Lang*. Springer International Publishing.
- León-Buitimea, A. *et al.* (2020) 'The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design', *Frontiers in Microbiology*, 11(July), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2020.01669.
- Li, S. *et al.* (2005) 'Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab', *Cancer Cell*, 7(4), pp. 301–311. doi: 10.1016/j.ccr.2005.03.003.
- Liu, A. Y. *et al.* (2002) 'Human  $\beta$ -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation', *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS, 118(2), pp. 275–281. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01651.x.
- Mann, E. R. (2014) 'Review: Skin and the Immune System', *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research*, 4(3). doi: 10.4172/2155-9554.S2-003.
- Mebratu, Y. and Tesfaigzi, Y. (2009) 'How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer?', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(8), pp. 1168–1175. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.
- Midorikawa, K. *et al.* (2003) 'Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes.', *Infection and immunity*, 71(7), pp. 3730–9. doi: 10.1128/IAI.71.7.3730.
- Mishra, B. *et al.* (2017) 'Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies', *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 38, pp. 87–96. doi:

10.1016/j.cbpa.2017.03.014.

Mwangi, J. *et al.* (2019) 'Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance', *Zoological research*, 40(6), pp. 488–505. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062.

Naumann, M. (2000) 'Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection.', *Biochemical pharmacology*, 60(8), pp. 1109–14. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00390-7.

Newton, A. C. (1995) 'Protein Kinase C : Structure , Function , and Regulation \*', 1(27).

O'Neil, D. a *et al.* (1999) 'Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.', *Jour* O'Neil, D. a, Porter, E. M., Elewaut, D., Anderson, G. M., Eckmann, L., Ganz, T., & Kagnoff, M. F. (1999). *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1, 163, pp. 6718–6724. doi: ji\_v163n12p6718 [pii].

Oda, K. *et al.* (2005) 'A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling', *Molecular Systems Biology*, 1(1), pp. E1–E17. doi: 10.1038/msb4100014.

Otto, M. (2011) 'Staphylococcus colonization of the skin and antimicrobial peptides', 5(2), pp. 183–195. doi: 10.1586/edm.10.6.Staphylococcus.

Otto, M. (2015) 'Staphylococcus aureus toxins', *Curr Opin Microbiol.*, pp. 32–37. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.Staphylococcus.

Park, K. *et al.* (2014) 'Epidermal growth factor receptor inhibitors selectively inhibit the expressions of human  $\beta$ -defensins induced by Staphylococcus epidermidis', *Journal of Dermatological Science*. Japanese Society for Investigative Dermatology, 75(2), pp. 94–99. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.04.011.

Park, S. C., Park, Y. and Hahm, K. S. (2011) 'The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation', *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), pp. 5971–5992. doi: 10.3390/ijms12095971.

Pérez-Soler, R. *et al.* (2005) 'HER1/EGFR inhibitor-associated rash: future directions for management and investigation outcomes from the HER1/EGFR inhibitor rash management forum.', *The oncologist*, 10(5), pp. 345–56. doi: 10.1634/theoncologist.10-5-345.

Peschel, A. and Sahl, H. G. (2006) 'The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance', *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), pp. 529–536. doi: 10.1038/nrmicro1441.

Pinto, C. *et al.* (2011) 'Management of Skin Toxicity Associated with Cetuximab Treatment in Combination with Chemotherapy or Radiotherapy', *The Oncologist*, 16(2), pp. 228–238. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0298.

Putney, J. W. and Tomita, T. (2011) 'Phospholipase C Signaling and Calcium Influx', *Advances in Biological Regulation*, 52(1), pp. 152–164. doi: 10.1016/j.advenzreg.2011.09.005.Phospholipase.

Rademacher, F., Simanski, M. and Harder, J. (2016) 'RNase 7 in cutaneous defense', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4). doi: 10.3390/ijms17040560.

Raj, P. and Dentino, A. (2002) 'Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity', *FEMS microbiology letters*, 206, pp. 9–18. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10979.x.

Rasigade, J. P. and Vandenesch, F. (2014) 'Staphylococcus aureus: A pathogen with still unresolved issues', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 21, pp. 510–514. doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.018.

Real, F. X. *et al.* (1986) 'Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Cultured Cells and Tissues: Relationship to Cell Lineage and Stage of Differentiation', *Cancer Res.*, 46(9), pp. 4726–4731. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/46/9/4726.abstract?ijkey=5137e697e83659c2f80eeb18a3>

1ecada61d9d00b&keytype2=tf\_ipsecsha.

Roberts, P. J. and Der, C. J. (2007) 'Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer', *Oncogene*, 26(22), pp. 3291–3310. doi: 10.1038/sj.onc.1210422.

Romano Carratelli, C. *et al.* (2009) 'Toll-like receptor-4 (TLR4) mediates human  $\beta$ -defensin-2 (HBD-2) induction in response to chlamydia pneumoniae in mononuclear cells', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 57(2), pp. 116–124. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00586.x.

Rončević, T., Puizina, J. and Tossi, A. (2019) 'Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era?', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). doi: 10.3390/ijms20225713.

Rosenberg, H. F. (2009) 'RNase A Ribonucleases and Host Defense: an Evolving Story', *Journal of Leukocyte Biology*, 83(5), pp. 1079–1087. doi: 10.1189/jlb.1107725.RNase.

Roskoski, R. (2012) 'ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation', *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 66(2), pp. 105–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.

Rothschild, S. I. *et al.* (2019) 'Prospective, observational practice survey of applied skin care and management of cetuximab-related skin reactions: PROSKIN study', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 84(4), pp. 881–889. doi: 10.1007/s00280-019-03927-x.

Roupé, K. M. *et al.* (2010) 'Injury is a major inducer of epidermal innate immune responses during wound healing', *Journal of Investigative Dermatology*, 130(4), pp. 1167–1177. doi: 10.1038/jid.2009.284.

Scaltriti, M. and Baselga, J. (2006) 'The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy', *Clin Cancer Res*, 12(18), pp. 5268–5272. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1554.

Schauber, J. *et al.* (2009) 'Antimicrobial peptides and the skin immune defense system', *Journal of Allergy*, 122(4), pp. 829–831. doi: 10.1016/j.jaci.2008.03.027.Antimicrobial.

Schibli, D. J. *et al.* (2002) 'The solution structures of the human  $\beta$ -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against Staphylococcus aureus', *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), pp. 8279–8289. doi: 10.1074/jbc.M108830200.

Schröder, J. M. and Harder, J. (1999) 'Human beta-defensin-2', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(6), pp. 645–651. doi: 10.1016/S1357-2725(99)00013-8.

Segaert, S. (2005) 'Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors', *Annals of Oncology*, 16(9), pp. 1425–1433. doi: 10.1093/annonc/mdi279.

Senoo, M. (2013) 'Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin', *Advances in Wound Care*, 2(6), pp. 273–282. doi: 10.1089/wound.2012.0372.

Shea, J. J. O. *et al.* (2017) 'The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention', (Figure 2), pp. 311–328. doi: 10.1146/annurev-med-051113-024537.The.

Shimizu, H. (2007) '02-05 D . Subcutaneous fat tissue E . Appendages', *Shimizu's Textbook of Dermatology*, p. 23.

Sibilia, M. *et al.* (2007) 'The epidermal growth factor receptor: From development to tumorigenesis', *Differentiation*. International Society of Differentiation, 75(9), pp. 770–787. doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00238.x.

Simanski, M. *et al.* (2010) 'RNase 7 protects healthy skin from staphylococcus aureus colonization', *Journal of Investigative Dermatology*, 130(12), pp. 2836–2838. doi: 10.1038/jid.2010.217.

Sorensen, O. E. *et al.* (2003) 'Wound Healing and Expression of Antimicrobial Peptides/Polypeptides in Human Keratinocytes, a Consequence of Common Growth Factors', *The Journal of Immunology*,

170(11), pp. 5583–5589. doi: 10.4049/jimmunol.170.11.5583.

Sorensen, O. E. *et al.* (2005) 'Differential Regulation of  $\alpha$ -Defensin Expression in Human Skin by Microbial Stimuli', *The Journal of Immunology*, 174(8), pp. 4870–4879. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4870.

Steubesand, N. *et al.* (2009) 'The expression of the beta-defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF-kappaB and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of Candida esophagitis', *BMC Immunology*, 10, pp. 1–16. doi: 10.1186/1471-2172-10-36.

Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) 'Pattern Recognition Receptors and Inflammation', *Cell*. Elsevier Inc., 140(6), pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

Taylor TA, U. C. S. A. [Updated 2017 O. 9]. I. S. [Internet]. T. I. (FL): S. P. 2018 J.-. A. from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868>. (2009) 'Staphylococcus aureus', *New South Wales Public Health Bulletin*, p. 164. doi: 10.1071/NB09017.

Ventola, C. L. (2015) 'The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.', *P & T: A peer-reviewed journal for formulary management (2015)*, 40(4), pp. 277–83. doi: Article.

Walter, S. *et al.* (2017) 'RNase 7 participates in cutaneous innate control of Corynebacterium amycolatum', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/s41598-017-14383-z.

Wang, S. *et al.* (2016) 'Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5). doi: 10.3390/ijms17050603.

Wieduwilt, M. and Moasser, M. (2008) 'The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics', *Cell Mol Life Sci*, 65(10), pp. 1566–1584. doi: 10.1007/s00018-008-7440-8.The.

Wiesner, J. and Vilcinskis, A. (2010) 'Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system', *Virulence*, 1(5), pp. 440–464. doi: 10.4161/viru.1.5.12983.

Yang, D. Chertov, O. Bykovskaia, S. N. *et al.* (1999) ' $\beta$ -Defensins-Linking Innate and Adaptive Immunity Through Dendritic and T Cell CCR6', *Science*, 286(October), pp. 525–527. doi: 10.1126/science.286.5439.525.

Yano, S. *et al.* (2004) 'Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes', *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS, 122(3), pp. 783–790. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22328.x.

Zanger, P. *et al.* (2009) 'Constitutive Expression of the Antimicrobial Peptide RNase 7 Is Associated with Staphylococcus aureus Infection of the Skin', *The Journal of Infectious Diseases*, 200(12), pp. 1907–1915. doi: 10.1086/648408.

Zapotoczna, M. *et al.* (2017) 'Eradication of Staphylococcus aureus Biofilm Infections Using Synthetic Antimicrobial Peptides', *The Journal of Infectious Diseases*, 215(6), pp. 975–983. doi: 10.1093/infdis/jix062.

Zhang, J., Dyer, K. D. and Rosenberg, H. F. (2003) 'Human RNase 7: A new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily', *Nucleic Acids Research*, 31(2), pp. 602–607. doi: 10.1093/nar/gkg157.

Zhang, L. *et al.* (2005) 'Antimicrobial Peptide Therapeutics for Cystic Fibrosis Antimicrobial Peptide Therapeutics for Cystic Fibrosis', *Society*, 49(7), pp. 2921–2927. doi: 10.1128/AAC.49.7.2921.

Zhang, L. J. and Gallo, R. L. (2016) 'Antimicrobial peptides', *Current Biology*. Elsevier, 26(1), pp. R14–R19. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017.

Zhao, X. *et al.* (2013) 'LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides', *PLoS ONE*, 8(6), pp. 6–11. doi: 10.1371/journal.pone.0066557.

Zimmermann, S. and Moelling, K. (1999) 'Phosphorylation and regulation of raf by akt', *Science*, 286(5445), pp. 1741–1744.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Laufe der Jahre bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Harder, der mir bei der Entwicklung und Umsetzung des Projektes jederzeit zur Seite stand. Seine vielfältigen Ratschläge und die immer offene Tür bei Ideen oder Problemen waren sehr wertvoll für mich.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. T. Schwarz für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Hautklinik des UKSH Campus Kiel und Dr. med. Matthias Ritgen für die Ermöglichung der Zusammenarbeit mit der Klinik für Innere Medizin II.

Von ganzem Herzen möchte ich mich auch beim restlichen Team der AG Harder bedanken. Ohne die wertvollen Tipps und Tricks zum Arbeiten im Labor von Heilwig Hinrichs und Cornelia Wilgus wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Insbesondere Heilwig danke ich für ihre unendliche Geduld mit der sie mich vor allem durch meine Anfangszeit begleitet hat. Mein ganz besonderer Dank gilt auch Franziska Rademacher für ihr ständig offenes Ohr und für ihre investierte Mühe und Zeit bei der Korrektur meiner Dissertation. Ihre konstruktive Kritik und ihre zahlreichen Denkanstöße haben mich stets vorangebracht. Auch bei meiner Kollegin Yelda Farid möchte ich mich bedanken, deren Humor und moralischer Beistand so manchen Tag gerettet haben.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Familie für ihre bedingungslose Unterstützung, nicht nur im Rahmen meiner Dissertation, sondern auch bei meinem Studium und meinen zahlreichen außerkurrikularen Aktivitäten. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid!

Zum Schluss möchte ich noch meiner lieben Freundin Wiebke Heimhuber danken, deren Freundschaft und Zuspruch so manchen Rückschlag und fehlgeschlagenes Experiment erträglicher gemacht haben.

Danke!