

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

**UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION ANTIMIKROBIELLER
PROTEINE IN KERATINOZYTEN DURCH *CORYNEBACTERIUM
AMYCOLATUM***

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

vorgelegt von
NICOLE UTE RENATE KOBINGER
aus Ingolstadt

Kiel 2021

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Jürgen Harder

2. Berichterstatter/in: PD Dr. Andreas Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.07.2022

gez.: Herr Prof. Dr. Jürgen Harder

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Haut	1
1.2 Die antimikrobiellen Proteine.....	3
1.2.1 Humanes Beta-Defensin 2.....	5
1.2.2 Humanes Beta-Defensin 3.....	7
1.2.3 RNase 7	8
1.3 <i>Corynebacterium amycolatum</i>.....	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Geräte	12
2.2 Zellkultur.....	13
2.2.1 Materialen.....	13
2.2.2 Anzüchtung und Kultivierung von NHEK.....	14
2.2.3 Anzüchtung des <i>C. amycolatum</i>	15
2.2.4 Herstellung der Kulturüberstände	17
2.3 Stimulation der NHEK.....	17
2.3.1 Materialien.....	17
2.3.2 Allgemeiner Ablauf der Stimulation	17
2.4 Genexpressionsanalyse	18
2.4.1 Materialen.....	18
2.4.2 Isolierung der RNA	19
2.4.3 Reverse Transkription	19
2.4.4 „Realtime“ PCR-Analyse.....	20
2.4.5 Verwendete Primer.....	21
2.5 ELISA	21
2.5.1 Materialen.....	21
2.5.2 Ablauf	21
3 Ergebnisse	23
3.1 Versuche zur Konzentrationskinetik	23
3.1.1 hBD-2	24
3.1.2 hBD-3	25
3.1.3 RNase 7	26
3.2 Versuch zur Zeitkinetik	27

3.2.1 hBD-2	27
3.2.2 hBD-3	28
3.2.3 RNase 7	29
3.3 Stimulation mit lebenden <i>C. amycolatum</i> und Kulturüberstanden	30
3.3.1 hBD-2	30
3.3.2 hBD-3	31
3.3.3 RNase 7	32
3.4 Stimulation mit lebenden <i>C. amycolatum</i> in Transwells	33
3.4.1 hBD-2	33
3.4.2 hBD-3	34
3.4.3 RNase 7	35
3.5 Stimulation von differenzierten Keratinozyten mit lebenden <i>C. amycolatum</i>.....	36
3.5.1 hBD-2	36
3.5.2 hBD-3	37
3.5.3 RNase 7	38
3.6 Versuche zur Signaltransduktion	39
3.6.1 Inhibition des EGFR mit Cetuximab	39
3.6.2 Inhibition des EGFR mit AG1478.....	42
4 Diskussion	45
4.1 hBD-2	45
4.2 hBD-3	50
4.3 RNase 7	54
5 Zusammenfassung	61
6 Literaturverzeichnis	62
7 Abbildungsverzeichnis	73
8 Danksagung.....	74
9 Veröffentlichung	75
9.1 Originalarbeit	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AMP	Antimikrobielle Peptide
β	Beta
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. amycolatum</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
CD1a	Cluster of Differentiation 1a
<i>C. diphtheriae</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
<i>C. minutissimum</i>	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
<i>C. striatum</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
CFU	„colony-forming unit“ = koloniebildende Einheit
<i>C. xerosis</i>	<i>Corynebacterium xerosis</i>
cDNA	„complementary DNA“ = komplementäre DANN
DNA	Desoxyribunucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
et al.	et alii = und andere
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
g	Erdbeschleunigung
γ	Gamma
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
hBD	humanes beta defensin
IL-1β	Interleucin-1
kDa	Kilodalton
KGM	„keratinocyte growth medium“

LPS	Lipopolysaccharide
m^2	Quadratmeter
min	Minute
ml	Milliliter
MLSB	Macrolide-lincosamide-streptogramin B
mm	Millimeter
mRNA	„messenger RNA“
n	nano
NaCL	Natriumchlorid
μ	Mikro
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
NF- κ B	„nuclear factor kappa B“
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
nm	Nanometer
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„Phosphat buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“ = Polymerase-Kettenreaktion
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
RNA	„Ribonucleic acid“ = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SIC	streptococcal inhibitor of complement
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Als größtes Grenzorgan des Menschen übernimmt die Haut viele wichtige Aufgaben. Sie macht beim erwachsenen Menschen eine Fläche von ca. 1,2 bis 2,3 m² aus und setzt sich aus verschiedenen Schichten zusammen (Cordes et al., 2014).

Diese Schichten sind die Epidermis (Oberhaut), die die eigentliche Deckschicht des Körpers darstellt und aus verhorntem mehrschichtigem Plattenepithel besteht, und die darunterliegende Dermis (Lederhaut), welche für die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut verantwortlich ist. Darunter liegt die Hypodermis, die auch Subcutis genannt wird. Die Epidermis ist frei von Gefäßen, während die Dermis die terminalen Gefäße führt. Des Weiteren sind diese beiden Schichten in der dermo-epidermalen Verbindungszone durch Verzahnungen eng miteinander verbunden, die je nach Lage Leisten, Rillen oder Papillen bilden können.

Die Gesamtdicke der Haut schwankt zwischen 1,5 mm und 4 mm, die der Epidermis schwankt, abhängig von verschiedenen Körperregionen zwischen 75-150 µm und 400-600 µm. Sie besteht zum größten Teil aus Keratinozyten, die in vier Schichten angeordnet sind. Die Epidermis beginnt im *Stratum basale*, wo sich basophile Keratinozyten befinden, die der Basalmembran aufsitzen. Sie sind über Hemidesmosomen miteinander verbunden. Diese Stammzellen im *Stratum basale* teilen sich und differenzieren weiter. Während dieses Prozesses steigen sie nach apikal, in die darüber liegende Schicht, das *Stratum spinosum*, auf, welches sich aus 2-5 Lagen dieser polygonalen Zellen zusammensetzt. Hier erscheinen die Zellen eher kubisch mit zentralem Zellkern und sind nach außen zunehmend leicht abgeflacht. Da gelegentlich Zellteilungen in beiden dieser Schichten stattfinden, können sie auch als *Stratum germinativum* zusammengefasst werden (Kühnel, 2008) (Lüllmann-Rauch, 2006).

Das *Stratum granulosum* liegt über dem *Stratum spinosum* und bildet die Schicht, in der sich Differenzierungsvorgänge und Apoptosen abspielen. Die Zellen flachen ab, verlieren ihren Zellkern und die Organellen. Dieses *Stratum* setzt sich aus ca. 1-3 Schichten von polygonalen, abgeflachten Zellen zusammen, die mit membranlosen Keratohyalingranula gefüllt sind. In diesen Keratohyalingranula befinden sich hauptsächlich Keratinfilamente und Filaggrin. Man kann in diesen Zellen auch membranumschlossene Lamellengranula finden. Sie sind mit Lipiden gefüllt und verschmelzen mit der Zellmembran. Dabei werden die Lipide in die Interzellularschicht ausgeschüttet und bilden so eine Barriere zum Schutz der Haut vor eindringenden Fremdkörpern und Wasser. Das dünne *Stratum lucidum* trennt das *Stratum granulosum* von der apikalsten Schicht, dem *Stratum corneum*, welches nur noch aus avitalen

Zellhüllen und dem Material der Keratohyalingranula, die über Lipide miteinander verbunden sind, besteht. Die Erneuerung der Epidermis dauert durchschnittlich ca. 28 Tage, abhängig von Alter und Körperregion.

Unter der Epidermis liegt die Dermis, sie besteht aus Bindegewebe, unterstützt die Epidermis und bildet die Verbindung zur darunterliegenden Hypodermis. Sie ist essentiell für die mechanische Stabilität der Haut. Sie setzt sich zusammen aus dem *Stratum papillare* und dem darunterliegenden *Stratum retikulare*. Unterhalb des *Stratum retikulare* liegt, wie bereits erwähnt, die Hypodermis oder auch Subcutis genannt, die aus lockerem Bindegewebe und läppchenförmig angeordnetem Fettgewebe besteht. Sie reicht bis zu den oberflächlichen Körperfaszien (Kühnel, 2008) (Junqueira & Carneiro, 2005) (Lüllmann-Rauch, 2006).

Zur Wahrnehmung von Vibration befinden sich die Pacini-Körperchen in der Subkutis. Zentral im Inneren der Pacini-Körperchen befindet sich ein Dentritenende, welches zwiebelschalenartig von Schwann-Zellen und einer Schicht perineuraler Neurothelzellen umgeben wird. Im *Stratum reticulare* der Dermis und in der Subkutis liegen als Dehnungsrezeptoren die Ruffini-Körperchen, an deren basalem Ende Nerven- und Kollagenfasern eintreten, die von einer Bindegewebeskapsel umgeben sind. Direkt unter der Epidermis, im *Stratum papillare* der Dermis, befinden sich die zapfenförmigen Meissner-Körperchen, welche Druckempfindungen detektieren und durch kurze Kollagenfasern mit der Basallamina verbunden sind. Sie sind stapelförmig übereinander geschichtet. Im *Stratum basale* der Epidermis befinden sich die Merkel-Zellen als weitere Mechanorezeptoren, die kleine elektronendichte Granula besitzen und an deren Basis Nervenendigungen liegen. Sie reagieren auf statische Druckänderung und sind durch Desmosomen mit den benachbarten Keratinozyten verbunden. Zur Wahrnehmung von Schmerz liegen freie Nervenenden in der Haut, die durch starke mechanische Reize wie Hitze und Abkühlung gereizt werden (Kühnel, 2008) (Junqueira & Carneiro, 2005).

Als äußere Hülle des Körpers schützt die Haut durch die Hornschicht vor dem Austrocknen und dem Eindringen von hydrophilen Substanzen und stellt somit eine Diffusionsbarriere dar. Die entscheidenden Faktoren für diese Funktion sind der Lipidverschluss durch extrazelluläre polare Lipide (Ceramide) und die Tight junctions im oberen *Stratum granulosum*. Außerdem schützt die Hornschicht durch das Vorhandensein von chemisch widerstandsfähigem Keratin bis zu einem gewissen Grad gegen Säuren, allerdings weniger gegen Laugen. Melanozyten im *Stratum basale* schützen die DNA vor UV-Strahlung. Durch ihre Fortsätze steht ein Melanozyt mit durchschnittlich 36 Keratinozyten in Kontakt und gibt die schützenden Melanosome ständig an die Keratinozyten weiter (Lüllmann-Rauch, 2006).

Da die Haut über eine kommensale Flora verfügt, kommt der Abwehr von Mikroorganismen eine besondere Bedeutung zu. Der immunologische Schutz erfolgt über

antigenpräsentierende Langerhans-Zellen und Lymphozyten. Die Langerhans-Zellen befinden sich vorwiegend im *Stratum spinosum*. Sie stammen aus dem Knochenmark, prozessieren und präsentieren Antigene den T-Lymphozyten. Sie exprimieren den Oberflächenrezeptor CD1a und wandern nach Antigenkontakt in den regionalen Lymphknoten.

Die oben beschriebene ständige Erneuerung der Epidermis gewährleistet, dass adhärente Mikroorganismen abgestoßen werden können. Auch die dichten Zellverbände und Lipide im *Stratum corneum* bilden eine physikalische Barriere für eindringende Mikroorganismen. Ein niedriger pH-Wert, antimikrobielle Lipide und antimikrobielle Peptide und Proteine bilden die chemische Barriere der Haut (Cordes et al., 2014) (Harder et al., 2013).

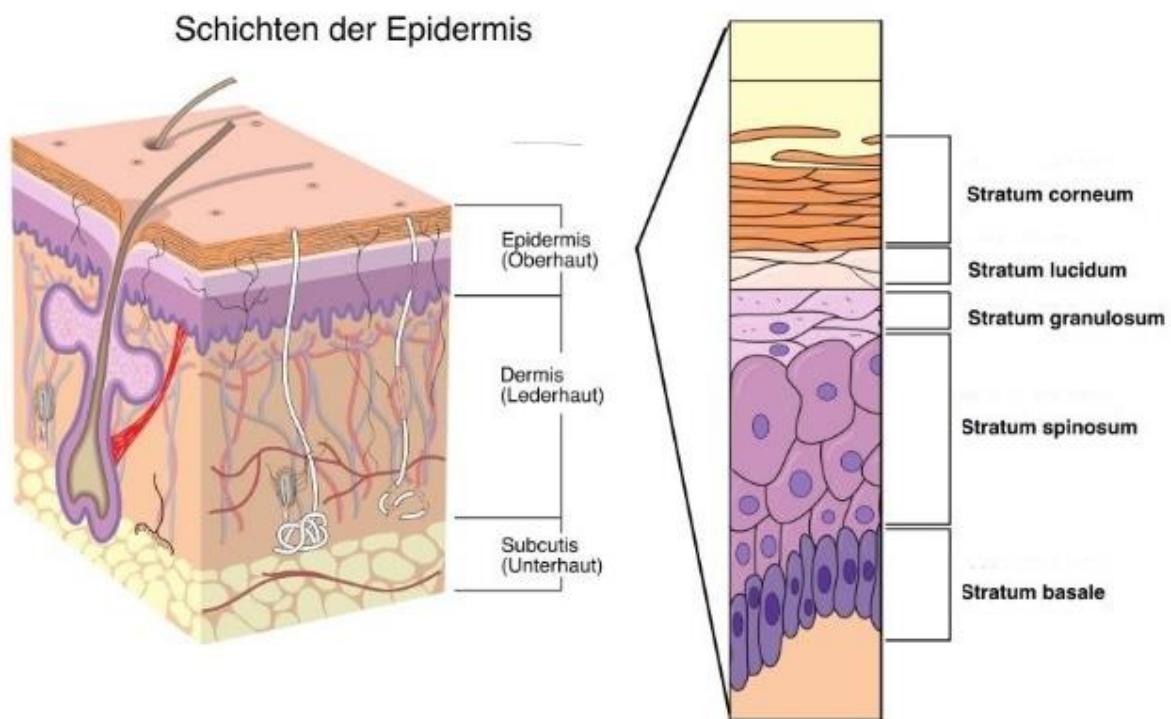


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Haut.

Nachbearbeitet nach (Hartmann, 2021, 29. Juli, *Aufbau und Behandlung der Haut*, <https://osteopathie-in-lueneburg.de/haut/>)

1.2 Die antimikrobiellen Proteine

Als wichtige chemische Barriere haben sich in den letzten 30 Jahren die antimikrobiellen Peptide und Proteine (AMPs) erwiesen, von denen über 1200 verschiedene in diesem Zeitraum identifiziert wurden. Sie stellen einen Teil des angeborenen Immunsystems dar und sind eine sehr heterogene Gruppe von Proteinen. Sie sind 12-150 Aminosäuren lang, kationisch geladen, unterscheiden sich in ihrer 3-dimensionalen Faltung und haben eine amphipathische Struktur (Nakatsuji & Gallo, 2012) (Lai & Gallo, 2009) (Fearon & Locksley,

1996) (Pasupuleti et al., 2012).

Man kann die AMPs in verschiedene Kategorien einteilen. Es gibt zum Beispiel Cathelicidine, Histatine, Dermcidine und Defensine. Defensine können anhand ihrer Struktur in Peptide mit α -Helix und Peptide mit β -Faltblatt Struktur, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden, unterteilt werden (Bals, 2000; White et al., 1995; Braff & Gallo, 2006). AMPs wurden sowohl bei Pflanzen (Broekaert et al., 1995), Insekten (Bulet et al., 1993), Amphibien (Barra & Simmaco, 1995), als auch bei Pilzen nachgewiesen und werden hier von verschiedenen Zellen synthetisiert. Oft werden sie gemeinsam exprimiert und wirken synergistisch (Braff & Gallo, 2006) (Reddy et al., 2004). Sie wirken gegen eine Großzahl verschiedener grampositiver, gramnegativer Bakterien, Pilze und Viren und sind trotz ihrer Jahrtausenden langen Existenz und Interaktion mit Mikroorganismen immer noch wirksam (Schröder, 2002). Resistenzen gegen AMPs sind selten, aber möglich, zum Beispiel durch Modifikation von Zellmembranbestandteilen wie Lipopolysacchariden (Ernst et al., 1999) oder Phosphorylcholinen (Lysenko et al., 2000). Dadurch können die kationisch geladenen AMPs nicht mehr mit der Oberfläche interagieren. (Peschel & Sahl, 2006) Auch eine Veränderung von Efflux Pumpen in der Bakterienmembran wurde beobachtet (Shafer et al., 1998).

Beim Menschen werden AMPs in diversen Organen, wie beispielsweise der Haut, der Lunge, dem Magendarmtrakt und dem Urogenitaltrakt, synthetisiert. Zu den verschiedenen Zelltypen der Haut, die AMPs synthetisieren, gehören zum Beispiel die Epithelzellen der ekkrienen Schweißdrüsen, Mastzellen und Sebozyten. (Cordes et al., 2014)

Als wichtige Vertreter der AMPs gelten zum Beispiel humanes β -Defensin 2 (hBD-2) (Schröder & Harder, 1999), humanes β -Defensin 3 (hBD-3) (Harder et al., 2001), Ribonuklease 7 (RNase 7) (Jürgen Harder & Schröder, 2002), das S100-Protein Psoriasin (Gläser et al., 2005), das Cathelicidin LL-37 (Frohm et al., 1997) und Dermcidin (Schittek et al., 2001).

Sie verfügen über verschiedene Mechanismen zur Bekämpfung von Mikroorganismen. Einige können sich auf Grund ihrer positiven Ladung und dreidimensionalen Struktur an negativ geladene Bakterienoberflächen anlagern und dadurch die Integrität der Zellmembran zerstören. Auch eine Bildung von Poren und eine daraus resultierende Lyse der Bakterienzelle sind möglich. Es konnten auch Interaktionen mit der Zellwandsynthese und Inhibition der DNA- und Proteinbiosynthese nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte eine Bindung an bakterielle Lipopolysaccharide nachgewiesen werden (Schröder, 1999).

Es ist anzumerken, dass bei einigen Hauterkrankungen AMPs runter, beziehungsweise hoch, reguliert sind und es hierdurch vermutlich zu weniger Infektionen kommt, obwohl die Hautbarriere geschädigt ist. So zum Beispiel bei Patienten mit *Psoriasis vulgaris*, bei denen RNase 7, hBD-2 und hBD-3 vermehrt exprimiert werden (Gambichler et al., 2008). Im Vergleich zur *Psoriasis vulgaris* werden AMPs beim atopischen Ekzem, bei dem es häufiger zu

Superinfektionen kommt, weniger hoch exprimiert, obwohl viele AMPs wie zum Beispiel hBD-2 und RNase 7, dort im Vergleich zu gesunder Haut immer noch hoch reguliert sind (Gläser et al., 2009). Einige AMPs verfügen außerdem über eine antivirale Wirkung wie beispielsweise hBD-2 und hBD-3, die bei *Verrucae vulgares* und *Condylomata acuminata*, beides durch humane Papillomaviren verursachte Epithelhyperplasien, in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden konnten (Meyer-Hoffert et al., 2008). Auch bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen sind die Level verschiedener AMPs verändert. Die Konzentrationen von hBD-1, -2 und -3 sind beim oralen Plattenepithelkarzinom erniedrigt (S. Joly et al., 2009). Beim Basalzellkarzinom wurde dagegen eine erhöhte hBD-2 und eine signifikant erniedrigte hBD-1 Konzentration nachgewiesen. Allerdings ist die genaue Rolle der AMPs in Neoplasien noch nicht ausreichend geklärt (Gambichler et al., 2008).

Durch verschiedene äußere Einflüsse, wie beispielsweise UV-Strahlung, können einige AMPs wie hBD-2, -3, RNase 7 und Psoriasin induziert werden. Dadurch lässt sich erklären, dass trotz der immunsuppressiven Wirkung auf das adaptive Immunsystem durch UV-Strahlung, kein erhöhtes Infektionsrisiko besteht (Gläser et al., 2009). Des Weiteren kann Vitamin D die Produktion von AMPs anregen (T.-T. Wang et al., 2004).

Die Expression verschiedener AMPs ist unterschiedlich in den verschiedenen Schichten der Haut. Psoriasin wird hauptsächlich im *Stratum granulosum* und im *Stratum spinosum* exprimiert. RNase 7, hBD-2 und hBD-3 sind eher im *Stratum corneum* zu finden. Eine altersabhängige Expression konnte für hBD-2 gezeigt werden, wobei bei älteren Patienten eine höhere Aktivität zu erkennen war. Bei RNase 7, Psoriasin und hBD-3 konnte keine Korrelation mit dem Alter gefunden werden. Eine geschlechtsabhängige Expression konnte für keines dieser AMPs nachgewiesen werden (Wittersheim et al., 2013).

AMPs bilden eine Verknüpfung zum adaptiven Immunsystem. Dies geschieht durch immun modulatorische Wirkungen und chemotaktische Effekte (Nakatsuji & Gallo, 2012). Untersuchungen konnten zeigen, dass β -Defensine dendritische Zellen und T-Gedächtniszellen über den CCR6-Rezeptor anlocken und damit eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Teil des Immunsystems herstellen (Yang et al., 1999) (Dhople et al., 2006).

1.2.1 Humanes Beta-Defensin 2

Als erstes AMP wurde 1997 das humane Beta Defensin 2 (hBD-2) aus menschlicher Haut isoliert (Harder et al., 1997). Es ist reich an Cystein, kationisch, hat ein niedriges Molekulargewicht und besteht aus insgesamt 41 Aminosäuren. hBD-2 ist aus β -Faltblättern, welche durch drei Disulfidbrücken stabilisiert werden, aufgebaut. Zusätzlich findet sich eine α -

helikale Struktur, die wiederum durch Disulfidbrücken mit dem β -Faltblatt verbunden ist. Insgesamt scheint die native Form von hBD-2, die eines Dimers zu sein. Diese dimere Form ermöglicht dem hBD-2 die Ausbildung einer Oligomerisierung höherer Ordnung in Form eines Oktamers. Es konnte gezeigt werden, dass die richtige Ausprägung der Disulfidbrücken von hBD-2 essentiell für seine Wirkung ist. Seine bakterizide Wirkung scheint nicht nur auf der Ausbildung von membran durchgreifenden Poren, sondern eher auf der elektrostatischen Veränderung der Permeabilität der Bakterienmembran zu beruhen (Hoover et al., 2000). Es wird fakultativ nach Kontakt mit Mikroorganismen oder Zytokinen, wie zum Beispiel TNF- α und IL-1 β , produziert (Singh et al., 1998) (Hiratsuka et al., 1998). Für diese Art der immunologischen Stimulation besitzt die hBD-2-Promotorregion Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF- κ B (L. Liu et al., 1998). hBD-2 selbst zeigt allerdings auch eine moderate Fähigkeit die Produktion von TNF- α , welche durch Aktivierung von Makrophagen durch LPS (Lipopolysaccharide) induziert wird, zu blockieren, indem es mit eben diesem LPS interagiert (Scott et al., 2000).

Experimente konnten zeigen, dass hBD-2-mRNA in verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel in Haut, Lunge, im urogenitalen Trakt, im hämatopoetischem System (Leukozyten, Thymus) und in Epithelzellen des Kolons, nachgewiesen werden kann. In der Epidermis ist hBD-2 im *Stratum spinosum*, hier in den Lamellarkörpern der Keratinozyten und im interzelluar Raum nachgewiesen worden. Auch synergistische Effekte zwischen hBD-2 und anderen antimikrobiellen Proteinen wie Lysozym und Lactoferrin sind bekannt (Bals et al., 1998) (Oren et al., 2003).

Bei erhöhten NaCl Konzentrationen zeigt hBD-2 eine geringere Wirkung, was speziell für Patienten mit zystischer Fibrose von Bedeutung sein könnte, da bei diesen Patienten eine erhöhte NaCl Konzentration in den Atemwegen herrscht (Zabner et al., 1998) (Singh et al., 1998).

Das hBD-2 Peptid ist sowohl wirksam gegen gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) als auch gegen Pilze wie *Candida albicans* (*C. albicans*), allerdings zeigt es nur geringe Aktivität gegen grampositive Bakterien, wie *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*). Wie oben bereits erwähnt, wird hBD-2 bei entzündliche Hauterkrankungen wie *Psoriasis vulgaris* vermehrt exprimiert (Schröder et al 1999).

Die Aktivität von hBD-2 kann jedoch auch von unterschiedlichen Faktoren gehemmt, beziehungsweise reduziert werden. Dies konnte beispielsweise für Cystein Proteasen wie Cathepsin B.L und S, und auch für „streptococcal inhibitor of complement“ (SIC), das von einem bestimmten Stamm A Streptokokken sezerniert wird, gezeigt werden (Taggart et al., 2003) (Fernie-King et al., 2006).

1.2.2 Humanes Beta-Defensin 3

Humanes Beta-Defensin 3 (hBD-3) ist ein 3-5 kDa großes, nicht hämolytisches Peptid, welches sich aus drei Disulfid-Brücken zwischen 6 Cysteinen zusammensetzt und insgesamt 45 Aminosäuren lang ist. Es wurde erstmals aus Hautläsionen von Patienten mit *Psoriasis vulgaris* isoliert (Ishimoto et al., 2006). Es ist ähnlich wie andere Beta-Defensine kationisch, verfügt aber im Gegensatz zu diesen, über eine höhere Dichte an kationischen Residuen, vor allem an seinem C-Terminus (Schutte & McCray, 2002). Die korrekte Faltung der Disulfidbrücken erwies sich in Experimenten als wichtig für die chemotaktischen Eigenschaften von hBD-3, allerdings schien sie für seine antimikrobielle Wirkung nicht von großer Bedeutung zu sein (Wu et al., 2003). Es ist dem hBD-3 Peptid anscheinend möglich, eine amphipathische symmetrische dimere Struktur zu bilden, welche eine stark positiv geladene Oberfläche präsentiert (Dhople et al., 2006).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass seine antimikrobielle Aktivität unabhängig ist von der umgebenden Salzkonzentration. Nur in supraphysiologischen Salzkonzentrationen konnte eine reduzierte antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. hBD-3 besitzt eine weitgefächerte Aktivität gegen verschiedene grampositive Bakterien, wie zum Beispiel gegen das multiresistente *S. aureus* und das Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (*E. faecium*). Außerdem zeigt hBD-3 Wirkung gegen gramnegative Bakterien wie *P. aeruginosa* und *E. coli* und auch gegen Hefepilze wie *C. albicans*. (Sawamura et al., 2005)

Es konnte nachgewiesen werden, dass Tonsillen und Haut eine hohe Expressionsrate von hBD-3-mRNA aufweisen, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt dagegen kaum oder gar keine nachweisbare hBD-3-mRNA Expression zeigen. Als zelluläre Ursprungsorte von hBD-3 Peptiden zeigten Keratinozyten und Epithelien der Atemwege in Versuchen eine geringe Expression an hBD-3 Protein. In der Epidermis konnte es vor allem im *Stratum spinosum* und *granulosum* nachgewiesen werden. In Experimenten zeigte sich, dass hBD-3 durch morphologische Veränderungen der Bakterienmembran zu deren Lyse führt. Eine Lyse der Zellwand verbunden mit einer Freisetzung von Zytoplasma nach 30 Minuten konnte bei *S. aureus* beobachtet werden (Harder et al., 2001) (Sawamura et al., 2005).

hBD-3 wird genauso wie hBD-2 fakultativ produziert. Dies konnte für den Kontakt mit TNF- α und Interleukin-1 gezeigt werden. Allerdings kann hBD-3 ähnlich wie hBD-2 die Endotoxin-Aktivität von LPS neutralisieren, welche für die Produktion von TNF- α wichtig ist. Des Weiteren konnte eine Induktion von hBD-3 sowohl durch grampositive, als auch durch gramnegative Bakterien nachgewiesen werden (Sophie Joly et al., 2005) (Harder et al., 2001) (Böhling et al., 2006). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass das grampositive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) hBD-3 in menschlichen Lungenepithelien

induziert (Scharf et al., 2012). Diese Induktion scheint über den EGF-Rezeptor abzulaufen. Ähnliches wird auch für hBD-2 vermutet (Sørensen et al., 2005). Die Aktivität von hBD-3 kann aber auch durch verschiedene Einflüsse gehemmt werden. Wie auch hBD-2 kann hBD-3 durch Cystein Proteasen, wie die Cathepsine B, L und S, reduziert werden (Taggart et al., 2003). Wie schon bereits im Abschnitt über hBD-2 erwähnt, kann auch hBD-3 durch SIC gehemmt werden (Fernie-King et al., 2006).

Untersuchungen konnten zeigen, dass die Gensequenz für hBD-3 (Gensequenz: DEFB103A), ebenso wie die für das oben beschrieben hBD-2 (Gensequenz: DEFB2), auf dem Chromosom 8p22-p23 liegt (Harder et al., 1997) (L. Liu et al., 1998) (Peng Jia et al., 2001).

1.2.3 RNase 7

RNase 7 ist eine 14,5 kDa große antimikrobielle Ribonuklease, die über ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität verfügt (LD90 (lethal dose of 90%) < 30 nm) und konstitutiv exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von RNase 7-mRNA in Keratinozyten und epithelialen Zellen nicht nur konstitutiv, sondern auch induzierbar durch Interleukin-1 β , Interferon- γ , Interleukin 17a und Interaktion mit Bakterien (z.B. *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, und *E. faecium*) getriggert wird (Simanski et al., 2010) (Simanski et al., 2013) (Harder & Schröder, 2002) (Köten et al., 2009).

RNase 7 wird von vielen verschiedenen epithelialen Geweben hergestellt. Man konnte RNase 7-mRNA in Haut, Urogenitaltrakt, Respirationstrakt, Tonsillen, Leber, Niere und Herzmuskel nachweisen. In anderen Geweben wiederum wie Gehirn, Thymus, Milz und Plazenta konnte sie nicht nachgewiesen werden (Jianzhi Zhang et al., 2003). Hautbereiche, die sich als besonders reich an RNase 7 erwiesen, sind Stirn, Wangen, Gesäß und die lumbale Region (Wittersheim et al., 2013). In der Haut an sich konnte RNase 7 in allen Schichten der Epidermis, vor allem aber im *Stratum corneum*, nachgewiesen werden (Köten et al., 2009).

Sie gehört zur Superfamilie der RNase A Proteine, deren Gene auf dem Chromosom 14 liegen und ist dosisabhängig zytotoxisch wirksam gegen ein großes Spektrum an grampositive Bakterien, wie zum Beispiel Vancomycin-resistentes *E. faecium* und *S. aureus*. Des Weiteren ist sie wirksam gegen gramnegative Bakterien wie *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) oder *Klebsiella*, auch eine Aktivität gegen Hefepilze wie *C. albicans* und gegen Dermatophyten ist nachweisbar. Sie besitzt aber scheinbar keine direkte antivirale Aktivität (J. Zhang, 2002) (Cho et al., 2005) (Harder & Schröder, 2002) (Fritz et al., 2012) (Spencer et al., 2011).

Das RNase 7 Protein ist kationisch und verfügt über den für die Superfamilie der RNase A Proteine typischen Aufbau. Dieser zeichnet sich durch das Vorhandensein eines klassischen hydrophoben Signalpeptides aus, gefolgt von einem reifen Peptid. Des Weiteren sind mehrere

Cysteine, die Disulfidbrücken bilden, vorhanden (Jianzhi Zhang et al., 2003). RNase 7 ist reich an Lysinen (18 von 128 Aminosäuren) und besitzt drei kationische Cluster mit katalytischen Triaden aus Hisidin-Lysin-Histidin. Von diesen scheint das am ersten N-Terminal gelegene Cluster jenes zu sein, welches für die bakterizide Wirkung entscheidend ist.

In Experimenten scheint sich zu zeigen, dass RNase 7 sich an negativ geladene Oberflächen von Bakterien anlagert und über elektrostatische Wechselwirkungen ihre Integrität beeinflusst (Huang et al., 2007).

In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass RNase 7 sich an LPS und Peptidoglykane bindet und zytoplasmatische Membranen von zum Beispiel *E. coli* und *S. aureus* depolarisieren kann (Torrent et al., 2010).

Eine entscheidende Rolle im Signalweg der RNase 7 Induktion scheint der EGF-Rezeptor zu spielen. Eine reduzierte Expression von RNase 7 konnte für mit EGF-Rezeptor Inhibitoren behandelte Keratinozyten gezeigt werden (Lichtenberger et al 2013) (Rademacher et al., 2017).

1.3 *Corynebacterium amycolatum*

Corynebacterium amycolatum (*C. amycolatum*) gehört zur Gattung der Corynebakterien, welche auch „diphtheroids“ genannt werden (Belmares et al., 2007). Sie verdanken ihren Namen ihrer Form, die an einem oder an beiden Enden aufgetrieben sein kann. Dadurch wird ihnen ein keulenartiges Aussehen verliehen (>>Koryne<<: Keule). Alle Corynebakterien sind unbeweglich, sie besitzen keine Katalase, sind aber Oxidase positiv. In der Neisser-Färbung zeigen sich metachromatische Granula (Polkörperchen). Sie sind relativ resistent gegen Austrocknung, im Gegensatz dazu aber hitzeempfindlich und können eine Erhitzung über 10 Minuten bei 58°C nicht überleben (Suerbaum et al., 2012). Ihre Gattung hat mehr als 90 Vertreter und es kommen immer wieder Neue hinzu. Der wohl bekannteste Verwandte des *C. amycolatum* ist *Corynebacterium diphtheriae*, der Auslöser der Diphtherie. (Olender, 2013) *C. amycolatum* selbst wurde erstmals 1988 als grampositives, aerobes, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes, nonlipophiles Stäbchenbakterium, welches außerdem keine Mykolsäure in der Zellwand besitzt und zur Fermentation in der Lage ist, beschrieben (Collins et al., 1988) (Suerbaum et al., 2012). Es wurde seitdem selten als Pathogen z.B. im Zusammenhang mit Endokarditis beschrieben (Rudresh et al., 2015).

Eigentlich gehört *C. amycolatum* zur Mikrobiota der Haut und Schleimhaut und wird oft in klinischen Proben nachgewiesen. Dabei wurde es häufig als Verunreinigung der Probe verstanden. Die mikrobiologische Klassifikation und das Verständnis für dieses Bakterium als Pathogen haben sich in den letzten Jahren allerdings geändert (Knox & Holmes, 2002). Es hat

sich herausgestellt, dass *C. amycolatum* oft als *Corynebacterium xerosis* (*C. xerosis*) fehldiagnostiziert wurde, welches als etabliertes Pathogen gilt (Funke et al., 1996). Hier bieten sich zur Unterscheidung chemotaxonomische Untersuchungen, wie die genaue Begutachtung der Zellwand auf Mykolsäure oder die Detektion von Propionsäure, als Produkt der Fermentation von Glucose, an (Wauters et al., 1998).

Auch die Form der Kolonien unterscheidet sich. *C. amycolatum* bildet flache, weißlich-graue, wachsige oder matte Kolonien auf Blutagar (Dalal et al., 2008), *C. xerosis* dagegen bildet auf Blutagar braun-gelbliche, eher trocken erscheinende Kolonien (Hernández-León et al., 2016). *C. amycolatum* kann außerdem von *Corynebacterium minutissimum* (*C. minutissimum*) und *Corynebacterium striatum* (*C. striatum*) durch dessen fehlenden Abbau von beispielsweise L-Tyrosin oder auch L-Serin unterschieden werden (Wauters et al., 1998) (Renaud et al., 1998). Darüber hinaus zeigt es im Gegensatz zu anderen Arten, wie *C. striatum* und *C. minutissimum*, eine allgemein niedrigere metabolische Aktivität. Auch modifizierte Carbon-Substrat-Assimilation Tests können für die Unterscheidung dieser verschiedenen Corynebakterien genutzt werden (Renaud et al., 1998).

Inzwischen ist *C. amycolatum* nachweislich verantwortlich für Infektionen, die Katheter-assoziiert sind, oder auch durch intravenös liegende Zugänge verursacht werden (Knox & Holmes, 2002). Beispielsweise konnte *C. amycolatum* inzwischen bei Endokarditis als Erreger eindeutig nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich, dass es vor allem eine Linksherzendokarditis bei Erwachsenen verursacht und Frauen eine Prädisposition für eine solche Endokarditis haben. Oft besteht bei diesen Patienten bereits eine Vorerkrankung der Herzklappen (Belmares et al., 2007). Auch in Urin, Eiter, zerebrospinaler Flüssigkeit und Sputum wurde *C. amycolatum* bereits nachgewiesen (Sengupta et al., 2015).

Es zeigte sich, dass *C. amycolatum* resistent ist gegen einige Antibiotika, wie zum Beispiel Penicillin, auch Clindamycin und Ciprofloxacin zeigten *in vitro* nur wenig Wirkung gegen *C. amycolatum*. Weiterhin wurden Resistenzen gegen Makrolide wie Erythromycin, Chloramphenicol und Trimethoprim/Sulfamethoxazole nachgewiesen. Vancomycin, Linezolid und Imipenem zeigten dagegen eine gute Aktivität gegen das Bakterium. Auch Multiresistenzen gegen bis zu sechs Antibiotika sind beschrieben worden (Rudresh et al., 2015) (Knox & Holmes, 2002) (Olender, 2013). Diese Multiresistenzen gegen Clindamycin und Erythromycin beruhen wahrscheinlich auf dem Vorhandensein des Kreuz-Resistenz Mechanismus Macrolid-Lincosamid-Streptogramin B (MLSB). Auch ein horizontaler Transfer von Resistenz Genen ist für Corynebakterien beschrieben worden (Olender, 2013).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit setzt sich mit der Hypothese auseinander, ob und inwieweit *C. amycolatum*, sowohl die Genexpression, als auch die daraus resultierenden antimikrobiellen Proteine in Keratinozyten induzieren könnte und ob sich diese Induktion über den Epidermal-growth-factor Rezeptor (EGFR) -weg vollziehen könnte. Eine Induktion durch dieses Bakterium wurde bisher noch nicht untersucht.

Für die hier durchgeführten Versuche wurden die AMPs RNase 7, hBD-2, und hBD-3 herangezogen.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die Signaltransduktion dieser Induktion über EGFR stattfindet, wurde der Signalweg im Verlauf der Versuche mit zwei verschiedenen EGFR spezifischen Inhibitoren (Cetuximab und AG 1478) gehemmt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

CO2 Inkubatoren	<ul style="list-style-type: none"> - Heraeus™ BB 16, Heraeus Holding (Haunau, Deutschland) - Formascientific™ 3164, Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) - CB 150I™, Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Flüssigstickstofftank	Arpege 70, Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland)
Gefrierschränke/-truhe (-80°C)	<ul style="list-style-type: none"> - Thermo Forma™ 905-86C, Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) - Sanyo Ultra low™ MDF-19, Panasonic (Osaka, Japan)
Mikroskope	<ul style="list-style-type: none"> - Leitz DiaVert™, Leica (Wetzlar, Deutschland) - Wilovert™ 30, Hund (Wetzlar, Deutschland) - Zeiss 47 17 01-990, Zeiss (Jena, Deutschland) - Olympus IX50, Olympus (Hamburg, Deutschland)
Photometer	NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Peqlab (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettierhilfen	<ul style="list-style-type: none"> - Pipetus™ akku, Hirschmann (Eberstadt, Deutschland) - Accu jet pipette boy™ Brand (Wertheim, Deutschland) Pipetman™ 20; 200;1000 µl, Gilson (Middleton, USA) - Reference™ 2,5; 10; 100; 1000 µl, Eppendorf (Hamburg, Deutschland) - Research™ 2,5; 10;100; 1000 µl,

	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage	KERN 822-33, Kern & Sohn (Balingen, Deutschland)
Real-Time PCR System	StepOne Plus™, Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Sterilwerkbank	- Cytosafe™ 2004, Gelaire,(Seven Hills, Australia) - clanLAF™ VFR 1206 GS, Labogene (Lynge, Dänemark)
Thermocycler	T3™, Biometra (Göttingen, Deutschland)
Vortexer	- Reax top, Heidolph (Schwabach, Deutschland) - Vortex Genie2™, Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zentrifugen	- Eppendorf 5810R, 5804R, 5424, 5417R, Eppendorf (Hamburg, Deutschland) - Heraeus Multifuge™ X3R, Heraeus Holding (Hanau, Deutschland) - Heraeus Megafuge™ 1.0R, Heraeus Holding (Hanau, Deutschland)

2.2 Zellkultur

2.2.1 Materialen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Low Glucose w/o L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate) - DMEM++- (500ml DMEM + 50ml FCS + 5ml L-Glutamin)	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Fetal Calf Serum (FCS)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Keratinocyte Growth Medium (KGM2) - KGM2 +++) (500ml KGM2 Basalmedium + Supplement Mix + 5ml Penicillin/Streptomycin + 0.06M CaCl ₂)	Promo Cell (Heidelberg, Deutschland)

(P/S)) - KGM2 +- (KGM2 (+++) ohne Zugabe von P/S)	
Kollagen 1, Rattenschwanz	Life Technologies (GIBCO) (Darmstadt, Deutschland)
L-Glutamin (200mM)	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin (10,000U/mL)	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biowest SAS (Nuillé, Frankreich)
Salzsäure (HCl) 1N	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin/ EDTA	Biochrom (Berlin, Deutschland)

Verschiedene Plastikmaterialen wie Pipettenspitzen/Filtertips, Zentrifugen-/Probenrörchen, Petrischalen, Zellkulturflaschen/Schaber wurden von der Firma Sarstedt, Nümbrecht bezogen

2.2.2 Anzüchtung und Kultivierung von NHEK

Für die Versuche wurden NHEK Zellen (Normale humane epidermale Keratinozyten) der Firma PromoCell, Heidelberg verwendet. Diese primären Keratinozyten wurden aus juvenilen Präputien gewonnen und setzten sich aus einem Zellpool von 3-5 Spendern zusammen. Sie wurden in Röhrchen in Stickstofftanks eingefroren gelagert und vor Verwendung daraus entnommen. Ein Röhrchen wurde auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt. Diese Zellkulturflaschen wurde davor mit einer Suspension aus 1%igem Rattenschwanz Kollagen Typ I und 0,02 M Salzsäure beschichtet und nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C zweimal mit PBS gewaschen. Darin wurden die Keratinozyten bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert, bis ihre Konfluenz bei ca. 80-90% lag. Das verwendete KGM2 (+++) Medium wurde dabei alle 2 Tage erneuert.

Eine höhere Konfluenz der Zellen führte zur Ausdifferenzierung der Zellen, was letztlich zum Absterben der Zellen führte, deshalb sollten sie frühzeitig weitergeteilt werden. Um sie weiter zu subkultivieren, mussten die Keratinozyten zunächst aus den Flaschen gelöst werden. Dies wurde erreicht, indem sie erst mit PBS gewaschen wurden, anschließend wurden 5 ml 0,05 % Trypsin/EDTA (T/E) in die Zellkulturflaschen pipettiert, dann wurden sie bei 37°C für 5 -10 Minuten inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde beurteilt, ob die Ablösung vollständig stattgefunden hatte. Dann wurde die Trypsinierung mit 10 ml FCS-haltigem DMEM (++) Medium abgestoppt. Sie wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das entstandene Zellpellett in KGM2 (+++) oder (++) wiederaufgenommen. Zur weiteren Verwendung wurde das Zellpellet,

je nach Verwendungszweck, in Zellkulturflaschen oder in 12-Loch-Platten überführt. Die Flaschen wurden dafür mit 10 ml Medium befüllt, dann wurde 1 ml Zellensuspension hinzugefügt und unter mikroskopischer Kontrolle die Verteilung der Zellen kontrolliert. In den Platten wurden mit 500 µl KGM vorgelegt und 500 µl Zellsuspension hinzu pipettiert. Sowohl die Flaschen als auch die Platten wurden dann bei 37°C und 5% CO₂ weiter inkubiert, bis der jeweilige erforderliche Grad der Konfluenz erreicht war. Das Medium wurde routinemäßig alle 2 Tage gewechselt.



Abbildung 2.1: NHEK, postkonfluent, kurz vor Weiterverwendung für eine Stimulation.

Die Abbildung zeigt NHKS in einer 12-Loch Platte, sie sind postkonfluent und wurden nach der Aufnahme des Fotos sofort zu einer Stimulation weiterverwendet. (Bild farblich nachbearbeitet)

2.2.3 Anzüchtung des *C. amycolatum*

2.2.3.1 Materialien

BHI (Brain-heart) -Boullion	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Blut-Agarplatte	BioMérieux (Nürtingen, Deutschland)
KGM2 -+- (KGM2 (+++) ohne Zugabe von Supplement Mix und P/S) nur CaCl ₂	Promo Cell (Heidelberg, Deutschland)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biowest SAS (Nuaillé, Frankreich)

2.2.3.2 Kultivierung des *C. amycolatum*

Das in den Versuchen verwendete *C. amycolatum* (klinisches Isolat aus dem Institut für Infektiologie, Medizin, Kiel; Identität verifiziert durch MALDI-TOF Massenspektrometrie (MALDI Biotyper, Bruker, Billerica, MA) war bei -80°C eingefroren.

Es wurde unter sterilen Bedingungen an einer Steril Werkbank entnommen, auf einer Blut-Agarplatte ausgestrichen und für 36h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die äquivalente Menge einer Impföse mit ausgewählten Bakterienkolonien entnommen und in 20 ml BHI Boullion in einem 100 ml Kolben überführt, in einen Schüttler bei 37°C gestellt und über Nacht inkubiert. Die Optische Dichte (OD600) wurde gemessen, dann wurden die Bakterien bei 2500 rpm RT 5 Minuten lang abzentrifugiert, danach wurden die Bakterien 1x mit PBS gewaschen und wieder bei 2500 rpm Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert. Im Folgenden wurden sie mit KGM2 (-++) auf eine optische Dichte von 0.2 eingestellt. Aus diesem Gemisch wurde dann die jeweilige erforderliche Verdünnung der Bakterien hergestellt.

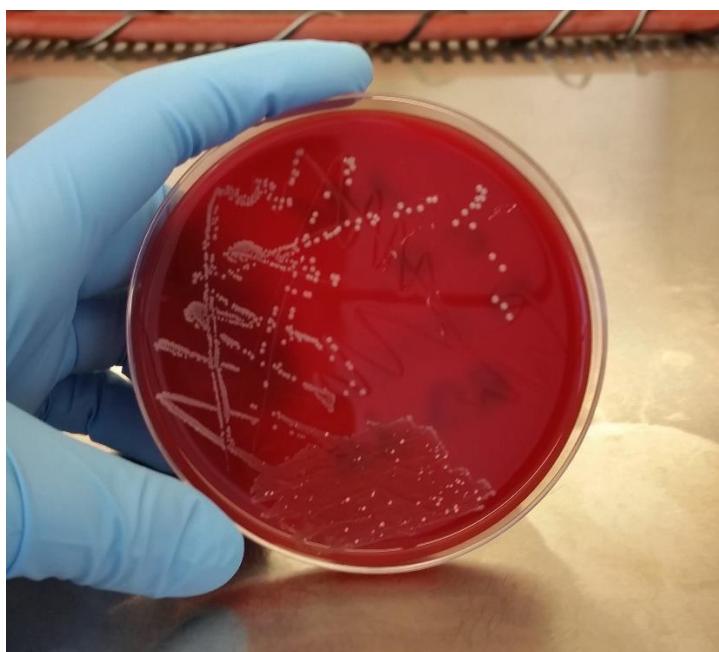


Abbildung 2.2 *C.amycolatum* Kolonien auf Blutagarplatte.

Die Abbildung zeigt mit einer Impföse ausgestrichene *C. amycolatum* auf einer Blutaragarplatte nach einer Inkubationszeit von 36 h bei 37°C

2.2.4 Herstellung der Kulturüberstände

Aus der, wie oben beschrieben, hergestellten Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von 0.2 wurden auch Kulturüberstände hergestellt. Dafür wurden 5 ml dieser Suspension mit 5 ml KGM2 (-++) in einer Petrischale vermischt und anschließend 24h bei 37°C in einem Brutschrank mit 5% CO₂ inkubiert. Folglich ergab sich eine Verdünnung von 1:2. Es wurde auch ein Kontrollüberstand bestehend aus 20 ml KGM2 (-++) in einer Petrischale angesetzt und ebenfalls 24h bei 37°C in einem Brutschrank mit 5% CO₂ inkubiert.

Dann wurde wieder die optische Dichte gemessen. Die Kontrolle und der Überstand wurden jeweils in ein Röhrchen überführt, für 10 Minuten bei 4500 rpm abzentrifugiert und steril filtriert (0,22 µm). Die Überstände wurden dann in Schraubröhrchen zu je 1 ml aliquotiert. Diese Schraubröhrchen konnten dann zur weiteren Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden. Um zu überprüfen, dass sich keine Bakterien mehr in den Überständen befanden, wurden Proben der Überstände auf Blutplatten auspipettiert, über 36h inkubiert und kontrolliert.

2.3 Stimulation der NHEK

2.3.1 Materialien

Tyrphostin AG1478, EGFR-Inhibitor	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Promocell (Heidelberg, Deutschland)
Cetuximab (Erbitux), EGFR-Antikörper, monoklonal, IgG	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
irrelevanten Antikörper, Ziege, IgG, Normalserum	ZIKA-Kaninchenbetrieb (Göttingen, Deutschland)

2.3.2 Allgemeiner Ablauf der Stimulation

Die in diesen Versuchen verwendeten NHEK wurden vor jeder Stimulation unter dem Mikroskop kontrolliert und 1x mit PBS gewaschen. Sie waren 1-2 Tage postkonfluent und wurden ohne Gebrauch von Antibiotika (++) angezüchtet. Es wurde bei der Durchführung der Versuche auf Zusätze wie FCS oder Supplamente verzichtet (-, Minimalmedium) um einer möglichen Verfälschung der Ergebnisse durch Interaktionen mit anderen Stoffen vorzubeugen. Es wurden sowohl lebende Bakterien in verschiedenen Konzentrationen getestet, als auch Kulturüberstände, die wie oben bereits beschrieben, hergestellt wurden. In einer

Versuchsreihe wurden die Zellen zum Zweck der Ausdifferenzierung mit 1,7 mM CaCl₂ für 24 Stunden vorinkubiert. Bevor die zu testende Bakteriensuspension auf die Keratinozyten pipettiert wurden, wurden sie allerdings mit PBS gewaschen um das CaCl₂ wieder zu entfernen. Bei Versuchen mit Inhibition wurden die Zellen mit Cetuximab (20 µg/ml EK) bzw. AG1478 1 µl/ml KGM2 (-+-) und einem irrelevanten Antikörper 1,1 µl/500 µl (20 µg/ml EK) bzw. DMSO 1 µl/ml KGM2 (-+-) für 1 Stunde bzw. 3 Stunden vorinkubiert und anschließend wieder, wie bereits beschrieben, mit PBS gewaschen.

Nachdem die zu testenden Suspensionen auf die Zellen gegeben wurden, und bevor sie zur Inkubation in den Brutschrank gestellt wurden, wurde die Bakteriensuspension mit 350 g für 5 Minuten auf die Zellen zentrifugiert. Sie wurden dann bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ für den entsprechenden Zeitraum inkubiert. Es wurden verschiedene Zeiträume getestet, doch die reguläre Inkubationszeit betrug zwischen 18-24 Stunden.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Überstände abpipettiert, zentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Die NHEK wurden einmal mit PBS gewaschen, und entweder gleich weiterverwendet, oder bei -80°C eingefroren.

2.4 Genexpressionsanalyse

2.4.1 Materialen

Crystal RNA magic	Biolabproducts (Bebensee, Deutschland)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
dNTP	BioLine, LotNo. DM-313612 (Luckenwalde, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Folie für qPCR Platten	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Maxima reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Lot 00189576 (Schwerte, Deutschland)
RT-Puffer	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
SYBR Premix Ex Taq	Takara Bio Europe/ Cloneteck (Saint-Germain en-Laye, Frankreich)

2.4.2 Isolierung der RNA

Um die Transkriptionsaktivität der Keratinozyten zu messen wurde zunächst die RNA isoliert. Dies wurde nach den Protokollen des Herstellers für Crystal RNA magic durchgeführt. Hierfür wurden die Wells mit den Keratinozyten mit 500 µl Crystal RNA magic befüllt, die Keratinozyten mechanisch durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren aus den Wells gelöst und mit Zugabe von 100 µl Chloroform in Schraubdeckelröhrchen überführt. Diese wurden bei 12000 g bei 4°C zentrifugiert. Dabei entstanden 3 Phasen. Die oberste, wässrig klare Phase, enthält RNA, die darunterliegende weiße Intermediärphase enthält DNA und die untere rote organische Phase enthält Proteine. Von diesen 3 Phasen wurde die oberste abpipettiert, in neue Röhrchen überführt und mit 250 µl Isopropanol vermischt (Chomczynski & Sacchi, 1987). Die Proben wurden daraufhin für 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um die Präzipitation der RNA ablaufen zu lassen. Dann wurden die Proben bei 12000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abpipettiert und das entstandene Pellet zweimal mit 500 µl Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 16,5 µl RNase freies Wasser aufgenommen. Mit einem Spektrophotometer wurde bei 260 nm die Konzentration der mRNA gemessen.

2.4.3 Reverse Transkription

Die instabile RNA wurde zur langfristigen Analysemöglichkeit in die stabilere Form der cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben.

Dies erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase nach Angaben des Herstellers mittels PrimeScript™ RT Reagent Kit.

Dafür wurden 2 µl Reaktionspuffer, bestehend aus 10 mM dNTP und 40 U/µl RNase Inhibitor, mit 0,5 µl Oligo (dT) Primer (20 mM), 0,125 µl PrimeScript RT und 0,5 µg RNA vermischt, und anschließend mit RNase freiem H₂O auf insgesamt 10 µl aufgefüllt.

Im Thermocycler wurde dieser Ansatz dann für 5 Minuten auf 65°C (Inkubationsschritt) erhitzt. Im nächsten Schritt (Synthese) folgte eine erneute Erhitzung auf 42°C für 30 Minuten, dann eine weitere Erhöhung der Temperatur (Inkubation) auf 85°C für 5 Minuten und als letztes eine Abkühlung auf 4°C. Im letzten Schritt dieses Vorgangs wurde den Proben jeweils 40 µl RNase-freies H₂O hinzugefügt, womit sich eine Konzentration von 10 ng/µl cDNA ergab. Anschließend wurden die cDNA Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.4.4 „Realtime“ PCR-Analyse

Nach Fertigstellung der cDNA, wie oben beschrieben, wurde die „Realtime“ PCR Analyse mit einem StepOnePlus „Realtime“ PCR System durchgeführt. Um cDNA sicher von genomischer DNA unterscheiden zu können, wurden intronspannende Primer verwendet.

Allgemein durchläuft die RT-PCR drei Phasen, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA bei 95°C, darauf folgt die Elongationsphase, bei der die beiden spezifischen Primer (bei für die jeweiligen Primer spezifischen Temperaturen) an je einen Einzelstrang binden. Die Elongationstemperatur wurde pro Zyklus von 66°C um 1°C bis auf 60°C heruntergesetzt. Im letzten Schritt folgt die enzymatische Amplifizierung der Primer durch die hitzestabile Taq DNA Polymerase (Elongation), die zum Leitstrang komplementäre Nukleotide miteinander verbindet und auf diesem Weg neue DNA-Doppelstränge synthetisiert. Diese Phasen wiederholen sich mehrmals in Zyklen.

Nach jedem Zyklus wird die Quantifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente mittels einer Fluoreszenzmessungen bestimmt. Dafür wurde SYBR green Reagenz benutzt. Dieser hitzestabile Cyanin-Farbstoff ist sehr sensitiv und selektiv für doppelsträngige DNA (Zipper et al., 2004).

Für diese beschriebene Reaktion wurde in einer 96-Loch-PCR Platte je Vertiefung 1 µl cDNA mit 5,2 µl SYBR Premix Ex Taq, 3 µl H₂O und je 0,4 µl des vorwärts und rückwärts Primers einpipettiert, dann mit einer selbstklebenden Folie (Micro AMP Optical Adhesive Film) verschlossen und für 1 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend in den StepOnePlus eingelegt.

Durch eine Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der entstandenen Produkte sichergestellt und durch Verwendung von Standardkurven, die für jedes Primerpaar spezifisch sind, konnte die Menge der cDNA bestimmt werden. Mit Bestimmung der Konzentration des „house keeping“ Gens RP38 konnte in Relation nachvollzogen werden, wie hoch die Induktion der untersuchten Gene im Verhältnis zur Grundexpression der Zelle war.

2.4.5 Verwendete Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

RP38	f1	5' -TCAAGGACTTCCTGCTCACA- 3'
	r1	5' -AAAGGTATCTGCTGCATCGAA -3'
hBD-3	f3	5' -TGTGCTTGCTCTCCTGT- 3'
	r3	5' -CGCCTCTGACTCTGCAATAA - 3'
hBD-2	for1	5' -GCCTCTCCAGGTGTTTTG - 3'
	ra	5' -GAGACCACAGGTGCCAATT - 3'
RNase 7	S2-31	5' -GGAGTCACAGCACGAAGACC- 3'
	S2-33 rev	5' -CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA -3'

2.5 ELISA

2.5.1 Materialen

96-Loch-Mikrotiterplatten	Nunc Immuno Plate Maxisorp, Nunc GmbH (Wiesbaden, Deutschland)
ABTS	Roche (Mannheim, Deutschland)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Multikanal-Photometer	Sunrise, Tecan (Crailsheim, Deutschland)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biowest SAS (Nuillé, Frankreich)
Streptavidin (Peroxidase-konjugierter Streptavidin Komplex)	Roche Diagnostics, (Mannheim, Deutschland)
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

2.5.2 Ablauf

Der ELISA („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“) ist ein Testverfahren, das auf dem Prinzip der Antikörperreaktion beruht. Hierbei soll die Konzentration von RNase 7 Protein in Überständen nachgewiesen werden.

Als erstes wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte der erste Antikörper an eine feste Phase gebunden. Dies geschah, indem man den ersten Antikörper in 50 µl 0.05 M

Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) auf 1 ng/ μ l verdünnte, in die Vertiefungen der Platten pipettierte und über Nacht bei 4°C inkubierte. Als nächstes wurde der überschüssige Antikörper entfernt. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde im nächsten Schritt 200 μ l PBS-Tween- und BSA (1%) -Lösung in die Vertiefungen gegeben, danach wurden sie 3x mit 200 μ l Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) gewaschen. Dann wurden 200 μ l der Überstände, die getestet werden sollten, in die Vertiefungen gegeben. Eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen des zu untersuchenden Proteins wurde verwendet, um die Konzentrationen der Proben zu bestimmen (RNase 7: 0,3 ng/ml – 40 ng/ml). Diese, für die Standardreihe verwendeten Proteine, wurden im Haus rekombinant in *E. coli* exprimiert. Als nächste Schritte folgten eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten und dreimaliges Waschen mit Waschpufferlösung. Im nächsten Schritt wurden die Vertiefungen mit 50 μ l des entsprechenden biotinylierten Antikörper befüllt. Dieser Antikörper wurde vorher in Waschpuffer verdünnt. Dann folgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurden die Platten wieder dreimal gewaschen. Nach Protokoll des Herstellers wurden anschließend 50 μ l Streptavidin (Peroxidase-konjugierter Streptavidin Komplex) in die Vertiefungen pipettiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Es folgte erneutes sechsmaliges Waschen der Vertiefungen und eine Befüllung mit jeweils 50 μ l ABTS. Nach einer kurzen Inkubationszeit konnte im Dunkeln die Intensität der Farbreaktion mittels der Messung der Extinktion bei 405nm in einem Multikanal-Photometer als Maß für die Proteinkonzentration bestimmt werden (Referenzwellenlänge: 492 nm).

3 Ergebnisse

Ziel dieser Doktorarbeit war es zu erfahren, ob *C. amycolatum* dazu in der Lage ist, die Genexpression für die AMPs RNase 7, hBD-2, und hBD-3, bzw. das RNase 7 Protein in primären Keratinozyten zu induzieren. Weiterhin wurde getestet, ob sich diese Induktion über den EGF-Rezeptor Signalweg erfolgt.

Alle hier dargestellten Ergebnisse beruhen auf mehrfach durchgeführten reproduzierbaren Versuchen mit Zellkulturen und werden in den abgebildeten Diagrammen graphisch dargestellt. Für die statistische Auswertung dieser Ergebnisse wurde das Programm „GraphPad Prism 5“ verwendet. Dabei wurde ein Wert von $p < 0.05$ als statistisch signifikant angesehen, der sogenannte Signifikanzwert. Über den Balken in den Diagrammen wird der signifikante p -Wert dargestellt. Die p -Werte beziehen sich hierbei auf den Vergleich zur zugehörigen unstimulierten Probe, auch als Kontrolle bezeichnet.

3.1 Versuche zur Konzentrationskinetik

Zuerst wurde mit verschiedenen Konzentrationen von lebenden *C. amycolatum* (C.a.) stimuliert, um zu testen, bei welchen Konzentrationen die Induktion am höchsten bzw. am niedrigsten ist. Hierbei sollte ermittelt werden welche Konzentrationen sich am besten für die weiteren Versuche eignen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 1:10, 1:20 und 1:50 aus einer Bakteriensuspension mit OD 0.2 für 24h stimuliert.

3.1.1 hBD-2

Es konnte festgestellt werden, dass hBD-2 bei einer Bakterienverdünnung von 1:10 am höchsten signifikant induziert wurde. Bei einer Konzentration von 1:20 konnte eine geringere signifikante Induktion gezeigt werden, und bei einer Konzentration von 1:50 wurde nur noch eine leichte Induktion festgestellt, welche im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht signifikant war (Abb.3.1).

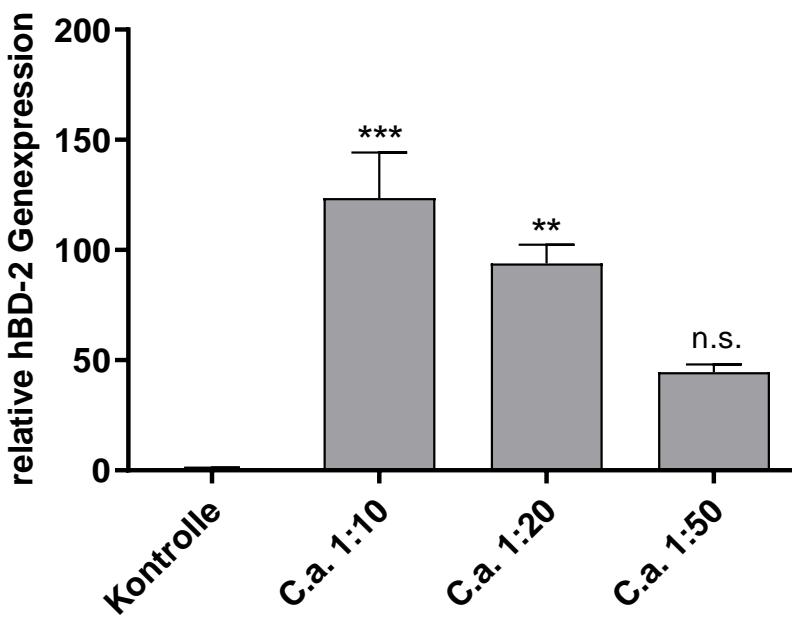


Abbildung 3.1: Hohe *C. amycolatum* Konzentrationen bewirken eine hohe Induktion der hBD-2 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden über 24h mit *C. amycolatum* in Konzentrationen von 1:10, 1:20 und 1:50 stimuliert, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-2 Genexpression bestimmt.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; ***p < 0.001 Student's t-Test)

3.1.2 hBD-3

Bei hBD-3 konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Bei einer Konzentration von 1:10 konnte die höchste Induktion der hBD-3 Genexpression gezeigt werden. *C. amycolatum*-Konzentrationen von 1:20 und 1:50 führten zu einer sukzessiven Abnahme der induzierten Genexpression von hBD-3. Bei einer Konzentration von 1:50 waren die Werte nicht mehr signifikant (Abb.3.2).

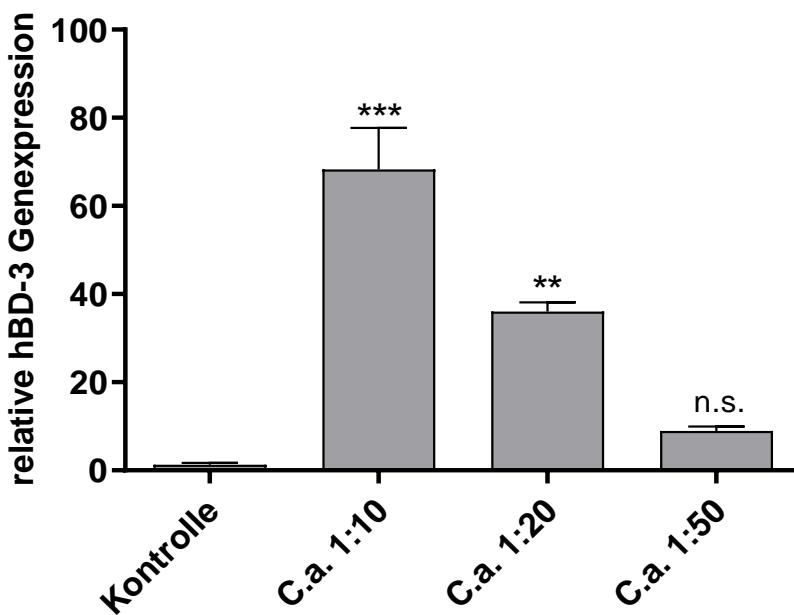


Abbildung 3.2: Hohe *C. amycolatum* Konzentrationen bewirken eine hohe Induktion der hBD-3 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden über 24h mit *C. amycolatum* in Konzentrationen von 1:10, 1:20 und 1:50 stimuliert, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-3 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; ***p < 0.001 Student’s t-Test)

3.1.3 RNase 7

RNase 7 zeigte bei einer Konzentration von 1:10 die höchste signifikante Induktion der Genexpression, bei 1:20 ergab sich eine niedrigere Induktion, die nicht mehr signifikant war. Am niedrigsten war die Induktion der RNase 7 Genexpression bei einer Konzentration von 1:50. Auch hier war die Induktion nicht signifikant.

Für RNase 7 konnte auch auf Proteinebene im ELISA eine signifikante Induktion nachgewiesen werden. Die höchste signifikante Induktion zeigte sich hier bei Konzentrationen von 1:10 und 1:20, bei einer Konzentration von 1:50 war die Induktion nicht signifikant im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb.3.2).

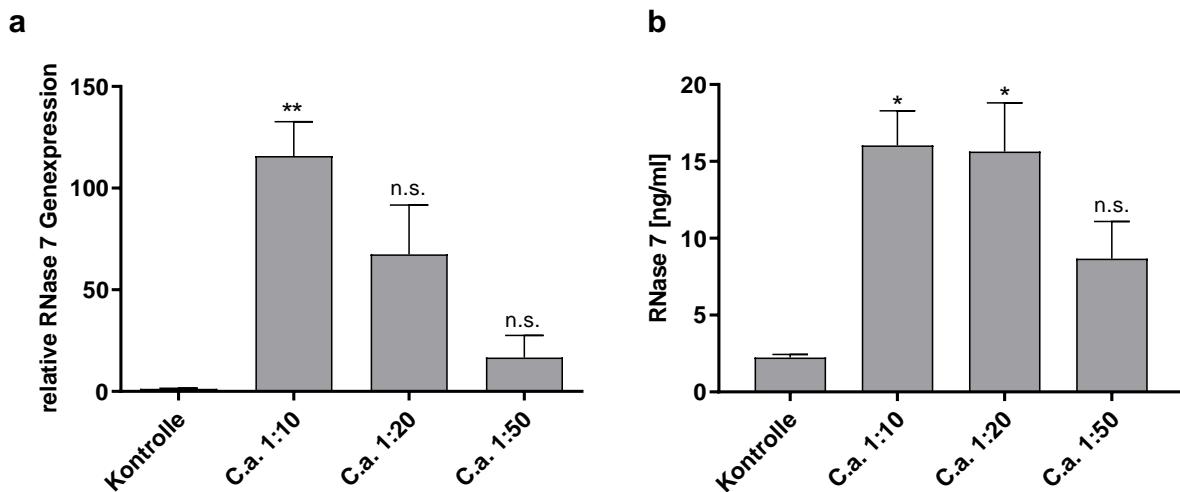


Abbildung 3.3: Hohe *C. amycolatum* Konzentrationen bewirken eine hohe Induktion der RNase 7 Gen- und Proteinexpression.

Postkonfluente NHEK wurden über 24h mit *C. amycolatum* in Konzentrationen von 1:10, 1:20 und 1:50 stimuliert, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle. **a:** Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative RNase 7 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; Student's t-Test). **b:** Mittels ELISA wurde die RNase 7-Protein Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; *p < 0.05; Student's t-Test)

3.2 Versuch zur Zeitkinetik

Um die optimale Dauer für die folgenden Versuche zu ermitteln, wurden NHEK für 6h und 24h mit einer Konzentration lebender *C. amycolatum* von 1:10 inkubiert.

3.2.1 hBD-2

Nach 6h konnte keine signifikante Induktion für hBD-2 Genexpression nachgewiesen werden.

Nach 24h zeigte sich eine statistisch signifikante Induktion. (Abb.3.4).

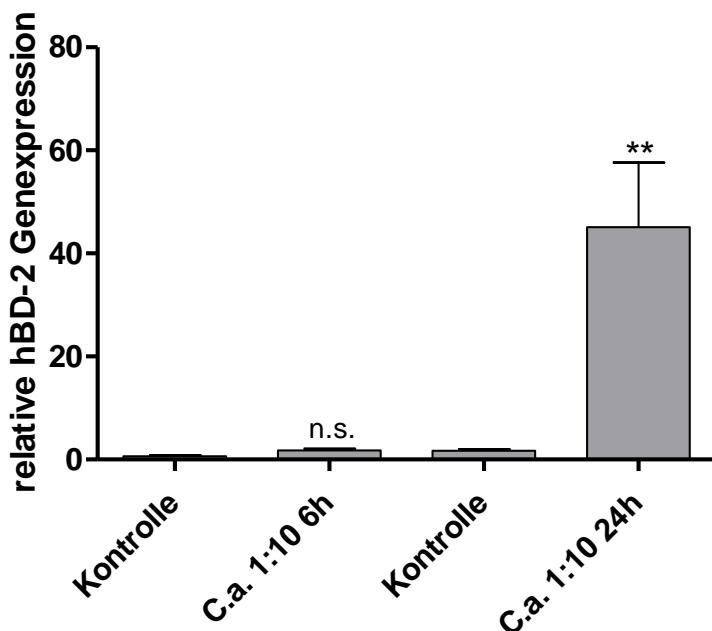


Abbildung 3.4: *C. amycolatum* induziert hBD-2 Genexpression nach 24h.

Postkonfluente NHEK wurden mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 über einen Zeitraum von 6 bzw. 24h stimuliert, im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-2 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant, **p < 0.005, Student's t-Test)

3.2.2 hBD-3

Für die hBD-3 Genexpression war nach 6h keine signifikante Induktion nachweisbar, nach 24h war eine deutlich signifikante Induktion in den stimulierten Proben messbar (Abb. 3.5).

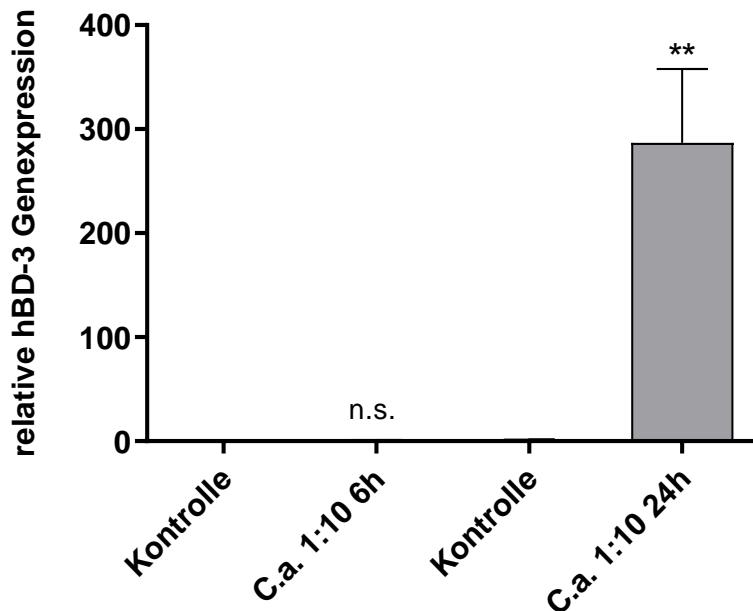


Abbildung 3.5: *C. amycolatum* induziert hBD-3 Genexpression nach 24h.

Postkonfluente NHEK wurden mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 über einen Zeitraum von 6 bzw. 24h stimuliert, im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-3 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; Student's t-Test)

3.2.3 RNase 7

Hier zeigte sich nach 6h Inkubationszeit keine signifikante Induktion. Eine statistisch signifikante Induktion zeigte sich nach 24h.

Auf Proteinebene zeigte sich nach 24h eine statistisch signifikante Induktion. Nach 6h war keine signifikante Induktion festzustellen (Abb.3.6).

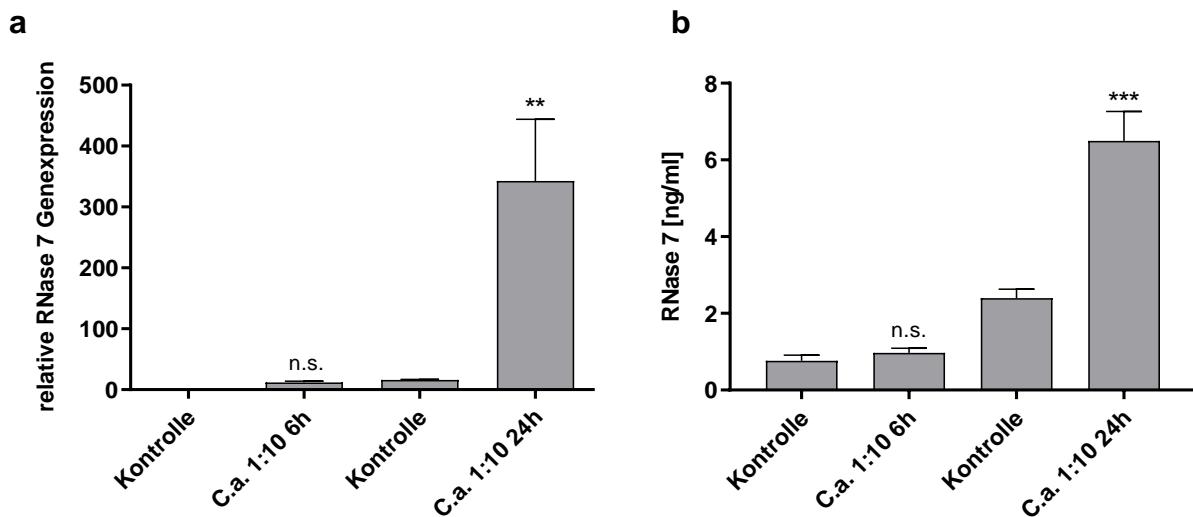


Abbildung 3.6: *C. amycolatum* induziert RNase 7 Gen- und Proteinexpression nach 24h.

Postkonfluente NHEK wurden mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 über einen Zeitraum von 6 bzw. 24h stimuliert, im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. **a:** Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative RNase 7 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01 Student's t-Test). **b:** Mittels ELISA wurde die RNase 7-Proteinkonzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; ***p < 0.001 Student's t-Test)

3.3 Stimulation mit lebenden *C. amycolatum* und Kulturüberständen

Als nächstes wurde geprüft, ob auch die Kulturüberstände des Bakteriums alleine, also Stoffe, die *C. amycolatum* sezerniert, eine Induktion bewirken könnten. Die Induktion durch Kulturüberstände wurde im Vergleich zur Induktion durch lebende *C. amycolatum* getestet.

3.3.1 hBD-2

Bei den mit Kulturüberständen inkubierten Proben konnte keine signifikante Induktion festgestellt werden. Bei den mit lebenden *C. amycolatum* inkubierten Keratinozyten zeigte sich eine signifikante Induktion von hBD-2 Genexpression im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (Abb. 3.7).

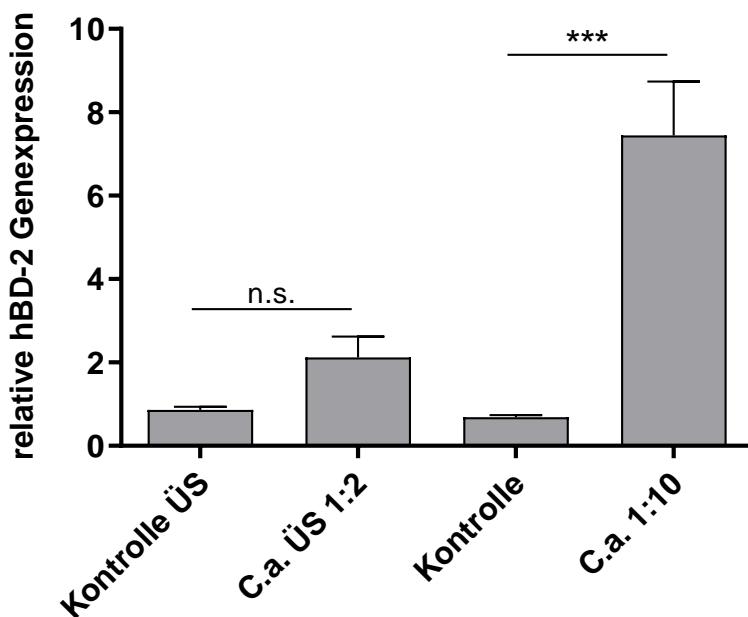


Abbildung 3.7: Kulturüberstände des *C. amycolatum* bewirken keine Induktion der hBD-2 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit Kulturüberstand des *C. amycolatum* (1:2 in Minimalmedium verdünnt), im Vergleich zu einem Kontrollüberstand, stimuliert. Zum Vergleich wurde parallel eine Stimulation mit lebenden *C. amycolatum* (1:10) durchgeführt. Der Inkubationszeitraum betrug 24h. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-2 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen und je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; ***p < 0.001 Student's t-Test)

3.3.2 hBD-3

Für die hBD-3 Genexpression konnte, im Vergleich zur Stimulation mit einer Bakterien Verdünnung von 1:10, keine signifikante Induktion durch die Kulturüberstände gezeigt werden. Es zeigte sich eine signifikante Induktion durch die Bakteriensuspension (Abb. 3.8).

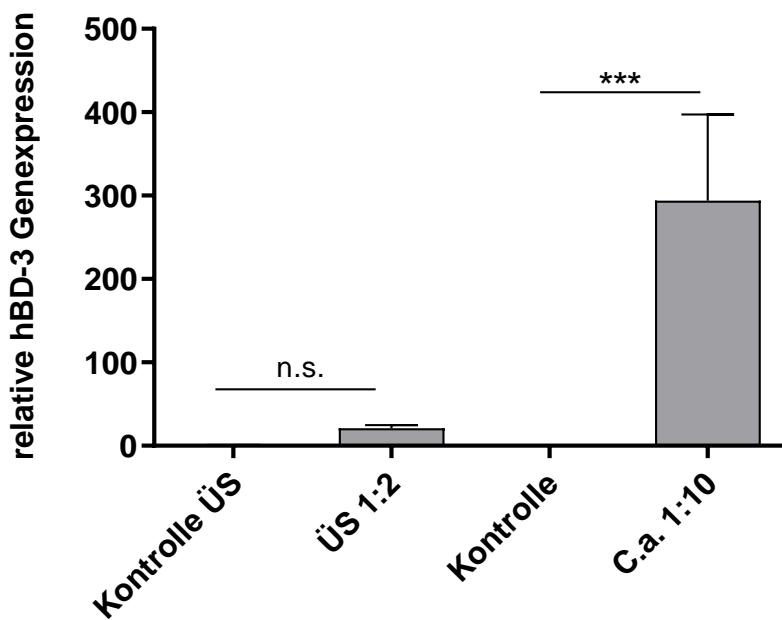


Abbildung 3.8: Kulturüberstände des *C. amycolatum* bewirken keine Induktion der hBD-3 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit Kulturüberstand des *C. amycolatum* (1:2 in Minimalmedium verdünnt), im Vergleich zu einem Kontrollüberstand, stimuliert. Zum Vergleich wurde parallel eine Stimulation mit lebenden *C. amycolatum* (1:10) durchgeführt. Der Inkubationszeitraum betrug 24h. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-3 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen und je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; ***p < 0.001 Student's t-Test)

3.3.3 RNase 7

Für RNase 7 Genexpression zeigte sich mit den Überständen keine signifikante Induktion. So verhielt es sich ebenfalls auf Proteinebene. Eine signifikante Induktion zeigte sich sowohl auf Genexpressionsebene, als auch auf Proteinebene für die mit lebenden Bakterien stimulierten NHEK (Abb. 3.9).

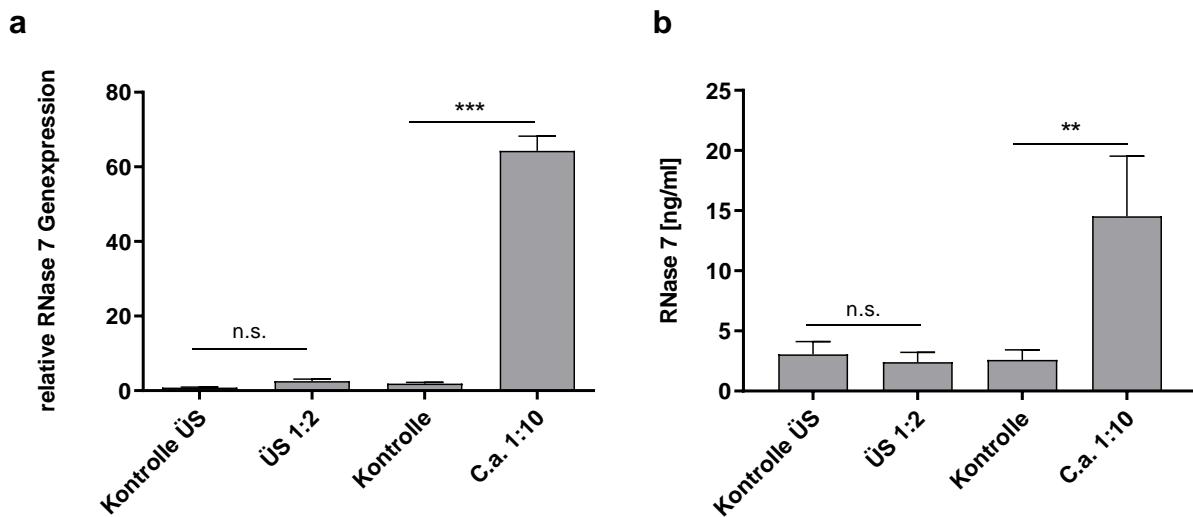


Abbildung 3.9: Kulturüberstände des *C. amycolatum* bewirken keine Induktion der RNase 7 Gen- und Proteinexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit Kulturüberstand des *C. amycolatum* (1:2 in Minimalmedium verdünnt), im Vergleich zu einem Kontrollüberstand, stimuliert. Zum Vergleich wurde parallel eine Stimulation mit lebenden *C. amycolatum* (1:10) durchgeführt. Der Inkubationszeitraum betrug 24h. **a:** Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative RNase 7 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen und je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; ***p < 0.001 Student's t-Test) **b:** Mittels ELISA wurde die RNase 7 Proteinkonzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen und je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; Student's t-Test)

3.4 Stimulation mit lebenden *C. amycolatum* in Transwells

Um die Arbeitshypothese zu bekräftigen, dass Überstände alleine keine ausreichende Induktion ergeben, sondern ein Kontakt zwischen Bakterium und Keratinozyt notwendig ist, wurde eine Stimulationsreihe in Transwells durchgeführt.

Dafür wurden die Keratinozyten wie gewohnt mit einer Konzentration von 1:10 stimuliert, im Transwells wurde eine Konzentration von 1:4 eingesetzt.

3.4.1 hBD-2

Bei direkter Stimulation zeigte sich, wie schon zuvor, eine signifikante Induktion für die hBD-2-mRNA. Im Vergleich dazu konnte in den Transwells keine signifikante Induktion erreicht werden (Abb 3.10).

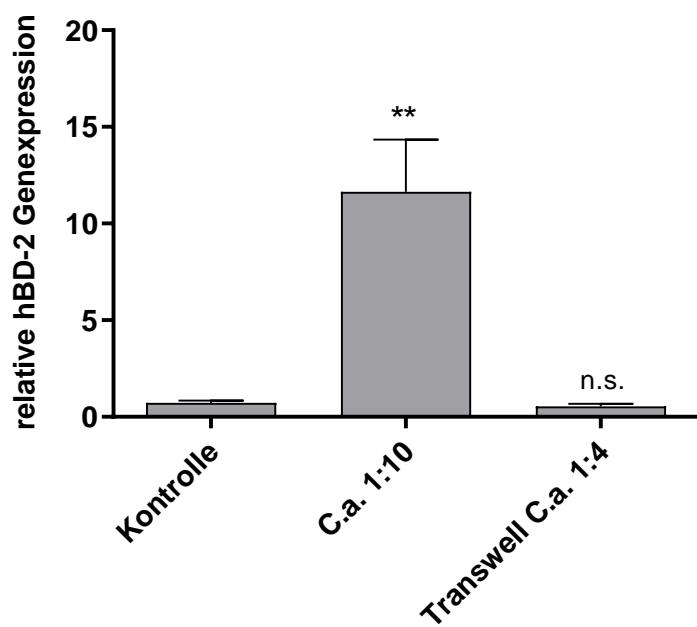


Abbildung 3.10: *C. amycolatum* bewirkt keine Induktion der hBD-2 Genexpression in Transwells.

Postkonfluente NHEK wurden über Transwells mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:4 über einen Zeitraum von 24h stimuliert, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle und einer Stimulation mit lebenden *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 ohne Transwells. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-2 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; Student's t-Test)

3.4.2 hBD-3

Für die Induktion der hBD-3 Genexpression zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie für hBD-2. Für die Bakterien Verdünnung von 1:10, das heißt für die Proben mit direktem Bakterium-Zell-Kontakt, konnte eine signifikante Induktion nachgewiesen werden. In den Transwells konnte keine signifikante Induktion nachgewiesen werden (Abb 3.11).

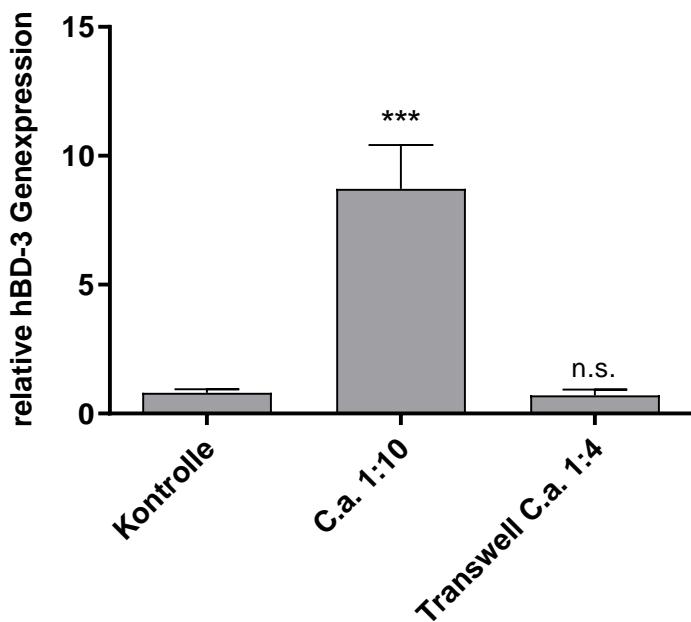


Abbildung 3.11: *C. amycolatum* bewirkt keine Induktion der hBD-3 Genexpression in Transwells.

Postkonfluente NHEK wurden über Transwells mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:4 über einen Zeitraum von 24h stimuliert, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle und einer Stimulation mit lebenden *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 ohne Transwells. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-3 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; ***p < 0.001 Student's t-Test)

3.4.3 RNase 7

Auch für die Induktion der RNase 7 Genexpression verhielt es sich ähnlich wie bei hBD-2 und hBD-3. Es konnte in den Proben mit einer Bakteriensuspension von 1:10 eine signifikante Induktion gemessen werden, im Gegensatz dazu, zeigte sich in den Transwells keine signifikante Induktion. Auf Proteinebene konnte im ELISA ein vergleichbares Ergebnis gemessen werden. In den Proben mit einer Bakterien Suspension von 1:10 zeigte sich eine signifikante Induktion, in den Transwells nicht (Abb 3.12).

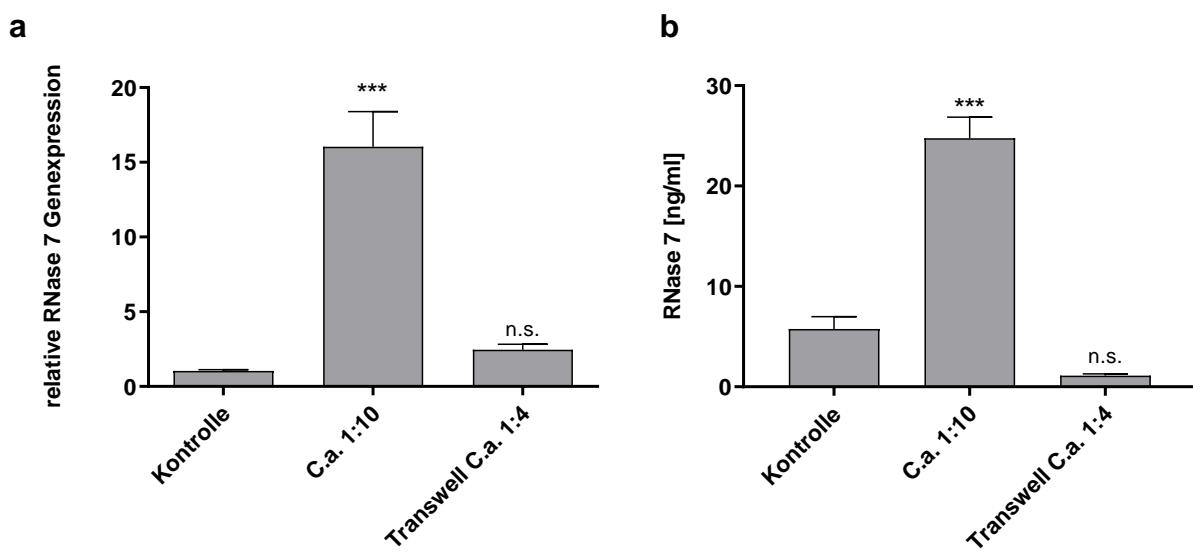


Abbildung 3.12: *C. amycolatum* bewirkt keine Induktion der RNase 7 Gen- und Proteinexpression in Transwells.

Postkonfluente NHEK wurden über Transwells mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:4 über einen Zeitraum von 24h stimuliert, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle und einer Stimulation mit lebenden *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 ohne Transwells. **a:** Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative RNase 7 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; ***p < 0.001 Student's t-Test). **b:** Mittels ELISA wurde die RNase 7-Protein-Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; ***p < 0.001 Student's t-Test).

3.5 Stimulation von differenzierten Keratinozyten mit lebenden *C. amycolatum*

Um zu zeigen, ob auch differenzierte Keratinozyten bei einem Kontakt mit *C. amycolatum* zu einer Produktion von AMP mRNA bzw. Proteinen angeregt werden können, wurden die Zellen über 24 h mit CaCl_2 (1,7 mM) vorinkubiert (VI). Dann wurden sie wie bereits zuvor beschrieben stimuliert (Mahanty et al., 2019).

3.5.1 hBD-2

Hierbei konnte für hBD-2 eine signifikante Induktion der Genexpression gezeigt werden, sowohl in den nicht differenzierten Zellen, als auch in den differenzierten Zellen. Ein signifikanter Unterschied in der Stärke der Induktion zeigte sich nicht (Abb 3.13).

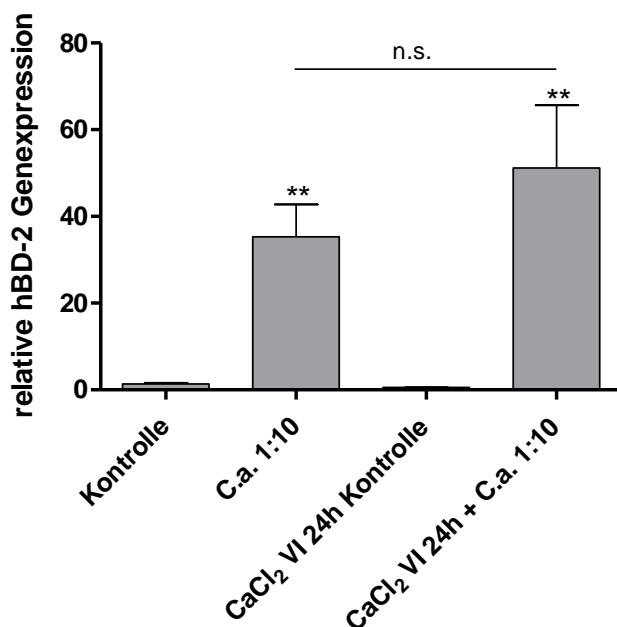


Abbildung 3.13: Die Stimulation differenzierter NHEK mit lebenden *C. amycolatum* führt zu einer signifikanten Induktion der hBD-2 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit CaCl_2 für 24h vorinkubiert (1,7 mM) und anschließend mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24h stimuliert, im Vergleich zu einer vorinkubierten, aber unstimulierten Probe. Parallel dazu verlief die gleiche Stimulation in undifferenzierten NHEK. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-2 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; **p < 0,005; Student's t-Test)

3.5.2 hBD-3

Bei hBD-3 zeigten die Zellen, die mit CaCl_2 vorinkubiert worden waren, eine höhere Induktion der Genexpression als die Zellen, die die nicht differenzierten NHEK. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Induktion zwischen den differenzierten und den nicht differenzierten Keratinozyten detektiert werden (Abb. 3.14).

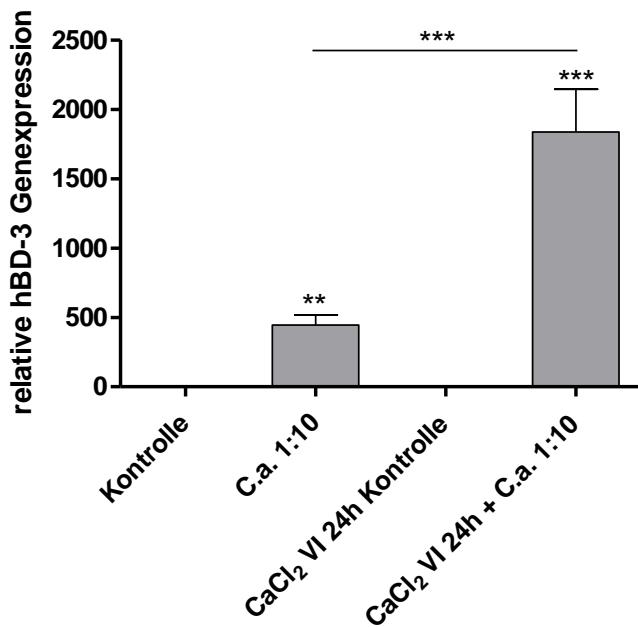


Abbildung 3.14: Die Stimulation differenzierter NHEK mit lebenden *C. amycolatum* führt zu einer signifikanten Induktion der hBD-3 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit CaCl_2 für 24h vorinkubiert (1,7 mM) und anschließend mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24h stimuliert, im Vergleich zu einer vorinkubierten, aber unstimulierten Probe. Parallel dazu verlief die gleiche Stimulation in undifferenzierten NHEK. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-3 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (**p < 0.01; ***p < 0.001 Student's t-Test)

3.5.3 RNase 7

Für RNase 7 konnte sowohl für die differenzierten, als auch für die nicht differenzierten Zellen eine signifikante Induktion der Genexpression gezeigt werden. Der Unterschied zwischen den Induktionen war signifikant.

Auf Proteinebene konnte im ELISA bei den differenzierten Zellen eine signifikante Sekretion von RNase 7 festgestellt werden, bei den nicht differenzierten Zellen war ebenfalls eine signifikante Induktion nachweisbar. Hier war der Unterschied zwischen den Induktionen auch signifikant (Abb. 3.15).

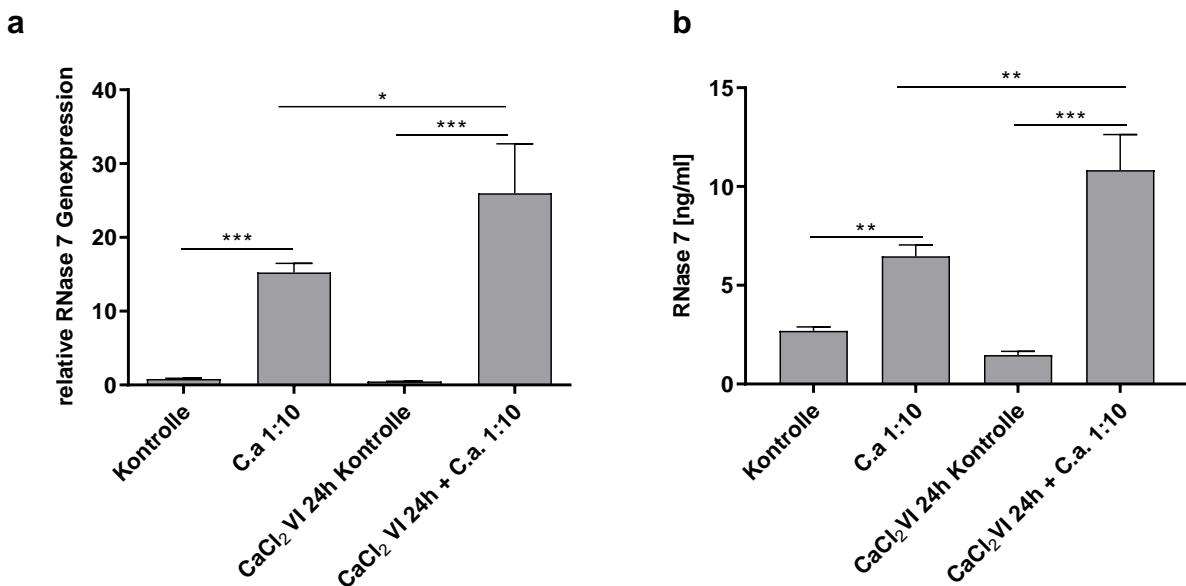


Abbildung 3.15: Die Stimulation differenzierter NHEK mit lebenden *C. amycolatum* führt zu einer signifikanten Induktion der RNase 7 Gen- und Proteinexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit CaCl₂ für 24h vorinkubiert (1,7 mM) und anschließend mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24h stimuliert, im Vergleich zu einer vorinkubierten, aber unstimulierten Probe. Parallel dazu verlief die gleiche Stimulation in undifferenzierten NHEK. **a:** Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative RNase 7 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 Student's t-Test). **b:** Mittels ELISA wurde die RNase 7-Protein-Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (**p < 0.005; ***p < 0.001 Student's t-Test).

3.6 Versuche zur Signaltransduktion

Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass sich ein Großteil der Induktion von AMPs über den „Epidermal-Growth-Factor“-Rezeptor (EGF-Rezeptor bzw. EGFR) abspielt. Um dies zu bestätigen, wurden die Keratinozyten mit Cetuximab für 1h, und in einem weiteren Versuch mit AG1478 für 3h, vorinkubiert und anschließend mit einer Bakteriensuspension in einer Konzentration von 1:10 stimuliert.

3.6.1 Inhibition des EGFR mit Cetuximab

Der EGFR-Antikörper Cetuximab wurde gegen einen irrelevanten Antikörper verglichen.

3.6.1.1 hBD-2

Für hBD-2-mRNA konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation mit Cetuximab keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion von hBD-2 Genexpression hat. Sowohl in der mit dem irrelevanten Antikörper vorinkubierten Probe, als auch in den mit Cetuximab vorinkubierten Proben wurde eine signifikante Induktion nachgewiesen (Abb. 3.16).

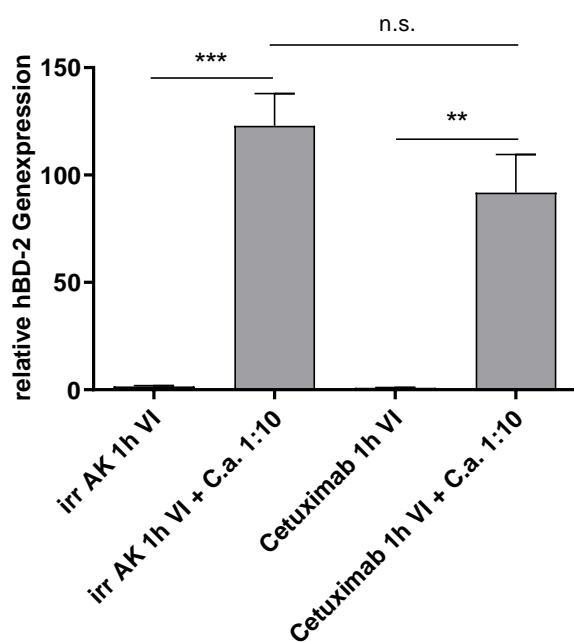


Abbildung 3.16: Cetuximab inhibiert nicht die *C. amycolatum*-vermittelte Induktion der hBD-2 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit einem irrelevanten Antikörper (Irr AK) (20 µg/ml) bzw. Cetuximab (20 µg/ml) für 1h vorinkubiert und dann mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24h stimuliert, im Vergleich zu unstimulierten, ebenfalls vorinkubierten Proben. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-2 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung ±SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; ***p < 0.001 Student's t-Test).

3.6.1.2 hBD-3

Für die Genexpression dieses AMPs zeigte sich keine signifikante Induktion mehr nach einer Vorinkubation der NHEKs mit Cetuximab im Vergleich zu den NHEK, die mit einem irrelevanten Antikörper vorinkubiert wurden. Der Unterschied in der Induktion zwischen den beiden vorinkubierten Proben war signifikant (Abb. 3.17).

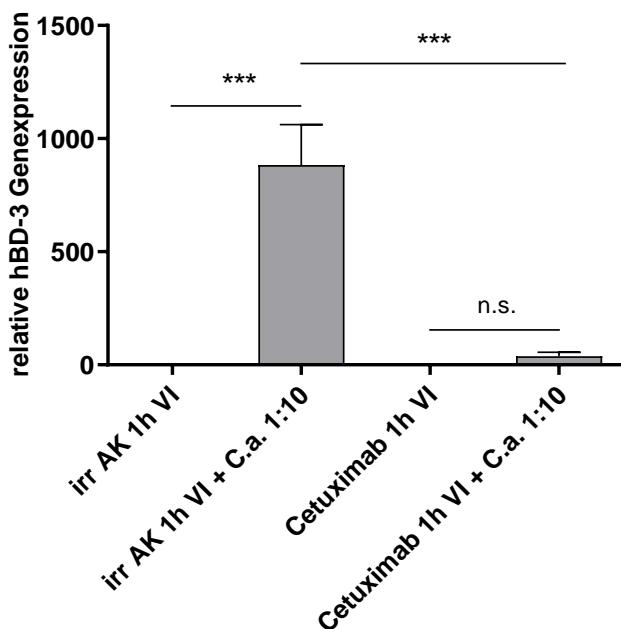


Abbildung 3.17: Cetuximab inhibiert die *C. amycolatum*-vermittelte Induktion der hBD-3 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit einem irrelevanten Antikörper (Irr AK) (20 µg/ml) bzw. Cetuximab (20 µg/ml) für 1h vorinkubiert und dann mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24h stimuliert, im Vergleich zu unstimulierten, ebenfalls vorinkubierten Proben. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-3 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung ±SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; ***p < 0.001 Student's t-Test).

3.6.1.3 RNase 7

Für RNase 7 konnte keine signifikante Induktion der Genexpression mehr gezeigt werden, nachdem die Zellen mit Cetuximab vorinkubiert worden waren. Auch der Unterschied zwischen den Proben, die mit Cetuximab bzw. dem irrelevanten Antikörper vorinkubiert worden waren, war signifikant.

Hier zeigte sich auch im ELISA auf Proteinebene eine reduzierte Induktion und ein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Antikörpern (Abb. 3.18).

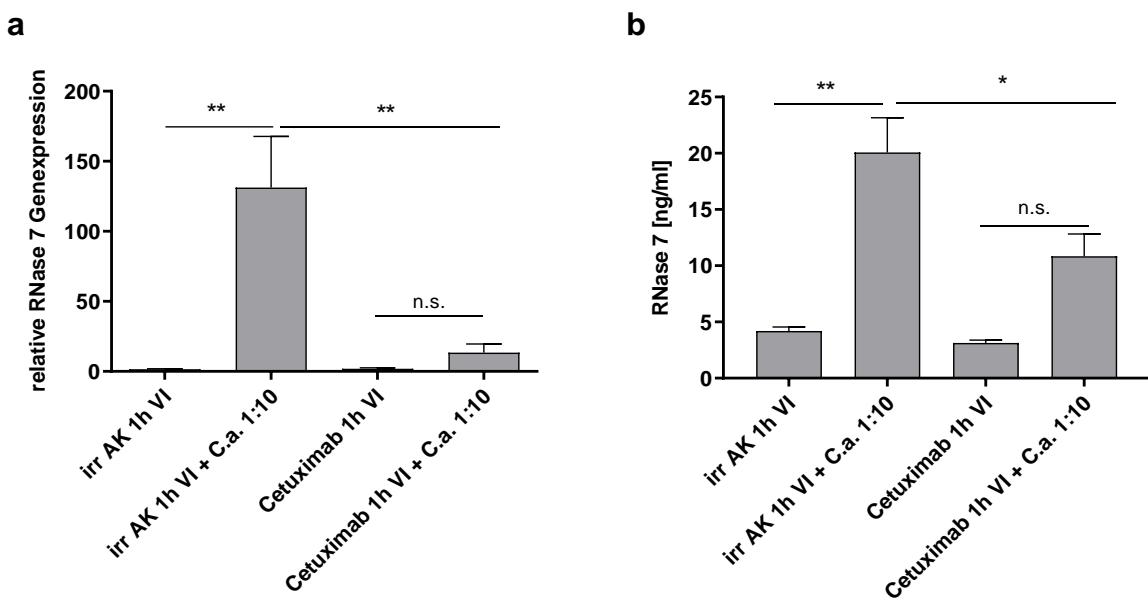


Abbildung 3.18: Cetuximab inhibiert die *C. amycolatum*-vermittelte Induktion der RNase7 Gen- und Proteinexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit einem irrelevanten Antikörper (20 µg/ml) bzw. Cetuximab (20 µg/ml) für 1h vorinkubiert und dann mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24h stimuliert, im Vergleich zu unstimulierten, ebenfalls vorinkubierten Proben. **a:** Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative RNase 7 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung ±SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; Student's t-Test). **b:** Mittels ELISA wurde die RNase 7-Protein-Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung ±SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; *p < 0.05; **p < 0.01; Student's t-Test).

3.6.2 Inhibition des EGFR mit AG1478

Zum Bekräftigen der Hypothese, dass der EGF-Rezeptor Signalweg für einige AMPs entscheidend ist, wurde hier der EGFR-Inhibitor AG1478 gegen eine DMSO Kontrolle verglichen. Die NHEK wurden mit AG1478 bzw. der DMSO-Kontrolle für 3h vorinkubiert und anschließend mit *C. amycolatum* für 24h stimuliert.

3.6.2.1 hBD-2

Hier konnte in den Proben, die mit AG1478 vorinkubiert wurden, eine signifikante Reduktion der Induktion der hBD-2 Genexpression gezeigt werden (Abb. 3.19).

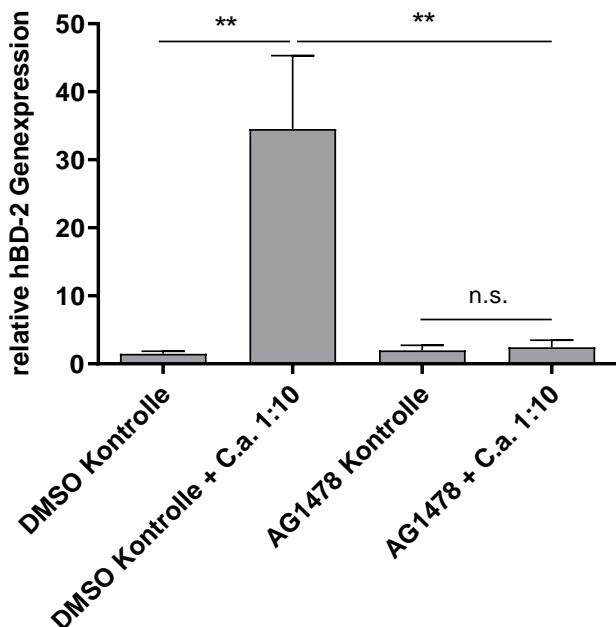


Abbildung 3.19: AG1478 inhibiert die *C. amycolatum*-vermittelte Induktion der hBD-2 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit DMSO (Vehikel, 1:1000) bzw. AG1478 (10 μ M) für 3h vorinkubiert, dann mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24h stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-2 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; **p < 0.01; Student's t-Test).

3.6.2.2 hBD-3

Für hBD-3 konnte in den Proben, die mit AG1478 vorinkubiert wurden, keine signifikante Induktion der hBD-3 Genexpression mehr nachgewiesen werden. Der Unterschied in der Induktion zwischen den miteinander verglichenen stimulierten Proben war signifikant (Abb. 3.20).

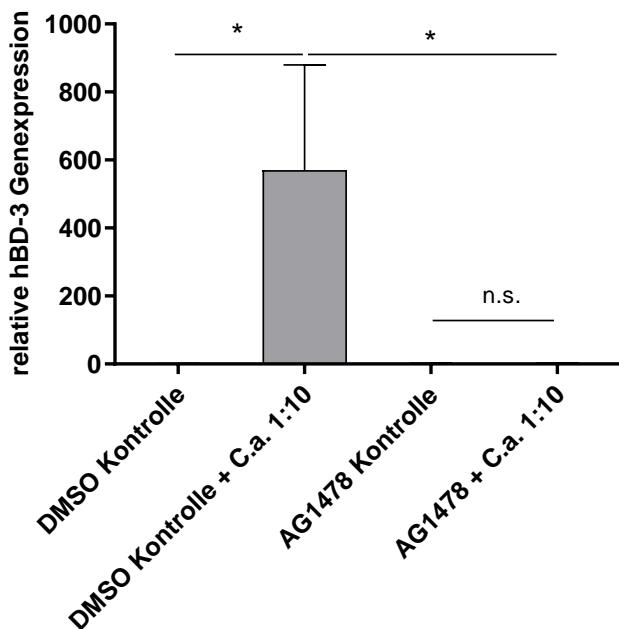


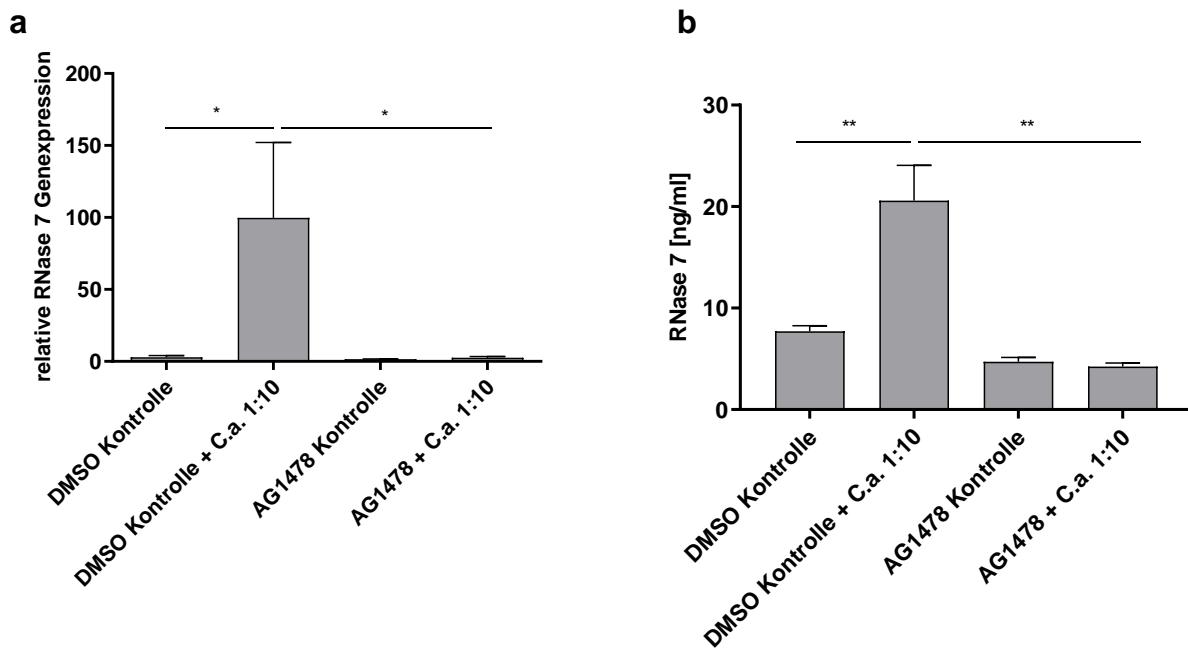
Abbildung 3.20: AG1478 inhibiert die *C. amycolatum*-vermittelte Induktion der hBD-3 Genexpression.

Postkonfluente NHEK wurden mit DMSO (Vehikel, 1:1000) bzw. AG1478 (10 μ M) für 3h vorinkubiert, dann mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24h stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative hBD-3 Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; * $p < 0.05$; Student’s t-Test).

3.6.2.3 RNase 7

Ebenso konnte für RNase 7 gezeigt werden, dass in den mit AG1478 vorinkubierten Proben die Induktion der RNase 7 Genexpression signifikant unterdrückt wurde. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit AG1478 und den mit DMSO Kontrolle vorinkubierten Zellen.

Dies konnte auch im ELISA nachgewiesen werden (Abb. 3.21).



Postkonfluente NHEK wurden mit DMSO (Vehikel, 1:1000) bzw. AG 1478 (10 μ M) für 3h vorinkubiert, dann mit *C. amycolatum* in einer Konzentration von 1:10 für 24 h stimuliert, im Vergleich zu unstimulierten, ebenfalls vorinkubierten Proben. **a:** Anschließend wurde mittels quantitativer „Real-Time“ PCR die relative RNase 7-Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 6 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; * $p < 0.05$; Student's t-Test). **b:** Mittels ELISA wurde die RNase 7-Protein Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelwerten mit Standardabweichung \pm SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (** $p < 0.01$; Student's t-Test).

4 Diskussion

Diese Doktorarbeit hatte das Ziel zu ermitteln, ob *C. amycolatum* eine Induktion der mRNA Expression von ausgewählten AMPs bzw. deren Proteine bewirkt. Diese ausgewählten AMPs waren hier humanes β -defensin-2 (hBD-2), humanes β -defensin-3 (hBD-3) und RNase 7. Wie schon in früheren Arbeiten gezeigt wurde, werden diese AMPs durch pathogene Mikroorganismen wie beispielsweise *S. aureus* oder *P. aeruginosa* induziert (Singh et al., 1998) (Hiratsuka et al., 1998) (Sophie Joly et al., 2005) (Harder et al., 2001) (Böhling et al., 2006) (Simanski et al., 2010) (Simanski et al., 2013) (Harder & Schröder, 2002) (Köten et al., 2009) (Rademacher et al., 2016). Hier konnte nun erstmals gezeigt werden, dass auch *C. amycolatum* zu einer Induktion dieser AMPs in der Lage ist. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Keratinozyten sowohl mit lebenden Bakterien, als auch mit ihren Kulturüberständen stimuliert, um ermitteln zu können, ob ein direkter Kontakt zwischen Bakterium und Zelle notwendig ist. Außerdem wurde untersucht, ob diese Induktionen zum Teil über den EGFR-Signalweg vermittelt werden.

4.1 hBD-2

Wie schon in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, wird das antimikrobielle Peptid hBD-2, welches zur Gruppe der β -Defensine gehört, durch Kontakt mit verschiedenen Stimuli wie Mikroorganismen und Zytokine induziert. Es zeigt eine antimikrobielle Aktivität insbesondere gegen gramnegative Bakterien und Pilze (Hiratsuka et al., 1998) (Singh et al., 1998) (Harder et al 2007, Ortega et al 2000).

Diese Arbeit befasste sich nun mit der Hypothese, ob der Kontakt mit *C. amycolatum*, einem Bakterium, welches zur Mikrobiota der Haut gehört, hDB-2 Genexpression in Keratinozyten induzieren kann. In dieser Arbeit konnte diese Hypothese nun zum ersten Mal bewiesen werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Stimulation von Keratinozyten mit steigender Bakterienkonzentration eine höhere hBD-2 Genexpression vorhanden war. Bei geringeren Konzentrationen der Bakteriensuspension war die Induktion an Genexpression nur noch gering und bei Konzentrationen von 20 ml/L (OD 0.2) war zwar in absoluten Zahlen noch eine Induktion nachweisbar, diese war aber im Vergleich zur Kontrolle statistisch nicht mehr signifikant. Dies deutet daraufhin, dass die Bakterien in einer bestimmten Konzentration vorhanden sein müssen, um eine Induktion der hBD-2 Genexpression bewirken zu können.

Ein Abfallen der hBD-2 Genexpression durch höhere Konzentrationen an Bakteriensuspension, wegen einer beispielsweise toxischen Wirkung des *C. amycolatum* auf die Keratinozyten, zeigte sich hier nicht.

Dies kann die Beobachtungen von Knox & Holmes bestätigen, dass *C. amycolatum* zwar in gewissen Mengen als Mikrobiota angesehen werden kann, allerdings in höheren Konzentrationen für Infektionen verantwortlich sein kann, wenn es eine passende Umgebung für ein ausreichendes Wachstum findet. Hier reagiert der Körper dann, wie auf pathogene Keime, mit einer erhöhten Ausschüttung verschiedener antimikrobieller Proteine, wie hier dem hBD-2 (Knox & Holmes, 2002) (Scharf et al., 2012) (Jürgen Harder et al., 2000).

In diesem Zusammenhang zeigen die Untersuchungen von Swaney & Kalan und Lee et al., dass *C. amycolatum* (zusammen mit anderen Bakterien der Mikrobiota der Haut) durchaus ein unterschiedliches Verteilungsmuster an den verschiedenen Körperoberflächen des Menschen hat. Weiterhin unterscheidet sich das Mikrobiom verschiedener Menschen von einander und ist auch abhängig von Körperhygiene, UV-Exposition, Temperatur, Antibiotikagebrauch, Alter und Geschlecht (Leyden et al., 1975) (Fierer et al., 2008) (Lee et al., 2019) (Swaney & Kalan, 2020).

Corynebakterien im Allgemeinen, darunter auch das hier untersuchte *C. amycolatum*, sind am höchsten präsent in Regionen der feuchten Haut (z.B. axilliar und inguinal Bereich, Sohle) gefolgt von trockenen Hautpartien (z.B. Unterarm). In geringen Mengen findet man sie außerdem in talgdrüsenreichen Hautregionen (z.B. Rücken, Stirn, Nasenflügel). Man könnte davon ausgehen, dass, wenn *C. amycolatum* die für die Induktion erforderliche Konzentration erreicht, in den Hautregionen mit einer höheren Konzentration an *C. amycolatum* auch eine höhere Induktion der hBD-2 Genexpression zu finden ist (Lee et al., 2019) (Grice & Segre, 2011).

Hieraus könnte man schlussfolgern, dass *C. amycolatum* durch seine ständige Anwesenheit, wie auch die Gesamtmikrobiotika, die Keratinozyten in einen allgemeinen "Alarmzustand" versetzen könnte, so dass eine ständige Basisausschüttung von AMPs vorhanden sein könnte. Dieser Vorgang könnte als Schutzmechanismus gegen pathogene Keime dienen. Des Weiteren kann man auf Grund der variablen Konzentrationen an *C. amycolatum* davon ausgehen, dass es sehr unterschiedliche hBD-2 Konzentrationen bei Menschen verschiedenen Alters und Geschlechts gibt, und ihre Haut dementsprechend unterschiedlich auf pathogene Keime reagiert.

Auch eine Untersuchung der hBD-2 Proteinkonzentration wäre noch ergänzend durchzuführen, um zu ermitteln, ob es sich mit der Ausschüttung des hBD-2 Proteins ähnlich verhält, wie mit

der Induktion der Genexpression, dass nämlich bei einer höheren Bakterienkonzentration eine höhere Konzentration an hBD-2 Protein nachzuweisen ist. Es ist allerdings zu erwarten, dass es sich mit der Induktion von hBD-2 Protein entsprechend der Induktion der Genexpression verhält, da die mRNA als Vorlage für das Protein gilt. (Alberts et al., 2002)

Auch umgekehrt sollte geklärt werden, ob und in welchen Konzentrationen hBD-2 *C. amycolatum* abtötet oder in seinem Wachstum hemmt. Bereits in Arbeiten von Harder et al., zeigte sich, dass hBD-2 sehr effektiv gramnegative Erreger wie *P. aeruginosa* und *E. Coli* mit einer LD90 von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ abtötet und einen bakteriostatischen Effekt auf grampositive Bakterien wie *S. aureus* bei einer Dosis von $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ zeigt (J. Harder et al., 1997). Da *C. amycolatum* ebenfalls ein grampositives Bakterium ist, könnte man annehmen, dass es ebenso wie *S. aureus* erst ab höheren Konzentrationen von hBD-2 gehemmt wird.

Auch die Dauer des Pathogen-Keratinozyten Kontakts ist von Bedeutung. Bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden konnte keine signifikante Induktion nachgewiesen werden, bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden konnte eine deutliche signifikante Induktion der hBD-2 Genexpression festgestellt werden.

Insgesamt passt zu den vorangegangenen Beobachtungen, dass *C. amycolatum* eine gewisse Konzentration und Wirkdauer braucht, um zu einer gesteigerten Genexpression von hBD-2 zu führen. Auch erscheint es logisch, dass eine Inkubationsdauer von mindestens 24 Stunden angenommen werden kann, da *C. amycolatum* als Teil der Mikrobiota auf der Haut kontinuierlich mit den Keratinozyten in Kontakt steht.

In verschiedenen Versuchen zeigte sich, dass *C. amycolatum* außerdem in direktem Kontakt mit den Keratinozyten stehen muss, um eine Induktion der hBD-2 Genexpression zu bewirken. Eine Induktion durch Kulturüberstände, also durch Stoffe, die *C. amycolatum* sezerniert, scheint nicht stattzufinden. Dies konnte auf unterschiedliche Weisen nachgewiesen werden. Dabei scheint es unerheblich zu sein, ob die Botenstoffe und Stoffwechselprodukte des Bakteriums in Echtzeit hergestellt wurden oder vorbereitet waren. Die Keratinozyten zeigten keine Erhöhung der hBD-2 Genexpression. Ähnliches konnte bereits für *S. aureus* und *S. epidermidis* gezeigt werden, ihre Kulturüberstände führten in Untersuchungen ebenfalls zu keiner hBD-2 Induktion in differenzierten Keratinozyten. (Wanke et al., 2011) Im Gegensatz dazu wird hBD-2 durch beispielsweise Flagellin, ein Protein, welches von *E. coli* Nissle 1917 produziert wird, induziert (Schlee et al., 2007). Auch das gramnegative *P. aeruginosa* exprimiert, wie *E. coli*, das Flagellin, welches von den Epithelzellen des Respirationstraktes via Toll-like Rezeptoren erkannt wird und so zu einer Induktion von hBD-2 führt. Da *C.*

amycolatum kein Flagellin besitzt, kann dies als Induktor der AMP Expression ausgeschlossen werden (Zalas et al., 2004). Andere Faktoren wie LPS (ein Bestandteil von Zellmembranen anderer gramnegativer Bakterien) führen nicht direkt zu einer Erhöhung von hBD-2, sondern führen in Monozyten zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-1, welches wiederum die Synthese von hBD-2 induziert (Avila-Calderón et al., 2021) (L. Liu et al., 2003).

Zusammenfassend kann man sagen, dass *C. amycolatum* einen direkten Zell-zu-Zell Kontakt über einen längeren Zeitraum in gewissen Mengen braucht, um eine Induktion von hBD-2 zu bewirken. Man sollte allerdings noch ergänzend untersuchen, ob es sich auf Proteinebene ähnlich verhält oder nicht. Es wäre denkbar, dass bereits synthetisierte hBD-2 Proteine aus Vesikeln bei Kontakt der Zelle mit Bakterienüberständen ausgeschüttet werden, dann aber keine weitere Produktion stattfindet, da die Produktion der mRNA nicht induziert wird. Auch für die Induktion über direkten Zell-zu-Zell Kontakt sollte im ELISA untersucht werden, ob hBD-2 Protein bereits früher als seine mRNA detektiert werden kann, da es, wie bereits erwähnt, möglich wäre, dass es bei Kontakt sofort aus Vesikeln freigesetzt wird, bevor seine Synthese beginnt.

In den hier durchgeführten Versuchen wurden primäre Keratinozyten (NHEK) verwendet. Um zu ermitteln, ob auch differenzierte Keratinozyten ähnlich auf die Anwesenheit von *C. amycolatum* reagieren, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die primären Keratinozyten mit Calciumchlorid vorinkubiert wurden. Calciumchlorid führt dazu, dass Zellen differenzieren (Mahanty et al., 2019). Hierbei zeigte sich für hBD-2 eine signifikante Induktion der Genexpression, bei den differenzierten und nicht differenzierten Zellen.

Es war zwar in absoluten Zahlen ein Unterschied in der Genexpression zwischen differenzierten und nicht differenzierten Zellen festzustellen, dieser war aber statistisch nicht signifikant. Dies könnte bedeuten, dass es für die Induktion durch *C. amycolatum* keine Rolle zu spielen scheint, ob die Keratinozyten differenziert sind oder nicht. Sie zeigten nicht etwa eine deutlich reduziertere Induktion, im Vergleich zu den nicht differenzierten Zellen, was auch denkbar gewesen wäre. Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen, dass die Induktion von hBD-2 durch IL-1 α in differenzierten Keratinozyten stärker zu detektieren war, als in nicht differenzierten Keratinozyten (A. Y. Liu et al., 2002). Die Differenzierung der Keratinozyten scheint als in gewisser Art und Weise eine Rolle zu spielen.

Deshalb ist, um realitätsnäher testen zu können, wie die differenzierten Keratinozyten auch im Zellverband mit anderen Zellen reagieren, für weitere Forschungsarbeiten geplant, an einem 3D Hautmodell zu testen, ob auch hier eine Induktion der hBD-2 Genexpression durch Stimulation mit *C. amycolatum* nachgewiesen werden kann.

Wenn man sich hier nun die absoluten Induktionszahlen im Verlauf der Versuche ansieht, stellt man fest, dass es starke Schwankungen der Induktionen der hier getesteten AMPs gab. Es gab zum einen ab einem gewissen Zeitpunkt im Verlauf der Versuche ein Problem bei der Anzüchtung des *C. amycolatum*. Es wurde anfangs von eingefrorenen Kugelchen auf Blutagarplatten ausgestrichen, für 36 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend in einer BHI Boullion über Nacht bei 37°C in einem Schüttler weiter inkubiert. Dann wurde die optische Dichte gemessen, hier zeigte sich ab Mitte der Versuche eine herabgesetzte optische Dichte im Vergleich zu vorherigen Messungen. Auch waren bei Beendigung der Versuche teils optisch weniger Bakterien in den Wells als bisher beobachtet. Daraufhin wurde versucht, ob man das Wachstum wieder verbessern konnte, wenn die Bakterien anders eingefroren würden. Sie wurden ab diesem Zeitpunkt in einem Glycerinstock eingefroren. Die Anzüchtung war daraufhin wieder problemlos möglich und die gemessene optische Dichte nach Inkubation im Kolben war stabil. Allerdings lässt sich zwischen diesem Wachstumsproblem des *C. amycolatum* und den unterschiedlichen Induktionszahlen kein klarer Zusammenhang erkennen. Andererseits waren auch bei den Zellen nach Beendigung der Inkubationszeit oft Unterschiede zu erkennen. Teils waren die Zellen stärker abgerundet und aus dem Verband gelöst, teils weniger.

Zum anderen könnte ein weiterer Grund für die starken Schwankungen der Induktionszahlen sein, dass Experimente mit zwei lebenden Systemen wie Bakterien und Keratinozyten generell das Problem haben, dass Induktionen stark variieren können. Man könnte dies darauf zurückführen, dass zum Beispiel die Keratinozyten von verschiedenen Individuen mit unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren bzw. verschiedenen Dichten an Oberflächenrezeptoren und Signalwegen ausgestattet sind. Dies könnte Schwankungen in der Induktion der Genexpressionen der hier getestete AMPs erklären.

Wie schon andere Arbeiten zum Thema antimikrobielle Proteine zeigten, wird angenommen, dass die Induktion von hBD-2 über verschiedene Signalwege vermittelt wird. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Induktion von hBD-2 in intestinalen Epithelzellen über Toll-Like Rezeptor 4 und Toll-like Rezeptor 2 vermittelt wird (Vora et al., 2004). Auch in trachobronchialen Epithelzellen verläuft die hBD-2 Induktion über den Toll-like Rezeptor 2 Signalweg (Hertz et al., 2003).

Um zu überprüfen, ob der EGF-Rezeptor auch eine Rolle spielen könnte, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene EGF-Rezeptor Inhibitoren verwendet. Zum einen wurde Cetuximab, ein chimärischer monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1, verwendet, welcher ein bekannter Inhibitor für den EGF-Rezeptor ist. (Humblet, 2004). Des Weiteren wurde AG1478 (Tyrphostin AG-1478 bzw. 4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline)) als zweiter Inhibitor verwendet,

um diese Hypothese weiter zu bekräftigen. AG1478 ist ein kleines synthetisches Molekül, welches spezifisch die Tyrosinkinase des EGFR-Rezeptors hemmt (W. Wang et al., 2018) (Shi et al., 2009).

Bei den Versuchen mit Cetuximab konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation mit Cetuximab keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von hBD-2 hatte. Es zeigte sich eine signifikante Induktion von hBD-2, sowohl in den mit Cetuximab vorinkubierten, als auch in den nicht vorinkubierten Proben. Im Gegensatz dazu zeigte die hBD-2 Genexpression bei den Inhibitionsversuchen mit AG1478 wiederum eine signifikant reduzierte Induktion. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sich ein Teil der Regulation von hBD-2 eventuell doch über den EGFR-Signalweg abspielt. Man sollte hier in Betracht ziehen, dass Cetuximab und AG1478 unterschiedliche Angriffspunkte am EGF-Rezeptor haben. Cetuximab bindet als Antikörper von außen an den EGF-Rezeptor, im Gegensatz dazu inhibiert AG1478 dessen Tyrosinkinase innerhalb der Zelle.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Regulation der Expression von hBD-2, wie schon oben beschrieben über verschiedene Signalwege abläuft. Es wurden aufgrund dessen auch Versuche mit einem Toll-like 2 Rezeptor Inhibitor unternommen, allerdings enthielt das verfügbare Reaktionsgemisch ein Antibiotikum, auf welches *C. amycolatum* sensibel war.

4.2 hBD-3

hBD-3 ist ein weiteres antimikrobielles Protein, mit dem sich diese Doktorarbeit befasst hat. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass hBD-3, welches wie hBD-2 zur Gruppe der β -Defensine gehört, durch eine ganze Reihe von grampositiven und gramnegativen Bakterien induziert wird (Harder et al., 2001) (Scharf et al., 2012). hBD-3 ist in vielen Epithelien nachweisbar und hat das breiteste Wirkspektrum der hier getesteten AMPs (Harder et al., 2001, Hoover et al., 2003). Für *C. amycolatum* gab es bisher noch keinen Nachweis einer Induktion. Hier konnte nun erstmals nachgewiesen werden, dass *C. amycolatum* eine Induktion von hBD-3 Genexpression in Keratinozyten bewirkt.

Es zeigte sich, dass je höher die Konzentration an Bakterien ist, umso höher ist die Induktion an hBD-3 Genexpression. Konzentrationen, bei denen die Induktion wieder abnehmen würde, wegen beispielsweise einer toxischen Wirkung des *C. amycolatum* auf die Keratinozyten, wurden hier nicht erreicht. Getestet wurden Verdünnungen von 20 ml/L bis 100 ml/L bei einer optischen Dichte von 0.2, wobei bei einer Bakterienkonzentration von 1:50 (20 mL/L) keine statistisch signifikante Induktion mehr festgestellt werden konnte. Hieraus lässt sich ableiten, dass *C. amycolatum* in einer gewissen Konzentration vorhanden sein muss, um eine

messbare Induktion zu bewirken. Dies steht im Einklang mit der bisherigen Annahme, dass *C. amycolatum* als Mikrobiota der Haut bzw. als fakultatives Pathogen gesehen werden kann (Knox & Holmes, 2002). Es induziert den Verteidigungsmechanismus der Keratinozyten erst ab einer gewissen Konzentration und hat in niedrigen Konzentrationen kaum Einfluss auf diesen Teil des angeborenen Immunsystems.

Untersuchungen von Lee *et al.* konnten bereits zeigen, dass *C. amycolatum* in verschiedenen Regionen der menschlichen Haut unterschiedlich häufig vorkommt. Man kann hieraus schlussfolgern, dass in Regionen mit einer höheren Konzentration an *C. amycolatum*, beispielsweise in Regionen der feuchten Haut, wie Bauchnabel und inguinal Region, auch eine höhere Induktion von hBD-3 Genexpression durch *C. amycolatum* wahrscheinlicher ist, als zum Beispiel in talgdrüsenreichen Hautregionen, wie Rücken, Stirn, Nasenflügel, wo *C. amycolatum* eher wenig vorkommt. Es wäre denkbar, dass sich beispielsweise ein Gleichgewicht zwischen Induktion von hBD-3 und Hemmung des Bakterienwachstums einstellt, wenn *C. amycolatum* in ausreichenden Mengen vorhanden ist. Hier könnte überlegt werden, ob das Vorhandensein des *C. amycolatum* eine positive, also schützende Wirkung auf unsere Haut hat, durch eben diesen Mechanismus. Die Keratinozyten wären durch die bereits vorhandene induzierte Sekretion an hBD-3 durch *C. amycolatum* sozusagen geschützt vor einem Kontakt mit pathogenen Keimen. Auch Alter und Geschlecht des Menschen, sowie weitere exogene Faktoren spielen eine Rolle im Aufbau der Mikrobiota. So könnte man annehmen, dass auch die Induktion von hBD-3 durch *C. amycolatum* sich je nach Alter, Geschlecht und zum Beispiel Habitat unterscheidet (Fierer *et al.*, 2008) (Leyden *et al.*, 1975) (Lee *et al.*, 2019).

Umgekehrt sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob hBD-3 eine abtötende beziehungsweise hemmende Wirkung auf das Wachstum des *C. amycolatum* haben könnte und wie hoch hier die Konzentration von hBD-3 sein müsste, um diesen Effekt zu erzeugen. Maisetta *et al.* konnten zeigen, dass hBD-3 beispielsweise *S. aureus* und *P. aeruginosa* in einer Konzentration von 4 bis 8 µg/ml nach einer Einwirkzeit von 1,5h abtötet. Für *E. faecium* wurden Konzentrationen von 8 µg/ml benötigt. Sie konnten weiterhin zeigen, dass hBD-3 in der Anwesenheit von humanem Serum in hohen Konzentrationen vor allem gegen grampositive Erreger wirkt, weniger gegen gramnegative (Maisetta *et al.*, 2006). Da *C. amycolatum* ein grampositives Bakterium ist, könnte man schlussfolgern, dass hBD-3 eine ähnliche Wirkung zeigt, wie bei anderen grampositiven Bakterien.

Die weiteren Versuche zur Zeitkinetik ähnelten denen von hBD-2, denn bei einer Inkubationsdauer von 6h ließ sich keine signifikante Induktion der hBD-3 Genexpression

messen. Erst nach einer Dauer von 24h war eine signifikante Erhöhung der Genexpression von hBD-3 nachweisbar. Es lässt sich annehmen, dass von einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden ausgegangen werden kann, da *C. amycolatum* als Bakterium der Mikrobiota der Haut ständig auf der Haut persistiert. Dies passt zu der Annahme, dass *C. amycolatum* als fakultatives Pathogen eine gewisse Inkubationszeit und eine gewisse Konzentration braucht, um diesen Teil des Immunsystems zu aktivieren (Knox & Holmes, 2002).

Auch wäre es hier interessant zu ermitteln, ob das hBD-3 Protein schon früher als die hBD-3 Genexpression nachweisbar sein könnte. Es wäre denkbar, dass zum Beispiel aus Vesikeln bereits synthetisiertes hBD-3 freigesetzt werden könnte, noch bevor es zu einer Induktion der hBD-3 Genexpression kommt.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob die Kulturüberstände, also Stoffe wie Botenstoffe und Stoffwechselprodukte, die *C. amycolatum* produziert und sezerniert, auch alleine eine Induktion der hBD-3 Genexpression bewirken könnten. Es zeigte sich, dass bei einer Inkubation mit diesen Kulturüberständen keine signifikante Induktion von hBD-3 erreicht werden konnte. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein gewisser Zell-zu-Zell Kontakt zwischen Keratinozyt und Bakterium für die Induktion der hBD-3 Genexpression notwendig ist. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Kulturüberstände bzw. Stoffwechselprodukte in Echtzeit vom Bakterium sezerniert wurden oder vorher vorbereitet waren. Die Annahme war, dass gegebenenfalls flüchtige Botenstoffe beziehungsweise Stoffwechselprodukte in einem bereits verarbeiteten und nicht in Echtzeit sezerniertem Überstand verloren gegangen sein könnten. In keinem dieser Fälle kam es allerdings zu einer signifikant erhöhten hBD-3-Genexpression. Ähnliches zeigte sich in Versuchen von Menzies & Kenoyer. Hier wurde nachgewiesen, dass Stoffwechselprodukte von *S. aureus* ebenfalls nur zu einer geringen Induktion von hBD-3 in primären Keratinozyten führen (Menzies & Kenoyer, 2006). Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen, dass triacylierte Lipopeptide, die von beispielsweise Mykobakterien wie dem *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) synthetisiert und freigesetzt werden, eine Induktion von hBD-3 in Keratinozyten bewirken (Cogen et al., 2012) (Sumikawa et al., 2006). Das hier getestete *C. amycolatum* scheint solche Stoffe nicht zu sezernieren (Zalas et al., 2004).

Auch auf Proteinebene sollte weiterhin geklärt werden, ob hier die Möglichkeit besteht, dass es zu keiner Induktion der hBD-3 Genexpression kommt, aber möglicherweise bereits bestehende Bestände an synthetisiertem hBD-3 Protein ausgeschüttet werden bei Kontakt der Keratinozyten mit Kulturüberständen des *C. amycolatum*. Außerdem könnte in weiteren Versuchen untersucht werden, welche Oberflächenstrukturen auf dem *C. amycolatum* wichtig für die Interaktion mit den Keratinozyten sind.

Insgesamt sollte auch bedacht werden, dass in den hier durchgeführten Versuchen nur Keratinozyten getestet wurden, es waren keine anderen Zellen, wie beispielsweise Immunzellen, an der Induktion von hBD-3 beteiligt. Im natürlichen Zellverband innerhalb der menschlichen Haut wäre es durchaus denkbar, dass eine Induktion von hBD-3 oder auch hBD-2 und RNase 7 durch *C. amycolatum* eben über andere Zelltypen, wie beispielsweise Immunzellen, vermittelt werden könnte. Diese Immunzellen könnten *C. amycolatum* detektieren und mit einer Ausschüttung von Botenstoffen reagieren, welche wiederum die Keratinozyten zur Ausschüttung von AMPs stimulieren könnten.

Als nächstes wurde getestet, ob eine Induktion der hBD-3 Genexpression auch bei Keratinozyten erreicht werden kann, die mit Calciumchlorid vorinkubiert wurden. Wie bereits erwähnt soll CaCl_2 dazu führen, dass die Keratinozyten differenzieren, dadurch soll eine realitätsnähere Situation geschaffen werden (Mahanty et al., 2019). Hier zeigte sich, dass differenzierte Zellen sogar eine signifikant höhere Induktion an hBD-3 Genexpression vorwiesen, als die nicht differenzierten primären Keratinozyten. Man kann also annehmen, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit durchaus auf eine *in vivo* Situation übertragen lassen und dass in einer *in vivo* Situation die Induktion an hBD-3 sogar noch größer sein könnte, da im Verband der Haut die Keratinozyten bei Aufstieg vom *Stratum basale* in apikalere Schichten differenzieren (Kühnel, 2008).

Bei Wanke et al. zeigte sich in Untersuchungen, dass es bei Stimulationen mit Kulturüberständen von *S. epidermidis* einen Unterschied gab zwischen differenzierten und primären Keratinozyten. Differenzierte Keratinozyten reagierten auf Kulturüberstände von *S. epidermidis* mit einer Ausschüttung von hBD-3, primäre nicht (Wanke et al., 2011). Da in den hier durchgeführten Versuchen mit Kulturüberständen primäre Keratinozyten verwendet wurden, könnte im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen wiederum noch einmal mit Kulturüberständen von *C. amycolatum* getestet werden, um festzustellen, ob differenzierte Keratinozyten anders auf diese Kulturüberstände reagieren als primäre Keratinozyten, ähnlich wie bei *S. epidermidis*,

In einem weiteren Schritt ist hierbei eine Untersuchung an einem 3D Hautmodell geplant, bei dem sich die Keratinozyten in einem ausdifferenzierten Zellverband befinden.

Um die Arbeitshypothese zu überprüfen, dass sich die Induktion der hBD-3 Genexpression über den EGFR-Signalweg vollziehen könnte, wurden Versuche mit verschiedenen EGF-Rezeptor Inhibitoren durchgeführt. Es wurden, wie im Abschnitt 4.1 geschildert, Versuche mit Cetuximab durchgeführt, um den EGF-Rezeptor zu hemmen. Bei einer Vorinkubation der NHEK mit Cetuximab konnte keine Induktion der hBD-3 Genexpression mehr nachgewiesen

werden. Das bedeutet, dass es wohl sehr wahrscheinlich ist, dass sich die Induktion von hBD-3 durch *C. amycolatum* in Keratinozyten über den EGFR-Signalweg vollzieht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bisherigen Daten, dass der EGF-Rezeptor für die hBD-3 Expression in Keratinozyten eine wichtige Rolle spielt (Sørensen et al., 2005).

Um diese Beobachtung noch weiter zu bestätigen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen AG1478 als Inhibitor verwendet wurde. Wie bereits in Abschnitt 4.1 erwähnt, ist auch AG1478 ein intrinsisch wirkender Inhibitor des EGF-Rezeptors (W. Wang et al., 2018) (Shi et al., 2009). Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass bei Keratinozyten, die mit diesem Inhibitor vorbehandelt worden waren, die Induktion der hBD-3 Genexpression signifikant reduziert war. Dies ist ein weiterer Beweis für die These, dass die Signaltransduktion, die zur Synthese von hBD-3 führt, über den EGF-Rezeptor vermittelt wird.

Im Gegensatz dazu zeigten Versuche, dass die Induktion von hBD-3 bei Kontakt der Keratinozyten mit grampositiven Bakterien wie *S. aureus* und *S. pneumoniae* über den Toll-like Rezeptor 2 vermittelt wird (Menzies & Kenoyer, 2006) (Scharf et al., 2012). Ähnlich verhält es sich auch bei der oben erwähnten Induktion von hBD-3 durch Stoffe, die das *M. leprae* sezerniert. Diese wird ebenfalls über den Toll-like Rezeptor 2 vermittelt (Cogen et al., 2012). Wie bereits erwähnt, wurden auch hier Versuche durchgeführt, um den Toll-like 2 Rezeptor zu hemmen, allerdings war im verfügbaren Reaktionsgemisch ein Antibiotikum, auf welches *C. amycolatum* sensibel war.

Zusammenfassend kann man vermuten, dass die Induktion von hBD-3 über mehr als einen Signalweg vermittelt wird, abhängig von beispielsweise der Art des Reizes und der Gattung des Pathogens.

4.3 RNase 7

RNase 7 ist ein antimikrobielles Protein mit einem großen Spektrum an antimikrobieller Wirkung (Harder et 2002, Köten et al 2009). Es gehört zur humanen RNase A Superfamilie, deren Namensgebung sich von der bovinen pankreatischen RNase A ableitet, welche als Referenz-RNase und Prototyp für die humane RNase A-Superfamilie verwendet wird (Boix & Nogués, 2007).

Man kann folglich vermuten, dass RNase 7 eine wichtige Rolle in der Immunabwehr der Haut spielt. Verschiedene Arbeiten von beispielsweise Köten et al. und Simanski et al. konnten zeigen, dass RNase 7 dazu beiträgt, das Wachstum von *S. aureus*, *E. faecium* und *P. aeruginosa* zu beschränken. RNase 7 wird von Keratinozyten und Epithelien in verschiedenen Regionen des Körpers wie im Urogenital-, Gastrointestinal- und Respirationstrakt synthetisiert

(Boix et al 2007).

Diese Arbeit beschäftigt sich nun mit der Frage, ob Keratinozyten auf die Anwesenheit von *C. amycolatum* mit einer RNase 7 Gen- und Proteinexpression reagieren. Dies ist insofern interessant, da diese Ausschüttung bisher hauptsächlich für pathogene Keime nachgewiesen werden konnte, *C. amycolatum* aber als Bakterium der Mikrobiota der Haut gilt, und es für eine Induktion bisher noch keinen Nachweis gab. Dieser Nachweis konnte hier nun erbracht werden.

In einem ersten Schritt konnte ermittelt werden, dass die Induktion an RNase 7 Genexpression stieg, je höher die Konzentration der Bakteriensuspension war. Bei niedrigen Konzentrationen von 20 ml/L (OD 0.2) war keine signifikante Induktion mehr nachweisbar. Bei einer Konzentration von 50 ml/L (OD 0.2) war zwar in absoluten Zahlen eine Induktion nachweisbar, diese war allerdings statistisch gesehen nicht signifikant. Dies lässt sich, wie schon im oberen Abschnitt besprochen, auf die große Varianz in der Höhe der Induktion zurückführen.

Auf Proteinebene im ELISA zeigte sich eine ähnlich hohe signifikante Induktion an RNase 7 sowohl bei einer Bakterienkonzentration von 100 ml/L (OD 0.2) als auch bei einer Konzentration von 50 ml/L (OD 0.2). Bei einer niedrigeren Konzentration von 20 ml/L (OD 0.2) war keine signifikante Protein-Ausschüttung mehr nachweisbar. Hieraus könnte man schließen, dass bereits bei niedrigeren Bakterienkonzentrationen eine Erhöhung der Protein-Ausschüttung stattfinden könnte.

Hierzu sollte man bedenken, dass für RNase 7 eine konstitutive Sezernierung durch Keratinozyten bekannt ist, diese aber bei einigen der hier durchgeführten Versuche im Vergleich zu den hohen Induktionswerten, eher zu niedrig gewesen sein könnte, um nachgewiesen werden zu können (Harder & Schröder, 2002).

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass ähnlich wie bei hBD-2 und hBD-3 zuvor, RNase 7 erst ab einer gewissen Konzentration von *C. amycolatum* induziert wird. Interessanterweise wurden alle drei Proteine ab ähnlich hohen Konzentrationen von *C. amycolatum* induziert. Dies passt zu den Ergebnissen, dass *C. amycolatum* zwar als Teil der Mikrobiota der Haut angesehen werden kann, welches AMPs induziert, es aber außerdem in höheren Konzentrationen als fakultatives Pathogen verstanden werden kann. Ähnliches wurde schon in anderen Arbeiten berichtet (Sengupta et al., 2015) (Berner et al., 1997). Man könnte folglich annehmen, dass *C. amycolatum* in normalen, nicht pathogenen Konzentrationen die Keratinozyten in ständiger Alarmbereitschaft halten könnte, um bei einer Besiedlung mit pathogenen Keimen eine schnelle Abwehrreaktion bewirken zu können. Es konnte bereits in

anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die Konzentrationen von Corynebakterien auf der Haut, darunter auch das hier getestete *C. amycolatum*, von verschiedenen Faktoren abhängig sind. Beispielsweise unterscheidet sich die Zusammensetzung der Mikrobiota der Haut zwischen Männer und Frauen. Auch Unterschiede je nach UV-Exposition, Körperhygiene, Antibiotika-Gebrauch und Alter wurden beschrieben (Leyden et al., 1975) (Fierer et al., 2008). Außerdem gibt es Unterschiede im Verteilungsmuster der Mikrobiota je nach Körperregion. Es wird unterschieden zwischen trockenen Hautregionen wie dem Unterarm, feuchten Hautregionen zu denen inguinal und axillar Bereiche zählen, und talgdrüsenreichen Zonen, wie man sie am Rücken und im Gesicht findet. *C. amycolatum*, zusammen mit anderen Corynebakterien, wurde in feuchten Hautpartien deutlich häufiger nachgewiesen als in talgdrüsenreichen Hautpartien. Aber auch auf trockenen Hautregionen konnte es im Vergleich zu anderen Bakterien häufig detektiert werden (Lee et al., 2019) (Grice & Segre, 2011).

Man könnte folglich davon ausgehen, dass in Hautregionen mit einem höheren Anteil an *C. amycolatum*, die Induktion von RNase 7 verschieden sein sollte und Regionen mit einem höheren Anteil an *C. amycolatum* eine höhere Induktion an RNase 7 aufweisen sollten. Allerdings zeigten Untersuchungen, dass die Verteilung von RNase 7 auf menschlicher Haut eben nicht unbedingt mit dem Verteilungsmuster von Corynebakterien korreliert, sondern eben auch von vielen anderen Faktoren abhängig ist (Rademacher et al., 2016).

Auch die Wirkung von RNase 7 auf *C. amycolatum* ist hier zu betrachten. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass RNase 7 sehr potent *S. aureus* abtöten kann (lethal dose of 90% (LD_{90}) = 3–6 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Simanski et al., 2010). Auch eine antimikrobielle Aktivität gegen *E. faecium* mit $LD_{90} = 0.4\text{--}0.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ konnte gezeigt werden. Gegen das hier getestete *C. amycolatum* zeigten Konzentrationen von sogar unter 1 $\mu\text{g/ml}$ bereits eine antimikrobielle Wirkung (Walter et al., 2017).

Auch der Zeitfaktor spielt bei der Induktion sowohl der RNase 7 Genexpression, als auch der Proteinexpression eine entscheidende Rolle. Es zeigte sich, dass es, bei einem Inkubationszeitraum von 6h, zu keiner signifikanten Induktion kam. Erst ab einer Inkubationszeit von 24h konnte eine signifikante Induktion von RNase 7 Genexpression nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch auf Proteinebene im ELISA, erst nach einer Inkubationszeit von 24h konnte eine signifikante Induktion der RNase 7 Proteinexpression festgestellt werden. Es scheint hier keine vorzeitige Ausschüttung von RNase 7 Protein statt zu finden, obwohl eine konstitutive Sekretion von RNase 7 bereits bekannt ist (Harder & Schröder, 2002). Allerdings ist es möglich, dass diese hier im Vergleich zu den Induktionszahlen zu niedrig war um statistische Signifikanz zu zeigen.

Im Gegensatz dazu wurde bei Inkubationen mit *S. aureus* nachgewiesen, dass bereits nach 2h eine deutlich erhöhte Sekretion, von wahrscheinlich bereits synthetisierter RNase 7 nachweisbar war (Simanski et al., 2010). Für die Schnelligkeit der RNase 7 Freisetzung scheint es also eine Rolle zu spielen, mit welcher Art von Pathogen die Keratinozyten stimuliert werden. Man kann schlussfolgern, dass *C. amycolatum* als Teil der Mikrobiota der Haut und als fakultatives Pathogen, erst über einen gewissen Zeitraum und in einer gewissen Konzentration mit den Keratinozyten in Kontakt stehen muss um eine Induktion von RNase 7 zu bewirken. Wie bereits erwähnt, kann davon ausgegangen werden, dass *C. amycolatum* über einen Zeitraum von mindestens 24h inkubiert, da es als Bestandteil der Mikrobiota konstant auf der Haut persistiert.

Um nun die Frage zu beantworten, ob auch Stoffwechselprodukte und Botenstoffe von *C. amycolatum* eine Induktion von RNase 7 anregen könnten, oder ob ein direkter Kontakt zwischen den Zellen notwendig ist, wurden in einem weiteren Schritt die Keratinozyten mit Kulturüberständen stimuliert. Es zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie schon zuvor bei hBD-2 und hBD-3. Die Proben, die mit Kulturüberständen stimuliert wurden, zeigten keine signifikante Induktion der RNase 7 Genexpression. Das gleiche Ergebnis war auch im ELISA nachweisbar. Es konnte bei den Proben, die mit Kulturüberständen inkubiert wurden, keine erhöhte RNase 7 Proteinexpression nachgewiesen werden. Hieraus kann man schlussfolgern, dass ein Zell-zu-Zell Kontakt notwendig ist um eine Induktion zu bewirken. Die Stoffwechselprodukte von *C. amycolatum* scheinen keinen Einfluss auf die Stimulation der Keratinozyten zu haben. Dabei wurde in weiteren Versuchen nachgewiesen, dass es keinen Unterschied macht, ob die Kulturüberstände in Echtzeit (durch das Einsetzen von Transwells) produziert worden waren, oder vorbereitet waren. Es wäre denkbar gewesen, dass in einem vorbereiteten Kulturüberstand flüchtige Botenstoffe beziehungsweise Stoffwechselprodukte bereits abgebaut wurden, beziehungsweise zerfallen waren.

Es konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass sowohl die RNase 7 Gen-, als auch die Proteinexpression in Keratinozyten durch Kulturüberstände von *P. aeruginosa* induziert werden können (Rademacher et al., 2017). Auch für *S. aureus* konnte nachgewiesen werden, dass dessen Stoffwechselprodukte, beziehungsweise Botenstoffe, RNase 7 in Keratinozyten induzieren. Allerdings zeigten die Kulturüberstände von *S. epidermidis*, ähnlich wie die von *C. amycolatum*, keine Induktion von RNase 7 (Wanke et al., 2011). Hier kann man überlegen, dass *S. epidermidis* und *C. amycolatum* zur Mikrobiota der Haut zählen und nur als fakultative Pathogene gelten, wo hingegen *P. aeruginosa* und *S. aureus* eher etablierte Pathogene sind (Knox & Holmes, 2002) (Otto, 2009) (Sawa et al., 2014) (Karst, 2005).

Als nächstes wurde getestet, ob *C. amycolatum* auch eine Induktion von RNase 7 bei Keratinozyten bewirken kann, die mit CaCl₂ vorinkubiert wurden. CaCl₂ führt dazu, dass Zellen differenzieren, so kann eine realitätsnähere Situation geschaffen werden kann (Mahanty et al., 2019). Auf Genexpressionsebene konnte sowohl in den differenzierten, als auch in den nicht differenzierten Proben eine signifikante Induktion gemessen werden. Der Unterschied zwischen diesen Proben war signifikant. Dies könnte bedeuten, dass es für die Induktion der Genexpression eine Rolle spielen könnte, ob die Keratinozyten differenziert sind oder nicht. Dies könnte weiterhin darauf hindeuten, dass sich eine Induktion der RNase 7 Genexpression in gewissem Maß auf eine *in vivo*-Situation übertragen lässt, weil die Keratinozyten in der Epidermis differenzieren, während sie aus dem *Stratum basale* in apikaler gelegene Schichten aufsteigen (Kühnel, 2008).

Auf Proteinebene im ELISA konnte ebenso eine Induktion von RNase 7, sowohl in den differenzierten, als auch in den nicht differenzierten Keratinozyten, gemessen werden. Der Unterschied zwischen den differenzierten und den nicht differenzierten war hier ebenfalls signifikant. Diese Ergebnisse scheinen insgesamt darauf hinzudeuten, dass sogar eine verstärkte Induktion in differenzierten Zellen im Vergleich zu nicht differenzierten Zellen stattfindet.

Wie bereits in Abschnitt 4.2 erwähnt, scheint es Unterschiede zu geben bei der Reaktion von differenzierten und primären Keratinozyten auf Kulturüberstände von *S. aureus* und *S. epidermidis* (Wanke et al., 2011). Man könnte in weiteren Versuchen testen, ob differenzierte Keratinozyten gegebenenfalls, anders als primäre Keratinozyten, mit einer erhöhten Gen- und Proteinexpression von RNase 7 auf Kulturüberstände des *C. amycolatum* reagieren könnten. An diese Versuche schlossen sich in unserem Labor Experimente mit einem 3D-Hautmodell an, dabei konnten die Ergebnisse der 2D-Kulturen in einer stratifizierten Epidermis bestätigt werden (Walter et al., 2017).

Um die Arbeitshypothese zu bestätigen, dass die Induktion von RNase 7 durch *C. amycolatum* in Keratinozyten über den EGF-Rezeptor Signalweg vermittelt wird, wurden Versuche mit verschiedenen EGF-Rezeptor Inhibitoren unternommen. Als erstes wurde Cetuximab verwendet. In den Versuchen mit Cetuximab zeigten die Keratinozyten, die mit Cetuximab vorinkubiert waren, keine signifikante Induktion der RNase 7 Genexpression. Der Unterschied, zwischen der Induktion bei den mit Cetuximab vorinkubierten und den mit einem irrelevanten Antikörper vorinkubierten Zellen, war signifikant. Bei den mit einem irrelevanten Antikörper vorinkubierten Keratinozyten zeigte sich eine signifikante Induktion der RNase 7 Genexpression. Auch im ELISA konnte keine signifikante RNase 7 Proteinexpression bei den

mit Cetuximab vorinkubierten Zellen mehr nachgewiesen werden. Hieraus kann man schließen, dass sich die Induktion von RNase 7 größtenteils über den EGF-Rezeptor abspielt. Dies zeigte sich bereits in anderen Arbeiten zum Beispiel mit *P. aeruginosa* (Rademacher et al., 2016).

Um diese Beobachtungen noch einmal zu bekräftigen, wurde als nächstes der EGF-Rezeptor Inhibitor AG1478 verwendet. Auch hier handelt es sich um einen potennten Inhibitor des EGF-Rezeptors. Hier zeigten die Proben, bei denen AG1478 verwendet wurde, eine vollständige Unterdrückung der RNase 7 Genexpression. Im ELISA konnte ebenfalls eine signifikant reduzierte Induktion von RNase 7 Proteinexpression gezeigt werden.

Dies bekräftigt insgesamt die bei Cetuximab gemacht Beobachtung, dass sich die Induktion von RNase 7 wohl größtenteils über den EGF-Rezeptor vollzieht.

Durch diese beiden Versuche konnte gezeigt werden, dass der EGF-Rezeptor eine wichtige Rolle spielt bei der *C. amycolatum*-vermittelten Induktion von RNase 7. Dies steht im Einklang mit anderen Arbeiten wie zum Beispiel von Firat et al. und Lichtenberger et al., die bereits zeigten, dass der EGF-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der durch Mikroorganismen vermittelten Expression von RNase 7 in Keratinozyten spielt (Firat et al., 2014) (Lichtenberger et al., 2013).

Allerdings zeigten auch Versuche von Rademacher et al., dass die Regulation der Genbeziehungsweise Proteinexpression, bei einer Stimulation von Keratinozyten mit *P. aequinosa*, nicht nur über den EGFR Signalweg vermittelt wird, sondern dass auch der Toll like Rezeptor 5 in die Induktion involviert ist (Rademacher et al., 2017). Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass mehr als ein Signalweg bei der *C. amycolatum*-vermittelten Induktion der Gen- und Proteinexpression von RNase 7 eine Rolle spielt und es davon abhängt, durch welche Art von Reiz die Keratinozyten stimuliert werden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu ermitteln, ob *Corynebacterium (C.) amycolatum* im Stande ist eine Induktion von ausgewählten antimikrobiellen Proteinen in Keratinozyten zu bewirken. Diese ausgewählten Proteine waren hBD-2, hBD-3 und RNase 7.

In den hier durchgeführten Versuchen wurden primäre Keratinozyten (NHEK) direkt mit lebenden *C. amycolatum* und deren Kulturüberständen, sowie lebend *C. amycolatum* über Transwells, stimuliert. Die Auswertung der gemessenen Stimulationen erfolgte mittels quantitativer „Realtime“-PCR (zur Detektion der Erhöhung der mRNA) und ELISA (zur Messung der Proteinexpression). Es konnte nachgewiesen werden, dass lebende Bakterien nach einer gewissen Inkubationszeit und in einer ausreichend hohen Konzentration in Keratinozyten zu einer Erhöhung der Genexpression aller hier getesteten antimikrobiellen Proteine führten. Für RNase 7 konnte außerdem eine Erhöhung der RNase 7 Proteinexpression detektiert werden. Kulturüberstände beziehungsweise, durch den Einsatz von Transwells, sezernierte Stoffwechselprodukte des *C. amycolatum*, führten zu keiner Induktion der Genexpression.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der EGF-Rezeptor bei der Induktion von hBD-3 und RNase 7 durch *C. amycolatum* in Keratinozyten eine Rolle spielt. Bei der Induktion von hBD-2 scheint der EGF-Rezeptor eher eine untergeordnete bis gar keine Rolle zu spielen, hier waren die Ergebnisse nicht ganz eindeutig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für alle hier geprüften antimikrobiellen Proteine eine Erhöhung der Genexpression durch *C. amycolatum* gezeigt werden konnte. Für RNase 7 konnte dies auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Einige dieser Daten wurden veröffentlicht in Scientific Reports „RNase 7 participates in cutaneous innate control of *Corynebacterium amycolatum*“ (Walter et al., 2017)

6 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *From RNA to Protein*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26829/>
- Avila-Calderón, E. D., Ruiz-Palma, M. del S., Aguilera-Arreola, M. G., Velázquez-Guadarrama, N., Ruiz, E. A., Gomez-Lunar, Z., Witonsky, S., & Contreras-Rodríguez, A. (2021). Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12, p. 557902). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>
- Bals, R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. In *Respiratory Research* (Vol. 1, Issue 1, p. 141). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/rr25>
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., & Wilson, J. M. (1998). Human-Defensin 2 Is a Salt-sensitive Peptide Antibiotic Expressed in Human Lung. In *J. Clin. Invest* (Vol. 102, Issue 5). <http://www.jci.org>
- Barra, D., & Simmaco, M. (1995). Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends in Biotechnology*, 13(6), 205–209. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88947-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88947-7)
- Belmares, J., Detterline, S., Pak, J. B., & Parada, J. P. (2007). Corynebacterium endocarditis species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infectious Diseases*, 7, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-4>
- Berner, R., Pelz, K., Wilhelm, C., Funke, A., Leititis, J. U., & Brandis, M. (1997). Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 1011–1012. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.1011-1012.1997>
- Böhling, A., Hagge, S. O., Roes, S., Podschun, R., Sahly, H., Harder, J., Schröder, J. M., Grötzinger, J., Seydel, U., & Gutsmann, T. (2006). Lipid-specific membrane activity of human β -defensin-3. *Biochemistry*, 45(17), 5663–5670. <https://doi.org/10.1021/bi052026e>
- Boix, E., & Nogués, M. V. (2007). Mammalian antimicrobial proteins and peptides: Overview on the RNase A superfamily members involved in innate host defence. *Molecular BioSystems*, 3(5), 317–335. <https://doi.org/10.1039/b617527a>
- Braff, M. H., & Gallo, R. L. (2006). Antimicrobial peptides: An essential component of the skin defensive barrier. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 306, pp. 91–110). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-29916-5_4
- Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., & Osborn, R. W. (1995). Plant defensins:

- Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. In *Plant Physiology* (Vol. 108, Issue 4, pp. 1353–1358). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1353>
- Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., & Hoffmann, J. A. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 14893–14897.
- Cho, S., Beintema, J. J., & Zhang, J. (2005). The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: Identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics*, 85(2), 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.10.008>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Cogen, A. L., Walker, S. L., Roberts, C. H., Hagge, D. A., Neupane, K. D., Khadge, S., & Lockwood, D. N. J. (2012). Human Beta-Defensin 3 Is Up-Regulated in Cutaneous Leprosy Type 1 Reactions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1869. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001869>
- Collins, M. D., Burton, R. A., & Jones, D. (1988). *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiology Letters*, 49(3), 349–352. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02755.x>
- Cordes, J., Wittersheim, M., Harder, J., & Gläser, R. (2014). Hauteigene Antibiotika: Wichtige Erkenntnisse über antimikrobielle Peptide für Klinik und Praxis. *Hautarzt*, 65(1), 50–55. <https://doi.org/10.1007/s00105-013-2638-6>
- Dalal, A., Urban, C., & Segal-Maurer, S. (2008). Endocarditis due to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Medical Microbiology*, 57(10), 1299–1302. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/003343-0>
- Dhople, V., Krukemeyer, A., & Ramamoorthy, A. (2006). The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1758, Issue 9, pp. 1499–1512). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.07.007>
- Dr. Hartmann, L. (n.d.). *Aufbau und Behandlung der Haut*. Retrieved July 29, 2021, from <https://osteopathie-in-lueneburg.de/haut/>
- Ernst, R. K., Yi, E. C., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M., & Miller, S. I. (1999). Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 286(5444), 1561–1565. <https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1561>
- Fearon, D. T., & Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272(5258), 50–54.

- <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.50>
- Fernie-King, B. A., Seilly, D. J., & Lachmann, P. J. (2006). Inhibition of antimicrobial peptides by group A streptococci: SIC and DRS. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 2), 273–275. <https://doi.org/10.1042/BST20060273>
- Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C. L., & Knight, R. (2008). The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17994–17999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807920105>
- Firat, Y. H., Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Brasch, J., & Harder, J. (2014). Infection of Keratinocytes with *Trichophyton rubrum* Induces Epidermal Growth Factor-Dependent RNase 7 and Human Beta-Defensin-3 Expression. *PLoS ONE*, 9(4), e93941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093941>
- Fritz, P., Beck-Jendroschek, V., & Brasch, J. (2012). Inhibition of dermatophytes by the antimicrobial peptides human β -defensin-2, ribonuclease 7 and psoriasin. *Medical Mycology*, 50(6), 579–584. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.660203>
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Ståhle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H., & Gudmundsson, G. H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15258–15263. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15258>
- Funke, G., Lawson, P. A., Bernard, K. A., & Collins, M. D. (1996). Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1124–1128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8727888>
- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N. S., Othlinghaus, N., Brockmeyer, N. H., Altmeyer, P., & Kreuter, A. (2008). Differential mRNA Expression of Antimicrobial Peptides and Proteins in Atopic Dermatitis as Compared to Psoriasis Vulgaris and Healthy Skin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 147(1), 17–24. <https://doi.org/10.1159/000128582>
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., & Schröder, J. M. (2005). Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nature Immunology*, 6(1), 57–64. <https://doi.org/10.1038/ni1142>
- Gläser, R., Navid, F., Schuller, W., Jantschitsch, C., Harder, J., Schröder, J. M., Schwarz, A., & Schwarz, T. (2009). UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(5), 1117–1123. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.01.043>
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 4, pp. 244–253). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>

- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., & Schroder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin [6]. In *Nature* (Vol. 387, Issue 6636, p. 861). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/43088>
- Harder, Jürgen, Bartels, J., Christophers, E., & Schröder, J. M. (2001). Isolation and Characterization of Human β -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5707–5713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008557200>
- Harder, Jürgen, Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., & Schröder, J. M. (2000). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL- β , but not IL-6, induce human β -defensin-2 in respiratory epithelia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22(6), 714–721. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.6.4023>
- Harder, Jürgen, Schröder, J.-M., & Gläser, R. (2013). The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks. *Experimental Dermatology*, 22(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/exd.12046>
- Harder, Jürgen, & Schröder, J. M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46779–46784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207587200>
- Harder, Jürgen, Siebert, R., Zhang, Y., Matthiesen, P., Christophers, E., Schlegelberger, B., & Schröder, J. M. (1997). Mapping of the gene encoding human β -defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics*, 46(3), 472–475. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5074>
- Hernández-León, F., Acosta-Dibarrat, J., Vázquez-Chagoyán, J. C., Rosas, P. F., & De Oca-Jiménez, R. M. (2016). Identification and molecular characterization of *Corynebacterium xerosis* isolated from a sheep cutaneous abscess: First case report in Mexico. *BMC Research Notes*, 9(1), 358. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2170-8>
- Hertz, C. J., Wu, Q., Porter, E. M., Zhang, Y. J., Weismüller, K.-H., Godowski, P. J., Ganz, T., Randell, S. H., & Modlin, R. L. (2003). Activation of Toll-Like Receptor 2 on Human Tracheobronchial Epithelial Cells Induces the Antimicrobial Peptide Human β Defensin-2. *The Journal of Immunology*, 171(12), 6820–6826. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6820>
- Hiratsuka, T., Nakazato, M., Date, Y., Ashitani, J. I., Minematsu, T., Chino, N., & Matsukura, S. (1998). Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(3), 943–947. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9239>
- Hoover, D. M., Rajashankar, K. R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J. J., Chertov, O., & Lubkowski, J. (2000). The structure of human β -defensin-2 shows evidence of higher

- order oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32911–32918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006098200>
- Huang, Y. C., Lin, Y. M., Chang, T. W., Wu, S. J., Lee, Y. S., Chang, M. D. T., Chen, C., Wu, S. H., & Liao, Y. Di. (2007). The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4626–4633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607321200>
- Humblet, Y. (2004). Cetuximab: An IgG1 monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5(7), 1621–1633. <https://doi.org/10.1517/14656566.5.7.1621>
- Ishimoto, H., Mukae, H., Date, Y., Shimbara, T., Mondal, M. S., Ashitani, J., Hiratsuka, T., Kubo, S., Kohno, S., & Nakazato, M. (2006). Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: The increase in pneumonia. *European Respiratory Journal*, 27(2), 253–260. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00105904>
- Joly, S., Compton, L. M., Pujol, C., Kurago, Z. B., & Guthmiller, J. M. (2009). Loss of human β -defensin 1, 2, and 3 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(5), 353–360. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00512.x>
- Joly, Sophie, Organ, C. C., Johnson, G. K., McCray, P. B., & Guthmiller, J. M. (2005). Correlation between β -defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Molecular Immunology*, 42(9), 1073–1084. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.11.001>
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2005). *Histologie* (6. Auflage). Manfred Gratzl, Springer.
- Karst, M. J. (2005). *Staphylococcus aureus*. In *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 86–87). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00899-1>
- Knox, K. L., & Holmes, A. H. (2002). Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerging Infectious Diseases*, 8(1), 97–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749760>
- Kötén, B., Simanski, M., Gläser, R., Podschun, R., Schröder, J. M., & Harder, J. (2009). RNase 7 contributes to the cutaneous defense against *Enterococcus faecium*. *PLoS ONE*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006424>
- Kühnel, W. (2008). *Histologie* (12. Auflag). Georg Thieme Verlag.
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. In *Trends in Immunology* (Vol. 30, Issue 3, pp. 131–141). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003>
- Lee, Byun, & Kim. (2019). Potential Role of the Microbiome in Acne: A Comprehensive Review. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), 987. <https://doi.org/10.3390/jcm8070987>
- Leyden, J. J., McGinley, K. J., Mills, O. H., & Kligman, A. M. (1975). Age related changes in the resident bacterial flora of the human face. *Journal of Investigative Dermatology*, 65(4),

- 379–381. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12607630>
- Lichtenberger, B. M., Gerber, P. A., Holcmann, M., Buhren, B. A., Amberg, N., Smolle, V., Schrumpf, H., Boelke, E., Ansari, P., Mackenzie, C., Wollenberg, A., Kislat, A., Fischer, J. W., Röck, K., Harder, J., Schröder, J. M., Homey, B., & Sibilia, M. (2013). Epidermal EGFR controls cutaneous host defense and prevents inflammation. *Science Translational Medicine*, 5(199), 199ra111-199ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005886>
- Liu, A. Y., Destoumieux, D., Wong, A. V., Park, C. H., Valore, E. V., Liu, L., & Ganz, T. (2002). Human β -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(2), 275–281. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01651.x>
- Liu, L., Roberts, A. A., & Ganz, T. (2003). By IL-1 Signaling, Monocyte-Derived Cells Dramatically Enhance the Epidermal Antimicrobial Response to Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 170(1), 575–580. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.575>
- Liu, L., Wang, L., Jia, H. P., Zhao, C., Heng, H. H. Q., Schutte, B. C., McCray, P. B., & Ganz, T. (1998). Structure and mapping of the human β -defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene*, 222(2), 237–244. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00480-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00480-6)
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). *Histologie* (2.Auflage). Georg Thieme Verlag.
- Lysenko, E. S., Gould, J., Bals, R., Wilson, J. M., & Weiser, J. N. (2000). Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infection and Immunity*, 68(3), 1664–1671. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1664-1671.2000>
- Mahanty, S., Dakappa, S. S., Shariff, R., Patel, S., Swamy, M. M., Majumdar, A., & Setty, S. R. G. (2019). Keratinocyte differentiation promotes ER stress-dependent lysosome biogenesis. *Cell Death & Disease* 2019 10:4, 10(4), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1478-4>
- Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Florio, W., Bottai, D., Favilli, F., & Campa, M. (2006). In vitro bactericidal activity of human β -defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(2), 806–809. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.806-809.2006>
- Menzies, B. E., & Kenoyer, A. (2006). Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human β -defensin 3 in skin keratinocytes. *Infection and Immunity*, 74(12), 6847–6854. <https://doi.org/10.1128/IAI.00389-06>
- Meyer-Hoffert, U., Schwarz, T., Schröder, J.-M., & Gläser, R. (2008). Expression of human beta-defensin-2 and -3 in verrucae vulgares and condylomata acuminata. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(9), 1050–1054.

- <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2008.02675.x>
- Nakatsuji, T., & Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides: Old molecules with new ideas. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 132, Issue 3 PART 2, pp. 887–895). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.387>
- Olander, A. (2013). Antibiotic Resistance and Detection of the Most Common Mechanism of Resistance (MLSB) of Opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy*, 59(4), 294–306. <https://doi.org/10.1159/000357467>
- Oren, A., Ganz, T., Liu, L., & Meerloo, T. (2003). In human epidermis, β -defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Experimental and Molecular Pathology*, 74(2), 180–182. [https://doi.org/10.1016/S0014-4800\(02\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0014-4800(02)00023-0)
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* - The “accidental” pathogen. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 7, Issue 8, pp. 555–567). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: Key components of the innate immune system. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 32, Issue 2, pp. 143–171). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
- Peng Jia, H., Schutte, B. C., Schudy, A., Linzmeier, R., Guthmiller, J. M., Johnson, G. K., Tack, B. F., Mitros, J. P., Rosenthal, A., Ganz, T., & McCray, P. B. (2001). Discovery of new human β -defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 263(1–2), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00569-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00569-2)
- Peschel, A., & Sahl, H. G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 4, Issue 7, pp. 529–536). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1441>
- Rademacher, F., Simanski, M., & Harder, J. (2016). RNase 7 in cutaneous defense. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17040560>
- Rademacher, F., Simanski, M., Schröder, L., Mildner, M., & Harder, J. (2017). The role of RNase 7 in innate cutaneous defense against *Pseudomonas aeruginosa*. *Experimental Dermatology*, 26(3), 227–233. <https://doi.org/10.1111/EXD.13166>
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: Premises and promises. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 24, Issue 6, pp. 536–547). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Renaud, F. N., Dutaur, M., Daoud, S., Aubel, D., Riegel, P., Monget, D., & Freney, J. (1998). Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), 3698–3702. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817901>

- Rudresh, S. M., Ravi, G. S., Alex, A. M., Mamatha, K. R., Sunitha, L., & Thangam Ramya, K. (2015). Non diphtheritic Corynebacteria: An emerging nosocomial pathogen in skin and soft tissue infection. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(12), DC19–DC21. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/15580.6977>
- Sawa, T., Shimizu, M., Moriyama, K., & Wiener-Kronish, J. P. (2014). Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: A review. In *Critical Care* (Vol. 18, Issue 1, p. 668). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0668-9>
- Sawamura, D., Goto, M., Shibaki, A., Akiyama, M., McMillan, J. R., Abiko, Y., & Shimizu, H. (2005). Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. *Gene Therapy*, 12(10), 857–861. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302472>
- Scharf, S., Zahlten, J., Szymanski, K., Hippenstiel, S., Suttorp, N., & N'Guessan, P. D. (2012). *Streptococcus pneumoniae* induces human β -defensin-2 and-3 in human lung epithelium. *Experimental Lung Research*, 38(2), 100–110. <https://doi.org/10.3109/01902148.2011.652802>
- Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., & Garbe, C. (2001). Dermcidin: A novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, 2(12), 1133–1137. <https://doi.org/10.1038/ni732>
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F., & Fellermann, K. (2007). Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and Immunity*, 75(5), 2399–2407. <https://doi.org/10.1128/IAI.01563-06>
- Schröder, J. M. (1999). Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 57(2), 121–134. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00226-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00226-3)
- Schröder, J. M. (2002). Antimikrobielle peptide: Effektormoleküle der haut als abwehrorgan. In *Hautarzt* (Vol. 53, Issue 6, pp. 424–435). <https://doi.org/10.1007/s00105-002-0387-z>
- Schröder, J. M., & Harder, J. (1999). Human beta-defensin-2. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(6), 645–651. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00013-8)
- Schutte, B. C., & McCray, P. B. (2002). β -Defensins in Lung Host Defense. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 709–748. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.134340>
- Scott, M. G., Vreugdenhil, A. C. E., Buurman, W. A., Hancock, R. E. W., & Gold, M. R. (2000). Cutting Edge: Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. *The Journal of Immunology*, 164(2), 549–553. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.2.549>

- Sengupta, M., Naina, P., Balaji, V., & Anandan, S. (2015). *Corynebacterium amycolatum*: An unexpected pathogen in the ear. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(12), DD01. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/15134.7002>
- Shafer, W. M., Qu, X. D., Waring, A. J., & Lehrer, R. I. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1829–1833. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1829>
- Shi, Z., Parmar, S., Peng, X. X., Shen, T., Robey, R. W., Bates, S. E., Fu, L. W., Shao, Y., Chen, Y. M., Zang, F., & Chen, Z. S. (2009). The epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor AG1478 and erlotinib reverse ABCG2-mediated drug resistance. *Oncology Reports*, 21(2), 483–489. https://doi.org/10.3892/or_00000248
- Simanski, M., Dressel, S., Gläser, R., & Harder, J. (2010). RNase 7 protects healthy skin from *staphylococcus aureus* colonization. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 130, Issue 12, pp. 2836–2838). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.217>
- Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Schumacher, H. M., Gläser, R., & Harder, J. (2013). IL-17A and IFN- γ Synergistically Induce RNase 7 Expression via STAT3 in Primary Keratinocytes. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059531>
- Singh, P. K., Jia, H. P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B. A. D., Greenberg, E. P., Valore, E. V., Welsh, M. J., Ganz, T., Tack, B. F., & McCray, P. B. (1998). Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14961–14966. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14961>
- Sørensen, O. E., Thapa, D. R., Rosenthal, A., Liu, L., Roberts, A. A., & Ganz, T. (2005). Differential Regulation of β -Defensin Expression in Human Skin by Microbial Stimuli. *The Journal of Immunology*, 174(8), 4870–4879. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4870>
- Spencer, J. D., Schwaderer, A. L., Dirosario, J. D., McHugh, K. M., McGillivray, G., Justice, S. S., Carpenter, A. R., Baker, P. B., Harder, J., & Hains, D. S. (2011). Ribonuclease 7 is a potent antimicrobial peptide within the human urinary tract. *Kidney International*, 80(2), 174–180. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.109>
- Suerbaum, S., Hahn, H., Schulz, T., Burchard, G.-D., & Kaufmann, S. H. E. (2012). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (7th ed.). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-24167-3>
- Sumikawa, Y., Asada, H., Hoshino, K., Azukizawa, H., Katayama, I., Akira, S., & Itami, S. (2006). Induction of β -defensin 3 in keratinocytes stimulated by bacterial lipopeptides through toll-like receptor 2. *Microbes and Infection*, 8(6), 1513–1521.

- <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.01.008>
- Swaney, M. H., & Kalan, L. R. (2020). Corynebacterium Comparative Genomics Reveals a Role for Cobamide Sharing in the Skin Microbiome 2 3. *BioRxiv*, 2020.12.02.407395. <https://doi.org/10.1101/2020.12.02.407395>
- Taggart, C. C., Greene, C. M., Smith, S. G., Levine, R. L., McCray, P. B., O'Neill, S., & McElvaney, N. G. (2003). Inactivation of Human β -Defensins 2 and 3 by Elastolytic Cathepsins. *The Journal of Immunology*, 171(2), 931–937. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.931>
- Torrent, M., Badia, M., Moussaoui, M., Sanchez, D., Nogués, M. V., & Boix, E. (2010). Comparison of human RNase 3 and RNase 7 bactericidal action at the Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall. *FEBS Journal*, 277(7), 1713–1725. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07595.x>
- Vora, P., Youdim, A., Thomas, L. S., Fukata, M., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., Michelsen, K. S., Wada, A., Hirayama, T., Arditi, M., & Abreu, M. T. (2004). β -Defensin-2 Expression Is Regulated by TLR Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 173(9), 5398–5405. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5398>
- Walter, S., Rademacher, F., Kobinger, N., Simanski, M., Gläser, R., & Harder, J. (2017). RNase 7 participates in cutaneous innate control of *Corynebacterium amycolatum*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14383-z>
- Wang, T.-T., Nestel, F. P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., Tavera-Mendoza, L., Lin, R., Hanrahan, J. W., Mader, S., & White, J. H. (2004). Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D 3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 173(5), 2909–2912. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2909>
- Wang, W., Yan, M., Liu, C., Wang, Y., Wang, Y., Wang, L., & Fan, J. (2018). Epidermal growth factor receptor inhibitor AG1478 affects HepG2 cell proliferation, cell cycle, apoptosis and c-Myc protein expression in a dose-dependent manner. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(4), 1021–1027. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1460620>
- Wanke, I., Steffen, H., Christ, C., Krismer, B., Götz, F., Peschel, A., Schaller, M., & Schittek, B. (2011). Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(2), 382–390. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.328>
- Wauters, G., Van Bosterhaut, B., Janssens, M., & Verhaegen, J. (1998). Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(5), 1430–1432. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9574722>
- White, S. H., Wimley, W. C., & Selsted, M. E. (1995). Structure, function, and membrane

- integration of defensins. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(4), 521–527. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(95\)80038-7](https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80038-7)
- Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Hedderich, J., & Gläser, R. (2013). Differential expression and *in vivo* secretion of the antimicrobial peptides psoriasin (S100A7), RNase 7, human beta-defensin-2 and -3 in healthy human skin. *Experimental Dermatology*, 22(5), 364–366. <https://doi.org/10.1111/exd.12133>
- Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boulègue, C., Santamaria, F., Oppenheim, J. J., Lubkowski, J., & Lu, W. (2003). Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8880–8885. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533186100>
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M. Z., & Oppenheim, J. J. (1999). β -Defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 286(5439), 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.525>
- Zabner, J., Smith, J. J., Karp, P. H., Widdicombe, J. H., & Welsh, M. J. (1998). Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Molecular Cell*, 2(3), 397–403. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80284-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80284-1)
- Zalas, P., Mikucka, A., & Gospodarek, E. (2004). [Biochemical properties of *Corynebacterium amycolatum* strains]. *Medycyna Doswiadczeniowa i Mikrobiologia*, 56(2), 147–154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544086>
- Zhang, J. (2002). RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic Acids Research*, 30(5), 1169–1175. <https://doi.org/10.1093/nar/30.5.1169>
- Zhang, Jianzhi, Dyer, K. D., & Rosenberg, H. F. (2003). Human RNase 7: A new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 31, Issue 2, pp. 602–607). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg157>
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12), e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Haut	3
Abbildung 2.1: NHEK postkonfluent, kurz vor Weiterverwendung für eine Stimulation.....	15
Abbildung 2.2: <i>C. amycolatum</i> Kolonien auf Blutagarplatte.....	16
Abbildung 3.1: Hohe <i>C. amycolatum</i> -Konzentrationen bewirken eine hohe Induktion der hBD-2 Genexpression.....	24
Abbildung 3.2: Hohe <i>C. amycolatum</i> Konzentrationen bewirken eine hohe Induktion der hBD-3 Genexpression.....	25
Abbildung 3.3: Hohe <i>C. amycolatum</i> Konzentrationen bewirken eine hohe Induktion der RNase 7 Gen- und Proteinexpression.....	26
Abbildung 3.4: <i>C. amycolatum</i> induziert hBD-2 Genexpression nach 24h.....	27
Abbildung 3.5: <i>C. amycolatum</i> induziert hBD-3 Genexpression nach 24h.....	28
Abbildung 3.6: <i>C. amycolatum</i> induziert RNase7 Gen- und Proteinexpression nach 24h.....	29
Abbildung 3.7: Kulturüberstände des <i>C. amycolatum</i> bewirken keine Induktion der hBD-2 Genexpression.....	30
Abbildung 3.8: Kulturüberstände des <i>C. amycolatum</i> bewirken keine Induktion der hBD-3 Genexpression.....	31
Abbildung 3.9: Kulturüberstände des <i>C. amycolatum</i> bewirken keine Induktion der RNase7 Gen- und Proteinexpression.....	32
Abbildung 3.10: <i>C. amycolatum</i> bewirkt keine Induktion der hBD-2 Genexpression in Transwells.....	33
Abbildung 3.11: <i>C. amycolatum</i> bewirkt keine Induktion der hBD-3 Genexpression in Transwells.....	34
Abbildung 3.12: <i>C. amycolatum</i> bewirkt keine Induktion der RNase7 Gen- und Proteinexpression in Transwells.....	35
Abbildung 3.13: Die Stimulation differenzierter NHEK mit lebenden <i>C. amycolatum</i> führt zu einer signifikanten Induktion der hBD-2 Genexpression.....	36
Abbildung 3.14: Die Stimulation differenzierter NHEK mit lebenden <i>C. amycolatum</i> führt zu einer signifikanten Induktion der hBD-3 Genexpression.....	37
Abbildung 3.15: Die Stimulation differenzierter NHEK mit lebenden <i>C. amycolatum</i> führt zu einer signifikanten Induktion der RNase 7 Gen- und Proteinexpression.....	38
Abbildung 3.16: Cetuximab inhibiert nicht die <i>C. amycolatum</i> -vermittelte Induktion der hBD-2 Genexpression.....	39

Abbildung 3.17: Cetuximab inhibiert die <i>C. amycolatum</i> -vermittelte Induktion der hBD-3 Genexpression.....	40
Abbildung 3.18: Cetuximab inhibiert die <i>C. amycolatum</i> -vermittelte Induktion der RNase 7 Gen- und Proteinexpression.....	41
Abbildung 3.19: AG1478 inhibiert die <i>C. amycolatum</i> -vermittelte Induktion der hBD-2 Genexpression.....	42
Abbildung 3.20: AG 1478 inhibiert die <i>C. amycolatum</i> -vermittelte Induktion der hBD-3 Genexpression.....	43
Abbildung 3.21: AG 1478 inhibiert die <i>C. amycolatum</i> -vermittelte Induktion der RNase 7 Gen- und Proteinexpression.....	44

8 Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Harder dafür bedanken, dass er mir dieses Thema überlassen hat und mich mit seinem fundierten Wissen bei der Planung und Durchführung dieser Experimente so tatkräftig unterstützt hat.

Ein besonders großes Dankeschön geht an, Frau Cornelia Wilgus, Frau Heilwig Hinrichs und insbesondere Dr. Franziska Rademacher, die mir mit so viel Geduld so viel beigebracht haben und immer ein offenes Ohr für alle Probleme auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit hatten. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen.

Frau Maj-Britt Hertz möchte ich ganz herzlich danken für ihre immerwährende Motivation und Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, Ute und Franz Kobinger, ohne deren Unterstützung nichts hiervon möglich gewesen wäre, meinem Mann Ali Shams, für all das Verständnis und die immerwährende Ermutigung weiterzumachen und meiner Schwester Isabelle Kobinger, für ihre liebevolle Unterstützung und Motivation.

Ich möchte diese Arbeit meinem Vater Franz Kobinger widmen, der ihre Fertigstellung leider nicht mehr miterleben konnte. Danke, dass Du immer für mich da warst.

9 Veröffentlichung

9.1 Originalarbeit

Walter, S., Rademacher, F., Kobinger, N., Simanski, M., Gläser, R., & Harder, J. (2017). RNase 7 participates in cutaneous innate control of *Corynebacterium amycolatum*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14383-z>