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

Untersuchungen zur rekombinanten Expression und biochemischen Eigenschaften des *C*-terminalen Profilaggrin-Fragments $FLG_{3880-4061}$

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Jonathan Hartmann

aus Oldenburg

Kiel, 2023

1. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. Thomas Schwarz
2. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly
Tag der mündlichen Prüfung:	13.06.2025
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 03.02.2025

gez.:

Prüfer:	Prof. Dr. Sascha Gerdes
	Prof. Dr. Jürgen Harder
Vorsitzende der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Franziska Theilig

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **5**
1. Einleitung **1**
1.1. Die Haut **1**
1.2. Aufbau der menschlichen Epidermis **1**
1.3. Die epidermale Differenzierung **2**
1.4. Cornified Cell Envelope und Corneocyte Lipid Envelope **3**
1.5. Die Immunabwehr der Haut **5**
1.6. Antimikrobielle Peptide **6**
1.7. Kationische intrinsisch ungeordnete Antimikrobielle Peptide (CIDAMPs) **7**
1.8. Die S100-Fused-Type-Protein-Familie **8**
1.9. Profilaggrin **9**
1.10. Zielsetzung der Arbeit **13**
2. Material und Methoden **15**
2.1. Chemikalien **15**
2.2. Vektoren **15**
2.3. Mikroorganismen und Zellkulturen **16**
2.4. Oligonukleotide **16**
2.5. Enzyme **16**
2.6. Nährmedien **17**
2.7. KITS **17**
2.8. Puffer und Lösungen **18**
2.9. Geräte **19**
2.10. Molekularbiologische Methoden **20**
2.10.1. Polymerase – Kettenreaktion (PCR) 20
2.10.2. Das Primerdesign der pSUMO3-Primer 21
2.10.3. Konzept der Nested-PCR 22
Primär-PCR 22
Sekundär-PCR 23
2.10.4. Kolonie-PCR 23
2.10.5. Agarose-Gelelektrophorese 24
2.10.6. Aufreinigung amplifizierter PCR-Fragmente 25
2.10.7. Klonierung 25
2.10.8. Ligation 26
2.10.9. Transformation 27
Transformation in chemisch kompetente *E. coli* TOP10F‘ und *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen 27
Transformation in elektrisch kompetente *E. coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen 28
2.10.10. Isolierung von Plasmid-DNA 29
2.10.11. DNA-Sequenzierung 29
2.10.12. Restriktionshydrolysen 29
2.11. Rekombinante Expression von $FLG_{3880-4061}$ in *E. coli* **30**
2.11.1. Struktur des Expressionsvektors 30
2.11.2. Durchführung der Expression des Fusionsproteins 31
2.12. Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins **32**
2.12.1. Lyse der Expressionsbakterien 32
2.12.2. Immobilisierende Nickel-Affinitätschromatographie 33
2.12.3. C8-Umkehrphasen-HPLC 33
2.12.4. Hydrolyse des Fusionsproteins 34
2.12.5. C4-Umkehrphasen-HPLC 34
2.12.6. C2/C18-Umkehrphasen HPLC 35
2.12.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen 35
2.12.8. Massenspektrometrie 36
Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie (ESI-MS) 37
Trypsinverdau und LysC-Verdau für MS-MS-Sequenzierung 37

Nanoelektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (NS-ESI-MS/MS) 38
2.12.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 38
Kolloidale Coomassie-Färbung 39
Zink-Imidazol-Färbung 39
3. Ergebnisse 41
3.1. Rekombinante Expression des $FLG_{3880-4061}$ Fragments 42
3.1.1. Amplifikation der $FLG_{3880-4061}$-Gensequenz mittels PCR 42
3.2. Klonierungen in verschiedenen Vektorsystemen und Zelllinien 43
3.2.1. Klonierung im pJet1.2/blunt- Vektorsystem 44
Ligation und Transformation in *E.coli* TOP10F'-Zellen 44
3.2.2. Klonierung im pSUMO3-Vektorsystem 45
Ligation und Transformation in *E.coli* TOP10F'-Bakterien 46
Transformation in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Bakterien 47
3.3. Expression der Fusionsproteine 48
3.3.1. Expressionen und Aufreinigung in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS 50
3.3.2. Transformation in *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen 54
3.3.3. Expressionen und Aufreinigung in *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen 55
3.3.4. Proteinanalyse nach Expression in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS 58
3.4. Proteolyse und Aufreinigung des trunkierten $FLG_{3880-4061}$ 59
3.4.1. Trypsinverdau und MS-MS-Sequenzierung 63
3.4.2. LysC-Verdau und MS-MS-Sequenzierung 65
3.4.3. Auswertung MS-MS-Sequenzierung 67
3.5. Antimikrobielle Testung 69
3.6. Analyse der Aminosäuresequenz 69
4. **Diskussion 70**
5. Zusammenfassung 79
6. Literaturverzeichnis 80
7. Anhang 86
7.1. Plasmid- und Vektorkarten 86
7.2. Protein- und Nukleotidsequenzen 88
7.2.1. Nukleotidsequenz $FLG_{3880-4061}$ 88
7.2.2. Proteinsequenz des Fusionsproteins 88
7.2.3. Proteinsequenz $FLG_{3880-4061}$ 88
7.2.4. Sequenzierungsdaten n. Ligation und Transformation in *E.coli* TOP10F' (Kol.1 + Kol.6) 89
7.2.5. Sequenzierungsdaten E.coli BL21 (DE3) pLysS und E.coli TOP10F' (Kol.7) 90
7.2.6. *In silico*-Analyse des FLG-*C*-Terminus 91
7.3. Klonierung im pGEM-T-Vektorsystem 91
7.3.1. Trypsinverdau – trunkiertes Fusionsprotein 93
7.3.2. Trypsinverdau – trunkiertes $FLG_{3880-4061}$ 94
7.3.3. LysC-Verdau – pSUMO3-Fusionstag 96
8. Danksagung 97
9. Erklärung 99

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielles Peptid
ANN	Artificial Neural Network
AS	Aminosäure
AU	″absorption unit″
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
CD	Cluster of differentiation
CE	Cornified Envelope
CID	Collision-induced dissociation
CIDAMP	Cationic intrinsically disordered Antimicrobial Peptides
CLE	Corneocyte Lipid Envelope
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DA	Discriminant Analysis
d.F.	der Fälle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EZM	Extrazellulärmatrix
FLG	Filaggrin
h	Stunde
hBD	humanes Beta-Defensin
HPLC	high performance liquid chromatography
IDP	intrinsisch ungeordnete Peptide
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LB	"Lysogenic Broth"
LEW	Lysis Equilibration Wash-Puffer
m	Meter
ml	Milliliter
m/V	Massenanteil in Flüssigkeit
M	molar
Mbp	Megabasenpaare
MDR	Multi-Drug-Resistenz
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
min	Minute
mM	millimolar
mRNA	"messenger“-RNA
MS	Massenspektrometrie
NK	Natürliche Killerzelle
NLR	NOD-like-Rezeptor
NS	Nanospray
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphate-Buffered Saline solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PRRs	Patern recognition receptors
QTOF	Quadrupol-Time-of-Flight
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOC	Super optimal broth
SPRR	Small proline-rich proteins
SVM	Support Vector Machine
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris-(2-chlorethyl)-Phosphat
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Transglutaminase
TLR	Toll-like-Rezeptor
Tm	Schmelztemperatur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TSB	"Tryptic soy broth"
U	Unit(s)
UCA	Urocainsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Die Haut

Die Haut nimmt als Hülle und Abgrenzung des Körperinneren gegenüber der Umwelt unter den Organen des menschlichen Körpers funktionell und für uns individuell einen besonderen Stellenwert ein.

Die Haut ist mit einer Oberfläche von 1-2 m^2 eines der größten Organe des menschlichen Körpers (Alonso & Fuchs 2003). Sie trägt auf vielfältige Art und Weise zur Erhaltung der Homöostase bei und verfügt über eine Vielzahl von Funktionen, die sich zum großen Teil aus ihrer besonderen Lage als Grenzorgan und der daraus resultierenden andauernden Exposition gegenüber den verschiedensten Umwelteinflüssen ableiten lassen.

Neben Aufgaben in der Thermoregulation, Nozizeption und peripheren Sensorik fällt der Barrierefunktion der Haut eine besondere Bedeutung zu. Die Differenzierung der Keratinozyten in der Epidermis zu leblosen Hornzellen ermöglicht die Bildung der Hornschicht als widerstandsfähigem Schutz vor mechanischen Kräften und Dehydratation durch Wasserverlust. Die Melaninproduktion der intraepithelialen Melanozyten schützt die Haut vor schädlicher UV-Strahlung. Außerdem verfügt die Haut über ein breites Spektrum an Effektoren des angeborenen und des erworbenen Immunsystems und bildet damit die erste Instanz der Keimabwehr.

1.2. Aufbau der menschlichen Epidermis

Die menschliche Haut besteht aus drei Schichten. Von superfizial nach zentral betrachtet liegen Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut). Die beiden erstgenannten bilden zusammen als Kutis die Haut im engeren Sinne.

Bei der Epidermis als eigentlicher Deckschicht des Körpers handelt es sich um ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel. Keratinozyten sind die hier vorherrschende Zellpopulation (Eckert, Crish et al. 1997). Ihr Differenzierungsprozess von vitalen prismatischen Zellen an der Basallamina zu Zellkernlosen, mechanisch und chemisch widerstandsfähigen Korneozyten (Hornzellen) an der Oberfläche als Ziel der epidermalen Differenzierung, führt zu einem Schichtbild bestehend aus vier Ebenen (Abbildung 1-1).

Die Zellschicht des *Stratum basale* liegt der Basallamina unmittelbar auf. Es besteht aus einer einzigen Lage prismatischer Zellen. Neben epidermaler Stammzellen sorgen hier vor allem Progenitor-Zellen durch mitotische Teilung für eine fortlaufende Neubildung aufsteigender Zellverbände (Alonso & Fuchs 2003). Darüber liegt das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht). Es umfasst etwa zwei bis fünf Lagen polygonaler Zellen. Das *Stratum granulosum* umfasst

meist drei Zelllagen. Als Charakteristikum weisen die Zellen in dieser Differenzierungsstufe Keratohyalingranula auf. Dabei handelt es sich um Korrelate der Aggregation zytoplasmatischer Zytokeratinfilamente im Rahmen des Verhornungsprozesses (1.3) zur leblosen Hornzelle.

Als oberflächliche Grenzschicht zur Außenwelt dient das *Stratum corneum* mit seinen Korneozyten. Abhängig von Lokalisation und mechanischer Beanspruchung umfasst es 25-100 Zelllagen. Korneozyten sind leblose polygonale Zellen sehr geringer Dicke (0,5 µm) ohne Zellkern oder Zellorganellen. Im Rahmen der Desquamation werden oberste Zelllagen fortwährend abgeworfen und durch nachrückende Zellen ersetzt. Der gesamte Differenzierungsprozess umfasst etwa einen Zeitraum von vier Wochen (Houben, De Paepe et al. 2007, Lüllmann-Rauch 2012).

1.3. Die epidermale Differenzierung

Grundstein der epidermalen Differenzierung sind epidermale Stammzellen. Sie liegen in Zellclustern im Bereich der Wulstregion des Haarfollikels (Lyle, Christofidou-Solomidou et al. 1998), der interfollikulären Epidermis und der Talgdrüsen (Ghazizadeh & Taichman 2001, Levy, Lindon et al. 2007). Neben der Bildung identischer Tochterzellen sind die Stammzellen in der Lage mittels asymmetrischer Teilung verschiedenste teilungsfreudiger Progenitor-Zelltypen zu bilden. Diese verlassen nach wenigen Zellteilungszyklen das *Stratum basale* und schlagen den Weg der terminalen Differenzierung ein (Braun & Watt 2004, Yan & Owens 2008).

Als Fundament des Verhornungsprozesses werden durch die epidermalen Zellen verschiedene Filament-Proteine exprimiert. Die proliferierenden Keratinozyten des *Stratum basale* exprimieren dabei vorwiegend die Keratine K5 und K14 (Fuchs & Cleveland 1998). Mit Beginn der terminalen Differenzierung verlieren die meisten Keratinozyten durch eine komplexe Transkriptionskontrolle ihre Fähigkeit zur Proliferation und kappen ihre Verankerung zur Basallamina (Hoffjan & Stemmler 2007). Im *Stratum spinosum* nimmt die Expression von K1- und K10-Filamenten zu. Sie ersetzen sukzessive das vorbestehende K5-K14-Netzwerk (Candi, Schmidt et al. 2005). Zusammen bilden sie 10 nm dicke Zytokeratinfilamente (KIFs). Innerhalb der Zelle erstrecken sich die Zytokeratinfilamente von den Desmosomen an der Zellwand zur Zellkernmembran. Mit den Mikrotubuli und Aktinfilamenten bilden sie das Zytoskelett der Epithelzelle (Candi, Schmidt et al. 2005). Plakine wie Envoplakin, Periplakin und Desmoplakin verbinden die Intermediärfilamente mit den Desmosomen (Ruhrberg, Hajibagheri et al. 1997) und bilden zusammen mit dem Protein Involucrin im *Stratum spinosum* den Startpunkt für die Bildung des „Cornified Envelope“ (Kypriotou, Huber et al. 2012) (1.4). Nach der Zellwanderung vom *Stratum spinosum* in das *Stratum granulosum* produzieren die Keratinozyten elektronendichte Keratohyalingranula, die zum überwiegenden Teil das in

dieser Arbeit untersuchte 400 kDA große Strukturprotein Profilaggrin enthalten (Fuchs 2007, Hoffjan & Stemmler 2007). Nach Dephosphorylierung und Spaltung durch Serin-Proteasen wird Profilaggrin zu 37 kDa großen Filaggrin-Monomeren prozessiert (1.9). Sie binden an den Keratin-Filamenten des Zytoskeletts, kondensieren sie und sorgen so für eine Verdichtung der Zelle hin zur abgeflachten hexagonalen Form der Korneozyten im *Stratum corneum* (Sandilands, Sutherland et al. 2009). Beim Übergang vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum* werden aus lebendigen Keratinozyten leblose abgeflachten Korneozyten. Die Zellen werden metabolisch inaktiv und es kommt zur koordinierten Degradierung der Zellorganellen mit Verlust des Zellkerns (Lippens, Denecker et al. 2005). Die Korneozyten verweilen in dieser Zellschicht etwa 14 Tage bis sie koordiniert abgeschilfert werden. Der Korneozyt stellt dabei das Ziel der terminalen Differenzierung dar.

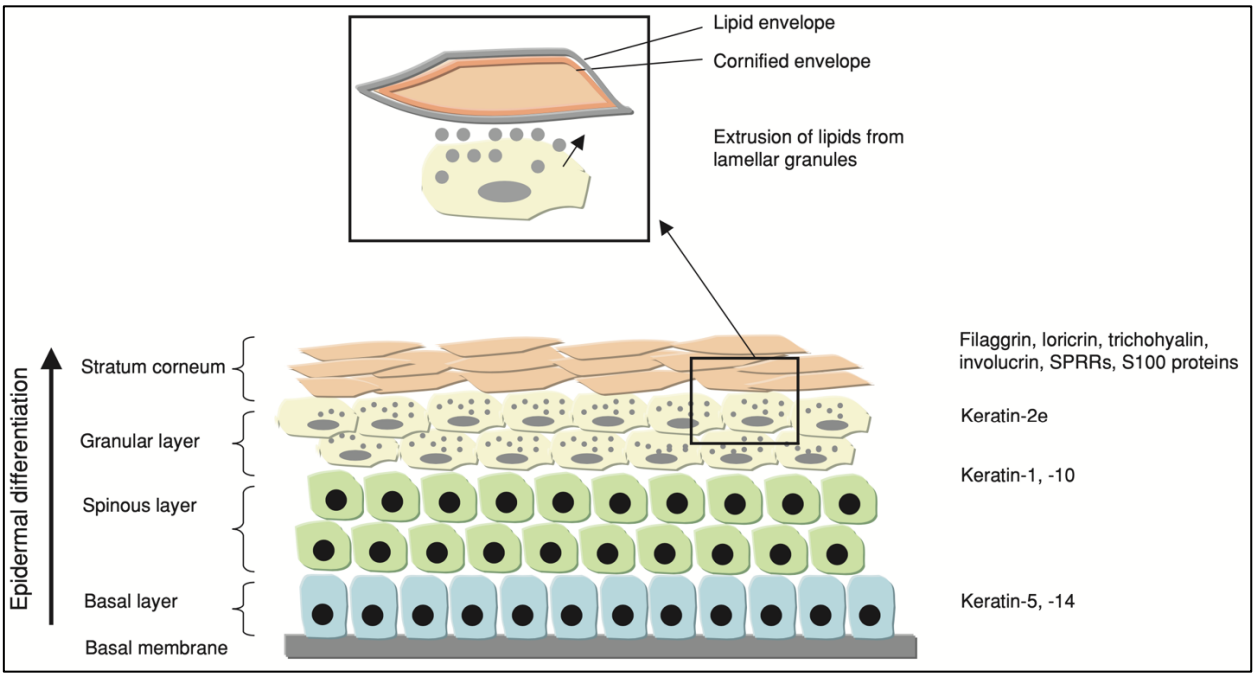


Abbildung 1-1 Aufbau und Differenzierung der menschlichen Epidermis. *Keratinozyten durchwandern nach Prolifaration im Stratum basale („basal layer") die Zellschichten Stratum spinosum („spinous layer") und Stratum granulosum („granular layer"). Im Rahmen der terminalen Differenzierung ändert sich die Keratinstruktur der Zellen. Im Stratum corneum haben die Korneozyten den Zellkern abgelegt und eine Hornhülle („Cornified Envelope") ausgebildet, die zusammen mit extrazellulären Lipiden aus den Lamellarkörperchen („lamellar granules") eine widerstandsfähige Wasserbarriere bilden (Hoffjan and Stemmler 2007).*

1.4. Cornified Cell Envelope und Corneocyte Lipid Envelope

Beim „Cornified Envelope" (CE) handelt es sich um eine unlösliche proteinreiche Verbundstruktur von 5-20 nm Dicke, die mit fortschreitender Differenzierung der Keratinozyten zu den Hornzellen des *Stratum corneum* langsam die Zellmembran ersetzt und mechanisch

besonders widerstandsfähig ist (Kalinin, Marekov et al. 2001).

Das Protein Involucrin kleidet in Verbindung mit den Plakinen die gesamte innere Oberfläche der Plasmamembran aus und bildet so eine Schablone für den weiteren Aufbau des „Cornified Envelope“ (Ruhrberg, Hajibagheri et al. 1997, Kalinin, Marekov et al. 2001). Im *Stratum granulosum* werden weitere Vorläuferproteine des „Cornified Envelope“ synthetisiert und anschließend kreuzverbunden (Candi, Schmidt et al. 2005). Die charakteristische Widerstandsfähigkeit und Unlöslichkeit der Hornhülle (CE) beruht dabei auf der Bildung sehr stabiler Isopeptid-Querverbindungen zwischen den einzelnen CE-Proteinen einerseits und andererseits zwischen dem Zytoskelett der Hautzellen und den CE-Proteinen unterhalb der Zellwand. Katalysiert werden die Querverbindungen durch die Transglutaminasen TG1, TG3 und TG5 (Lorand & Graham 2003).

Parallel zur terminalen Differenzierung der Keratinozyten mit der Konstruktion des „Cornified Envelope“ verschwindet zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* die Plasmamembran der Zellen. Eine einschichtige Lipidmembran, der „Corneocyte Lipid Envelope (CLE)“ tritt stattdessen außerhalb der Zelle an ihre Stelle (Elias, Gruber et al. 2013). Diese einschichtige Lipidmembran scheint dabei als Schablone für die Anordnung einer mehrschichtigen Lipidmatrix zu fungieren, welche für die Haut einen entscheidenden Anteil an der Vermittlung der Funktion als Wasserbarriere hat (Kypriotou, Huber et al. 2012, van Smeden, Janssens et al. 2013).

Die Synthese der Vorstufen zu den Extrazellulärmatrix (EZM)-Lipiden erfolgt überwiegend in den unteren Schichten der Epidermis. Etwa ab Höhe des oberen *Stratum spinosum* erfolgt der Einbau in die sogenannten Lamellarkörperchen (Houben, De Paepe et al. 2007). Diese transportieren verschiedenste Enzyme und Antimikrobielle Peptide, wie Beta-Defensin 2 und Cathelicidin LL-37 (Madison 2003, Feingold & Elias 2013) und fusionieren im oberen *Stratum granulosum* mit der Zellmembran, sodass ihr Inhalt den Extrazellularraum sekretiert wird.

Zusammengefasst beginnt der Prozess der Verhornung im *Stratum spinosum* mit der Bildung einer unreifen Hornhülle unterhalb der Plasmamembran der Keratinozyten. Im Verlauf reift diese Hülle auf dem Weg ins *Stratum corneum* durch kovalente Anbindung der verschiedenen CE- Vorläufermoleküle zu der unnachgiebigen Struktur, die als „Cornified Envelope“ bezeichnet wird. Die Korneozyten bilden zusammen mit den hydrophoben Eigenschaften des „Corneocyte Lipid Envelope“ und den assoziierten mehrschichtigen Lipidlamellen des Extrazelluräraumes eine Funktionseinheit, die der Haut ihre charakteristische Widerstandsfähigkeit verleiht und dem Körper als Wasserbarriere dient („Brick & Mortar“-Prinzip, (Nemes & Steinert 1999))

1.5. Die Immunabwehr der Haut

Als Grenzorgan zur Umwelt ist die menschliche Haut neben einer Reihe physikalischer und chemischer Einflüsse auch verschiedensten Mikroorganismen ausgesetzt. Auf der Oberfläche der Epidermis beherbergt die Haut je nach Lokalisation zwischen 10^2 bis 10^7 Mikroorganismen pro cm^2 (Schröder & Harder 2006). Als Kommensale bilden Bakterien, Pilze und Viren zusammen das Mikrobiom der Haut. Jedoch beherbergt die Haut auch verschiedenste pathogene Mikroorganismen und stellt damit die erste Barriere in der Keimabwehr dar (Schröder & Harder 2006, Byrd, Belkaid et al. 2018).

Die intakte Haut verfügt vermittelt durch den „Cornified Cell Envelope“ und den „Corneocyte Lipid Envelope“ über physikalische Barriereeigenschaften. Zusätzlich erschweren der saure pH-Wert der Hautoberfläche (pH 4,1 bis 5,8) (Elias 2005, Proksch 2018) die Desquamation und eine kontinuierliche Schleimproduktion des Mukosa-Epithels an Schleimhäuten der inneren Hohlorgane die Invasion von pathogenen Keimen in den menschlichen Organismus. Darüber hinaus verfügt die Haut durch enge Verknüpfung mit den unterschiedlichen Teilkomponenten des Immunsystem über Eigenschaften einer biochemischen Barriere. Das Immunsystem lässt sich in das angeborene (natürliche) Immunsystem und in das erworbene (adaptive) Immunsystem unterteilen.

Die Abwehrmechanismen des angeborene Immunsystems greifen bereits bei Erstkontakt mit einem Antigen und umfassen von Geburt an ein breites Arsenal an Effektoren. Die Abwehrreaktion der angeborenen Immunität kann sowohl zellvermittelt als auch in löslicher Form durch die humorale Immunabwehr erfolgen. Beispiele für die humorale Abwehr sind das Komplementsystem oder lösliche Antimikrobielle Peptide, wie dem in Körpersekreten gelösten Lysozym (Fleming 1922). Zu den Abwehrzellen der zellvermittelten angeborenen Immunabwehr gehören als Beispiele Natürliche Killer (NK) -zellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Zu ihren Aufgaben zählen Identifikation, Phagozytose und Zytolyse von Pathogenen oder entarteten/infizierten Körperzellen. Phagozytierte Pathogene können prozessiert und deren Antigene anschließend Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert werden, um eine auf das Pathogen zugeschnittene Immunantwort auszulösen. In der Epidermis wird diese Funktion von Langerhans-Zellen eingenommen, die in regelmäßigen Abständen von 500 Zellen pro mm^2 (Langerhans 1868) zwischen den Keratinozyten liegen und ein lückenloses Abfangnetz für Antigene bilden. Über Zytokine und Chemokine sind die Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage die Immunantwort des menschlichen Körpers zu modulieren, weitere Immunzellen an den Ort der Entzündung zu beordern oder zum Beispiel die Bildung Antimikrobieller Peptide, wie das humane ß-Defensin 2 (hBD2), zu induzieren (Harder, Bartels et al. 1997). Zusammen mit Cathelicidin LL37 wird hBD2 beispielsweise aus den Lamellarkörperchen des *Stratum granulosum* in die extrazelluläre Lipidmatrix des CLE abgegeben (Elias 2005).

Das adaptive Immunsystem ist eng mit der Funktion des angeborenen Immunsystems verzahnt. Seine Aufgabe besteht darin, nach Antigenkontakt eine möglichst passgenaue und effiziente Immunantwort auf das Pathogen zu entwickeln und ein „immunologisches Gedächtnis“ auszubilden, um im Falle eines erneuten Kontakts mit dem gleichen Pathogen schnell auf diese passgenaue Immunantwort in Form von spezifischen Antikörpern zurückgreifen zu können. Die Bildung dieser spezifischen Antikörper nach Erstkontakt benötigt jedoch Zeit, sodass die Keimabwehr in der Frühphase einer Infektion durch das angeborene Immunsystem getragen wird (Lüllmann-Rauch 2012).

In der Haut greifen die Prozesse der angeborenen und erworbenen Immunabwehr ineinander. Bei Pathogenkontakt in der Epidermis beispielsweise wandern Langerhans-Zellen nach Phagozytose des Pathogens über Lymphbahnen in die Lymphknoten der Subkutis, präsentieren das prozessierte Antigen und initiieren die Lymphozytenrreifung, während Antimikrobielle Peptide die Haut direkt durch ihre antimikrobielle Wirkung schützen können.

1.6. Antimikrobielle Peptide

Bei der heterologen Gruppe der Antimikrobielle Peptide (AMP) handelt es sich um kleine, evolutionsgenetisch hochkonservierte Moleküle, die in der angeborenen Immunabwehr von Pflanzen, Intervertebraten und Vertebraten gegen Viren, Bakterien, Protozoen, Pilze und sogar Tumorzellen eine Schlüsselrolle einnehmen (Izadpanah & Gallo 2005, Tornesello, Borrelli et al. 2020).

Antimikrobielle Peptide finden sich beim Menschen in allen Körpergrenzen zur Außenwelt wie Epidermis, Dermis, Schleimhäuten, dem Gastrointestinal- und dem Urogenital-Trakt, im Lymphatischen System und in Sekreten (Moravej, Moravej et al. 2018).

Die Klassifikation der Antimikrobiellen Peptide kann sowohl nach AMP-Familien wie Defensine, Cathelicidine, S100-Proteine, Ribonucleasen und nicht klassifizierbare Antimikrobielle Peptide (Harder, Gläser et al. 2007) oder nach Sekundärstruktur α-helikal, β-Faltblatt, $\alpha\beta$-Mischformen und „Linear-Extended-Peptide“ erfolgen (Hancock & Diamond 2000, Zasloff 2002, Koehbach & Craik 2019).

Trotz ihrer Diversität weisen in der Gruppe der Antimikrobiellen Peptide viele Moleküle Gemeinsamkeiten auf. So verfügen viele AMP über einen hohen Anteil an den basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin und sind damit kationisch geladen. Sie besitzen in ihrem natürlichen Umfeld im Vergleich zum dortigen pH-Milieu eine positive Nettoladung von +2 bis +9, sind typischerweise kurz (12-100 Aminosäuren) und besitzen häufig eine amphipathische Tertiär-Struktur, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Domänen beinhaltet. Während die hydrophoben Anteile die Passage durch Lipidmembranen ermöglichen, erlaubt die positive Ladung der hydrophilen Domänen eine Interaktion mit den negativ geladenen Bakterienmembranen (Izadpanah & Gallo 2005, Jenssen, Hamill et al.

2006, Browne, Chakraborty et al. 2020). Die meisten AMPs verfügen über eine direkt-schädigende Wirkung auf das Pathogen. Darüber hinaus können AMPs auch immunmodulierend wirksam sein und so unter anderem neutrophile Granulozyten rekrutieren, immunkompetente T-Zellen mobilisieren oder die Komplement-Kaskade aktivieren (Schröder & Harder 2006, Moravej, Moravej et al. 2018). Während viele Antimikrobielle Peptide kontinuierlich produziert werden, konnte anhand des humanen ß-Defensin 2 (hBD-2) erstmals gezeigt werden, dass die Bildung Antimikrobieller Peptide auch durch IL-1, TNF-α oder auch INF-ɣ induzierbar sein kann (Harder, Bartels et al. 1997, Harder & Schröder 2005).

Die antimikrobielle Wirkung und die Angriffspunkte der verschiedenen AMPs sind komplex und können in Membran-zerstörende und nicht-Membran-zerstörende Wirkmechanismen unterschieden werden. (Kacprzyk, Rydengard et al. 2007). Während initial hauptsächlich eine zytotoxische Wirkung durch Porenbildung auf pathogene Mikroorganismen nach elektrostatischer Interaktion mit deren Lipidmembran diskutiert wurde (Kagan, Selsted et al. 1990, Sato & Feix 2006), bestehen heute umfassende Kenntnisse über weitere Wirkmechanismen. So vermittelt beispielsweise das „S100-Protein“ Psoriasin seine antimikrobielle Wirksamkeit über die Bindung und damit Entzug des für den bakteriellen Metabolismus essenziellen Zink-Ions (Gläser, Köten et al. 2011). Auch die Wirkweise des „S100-Fused-Type“-Proteins Filaggrin-2 beruht nicht auf Porenbildung und Membranzerstörung, sondern auf einem Eingriff in die bakterielle Replikation (Hansmann, Schröder et al. 2015). Indolicidin aus bovinen neutrophilen Granulozyten verhindert ebenfalls die bakterielle Replikation, indem es an der bakteriellen DNA bindet und die DNA-Synthese stört (Hsu, Chen et al. 2005). Das aus ekkrinen Schweißdrüsen ausgeschüttete hochwirksame Dermcidin vermittelt seine antimikrobielle Wirksamkeit ebenfalls nicht über Porenbildung und ist dazu ein anionisches AMP (Schittek 2012).

1.7. Kationische intrinsisch ungeordnete Antimikrobielle Peptide (CIDAMPs)

Die Gruppe der „Cationic Intrinsically Disorderd Antimicrobial Peptides“ (CIDAMPs) gehört zu einer neuen Klasse epithelialer Peptid-Antibiotika mit hoher antimikrobieller Aktivität gegen verschiedene Pathogene wie *Pseudomonas aeruginosea*, *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* und *Candida albicans* (Gerstel, Latendorf et al. 2018). Entdeckt wurden sie in *Stratum corneum*-Extrakten als degradierte Fragmente des S100 „fused-type“- Proteins Hornerin, welches zu 95% aus stark kationischen sich wiederholenden Glycerin- und Serin-reichen Domänen besteht (Wu, Meyer-Hoffert et al. 2009). Sie wirken an der Hautoberfläche. Das ubiquitäre Vorkommen potenzieller CIDAMP-Quellen in der Natur suggeriert einen verbreiteten Einsatz in der angeborenen Keimabwehr (Latendorf, Gerstel et al. 2019).

Anders als bei vielen amphipathischen AMPs ist die Wirksamkeit der kationischen intrinsisch ungeordneten AMPs nicht zwingend an eine bestimmte Tertiärstruktur gebunden. Als lineare Peptide sind die CIDAMPs auch ohne spezifische Tertiärstruktur hochgradig antimikrobiell wirksam. Die antimikrobielle Wirkung der verschiedenen CIDAMPs richtet sich dabei u.a. gegen verschiedene Angriffspunkte der bakteriellen Proteinsynthese. So konnten elektrononenmikroskopisch beispielsweise verschiedene mikrobielle Ribosomen als Ziel identifiziert werden. Die Aufnahme der CIDAMPs in die Zelle scheint ein aktiver Prozess zu sein und führt zur Bildung toxischer Proteinaggregate im bakteriellen Zytoplasma und damit zum Zelltod. Anders als bei amphipathischen Poren-bildenden Antimikrobiellen Peptiden fanden sich elektronenmikroskopisch keine Zeichen einer Porenbildung der mikrobiellen Lipidmembran (Gerstel, Latendorf et al. 2018). Die Stärke der antimikrobiellen Wirksamkeit gegen verschiedene Keimspektren hängt dabei hauptsächlich von der Aminosäurezusammensetzung, dem Anteil der positiven Ladungen des Peptids und seiner Länge, sowie einer potenziellen Palmitoylierung (posttranslationale Modifikation, bei der Palmitinsäure an Cystein-Reste gebunden wird) ab. So konnte anhand von rekombinant exprimierten und synthetisch erzeugten Hornerin-Polypeptiden für *Pseudomonas aeruginosa* erstmals gezeigt werden, dass der Grad der bakteriziden Wirkung von einem hohen Verhältnis „Unordnung-fördernder Aminosäuren“ (Arginin, Asparaginsäure, Glutamin, Glumatinsäure, Glycin, Hisitidin, Lysin, Proline, Serin) zu „Ordnung-fördernder Aminosäuren“ (Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryphtophan) abhängig ist. Weitere Einflussfaktoren für antimikrobielle Wirksamkeit gegen *Pseudomonas aeruginosa* sind zudem eine hohe positive Nettoladung, also ein Überschuss kationischer Aminosäuren, bei normalem Haut pH-Wert (5.5) und eine kurze Peptidlänge (Latendorf, Gerstel et al. 2019).

Obwohl die CIDAMPSs anhand des „S100 Fused Type“ Proteins Hornerin entdeckt wurden, sind fast 30% aller natürlich vorkommenden Proteine „intrinsisch ungeordnete Peptide“ (IDP) oder enthalten „intrinsisch ungeordnete Peptidregionen“ (IDPR) (Uversky 2013). Da die bisher identifizierten CIDAMPs ihren Beitrag zur angeborenen Keimabwehr ähnlich einer Desinfektion an der Hautoberfläche verrichten, stellt sich die Frage, ob weitere Hautstrukturproteine an der Bildung der oberflächlichen Keimabwehr beteiligt sein könnten. Die Analyse weiterer Mitglieder der „S100 Fused Type“ Proteinfamilie zeigt, dass Proteine wie Filaggrin 2, Repetin und das in dieser Arbeit untersuchte Profilaggrin als IDP identifiziert werden können oder IDPR enthalten (Latendorf, Gerstel et al. 2019).

1.8. Die S100-Fused-Type-Protein-Familie

Auf dem Genlocus 1q21 auf Chromosom 1 liegt eine etwa 1,9 Mbp umfassende Genregion, die als „Epidermaler Differenzierungskomplex“ bezeichnet wird. Hier befinden sich eng benachbart ein Großteil der Gene, die bedeutende Funktionen in der terminalen

Differenzierung der menschlichen Epidermis innehaben. Aufgeteilt in Cluster können vier Genfamilien unterschieden werden (Marenholz, Volz et al. 1996, Jackson, Tilli et al. 2005). Neben der Genfamilie für die „Late Cornified Envelope“-Proteine, den „Small Proline-rich“-Protein-Genen und den Genen der Calcium-bindenden „S100-Proteine“, liegt hier das Gencluster, welches für die „S100-Fused-Type-Protein“-Familie codiert (Mischke, Korge et al. 1996, Cabral, Voskamp et al. 2001).

Zu den Proteinen der „S100-Fused-Type“-Familie gehören Trichohyalin (Lee, Kim et al. 1993), Trichohyalin-like 1 (Wu, Latendorf et al. 2011), Cornulin (Contzler, Favre et al. 2005), Repetin (Krieg, Schuppler et al. 1997), Hornerin (Makino, Takaishi et al. 2001), Filaggrin-2 (Wu, Hansmann et al. 2009) und das in dieser Arbeit untersuchte Profilaggrin (Presland, Haydock et al. 1992). Der Name der „S100-Fused-Type“-Proteine resultiert dabei aus der Kombination charakteristischer Merkmale der anderen Genfamilien. In ihrer Struktur weisen die „S100-Fused-Type“-Proteine ähnlich den “Cornified Cell Envelope Precursor“-Proteinen zentral individuell unterschiedlich lange Tandem-Wiederholungen auf. In der genomischen Sequenz ähneln sie den S100-Proteinen und sind wie diese in der Lage über ihre amino-terminal gelegenen S100- und EF-Hand-Domänen Calcium zu binden. Die „S100-Fused-Type“-Gene bestehen dabei aus zwei Introns und werden von drei Exons flankiert. Einem etwa 50 bp kleinen untranslatierten Exon 1, dem mit etwa 150 bp etwas größeren Exon 2, welches das Translationsstartkodon enthält und für die S100-Domäne kodiert, sowie dem großen Exon 3, das die Gensequenz für die EF-Hand-Domäne und zentralen Tandemsequenz-Wiederholungen enthält (Segre 2006, Wu, Hansmann et al. 2009).

1.9. Profilaggrin

Profilaggrin ist mit einem Gewicht von mehr als 400 kDa eines der größten Proteine der menschlichen Epidermis. Es gehört zur „S100-Fused-Type“-Familie und wird als unlösliches hoch phosphoryliertes Protein ab dem *Stratum granulosum* exprimiert (Resing, Thulin et al. 1995). Profilaggrin wird in den für diese Zellschicht charakteristischen F-Keratohyalin-Granula gelagert (Steinert, Cantieri et al. 1981, Steven, Bisher et al. 1990). Es dient als „Precursor“-Protein für das später durch Proteolyse freigesetzte Filaggrin.

Profilaggrin wird im menschlichen Genom über das *FLG*-Gen codiert. Dieses liegt wie die übrigen Gene des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ auf dem Chromosom 1q21 (McKinley-Grant, Idler et al. 1989, Mischke, Korge et al. 1996). Wie bereits unter 1.9 für diese Genfamilie beschrieben, besteht auch Profilaggrin aus drei Exons und zwei Introns. Das erste Exon umfasst lediglich 54 bp und wird nicht translatiert. Die kodierende Sequenz ist aufgeteilt in Exon 2 und Exon 3. Während sich Exon 2 über 159 bp erstreckt und das Startkodon, sowie die S100-Domäne enthält, liegt der Hauptteil der kodierten Geninformation für die langen Filaggrin-Monomere (jeweils 972 bp) zusammen mit der 3’-untranslatierten Region in Exon 3

(Abbildung 1-2)(Presland, Haydock et al. 1992, Markova, Marekov et al. 1993). Je nach Genotyp kodiert das FLG-Gen für 10-12 *Repeats* gleicher Länge, die sich nur minimal anhand von „Single-Nucleotide-Polymorphisms“ (SNP’s) unterscheiden (Gan, McBride et al. 1990). Mittels Sequenzierung konnten die unterschiedlichen Anzahlen der Filaggrin-*Repeats* entweder auf ein Duplikat des *Repeats* 8 (elf *Repeats*) oder auf Duplikate der *Repeats* 8 und 10 (zwölf *Repeats*) zurückgeführt werden (Sandilands, Terron-Kwiatkowski et al. 2007).

Humanes Profilaggrin ist Histidin-reich und besteht (je nach Genotyp) aus etwa 4060 Aminosäuren. Die zehn bis zwölf Filaggrin-Einheiten machen mit je 324 Aminosäuren pro *Repeat* den Großteil der Proteinmasse aus. Die Region der Filaggrin-*Repeats* wird auf beiden Seiten von zwei trunkierten Filaggrin-Sequenzen sowie einer *N*- und einer *C*-terminalen Einheit flankiert. (McKinley-Grant, Idler et al. 1989, Gan, McBride et al. 1990, Presland, Haydock et al. 1992). Das Profilaggrin-Molekül zeigt nach Expression und Einlagerung in den elektronendichten F-Keratohyalin-Granula im *Stratum granulosum* in seiner hoch phosphorylierten und unlöslichen Form keine Keratin-bindenden Eigenschaften. Erst nach Dephosphorylierung und Proteolyse in multiple Filaggrin-Monomere am Übergang zum *Stratum corneum* ist es in der Lage die Intermediärfilamente der Keratinozyten zu binden (Lonsdale-Eccles, Teller et al. 1982) und die Filamente parallel als dicht gepackte Aggregate anzuordnen und zu bündeln. Dieser Prozess führt zum Kollaps des Zytoskeletts hin zur abgeflachten Form der Korneozyten und ermöglicht erst die ausgeprägte Quervernetzung der Zytokeratinfilamente, die den Korneozyten ihre Widerstandsfähigkeit verleiht (Dale, Presland et al. 1997, Lorand & Graham 2003, Sandilands, Sutherland et al. 2009). Jedes Filaggrin-*Repeat* verfügt über eine kurze Linker-Region als Zielsequenz für die proteolytische Spaltung in die einzelnen Filaggrin-Monomere. An der Prozessierung von Profilaggrin mit Abspaltung der Filaggrin-Einheiten, des *N*- und des *C*-Terminus scheinen verschiedene Proteasen und auch der *C*-Terminus selbst beteiligt zu sein. So werden Beteiligungen der Proteasen wie Kallikrein 5 (Sakabe, Yamamoto et al. 2013), SASPase (Matsui, Miyamoto et al. 2011), Matriptase (List, Szabo et al. 2003), Prostasin (Leyvraz, Charles et al. 2005) Endoproteinase 1 (Resing, Thulin et al. 1995) ,μ-calpain (Yamazaki, Ishidoh et al. 1997), Furin und PACE 4 (Pearton, Nirunsuksiri et al. 2001) diskutiert, der genaue Weg der Aufspaltung Profilaggrins bleibt jedoch weiterhin Gegenstand der Forschung. Nach der proteolytischen Spaltung in Monomere erfolgt im Verlauf eine weitere Prozessierung des Filaggrins. Zuerst kommt es zu einer Citrullinierung der Arginine in der Aminosäuresequenz durch Peptidylarginin-Deiminasen (Tarcsa, Marekov et al. 1996), bevor die Filaggrin-Moleküle durch Caspase 14 weiter degradiert werden (Denecker, Hoste et al. 2007) und an der Hautoberfläche als hygrokoskopisch wirksame Aminosäuren, sogenannte „natural moisturising factors“, zum natürlichen Feuchtigkeitsfilm der Haut beitragen (Rawlings & Harding 2004, Sandilands, Sutherland et al. 2009). Durch den Reichtum an der Aminosäure Histidin ist der Abbau von Profilaggrin über die Filaggrin-Histidin-Urocaninsäure-Kaskade darüber hinaus an der

Entstehung des natürlichen sauren Hautmilieus beteiligt. Die Urocaninsäure (UCA) selbst trägt als Photoisomer nach UVB-Exposition über Umwandlung von trans- zu cis-UCA zum natürlichen Schutz vor UV-Strahlung bei und ist an der UV-bedingten Immunsuppression beteiligt. (Schwarz 2005, Fluhr, Elias et al. 2010, Proksch 2018). Neben der Beeinflussung des Hautmilieus und damit des Mikrobioms der Haut scheint Profilaggrin auch aktiv als Effektor der angeborenen Immunität in die Keimabwehr einzugreifen. So konnten in unserer Arbeitsgruppe in radialen Plattendiffusionstests mehrere antimikrobiell wirksame Profilaggrin-Fragmente identifiziert werden. Im Bereich des *N*-Terminus zeigte das Fragment $FLG_{123-200}$ antimikrobielle Wirksamkeit gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* (Schulz 2010). Das Fragment FLG_{87-197} ist zusätzlich noch gegen *Pseudomonas aeruginosa* wirksam (Karsch 2011). Weitere Domänen mit antimikrobieller Aktivität konnte Hartnagel 2018 im Verbindungsbereich zwischen *Repeat* 1 und *Repeat* 2 ($FLG_{764-903}$) und im Bereich des *Repeat* 8 ($FLG_{2849-2900}$) identifizieren. Sie waren wirksam gegen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* ($FLG_{764-903}$) bzw. gegen *Escherichia coli* und *Candida albicans* ($FLG_{2849-2900}$).

Das *N*-terminale Ende Profilaggrins besteht aus 293 Aminosäuren und kann in zwei Subdomänen unterteilt werden. Die A-Domäne besteht aus 81 Aminosäuren und enthält mit dem EF-Hand- und dem S100-Motiv zwei Ca^{2+}-bindende Abschnitte. *In vitro* Versuche konnten Konformationsänderungen des Profillaggrin-Moleküls in Abhängigkeit der Calcium-Konzentration zeigen (Presland, Bassuk et al. 1995). In der Epidermis steigt der intrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel von *Stratum basale* bis *Stratum ganulosum* stetig an (Menon, Grayson et al. 1985). Dieser steigende Ca^{2+}-Gradient nimmt in der Regulation der epidermalen Differenzierung eine Schlüsselrolle ein (Elias, Ahn et al. 2002, Komuves, Oda et al. 2002) und scheint auch in der Prozessierung von Profilaggrin einen wichtigen Stellenwert innezuhaben (Sandilands, Sutherland et al. 2009). Die B-Domäne besteht aus 212 Aminosäuren. Sie enthält eine Sequenz, die in den terminalen Differenzierungsschritten der Keratinozyten zur Translokation der *N*-terminalen-Domäne in den Zellkern führt und scheint dort an der Denukleation der kernhaltigen Keratinozyten beteiligt zu sein. Mittels immunhistochemischer Färbung konnte die *N*-terminale Domäne Profilaggrins noch in den apoptotischen Zellkernen des Übergangstadiums vom vitalen Keratinozyten zum kernlosen Korneozyten zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* nachgewiesen werden (Ishida-Yamamoto, Takahashi et al. 1998, Pearton, Dale et al. 2002, Zhang, Karunaratne et al. 2002).

Das *C*-terminale Ende des menschlichen Profilaggrins besteht aus 157 Aminosäuren (Presland, Kimball et al. 1992) und wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Die genaue Funktion dieser Domäne ist bisher nicht hinreichend geklärt. Daten verschiedener Studien legen nahe, dass der *C*-Terminus eine bedeutende Funktion in der Prozessierung von Profilaggrin in die multiplen Filaggrin-Monomere zu haben scheint und über diese Funktion an der Entstehung verschiedener dermatologischer Krankheitsbilder wie erblichen Formen *der*

Ichthyosis vulgaris beteiligt ist oder die Entwicklung von atopischer Dermatitis und allergischem Asthma begünstigt (Sandilands, O'Regan et al. 2006). Bei Patienten mit *Ichthyosis vulgaris*, einem Gendefekt, der zu trockener und schuppender Haut führt, konnten Null-Mutationen im *FLG*-Gen identifiziert werden, die zu trunkierten Profilaggrin-Molekülen mit fehlendem *C*-Terminus führen. Obwohl die verkürzten Profilaggrin-Moleküle teils über bis zu zehn Filaggrin-Einheiten verfügen, können die Profilaggrin-Moleküle nicht zu Filaggrin-Monomeren prozessiert werden. Diese Patienten verfügen über ein deutlich verschmälertes *Stratum granulosum* (Nomura, Sandilands et al. 2007, Sandilands, Terron-Kwiatkowski et al. 2007). Modellorganismus für dieses Krankheitsbild ist die „Flaky tail“ Maus mit autosomal vererbter 1-bp Deletionsmutation im Exon 3 des murinen Profilaggrin-Gens (Presland, Boggess et al. 2000, Moniaga, Egawa et al. 2010). Ihr Phänotyp zeigt ein trockenes, feinschuppiges Hautbild mit verstärkter Linienzeichnung an Schwanz und Pfoten. Bei der Maus führt die Deletion zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einer fehlerhaften Profilaggrin-Expression. Es entsteht gegenüber der Norm (≈ 500 kDa) ein abnormal trunkiertes Profilaggrin-Molekül mit deutlich geringerer Masse (≈ 215 kDa) (Fallon, Sasaki et al. 2009). Dieses kann im Rahmen der epidermalen Differenzierung proteolytisch nicht in seine Filaggrin-Monomere aufgespaltet werden. Dagegen führt das Filaggrin-Defizit in der Maus analog zu einem Defizit in der menschlichen Epidermis zum Krankheitsbild der *Ichthyosis vulgaris* (Presland, Boggess et al. 2000). Bei Patienten mit *Ichthyosis vulgaris* scheint dieser Filaggrin-abhängige Defekt zusätzlich den Transfer von Antigenen über die Hautbarriere zu ermöglichen und so über eine IgE-abhängige kutane Inflammation den Hauptmechanismus für die Entwicklung einer Filaggrin-abhängigen atopischen Dermatitis darzustellen (Fallon, Sasaki et al. 2009, Moniaga, Egawa et al. 2010).

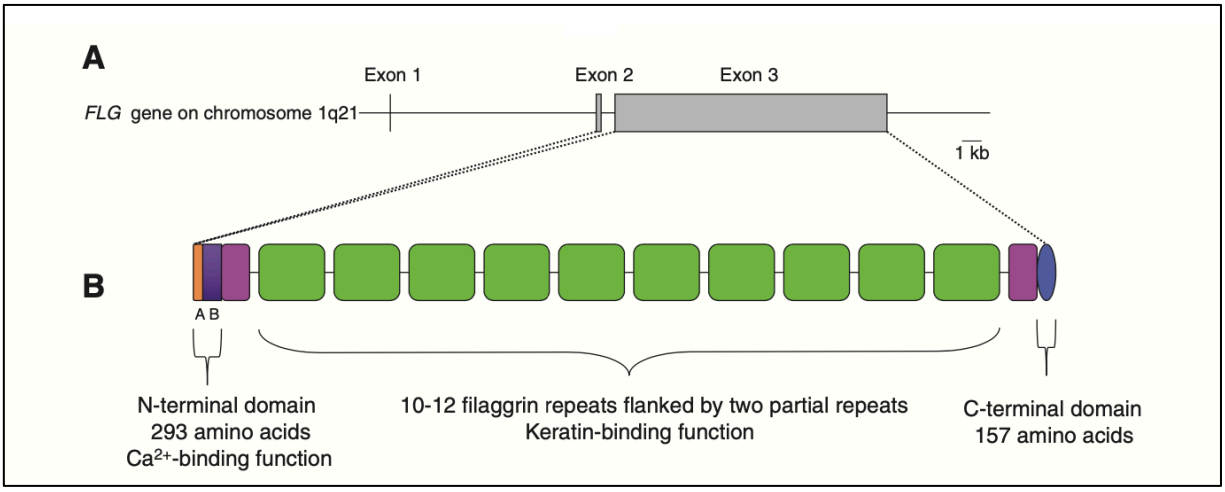


Abbildung 1-2 Struktur des Filaggrin-Gens und Proteinstruktur von Profilaggrin. A: *Das humane Profilaggrin-Gen (FLG) besteht aus drei Exons und zwei Introns und ist auf Chromosom 1q21 innerhalb des „Epidermalen Differenzierungskomplex" lokalisiert. Den Hauptteil der kodierten Geninformation trägt Exon 3.* ***B****: Die Proteinstruktur von Profilaggrin beinhaltet einen 293 Aminosäuren langen N-Terminus mit Ca^{2+}-bindender Funktion, geteilt in die Subdomänen A und B und einen 157 Aminosäuren langen C-Terminus. Als Precursor-Molekül nehmen 10-12 nahezu identischen Filaggrin-Repeats mit Länge von je 324 Aminosäuren einen Großteil der Proteinmasse ein. Sie werden durch eine kurze Linker-Sequenz getrennt. Zwei trunkierte Filaggrin-Repeats (violett) bilden die Verbindung zu den N- und C-terminalen Profilaggrin-Enden. Aus (Sandilands, Sutherland et al. 2009).*

1.10. Zielsetzung der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe befasst sich mit der Erforschung antimikrobieller Aktivität in der menschlichen Haut insbesondere vermittelt durch Proteine der „S100 Fused Type"-Proteinfamilie. Hier konnte in Proteinextrakten aus dem *Stratum corneum* gesunder Probanden nach Auftrennung mittels HPLC neben den bisher bekannten Antimikrobiellen Peptiden RNase7, Psoriasin und Lysozym auch für weitere Proteinfraktionen eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Nachfolgende Analysen und Forschung führten zum Nachweis antimikrobieller Eigenschaften der „S100 Fused Type"-Proteine Hornerin (Gerstel, Latendorf et al. 2018) und Filaggrin-2 (Hansmann, Schröder et al. 2015).

Für Profilaggrin, dem größten Protein der „S100 Fused Type"-Familie, fanden sich in den Proteinextrakten ebenfalls Hinweise auf antimikrobielle Eigenschaften. Wegen seiner ausgeprägten Größe von etwa 400 kDa und einer aufgrund vieler repetitiver Sequenzen erschwerten Sequenzierung wurde die strukturierte Analyse von Profilaggrin aufgeteilt. Relevante Profilaggrin-Domänen wurden in verschiedenen Arbeiten durch Sequenzierung, Expression und antimikrobieller Testung der jeweiligen Profilaggrin-Teilfragmente untersucht. Schulz (2010) und Karsch (2011) konnten in ihren Arbeiten antimikrobielle Aktivität für zwei Fragmente aus der B-Domäne des *N*-Terminus bestätigen. Auch im Bereich der Filaggrin-*Repeats* konnte Hartnagel (geb. Schmidt) antimikrobielle Aktivität nachweisen. Die

Untersuchung eines dem *C*-Terminus vorgelagerten Peptids $FLG_{3605-3879}$ zeigte keine antimikrobielle Aktivität (Babian, 2010).

Obwohl umfassende Informationen zur Funktion der *N*-Terminalen Domänen und der *Repeat*-Region von Profilaggrin bestehen, ist die Datenlage bezüglich des *C*-Terminus (Aminosäuren 3905-4061) weiterhin spärlich und über seine Funktion wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und dadurch genauere Charakterisierung des *C*-terminalen Profilaggrin-Endes durch rekombinante Expression des 182 Aminosäure-langen $FLG_{3880-4061}$ Fragments. Anschließend sollte untersucht werden, ob Profilaggrin im Bereich des *C*-Terminus analog zum strukturverwandten Filaggrin-2 (Hansmann, 2009) ebenfalls über antimikrobielle Eigenschaften verfügt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Tabelle 2.1 Für diese Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalie	**Hersteller**
Acetonitril	Promochem GmbH
Agarose	Biozym
Antibiotika:	
Carbenecillin	Roth
Kanamycin	Boehringer
Cloramphenicol	Roth
Tetrazyclin	Sigma
BSA	New England Biolabs
dNTPs	Pharmacia
EDTA	Gibco
Glycerin	USB
Größenstandards:	
100 bp TriDye Ladder	New England Biolabs
100 bp DNA-Ladder	Invitrogen
1kb Hyperladder	Bioline
2-log DNA-Ladder	New England Biolabs
Smart DNA-Ladder	Eurogentec
„Spektra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder"	Fermentas
H_2O (HPLC)	Promochem GmbH
Pierce™ Protease-Inhibitor Mini Tabletten, EDTA-frei	Thermo Fisher Scientific
Triflouressigsäure (TFA)	Promochem GmbH

2.2. Vektoren

Tabelle 2.2 Für diese Arbeit verwendete Vektoren

pGEM-T-Vektor	Promega
pJet 1.2/blunt-Vektor	Fermentas / Thermo Fisher Scientific
pSUMO3-Vektor	LifeSensors

2.3. Mikroorganismen und Zellkulturen

Tabelle 2.3 Für diese Arbeit verwendete Zelllinien

Mikroorganismus	Zelllinie	Hersteller
Escherichia coli	TOP10F'	Invitrogen
	BL21(DE3) pLysS	Novagen
	Rosetta-gami2 (DE3) pLysS	Novagen

2.4. Oligonukleotide

Primer für Primär-PCR		**Tm**
FLG-cF	TGACAGTGAGGCATACCCAGAGGA	70.9 °C
FLG-cR	TTCTTGGATTAATTCCTTTGCCATT	66.0 °C
Primer für pSUMO3-System (Sekundär-PCR)		**Tm**
SUMO3-FLG-cF	AAGGTCTCAAGGTTCTGAGTCTGCTTCCAGAAAC	75.1 °C
SUMO3-FLG-cR	AAGCGGCCGCTTACTCATAGTAATAGTATCTCTG	71.2 °C
Vektorprimer für Kolonie-PCR und Sequenzierung		**Tm**
GAPDH-F	CCAGCCGAGCCACATCGCTC	65.9 °C
GAPDH-R	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	63,4 °C
M13-F	GTTTTCCCAGTCACGAC	52.0 °C
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	50.0 °C
pJet1.2-Forward-Seq.	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74.0 °C
pJet1.2-Reverse-Seq.	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	68.0 °C
SUMO Forward 5455	TCAATGAGGCAGATCAGATT	59.8 °C
T7 Term Short	CTAGTTATTGCTCAGCGG	56.0 °C

Alle Oligonukleotid-Primer wurden durch die Firma Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert

2.5. Enzyme

Tabelle 2.4 Für diese Arbeit verwendete Enzyme

Amlitaq Gold + Puffer + $MgCl_2$	Applied Biosystems / Thermo Fischer
PfuTurbo HotStart Polymerase + Puffer	Stratagene/Agilent
*Bsa*I + NEBuffer 3	New England Biolabs

*Not*I + NEBuffer 3	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase + Ligation Puffer	Invitrogen/ Thermo Fischer Scientific
T4-Taq-DNA-Polymerase + Puffer	Invitrogen/ Thermo Fischer Scientific
SUMO Protease 2	LifeSensors

2.6. Nährmedien

Tabelle 2.5 Für diese Arbeit verwendete Nährmedien

SOC-Medium	2% Pepton 0,5 % Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl Autoklaviert dann: 20 mM Glukose 10 mM $MgCl_2$ 10 mM $MgSO_4$
LB-Medium	1% Sojamehlpepton 0,5% NaCl 0,5% Hefe-Extrakt Ad 1000 ml H_2O (pH 7,4 eingestellt mit HCl) autoklaviert

2.7. KITS

Tabelle 2.6 Für diese Arbeit verwendete Kits

Nucleospin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel
Protino® Ni-ted 1000 packed columns Nickelsäule	Macherey-Nagel
QIAEX II Gel Extraction Kit	Quiagen

2.8. Puffer und Lösungen

Tabelle 2.7 Für diese Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer LVI 6x (pH 8,0)	0,25%	Bromphenolblau
	30%	Glycerin
	10 mM	Tris/HCL
Elutionspuffer (pH 8,0)	50 mM	NaH_2PO_4
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
Kolloidale Coomassie Färbung (Färbelösung)	0,02% (m/V)	Coomassie Brilliant Blue-G250
	5% (w/V)	Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat
	10%	Ethanol (96%)
	2%	*ortho*-Phosphorsäure
	Rest	H_2O
Kolloidale Coomassie Färbung (Entfärber-Lösung)	10%	Ethanol (96%)
	2%	*ortho*-Phosphorsäure
	Rest	H_2O
Ladepuffer 4x (SDS-PAGE)	4% (w/V)	SDS
	60% (v/v)	Glycerin
	0,3 M	Tris
LEW-Puffer (pH 8,0)	50mM	NaH_2PO_4
	300 mM	NaCl
MES-Laufpuffer 1x (pH 7,4)	0,05 M	MES
	0,05 M	Tris-Base
	3,5 mM	SDS
	1,025 mM	EDTA
NPI-10-Puffer (pH 8,0)	50 mM	NaH_2PO_4
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
TAE-Puffer 1x (pH 8,0)	40 mM	Tris
	20 mM	Acetat
	1 mM	EDTA
Zink-Imidazol-Färbung (Äquilibrierungs-Lösung)	2 M	Imidazol
	1% (w/v)	SDS
	Rest	H_2O

Zink-Imidazol-Färbung	3 M	Zinksulfat
(Entwickler-Lösung)	Rest	H_2O

2.9. Geräte

Tabelle 2.8 Für diese Arbeit verwendete Geräte

Elektroporator	MicroPulser™ Electroporator	Bio-Rad
Gefrierschränke	Kryosafe (-80 °C)	Hans Schröder GmbH
	Premium	Liebherr
Geldokumentationsanlage		Biometra
Gelkammer	Horizon 11·14	Invitrogen
Gelsystem (SDS-Page)	Mini-PROTEAN3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad
HPLC		
Gradientenpumpen	Liquid Chromatograph LC-10AT VP	Shimadzu
	FCV-10 AL VP	Shimadzu
	SpectraSystem P4000	Spectra Physics
Detektoren	UV-VIS Detector SPD-10 VP	Shimadzu
Entgaser	Degasser DG-4	Henggeler
Integratoren	SP 4270 integrator	Spectra Physics
	SP 4290 integrator	Spectra Physics
Trennsäulen		
C8	Nucleosil 300 – 7 C8 SP250/10	Macherey-Nagel
C4	Jupiter 5U C4 300A	Phenomenex
C2/C18	µRPC C2/C18 SC 2.1/10	GE Healthcare
	SMART™-System	Pharmacia
Lyophilisator	Alpha 2-4 LSC	Christ
Vakuumpumpe	KAS 16	Pfeiffer Vacuum
Massenspektrometer	Waters Micromass QTOF II	Waters Mircomass
Photometer	150-20 Spectrophotometer	Hitachi
	Biophotometer	Eppendorf
Rotationsschüttler	VF II Vortex	Jahnke & Kunkel
SpeedVac	Concentrator 5301	Eppendorf
	Gel Pump GP 100	Savant

Thermoblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermocycler	T3 Thermocycler PTC-200	Biometra MJ-Research
Ultraschallgerät	Sonoplus GM 70	Bandelin
UV-Tisch	Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator TM-20	Ultraviolet products
Zentrifugen	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf

Die verwendeten Einwegmaterialen und Pipettierhilfen stammten von den Firmen Sarstedt und Eppendorf.

2.10. Molekularbiologische Methoden

2.10.1. Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro* Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis *et al*., 1986) wird angewandt, wenn es notwendig ist ein spezifisches DNA-Fragment zu amplifizieren.

Dazu werden neben der Ausgangs-DNA als Vorlage (Template), ausreichend Desoxynukleosid-5‘-trisphosphate (dNTPs), Mg^{2+} und Pufferlösung auch zwei kurze, im Überschuss vorhandene Oligonukleotide als Primer benötigt. Diese Primer sind so designt, dass sie jeweils eine kurze, zum Template komplementäre Basenfolge aufweisen. Durch Erhitzen wird die Ausgangs-DNA denaturiert und liegt einzelsträngig vor, sodass sich die Primer möglichst spezifisch an den Zielabschnitt der Ausgangs-DNA anlagern. Die Zielsequenzen der Primer stellen Beginn und Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts dar. Eine thermostabile DNA-Polymerase amplifiziert dann ausgehend von den Primern sowohl für den *Sense*- als auch für den *Antisense*-Strang das gewünschte Fragment jeweils komplementär zur Ausgangs-DNA. Durch die Wiederholung der drei PCR-Phasen Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation lässt sich theoretisch in jedem Zyklus die Menge der vorhandenen DNA-Fragmente verdoppeln. Dauer und Temperatur jeder einzelnen Phase können je nach DNA-Template, Reaktionsvolumen, verwendeten Oligonukleotiden und der Länge des zu amplifizierenden Fragments optimiert werden. Die PCR-Reaktionen in dieser Arbeit wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 20 bzw. 50 µl in einem Thermocycler durchgeführt. Die für die PCR verwendeten Primer sind unter 2.4 aufgeführt. Es kamen verschiedene Formen der PCR zur Verwendung. Die jeweiligen Planungsschritte dazu werden im Folgenden erläutert.

2.10.2. Das Primerdesign der pSUMO3-Primer

Im Vorfeld der PCR-Läufe wurde für die spätere Arbeit mit dem pSUMO3-Vektorsystem über die Firma Sigma-Genosys (Steinheim) Primerpaare nach eigener Vorlage produziert. Drei Voraussetzungen mussten dabei im Design für die Arbeit im pSUMO3-System berücksichtigt werden:

1. Beide Primer benötigen zur gewünschten Bindungssequenz komplementäre genspezifische Basenfolgen des Zielgens.
2. Die Primer müssen neben den Erkennungssequenzen auch Schnittstellen für Restriktionsenzyme beinhalten, um die DNA-Fragmente nach erfolgreicher Nested-PCR (2.10.3) vor der Ligation in das Vektorsystem von nicht benötigten Überhängen zu trennen und auf die Zielgensequenz zu reduzieren.
3. Es werden jeweils Sequenzen benötigt, die nach der Restriktionshydrolyse zu den Enden des pSUMO-Vektors passende komplementäre Überhänge bilden, um eine Ligation in das Vektorsystem zu ermöglichen.

Die Primer enthalten damit einen genspezifischen und einen nicht-genspezifischen Anteil (Abbildung 2-1). Während der Annealing-Phase lagern sich diese genspezifischen Primer-Anteile an das Template an, während die unspezifischen Anteile einen Überhang bilden.

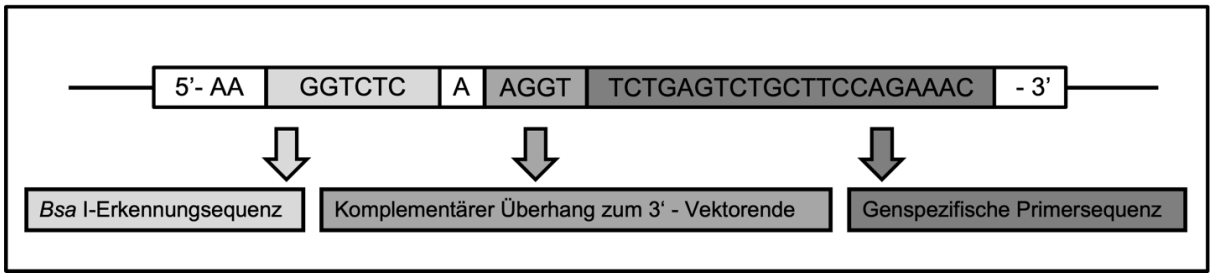


Abbildung 2-1 Aufbau des 5'- Jo flg-pSUMO3-cF-Primers: *Am 5'-Ende befindet sich der genunspezifische Überhang aus BsaI-Erkennungssequenz und der Sequenz, die komplementär zum 3'-Ende des Vektors ist, das 3'-Ende besteht aus der genspezifischen Sequenz.*

Im 5'-Primer dient die Basenfolge GGTCTC als Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bsa*I. Der Schnitt selbst erfolgt mit Abstand von einer Base zur Erkennungssequenz. Als Platzhalter wurde die Base Adenin eingesetzt. Durch ein versetztes Schneiden der Restriktionsenzyme in der Doppelstrang-DNA entstehen sogenannte „sticky ends". Die so entstehenden Überhänge greifen später mit den ebenfalls versetzten Enden des linearisierten pSUMO3-Vektors ineinander und ermöglichen so den Ringschluss. In 5'-Richtung entsteht ein AGGT-Überhang passend zum komplementären TCCA-Überhang am 3'-Ende des pSUMO3-Vektors. Bei den ersten zwei Basen des Primers (hier Adenin) handelt es sich um optional angehängte unspezifische Basen, die im weiteren Verlauf eine effizientere Restriktionshydrolyse ermöglichen sollen.

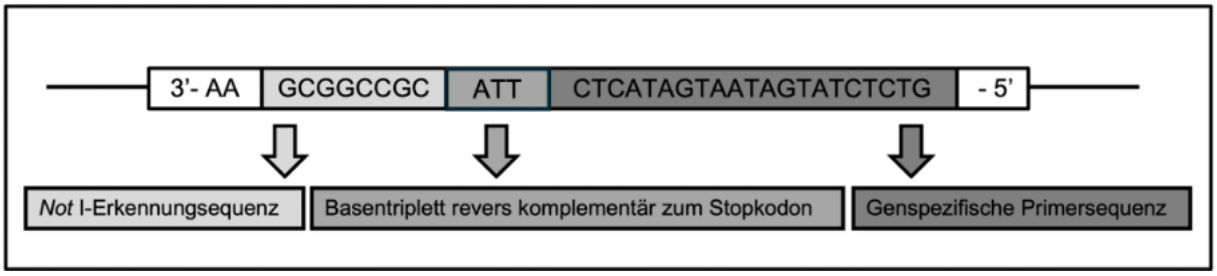


Abbildung 2-2 Aufbau des 3'- Jo flg-pSUMO3-cR-Primers: *Das 5'-Ende besteht aus der genspezifischen Sequenz, Am 3'-Ende befindet sich der genunspezifische Überhang aus NotI-Erkennungssequenz und einem Stop-Codon TAA.*

Der 3'-Primer enthält analog zum 5'-Primer ebenfalls eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym. Die Basenfolge GCGGCCGC dient hier als Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Not*I. Anders als bei der *Bsa*I-Restriktion im 5'-Primer wird hier innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz nach den ersten beiden Basen (GC) geschnitten, so dass am 3'-Ende nach der Hydrolyse ein GGCC-Überhang entsteht. Auch hier entstehen „sticky ends". Zudem wird das Basentriplett ATT als Stopkodon in die Primersequenz integriert, um später als Endpunkt der Transkription bei der Proteinexpression zu dienen. Die ersten zwei Adenine erhöhen wie schon im 5'-Primer die Effizienz der Restriktionshydrolyse.

2.10.3. Konzept der Nested-PCR

Bei der Nested-PCR handelt es sich um eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion mit zwei sequenziell durchgeführten PCR-Läufen. Dabei dient das PCR-Produkt einer Primär-PCR im zweiten Schritt als Matrize für ein weiteres Fragment in einer Sekundär-PCR. Die Bindungsstellen für das Primerpaar der Sekundär-PCR liegen dabei innerhalb der Sequenz des PCR-Produkts der Primär-PCR. Ziel der Primär-PCR ist die deutliche Reduktion der Nukleotidsequenz als Ausgangs-DNA vor der Durchführung der Sekundär-PCR zur Verhinderung unspezifischer PCR-Produkte.

Aufgrund der Verwendung von pSUMO3-Primern mit nicht-genspezifischen Überhängen auf genomischer DNA bestand in dieser Arbeit ein hohes Risiko für nicht-spezifische Primerbindungen, sodass für die Amplifikation der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz auf das Konzept der Nested-PCR zurückgegriffen wurde und eine Primär-PCR mit vollständig genspezifischen Primern vorgeschaltet wurde.

Primär-PCR

Die Primär-PCR wurde mit Hilfe der Primer Flg-cF und Flg-cR (2.4) und mit Keratinoyten-cDNA als Template durchgeführt. Verwendet wurde eine aus *Pyrococcus furiosus* stammende *Pfu*-DNA-Polymerase, die im Vergleich zur *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* eine 3'-

5‘ Exonukleaseaktivität besitzt und somit in der Lage ist, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu entfernen („*proof reading*“).

Für die Primär-PCR (50 µl) wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 5 µl 10x cloned *Pfu* Reaction Buffer
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1,25 µl Flg-cF-Primer (10 µM)
- 1,25 µl Flg-cR-Primer (10 µM)
- 1,25 µl cDNA
- 1 µl 2,5 U *Pfu* Turbo Hotstart DNA-Polymerase
- 39,25 µl H_2O

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C	7 Min	
95 °C	30 s	35 Zyklen
57 °C	30 s	
72 °C	90 s	
72 °C	7 Min	
4 °C	∞	

Sekundär-PCR

Als Template der Sekundär-PCR diente das PCR-Produkt der Primär-PCR. Als Primer wurden die pSUMO3-Primer SUMO3-flg-cF und SUMO3-flg-cR verwendet.
Reaktionsansatz der Sekundär-PCR:

- 5 µl 10 x cloned *Pfu* Reaction Buffer
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1,25 µl SUMO3-flg-cF-Primer (10 µM)
- 1,25 µl SUMO3-flg-cR-Primer (10 µM)
- 5 µl 50-fach verdünntes Gelextrakt des Primär-PCR-Produkts
- 1 µl 2,5 U *Pfu* Turbo Hotstart DNA-Polymerase
- 35,25 µl H_2O

Folgendes Programm wurde für die Sekundär-PCR verwendet:

95 °C	7 Min	
95 °C	30 s	35 Zyklen
54 °C	30 s	
72 °C	90 s	
72 °C	7 Min	
4 °C	∞	

2.10.4. Kolonie-PCR

Nach den Transformationen (2.10.9) in verschiedene Vektorsysteme wurden jeweils Kolonie-PCRs zur Erfolgskontrolle durchgeführt. Dazu wurden die Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Nähragarplatte aufgenommen und in den PCR-Ansatz (s.

unten) resuspendiert. Ein 10-minütiges Erhitzen des Ansatzes zu Beginn des PCR-Programms führte zur Lyse der Bakterienzellen, sodass deren DNA und damit im Erfolgsfall auch das als Template dienende Vektorkonstrukt in den Ansatz freigesetzt wurden. Um den Ringschluss des zuvor linearisierten Vektors mit Aufnahme des Inserts nach Ligation (2.10.8) sicherzustellen, wurden in der Regel je ein vektorspezifischer und ein genspezifischer Primer des Inserts verwendet. Anhand der Länge und anhand des Vorhandenseins amplifizierter PCR-Fragmente konnte anschließend mit Hilfe von Banden im Agarose-Gel (2.10.5) auf eine erfolgreiche Transformation bzw. Ligation geschlossen werden.

Verwendete Primer:

PJet1.2-Vektorsystem:	pJet1.2-Forward-Sequenzing-Primer pJet1.2-Forward-Reverse-Primer
pSUMO3-Vektorsystem	T7 Term Short SUMO Forward 5455 SUMO3-flg-cF-Primer SUMO3-flg-cR-Primer
pGEM-T-Vektorsystem	M13-F M13-R

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 2 µl 10x *Taq* Puffer (Invitrogen)
- 0,6 µl $MgCl_2$ (Invitrogen)
- 0,4 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1 µl 5'-Primer (10 µM)
- 1 µl 3'-Primer (10 µM)
- 0,2 µl 5 U/µl *Taq* Polymerase (Invitrogen)
- 14,8 µl H_2O

Die PCRs wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C	10 Min	
95 °C	30 s	30 Zyklen
X °C*	30 s	
72 °C	90 s	
72 °C	7 Min	
4 °C	∞	

**Die Annealing-Temperatur wurde je nach verwendetem Primerpaar optimiert. Als Orientierung dienten die vom Hersteller angegebene Schmelztemperaturen Tm der jeweiligen Primer (2.4). In der Regel wurde eine Annealing-Temperatur gewählt, die 2 °C niedriger lag als die Schmelztemperatur des Primers mit der kleineren Schmelztemperatur.*

2.10.5. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelektrophorese können DNA-Fragmente (z.B. Plasmide, PCR-Produkte, usw.) bis etwa 25 kb Länge aufgetrennt werden. Zur Detektion wurde Ethidiumbromid verwendet, das als fluoreszierender Farbstoff mit den Basen der Nukleinsäuren interkaliert und so unter UV-Licht (Absorptionsspektrum etwa 260 nm) im Transilluminator sichtbar gemacht

wurde. Verwendet wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur präparativen Gewinnung mittels PCR erzeugter DNA-Fragmente, zur Analyse von PCR-Produkten, Gel-Extrakten, Plasmidpräparationen und Restriktionshydrolysen. Je nach Größe und Fragment-Typ wurden 0,8-1,5%ige horizontale Agarose-Gele gegossen und verwendet. Die jeweilige Menge Agarose wurde durch Aufkochen in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst, anschließend auf ca. 50 °C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und die Lösung dann in eine horizontale Laufkammer mit Probenkamm gegossen. Nach Auspolymerisieren des Gels wurden die Proben mit 6x Ladepuffer LVI vermischt. Die Verwendung der jeweiligen Größen- und Massenstandards richtete sich nach erwarteter Fragment- bzw. Plasmidgröße. Die Laufzeit der Proben und die angelegte Stromspannung wurden jeweils an die Agarosemenge und die erwartete Fragmentgröße angepasst. Nach Auftrennung der Proben in TAE-Puffer wurden die Banden der Nukleinsäuren durch Fluoreszenz des verwendeten Ethidiumbromids bei 266 nm Wellenlänge auf einem UV-Transilluminator detektiert, photographisch mittels CCD-Kamera dokumentiert und gegebenenfalls zur Weiterverarbeitung unter Zuhilfenahme eines sterilen Einmalskalpells ausgeschnitten.

2.10.6. Aufreinigung amplifizierter PCR-Fragmente

Zur Aufreinigung der in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente aus PCR oder Restriktionshydrolyse wurde jeweils das „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Banden wurden dazu unter UV-Licht detektiert, ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers in 20 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 eluiert. Im Anschluss an die Aufreinigung erfolgte zur Konzentrationsbestimmung in der Regel eine Überprüfung der Extraktion durch eine weitere Agarose-Gelelektrophorese.

2.10.7. Klonierung

Die molekularbiologische Methode der Klonierung ermöglicht die Vervielfältigung von Nukleinsäure-Fragmenten innerhalb von Wirtsorganismen, beispielsweise DNA in Bakterien, wie in dieser Arbeit verwendet. Durch Kultivierung der Bakterien ist eine PCR-unabhängige und einfache Vervielfältigung der DNA möglich. Bakterien sind robuste Organismen, die auch unterhalb des Gefrierpunkts nicht absterben. So können sie nach der Lagerung bei -80 °C jederzeit genutzt werden, um neues DNA-template nachzuproduzieren. Dabei macht man sich die Replikationsmechanismen der Wirtszelle zunutze. Nachdem das gewünschte DNA-Molekül mittels Ligation (2.10.8) in einen Vektor eingebracht wurde, wird diese Plasmid-DNA nach der Transformation (2.10.9) in die kompetente Wirtszelle (hier *Escherichia coli*) bei jeder Zellteilung ebenso wie die bakterieneigene DNA vervielfältigt. Zellen werden als kompetent bezeichnet, wenn sie in der Lage sind, sich in Lösung befindende DNA durch den Transformationsvorgang aufzunehmen. Durch kulturelle Anzucht ist so bis zum Erreichen der Kapazitätsgrenzen der Bakterienkultur eine exponentielle Replikation der Ziel-DNA möglich.

Zur besseren Selektion verfügen die jeweiligen Zellsysteme häufig über Resistenzen für definierte Antibiotika (Tabelle 2.9), die in Zusammenspiel mit den Vektor-vermittelten Antibiotika-Resistenzen der Plasmid-DNA (Tabelle 2.10) ein unspezifisches Bakterienwachstum auf entsprechend vorbehandelten Nährboden verhindern sollen. Nach der Anzucht der Klone kann die DNA mittels Plasmid-Isolation (2.10.10) extrahiert werden. Darüber hinaus kann das Verfahren der Klonierung durch Verwendung eines Expressionsvektors auch zur Expression rekombinanter Proteine (2.11) genutzt werden.

In dieser Arbeit wurde mit drei verschiedenen Vektorsystemen gearbeitet. Mit dem Klonierungsvektor pJET 1.2 blunt-Vektor wurde die $FLG_{3880-4061}$-DNA in *E.coli* Top10F' vervielfältigt. Über den pSUMO3-Expressionsvektor erfolgte später die rekombinante Expression des Fusionsproteins in *E.Coli* BL21(DE3) pLysS (2.10.9).

Die Arbeit im pGEM-T-Klonierungsvektor führte nicht zur Anzucht bakterieller Klone mit Nachweis von $FLG_{3880-4061}$-DNA, sodass die Arbeit in diesem Vektorsystem nicht fortgesetzt wurde und hier im Folgenden nicht weiter beschrieben wird.

2.10.8. Ligation

Bei der Ligation wird, katalysiert durch eine Ligase, das Zielfragment per Phosphodiesterbindung mit den beiden Enden des in linearer Form vorliegenden Vektors verbunden und so ein Ringschluss initiiert. Zur Ligation der DNA des $FLG_{3880-4061}$-Fragments wurde in dieser Arbeit eine T4 DNA-Ligase verwendet.

Vor Ligation im pJet1.2-Vektorsystem wurde das doppelsträngige Insert mit „blunting enzyme" zur Generierung glatter Enden („blunt ends") behandelt. Bei der Ligation im pSUMO3-System wurden dagegen „sticky ends" benötigt. Hier griffen nach Restriktionshydrolyse (2.10.12) passende Überhänge von Insert und Vektor ähnlich dem „Schlüssel-Schloss"-Prinzip ineinander und ermöglichten so die Verknüpfung zum Plasmid.

Folgende Ligationsansätze wurden verwendet:
20 µl Ligationsansatz für den pJET 1.2 blunt Vektor:

1.Schritt:

- 10 µl 2x T4 Ligase Puffer (Fermentas)
- 3 µl PCR-Produkt
- 4 µl H_20
- 1 µl DNA blunting Enzyme

Inkubation über 5 Minuten bei 70 °C zum Auffüllen der 3‘- und 5‘-Überhänge zur Bildung von „blunt ends“.

2.Schritt:

- 18 µl Reaktionsansatz (siehe Schritt 1)
- 1 µl 50 ng pJET 1.2. blunt Vektor
- 1 µl 5 U T4 DNA-Ligase (Fermentas)

Inkubation über 30 Minuten bei Raumtemperatur.

10 µl Ligationsansatz für den pSUMO3-Vektor:

- 1 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer (Promega)
- 5,3 µl PCR-Produkt
- 3 µl 10 ng/µl pSUMO3-Vektor (Life Sensors)
- 0,7 µl 1U/µl T4-Ligase (Promega)

Inkubation über 8 h bei 16 °C

2.10.9. Transformation

Mit dem Begriff „Transformation“ wird in der Molekularbiologie ein Vorgang beschrieben, bei dem freie DNA in kompetente Zellen, häufig Bakterien, übertragen wird. Der DNA-Transfer kann auf verschiedene Wege realisiert werden. In dieser Arbeit erfolgten Transformationen durch Hitzeschockbehandlung in *E.coli* TOP10F‘- sowie *E.coli* BL21(DE3) pLysS- Zellen und durch Elektroporation in *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen.

Transformation in chemisch kompetente *E. coli* TOP10F‘ und *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen

Die Transformation in *E. coli* TOP10F‘ und *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen erfolgte durch Hitzeschockbehandlung. In diesen Zellen führt ein plötzlicher Temperaturanstieg in Kalziumchlorid-reicher Umgebung zur Porenbildung in der Zellmembran. Über diese Poren gelingt die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzelle.
Die Transformation wurde in Anlehnung an das „pGEM-T-Vector manual“ (Promega) durchgeführt. Je 2 µl des Ligationsansatzes bzw. des isolierten Plasmids wurden mit 8 µl H_2O verdünnt und dann mit 50 µl der auf Eis gehaltenen *E. coli*- Bakterien vorsichtig vermischt. Im Eisbett wurden sie für 25 Minuten inkubiert, anschließend 30 Sekunden lang bei 42 °C hitzeschockbehandelt und erneut für drei Minuten auf Eis gehalten. Nach vorsichtiger Zugabe

von 300 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 100 bzw. 200 µl der Ansätze auf vorgewärmten LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die LB-Platten waren im Vorfeld jeweils mit Antibiotika entsprechend den vektorvermittelten Resistenzen (Tabelle 2.10) gegossen worden, um ein unspezifisches Anwachsen von Klonen ohne erfolgreiche Plasmidaufnahme zu verhindern.

Transformation in elektrisch kompetente *E. coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen

Bei den Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen handelt es sich um einen elektrisch kompetenten *E.coli*- Stamm, bei dem die Transformation durch Elektroporation erfolgt.
Dabei werden die Bakterien durch einige Millisekunden lange elektrische Impulse in einem elektrischen Feld mit hoher Feldstärke aufgeschlossen und zur Porenbildung gebracht, durch welche die DNA aufgenommen werden kann.
Nach dem Auftauen wurden die Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen für eine Minute auf Eis mit 2 µl Plasmid inkubiert und das Gemisch anschließend in Elektroporationsküvetten gegeben. Im Elektroporator wurde der Zell-Plasmid-Mix mit elektrischen Impulsen von 5,8 ms Länge mit einer Spannung 2,5 kV behandelt und unmittelbar danach wurde 1 ml SOC-Medium in die Küvetten gegeben. Danach wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C auf dem Inkubationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden sie auf mit passenden Antibiotika versetzte LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
Nach den Transformationen wurde jeweils der Transformationserfolgs mit Hilfe von Kolonie-PCRs (siehe 2.10.4) kontrolliert.

Tabelle 2.9 Übersicht über die Antibiotika-Resistenzen der jeweiligen Bakterienstämme

***E.coli*-Stamm**	**Antibiotika-Resistenz**	**Endkonzentration**
Top10F‘	-	
BL21(DE3) pLysS	Chloramphenicol	34 µg/ml
Rosetta-gami2 (DE3) pLysS	Kanamycin Chloramphenicol Tetracyclin	50 µg/ml 34 µg/ml 12,5 µg/ml

Tabelle 2.10 Übersicht über die Antibiotika-Resistenzen der jeweiligen Vektoren

Vektor	**Antibiotika-Resistenz**	**Endkonzentration**
pJET1.2/blunt	Carbenicillin (Ampicillin)	50 µg/ml
pSUMO3	Kanamycin	50 µg/ml
pGEM-T	Carbenicillin (Ampicillin)	50 µg/ml

2.10.10. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde mit dem „NucleoSpin® Plasmid QuickPure“-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für jeden Klon wurde eine 3 ml Übernachtkultur bei 37 °C angesetzt. Anschließend wurde eine alkalische Zelllyse durchgeführt und die DNA mittels Anionenaustausch an eine Silica-Membran gebunden. Nach dem Entfernen des Durchflusses wurde die DNA mit 30 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) eluiert. Das Ergebnis der Plasmid-Isolierung wurde im Anschluss daran mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.10.11. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA von positiven Klonen wurde mittels Strangabbruchmethode nach Sanger von der Göttinger Firma SeqLab durchgeführt. Dazu wurden je 5 µl Plasmid mit 2 µl T7-Term-short-Primer vermischt und mit Hilfe eines Fluoreszenz-Kapillar-Sequenzierers extern sequenziert.

2.10.12. Restriktionshydrolysen

Durch Restriktionshydrolyse können DNA-Moleküle enzymatisch gespalten werden. Bei korrekter Vorplanung mit Auswahl der richtigen Restriktionsendonukleasen können so gezielt DNA-Fragmente aus ihrer Umgebung, wie hier beispielsweise aus Plasmid-DNA, ausgeschnitten werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die gewählten Restriktionsendonukleasen nicht innerhalb der Sequenz des Ziel-Fragments schneiden. In dieser Arbeit wurde das $FLG_{3880-4061}$-Fragment nach erfolgreicher Klonierung aus dem pJET 1.2 blunt-Vektor herausgetrennt, um im Folgenden in den pSUMO3-Expressionvektor ligiert werden zu können. Wie im Abschnitt „Primerdesign“ (2.10.2) beschrieben, wurden die SUMO3-flg-Primer mit Erkennungssequenzen und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Not*I und *Bsa*I entworfen. Diese Schnittstellen wurden so gewählt, dass sie das Insert unmittelbar flankieren und so ein passgenaues Heraustrennen des Zielfragments ermöglichen. Der pSUMO3-Vektor selbst verfügt in seiner Sequenz innerhalb der „Multiple Cloning Site“ (2.11.1) ebenfalls über Schnittstellen für *Not*I und *Bsa*I. Im Vorfeld der Ligation in den Expressionsvektor wurde der pSUMO3-Vektor daher mit beiden Restriktionsenzymen hydrolysiert. Dabei entstanden zu den „sticky ends“ des Inserts passende Überhänge an den Vektorenden.

Die Restriktionshydrolyse wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte der Verdau der Plasmid-DNA in einem 50 µl Ansatz mit dem Restriktionsenzym *Not*I, anschließend wurde *Bsa*I hinzugegeben. Zur Funktionsprüfung der Restriktionsenzyme wurden Kontrollen angesetzt, die jeweils nur mit einer Restriktionsendonuklease verdaut wurden.

Schritt 1: 50 µl-Ansatz für den Restriktionsverdau mit *NotI* bei 37 °C:

- 5 µl 10x NEBuffer 3
- 0,5 µl 100x BSA (bovines Serumalbumin)
- 2 µl 10U/µl *Not*I-Enzyme
- 3,5 µl Plasmid-DNA
- 39 µl H_2O

} 3 h

→ Abpipettieren eines 5 µl Aliquots als Kontrolle 1

Schritt 2: 50 µl-Ansatz für den Restriktionsverdau mit *Bsa*I bei 50 °C:

- 45 µl Hauptansatz aus Schritt 1
- 2 µl 10U/µl *Bsa*I-Enzyme
- 3 µl H_2O

} 2,5 h

Nach dem Verdau mit *Not*I (Schritt 1) wurde ein 5 µl großes Aliquot aus dem Ansatz entnommen und als Kontrollprobe bei -20 °C eingefroren. In Schritt 2 wurden 2 µl *Bsa*I-Enzyme hinzugegeben und mit 3 µl H_2O auf 50 µl aufgefüllt. Als zweite Kontrollprobe wurde eine 10 µl Kontrollansatz mit *Bsa*I-Ezym (ohne *Not*I-Enzym) angefertigt und parallel zu Schritt 2 verdaut.

Kontrolle 2: 10 µl *Bsa*I-Kontrollverdau bei 50 °C:

- 1 µl 10x NEBuffer 3
- 0,1 µl 100x BSA
- 0,4 µl 4 U *Bsa*I-Enzyme
- 0,7 µl Plasmid-DNA (unverdaut)
- 7,8 µl H_2O

} 2,5 h

Nach der Restriktionshydrolyse wurden Insert und Klonierungsvektor mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und mit den Kontrollproben verglichen. Das Insert wurde unter dem UV-Transilluminator aus dem Gel herausgeschnitten und in 20 µl Tris-HCl-Puffer eluiert. Das im Eluat befindliche DNA-Fragment wurde im Anschluss daran für die Ligation in den pSUMO3-Expressionsvektor erneut als Insert verwendet.

2.11. Rekombinante Expression von $FLG_{3880-4061}$ in *E. coli*

2.11.1. Struktur des Expressionsvektors

Für die rekombinante Expression des $FLG_{3880-4061}$-Peptids in *E.coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen wurde der pSUMO3-Vektor der Firma LifeSensors gewählt. Das 5610 bp große Expressionsvektorsystem ermöglicht über die Bildung eines Fusionsproteins eine besonders effiziente Sicherung und Aufreinigung des Zielpeptids. Dieses Fusionsprotein besteht *N*-

terminal aus einem 101 Aminosäuren langen Fusionsanteil (Fusionstag) an den sich die Aminosäuresequenz des Zielpeptids anschließt. Dieser Fusionstag besitzt am *N*-Terminus, bezeichnet als „His-Tag“, aufeinanderfolgend sechsmal die Aminosäure Histidin. Durch die hohe Affinität von Histidin zu Nickel ermöglicht der „His-Tag“ die Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Nickel-Affinitätssäulenchromatographie und vereinfacht auf diese Weise die gezielte Isolierung des exprimierten Proteins. Die Trennung von Fusionstag und Zielpeptid kann im Verlauf mittels enzymatischer Spaltung durch passende SUMO-Proteasen erfolgen.

Als Grundlage der Expression durch die bakterieneigene T7-RNA-Polymerase in *E.coli* BL21(DE3) pLysS verfügt der pSUMO3-Vektor über eine T7-Promoterregion für den Expressionsstart des rekombinanten Fusionsproteins. Zudem besitzt der Vektor eine „Multiple Cloning Site“ mit Schnittstellen und Erkennungssequenzen für gängige Restriktionsendonukleasen. In Abhängigkeit von der DNA-Sequenz des Zielfragments können die Restriktionsenzyme durch vorausschauende Planung beim Primer-Design so gewählt werden, dass eine hydrolytische Trennung der Zielsequenz während des Restriktionsverdaus umgangen wird. Zur selektiven Kultivierung nach erfolgreicher Transformation enthält der pSUMO3-Vektor außerdem einen Sequenzabschnitt, der den vektortragenden Bakterien eine Kanamycin-Resistenz vermittelt.
Der pSUMO3-Vektor liegt in linearer Form vor und ist bereits gebrauchsfertig für einen Einsatz der Restriktionsendonukleasen *Bsa*I und *BamH*I vorbereitet. Da das $FLG_{3880-4061}$-Insert jedoch mit der Basenfolge GGATCC innerhalb seiner Nukleotidsequenz die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *BamH*I enthält, wurden für die Arbeit mit $FLG_{3880-4061}$ die Restriktionsenzyme *Not*I und *Bsa*I gewählt und dies im Primer-Design berücksichtigt. Dementsprechend musste zur Vorbereitung der Ligation mit $FLG_{3880-4061}$ und um zum Insert passende Überhänge zu generieren eine Restriktionshydrolyse des pSUMO3-Vektors mit *Not*I durchgeführt werden (Bedingungen 2.10.12, Einsatz: 1 µl (250 ng/µl) pSUMO3-Vektor). Dabei schnitt *Not*I nach den ersten beiden Basen innerhalb der als Palindrom angelegten Erkennungssequenz GCGGCCGC, sodass ein CCGG-Überhang am 5‘-Ende des Vektors entstand. Am 3‘-Ende weist der Vektor bereits optimiert für die Arbeit mit dem Restritkionsenzym *Bsa*I einen TCCA-Überhang auf. Eine komplementäre Basenfolge im Sinne eines AGGT-Überhangs entstand am 5‘-Ende des $FLG_{3880-4061}$-Fragments nach Restriktionshydrolyse mit *Bsa*I.

2.11.2. Durchführung der Expression des Fusionsproteins

Die Proteinexpressionen des Fusionsproteins wurden in den Bakterienstämmen *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS und *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS durchgeführt. Beide Zelllinie enthalten einen Induktions-abhängigen lacUV5-Promoter, der das T7-RNA-

Polymerase Gen kontrolliert. Unter Zugabe von IPTG (1 mM) zur Induktion transkribiert diese Polymerase die unter der T7-Promoter-Kontrolle stehende Zielsequenz für das Fusionsprotein auf dem pSUMO3-Vektor.

Die Selektion der Klone nach Transformation und während der Expression erfolgte jeweils über zellvermittelte und plasmidvermittelte Antibiotika-Resistenzen (Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10) durch Zugabe entsprechender Antibiotika in die Nährmedien. Nach der Kolonie-PCR wurden positive Klone ausgewählt, in LB-Medium (3 ml) überführt und bei 37 °C über Nacht mit 200 Upm auf einer Schüttelplatte inkubiert. Die optische Dichte (OD) der Übernachtkulturen wurde zur Bestimmung der Bakteriendichte bei 600 nm mittels Spektrophotometer gemessen. Aus den Übernachtkulturen wurden 250 ml große LB-Expressionskulturen angeimpft. Bei *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS wurde auf eine OD_{600nm} von 0,02 und bei *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS auf eine OD_{600nm} von 0,1 angeimpft. Die Expressionskulturen wurden bei 200 Upm und 37 °C bis auf eine OD_{600nm} von 0,4 bis 0,6 inkubiert und anschließend mit 1 mM IPTG zur Induktion der Proteinexpression versetzt. Anschließend wurde für 3 h bei 37 °C und 200 Upm weiter inkubiert. Danach wurden die Expressionskulturen bei 4 °C mit 6000 x g für 5 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Bakterienpellets wurden jeweils in 3 ml LEW-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingelagert.

Für eine SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (2.12.9) zur Überprüfung der Proteinexpression wurden vor und 3 h nach IPTG-Induktion Proben aus den Expressionskulturen entnommen (SDS-PAGE siehe 2.12.9).

Die Probenmenge der Aliquote in µl wurde nach der Formel (90 / gemessene OD_{600nm}) berechnet und die Proben anschließend für 5 min bei 11000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden bis zur Anfertigung des Gels bei -20 °C gelagert.

2.12. Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins

Vom exprimierten Fusionsprotein im Zytosol in der intakten *E.coli*-Expressionszelle bis zur Trennung des Zielpeptids vom Fusionstag erfolgte die Aufreinigung von $FLG_{3880-4061}$ in den folgenden Aufreinigungsschritten (2.12.1 bis 2.12.6):

2.12.1. Lyse der Expressionsbakterien

Zur Trennung der im Zytosol gelösten Zellproteine von den festen Zellbestandteilen der *E.coli*-Expressionszellen war im ersten Schritt ein Aufschluss der Bakterien notwendig.

Die Zelllyse der unter 2.11.2 gewonnenen Zellpellets erfolgte durch eine Kombination aus „Freeze & Thaw“-Methode und anschließender Ultraschallbehandlung. Zuerst wurden die

Zellpellets in drei „Freeze & Thaw“-Zyklen jeweils bei -80 °C für 10 Minuten gefroren und anschließend im 37 °C-Wasserbad wieder erwärmt. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen per Ultraschallgerät (Sonopuls, Bandelin Elektronik, Berlin) in sieben Zyklen (30 s Ultraschall und 15 s Pause auf Eis). In der Zentrifuge wurden danach das Zelllysat für 45 Minuten bei 4 °C und 12500 x g in ein Pellet, bestehend aus festen Zellbestandteilen, und den Überstand, in dem sich auch das gelöste Fusionsprotein befand, getrennt. Der Überstand wurde im Anschluss daran jeweils sterilfiltriert (Filtropur, Porengröße 0,45 µm) und zur weiteren Aufreinigung auf die Nickelsäule aufgetragen (2.12.2)

2.12.2. Immobilisierende Nickel-Affinitätschromatographie

Der nächste Schritt in der Aufreinigung des Fusionsproteins bestand in der Extraktion Histidin-reicher Proteine aus den gefilterten Lysat-Überständen über eine Nickel-Affintitätssäule. Das Prinzip der Nickel-Affinitätschromatographie beruht dabei auf der spezifischen und reversiblen Bindung von Histidin-Gruppen an Ni-Ionen. Durch den Histidin-Tag bindet das Fusionsprotein an der mit Ni-Ionen beladenen Trennsäule, während der Großteil der *E.coli*-Proteine ohne Bindung im Durchfluss verbleibt. Anschließend wird das Zielprotein zusammen mit weiteren Histidin-reichen Proteinen durch Elutionspuffer von der Säule gelöst. Als Trennsäulen wurden „Protino® Ni-TED packed coloumns“ nach Protokoll des Herstellers verwendet. Nach Äquilibrierung der Säulen mit 2 ml LEW-Puffer wurden je 2 ml Lysat-Überstand auf die Nickelsäulen aufgetragen. Das rekombinante Fusionsprotein wurde mit Hilfe von 4 ml Elutionspuffer von der Nickel-Affinitätssäule gelöst. Da allerdings unter anderem auch Metalloproteasen und andere Histidin-reiche *E.coli*-Proteine in der Lage sind an der Nickelsäue zu binden, war mit der C8-Umkehrphasen-HPLC ein weiterer Schritt im Aufreinigungsprozess des Fusionsproteins nötig. Als Vorbereitung für die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) wurde das Eluat mit TFA versetzt, bis ein pH-Wert von 2-3 erreicht wurde. Anschließend wurde die Probe bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm).

2.12.3. C8-Umkehrphasen-HPLC

Für die finale Trennung des Fusionsprotein von den übrigen im Eluat verbliebenen Proteinen ist die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und Ausbeute besonders geeignet. Die Probe wird bei diesem säulenchromatographischen Verfahren als mobile Phase mittels eines polaren Puffers A (0,1% TFA in H_2O), auf die HPLC-Säule gebracht. Dort interagieren die Proteine der Probe mit den durch Alkylketten beschichteten apolaren Silicapartikeln. Diese porösen Silicapartikel werden als stationäre Phase bezeichnet und weisen je nach Alkylkettenlänge (hier C_8) unterschiedliche Trenneigenschaften auf. Durch langsames Zuführen eines apolaren zweiten Puffers B (0,1% TFA in Isopropanol) über einen steigenden Gradienten werden die verschiedenen Proteine

dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten entsprechend den spezifischen Mischungsverhältnissen der Puffer eluiert und somit getrennt. Ein der Säule nachgeschalteter Detektor registriert durch Lichtabsorption kontinuierlich die unterschiedlichen Proteinfraktionen, die von der Säule eluiert werden. Dies erfolgt bei einer Wellenlänge von 215 nm, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum für Peptidbindungen besteht. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine SP 250/10 Nucleosil 300-7 C8-Säule. Die Flussgeschwindigkeit betrug 3 ml/min und die Aufzeichnung des Chromatogramms erfolgte mit einer Papiervorschubgeschwindigkeit von 0,5 cm/min. Die Fraktionierung der Proben erfolgte manuell. Die Analyse der Fraktionen auf vorhandenes Fusionsprotein erfolgte anschließend mittels Massenspektrometrie und SDS-PAGE. Die Proben des Fusionsproteins wurden im Anschluss daran zur Entfernung von TFA, Isopropanol und Wasser im Vakuum lyophilisiert und bei -20 °C verwahrt.

2.12.4. Hydrolyse des Fusionsproteins

Auf dem Weg zu einem aufgereinigten $FLG_{3880-4061}$-Fragment musste das Fusionsprotein im nächsten Schritt in Fusionstag und Zielpeptid gespalten werden.

Wie unter 2.11.1 beschrieben, wird bei der Expression mit dem pSUMO3-System ein Fusionsprotein erzeugt, dass sich aus der eigentlichen Zielsequenz und einer dem Expressionsvektor entstammenden Sequenz für den Fusionstag zusammensetzt. Neben der erleichterten Aufreinigung durch den Histidin-Tag wird die intrazelluläre Löslichkeit des gekoppelten Zielproteins durch den Fusionstag verbessert und darüber hinaus Protein-Protein-Interaktionen in der Expressionszelle verhindert.

Die Spaltung des Fusionstag vom Zielproteinanteil wurde über eine Proteolyse realisiert. Dazu wurde die zum pSUMO3-Vektor passende SUMO-Protease 2 verwendet. Die Identifikation des Fusionsanteil geschieht dabei anhand seiner Tertiärstruktur, sodass die hydrolytische Trennung von Fusionstag und Zielfragment hochspezifisch erfolgt.

Für die Hydrolyse wurde der empfohlene Reaktionsansatz aus dem Hersteller-Manual verwendet:

- 100 µg Fusionsprotein
- 500 µl PBS
- 2,5 µl 1 M DTT
- 10 U SUMO Protease 2

} 7 d

Die Inkubation erfolgte für 7 Tage bei 30 °C und 300 Upm.

2.12.5. C4-Umkehrphasen-HPLC

Eine mit Alkylketten (vier C-Atome) beschichtete HPLC-Säule kam nach der Proteolyse des Fusionsproteins zum Einsatz, um das Zielprotein vom Fusionstag und der verbliebenen

Protease zu trennen. Das Analytengemisch wurde mit Hilfe von 5% TFA auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert und im Anschluss daran für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Verwendet wurde eine Bakerbond Jupiter 5U C4 300A-Säule (250 x 4,6 mm, Phemomenex, Aschaffenburg). Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Der Verlauf des Gradienten von Puffer B lässt sich Tabelle 2.11 entnehmen. Als Puffer A wurden 0,05% TFA in H_2O verwendet. Die Fraktionierung der Proben erfolgte manuell nach Detektion der Proteine mittels UV-Absorption bei 215 nm.

Tabelle 2.11 Gradientenverlauf der C4-Umkehrphasen-HPLC

Zeit (min)	Konzentration Puffer B in % (80% Isopropanol, 0,05% TFA)
0,01	10
10	40
40	70
50	100
55	100

2.12.6. C2/C18-Umkehrphasen HPLC

Massenspektrometrische Analysen und SDS-PAGE zeigten in Abweichung zu den Vorberechnungen wiederholt eine zu geringe Masse bzw. Verkürzung von Fusionsprotein und $FLG_{3880-4061}$-Teilfragment (3.3.4 und 3.4.), sodass zur Erhebung der Aminosäuresequenz MS/MS-Sequenzierungen (2.12.8) durchgeführt wurden. Nach Proteolyse durch Trypsin oder LysC wurden die Enzym-Peptid-Gemische mittels C2/C18-HPLC aufgereinigt und fraktioniert. Im Anschluss erfolgte die Tandem-Massenspektrometrie (HPLC/MS) der Fraktionen zur Sequenzierung.

Zur HPLC wurde eine µRPC C2/C18 SC 2.1/10-Säule von GE Healthcare an einer „SMART™ System“-Anlage (Pharmacia) eingesetzt. Über einen H_2O/Acetonitril Gradienten von Puffer A (0,1% TFA in H_2O) zu Puffer B (0,1% TFA in 80% Acetonitril (v/v)) erfolgte die Auftrennung der Proben. Nach 10-minütiger Äquilibrierung der Säule mit 100 % Puffer A wurde der Gradient in den ersten 10 Minuten linear auf 25% Puffer B gesteigert. In den folgenden 30 min stieg der Gradient auf 70% und anschließend für weitere 10 min auf 100%. Die HPLC wurde mit einer Flussrate von 100 µl/min durchgeführt, fraktioniert wurde manuell und die Detektion erfolgte bei 215, 254 und 280 nm.

2.12.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Im Vorfeld der Proteinanalytik wurde die Konzentration der jeweiligen Proteinlösung mit Hilfe eines Einstrahlphotometers (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) durch

Absorptionsmessung näherungsweise ermittelt. Dabei wird sich zunutze gemacht, dass die Lichtextinktion einer Proteinlösung bei einer bestimmten Wellenlänge proportional zur Konzentration der Lösung ist. Diese Gesetzmäßigkeit ist im Lambert-Beer'schen Gesetz festgehalten:

$$E_{280nm} = \varepsilon_{280\ nm} \cdot c \cdot d$$

Bei gleichbleibender Schichtdicke **d** der Küvette und bekanntem Extinktionskoefizienten ($\varepsilon_{280\ nm}$) lässt sich unter Berücksichtigung der im Photometer gemessenen Extinktion bei 280 nm (E_{280nm}) die molare Konzentration (**c**) der Proteinlösung berechnen. Verwendet wurden UV-Einmal-Kunststoffküvetten der Firma Eppendorf (UVette®) mit einer Schichtdicke von 1 cm. Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{280\ nm}$ ist bei einer Wellenlänge von 280 nm spezifisch für Proteine in Lösung. Die Absorption der Lösung im ultravioletten Licht bei 280 nm hängt vor allem von vorhandenen aromatischen Aminosäuren, wie z.B. Tryptophan und Tyrosin, und der Ausbildung von Disulfid-Brücken in der Tertiärstruktur ab und kann bei bekannter Aminosäuresequenz mit der Hilfe des Analyseprogramms „ProtParam" online auf der Seite des Swiss Bioinformatics Resource Portal (https://web.expasy.org/protparam/) kalkuliert werden. Die Proteinkonzentrationen wurden nur bei Absorptionswerten zwischen 0,04 und 0,8 kalkuliert, da das Lambert-Beer'sche Gesetz nur in einem definierten Messrahmen Gültigkeit besitzt. Wurden Absorptionswerte außerhalb dieses Rahmens gemessen, wurde dementsprechend verdünnt oder aufkonzentriert.

2.12.8. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie als analytisches Verfahren ermöglichte die Massenbestimmung von Proteinen. So wurde sie zur Kontrolle der Proteinaufreinigung nach C8- und C4-Umkehrphasen-HPLC und im weiteren Verlauf auch zur Fehleranalyse eingesetzt. Da Analysen mittels Massenspektrometrie und SDS-PAGE wiederholt zu niedrige Massen für das Fusionsprotein zeigten, wurden die Peptid-Bruchstücke des exprimierten Fusionsproteins nach Trypsin- und LysC-Verdau mittels Tandem-Massenspektrometrie charakterisiert.

Das Prinzip des Massenspektrometers beruht dabei auf der Messung des Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z) der in der Probe befindlichen Analyten. Das Massenspektrometer besteht dabei jeweils aus drei Komponenten. In der Ionenquelle wird die zu untersuchende Substanz in die Gasphase überführt und ionisiert. Die geladenen Moleküle werden dann im Analysator durch ein elektrisches Feld beschleunigt und der Masse nach aufgetrennt. Im Detektor erfolgen anschließend der Empfang, die Verstärkung und die Aufzeichnung der Ionenstromsignale. Je nach Fragestellung kann der oben genannte Aufbau, wie im Fall der Tandem-Massenspektrometrie, erweitert werden. Die Durchführungen der massenspektrometrischen Analysen erfolgte dabei freundlicherweise durch Dr. rer. nat. Joachim Bartels.

Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Masse des trunkierten Fusionsproteins wurde mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierung bestimmt. Zum Einsatz kam dabei ein Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF II, Mircomass, Manchester, UK) im Positiv-Ionen-Modus. Die Ionisation der Proteinprobe erfolgt in einem elektrischen Feld zwischen der Probenkapillare, an deren Ende eine Hochspannung von 2-5 kV angelegt wird, und einer Gegenelektrode. Entsprechend der Feldrichtung sammeln sich am Ende der Kapillare die positiv geladenen Ionen des Analyten in einem Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus). Aus diesem Kegel lösen sich unterstützt durch den Zustrom des Stickstoff-Trägergases mit positiven Ionen beladene Tröpfchen ab. Diese verdunsten in der Ionisationskammer weiter, bis die elektrische Abstoßung der Ionen innerhalb der Tröpfchen größer wird als die Oberflächenspannung. Es kommt zur Coloumb-Explosion der Tröpfchen in Mikrotröpfchen, die häufig nur noch einzelne Ionen enthalten und schlussendlich unter weiterer Verdunstung des Lösungsmittels zum Ionengas führen. Nach Beschleunigung der ionisierten Moleküle durch ein elektrisches Feld erfolgt im Quadrupol eine Vorselektion der zu analysierenden Ionen. Bei den vorliegenden Messungen wurden Spektren im Bereich von 80-2000 m/z detektiert. Die eigentliche Analyse erfolgt im Flugzeitanalysator nach der „Time-of-Flight“ Methode. Je nach Masse und Ladung werden die Ionen im elektrischen Feld unterschiedlich stark beschleunigt und können anhand ihrer variierenden Flugzeit durch das Hochvakuum des Flugrohrs nach Auftreffen auf den Detektor einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis zugeordnet werden. Die gemessenen Rohdaten wurden mit Hilfe der MassLynx 4-Software (Micromass) ausgewertet. Dazu wurden die Spektren der einzelnen Scans gemittelt und Hintergrund-korrigiert. Abschließend wurden die monoisotopischen Massen in Dalton durch „Maximum Entropy1“ (MaxEnt1)-Dekonvolution berechnet.

Trypsinverdau und LysC-Verdau für MS-MS-Sequenzierung

ESI-MS- und SDS PAGE-Analysen zeigten wiederholt für das Fusionsprotein und das $FLG_{3880-4061}$-Fragment deutlich geringere Massen als zuvor berechnet worden war (3.3 und 3.4). Zur Analyse der Aminosäuresequenz wurden diese Peptide durch die Endopeptidasen Trypsin und LysC hydrolytisch gespalten und die entstandenen Fragmente anschließend mittels Tandem-Massenspektrometrie sequenziert. Die Auswahl der geeigneten Endoproteasen erfolgte nach virtuellem Verdau des Zielpeptids im PeptideCutter-Tool (www.expasy.org) des Swiss Institute of Bioinformatics mit dem Ziel in beiden Hydrolysen möglichst charakteristische Fragmente mit unterschiedlichen Längen zu produzieren

Die Serinprotease Trypsin spaltet dabei jeweils am Carboxyende der Aminosäuren Lysin, Arginin und auch nach modifizierten Cysteinen, während LysC nur am Carboxyende der Aminosäure Lysin schneidet und so längere Fragmente produziert. Die lyophilisierten Proben wurden vor dem Verdau gelöst und anschließend photometrisch die Proteinkonzentrationen

bestimmt. Je nach Proteinkonzentration wurden die Proben verdünnt, durch Zugabe von NH_4HCO_3 auf das pH-Optimum der entsprechenden Proteasen gebracht und anschließend für 4 h bei 37 °C mit je 100 ng Protease verdaut. Die verdauten Proben wurden mittels MS/MS-Sequenzierung analysiert.

Nanoelektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (NS-ESI-MS/MS)

Für die Analyse der Trypsin- und LysC-Fragmente wurde das Proteingemisch nach Hydrolyse mit den jeweiligen Endoproteasen zuerst mittels C2/C18 HPLC aufgetrennt und anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mittels Massenspektrometrie analysiert (HPLC-MS).
Für die MS-MS-Peptidsequenzierung wurde die Nanospray-Ionisierung (Wilm & Mann, 1996) gewählt. Diese Form der Ionisierung bedient sich dabei dem gleichen Prinzip wie die Elektrospray-Ionisierung, jedoch ermöglichen Metall-bedampfte Glaskapillaren mit einer Öffnung von lediglich 1-2 µm und einer damit verbundenen herabgesetzten Flussrate von 50-100 nl/min die Generierung kleinerer ionenbeladener Primärtröpfchen. Der geringere Verbrauch an Trägerlösung erlaubt eine höhere Konzentration der Probe bei gleichzeitig verringertem Probenvolumen, was zu sehr präzisen Messungen und einem insgesamt reduziertem Probenbedarf führt. Das Massenspektrometer wurde zu diesem Zweck mit einer Nano Z Spray-Einheit erweitert. Verglichen mit dem zuvor beschriebenen Aufbau wurde bei der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) zwischen dem Quadrupol zur Ionen-Selektion und dem Time-of-Flight-Flugzeitanalysator noch eine Stoßkammer zur Fragmentierung der gewählten Ionen zwischen geschaltet (QqTOF). Das Verfahren zur Fragmentierung wird „collision-induced dissociation“(CID) genannt. Im ersten Quadrupol werden die Ionen selektiert und anschließend in der Stoßkammer, ebenfalls ein Quadrupol, mit Argon-Atomen gezielt zur Kollision gebracht. Dadurch zerfällt das ausgewählte Molekül-Ion in für seine Aminosäure-Sequenz spezifische Fragmente, welche anschließend im Time-of-Flight-Analysator erfasst werden. Mittels „Maximum Entropy 3“ (MaxEnt3)-Dekonvolution wurden die monoisotopischen Massen der Fragmente aus den Trypsin- und den LysC-Verdauen in der „MassLynx 4“-Software berechnet. Die Identifikation der Peptidfragmente mittels „Fingerprint“-Analyse erfolgte per Datenbanksuche mit dem „Mascot“-Programm (MatrixScience, Boston, USA). Die massenspektrometrische Analyse und „Fingerprint“-Analyse wurde freundlicherweise durch Dr. rer. nat. Joachim Bartels durchgeführt.

2.12.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente als ergänzende Kontrolle der Proteinexpression und der Proteolyse des Fusionsproteins. Insbesondere weil die massenspektrometrisch bestimmten Massen von Fusionsprotein und Zielpeptid nicht den

zuvor berechneten Massen entsprachen (3.3.4 und 3.4). Es wurde ein 12%-Gel mit nachfolgender Zusammensetzung gegossen:

Trenngel:	gesamt: 5 ml
• 40% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid	1,5 ml
• Gel-Buffer: 3 M Tris (pH 8,5) 0,3% SDS	1,67 ml
• dH_2O	1,03 ml
• Glycerol 87%	0,77 ml
• APS 10%	25 µl
• TEMED	5 µl

Die Elektrophorese wurde in 1-fachem MES-Laufpuffer durchgeführt. Zur Minimierung unerwünschter Proteinanlagerung durch mögliche Kontaminationen wurde jede Probe mit 10 µl NPI-10 Puffer (pH 8,0) versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde jeder Probe 4-fach Ladepuffer hinzugefügt und für fünf Minuten erneut auf 95 °C erwärmt. Um die Sensitivität der Detektion von Proteinbanden zu erhöhen wurde eine Doppelfärbung mit Coomassie brilliant blue und Zink-Imidazol-Färbung durchgeführt (Fernandez-Patron, Hardy et al. 1995). Während Coomassie brilliant blue die Proteine durch Anlagerung an basische Seitenketten direkt anfärbt, wirkt die Zink-Imidazol-Färbung als Negativ-Färbung durch Färbung des Gels unter Aussparung der Proteinbanden. Als Größenstandard wurde die „Spektra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder" (Fermentas) verwendet.

Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Färbung mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue wurde in Kombination mit der Zink-Imidazol-Färbung angewandt. Das hier verwendete Färbe-Protokoll modifiziert nach Kang et. al 2002 (Kang 2002) hat den Vorteil einer erhöhten Empfindlichkeit bei verlängerter Färbedauer (untere Nachweisgrenze etwa 20-50 ng pro Bande). Nach der Elektrophorese in der Laufkammer wurde das Gel zwei Mal zur SDS-Elimination für jeweils zehn Minuten auf der Schüttelplatte mit H_2O gewaschen. Anschließend wurde das Gel in der kolloidalen Coomassie Färbelösung (2.8) über Nacht auf der Schüttelplatte gefärbt. Am nächsten Tag wurde das Gel nochmals zwei Mal für zehn Minuten in H_2O gewaschen und anschließend für 30 Minuten in einer Entfärbe-Lösung aus Ethanol und *ortho*-Phosphorsäure entfärbt. Danach wurde erneut zwei Mal für je 15 Minuten in H_2O gewaschen und anschließend die Zink-Imidazol-Färbung durchgeführt.

Zink-Imidazol-Färbung

Es handelt sich bei dieser Methode um eine Negativfärbung. Ihr Prinzip beruht darauf, dass die Salze im SDS-Gel in Gegenwart von Proteinen Salz-Protein-Verbindungen eingehen, die

weniger reaktiv sind als die freien Salze ohne Proteinkontakt. Während die SDS-Gel-Matrix nach der Zink-Imidazol-Färbung milchig erscheint, bleiben die Banden, in denen sich Protein befindet, durchsichtig. Die Doppelfärbung erhöht dadurch die Sensitivität gegenüber einer einfachen Coomassie Färbung. Zuerst erfolgte eine 15-minütige Inkubation in 100 ml Äquilibrierungs-Lösung. Im zweiten Schritt wurde das Gel in 100 ml Entwickler-Lösung für 30-40 Sekunden entwickelt. Um dieses Ergebnis zu konservieren, kann die Aufbewahrung in 100 ml 5%iger Natriumcarbonat-Lösung erfolgen (Ferreras et al. 1993).

3. Ergebnisse

Die strukturelle Charakterisierung des epidermalen „S100 Fused-Type“-Proteins Profilaggrin erfolgte bereits Anfang der 90er Jahre (Presland, Haydock et al. 1992). Trotzdem ist die Datenlage zum *C*-terminalen Ende von Profilaggrin spärlich und die Funktion weitgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der *C*-Terminus von Profilaggrin in Form des 182 Aminosäuren langen $FLG_{3880-4061}$ Fragment rekombinant exprimiert werden und anschließend zur weiteren Charakterisierung hinsichtlich einer antimikrobiellen Aktivität untersucht werden.

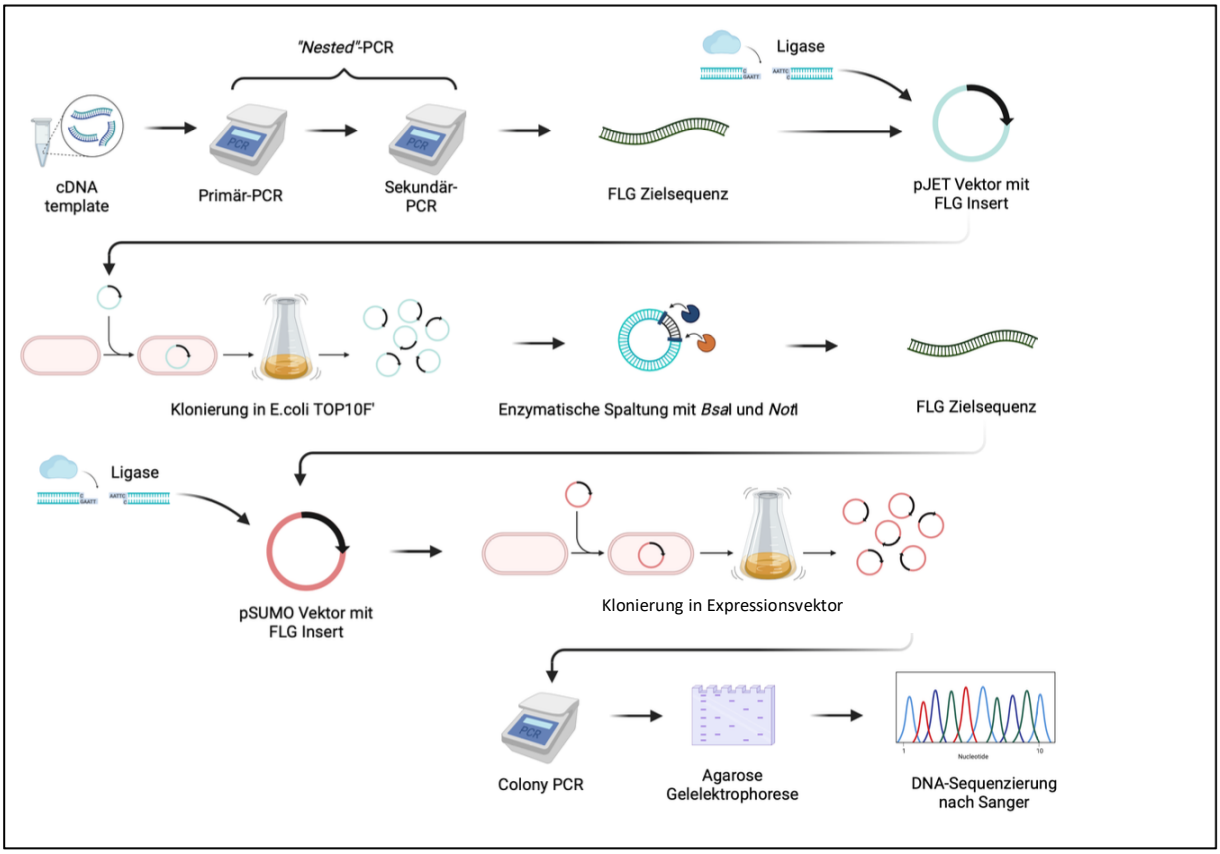


Abbildung 3-1: Methodisches Konzept – Teil 1 Molekulargenetik. *Das cDNA template wird zunächst mittels Nested-PCR vervielfältigt, in den Klonierungsvektor (pJET) ligiert und anschließend in E.coli-Zellen kloniert. Diese dienen als Bestand, um später erneut auf die Zielsequenz zurückgreifen zu können. Anschließend wird die Zielsequenz mittels enzymatischer Spaltung gewonnen und in den Expressionsvektor (pSUMO) eingebracht. Die erfolgreiche Klonierung wird mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Zielsequenz wird aus dem Gel extrahiert und durch DNA-Sequenzierung (Sanger) bestätigt (Abbildung erstellt mit BioRender).*

Die Versuchsschritte wurden jeweils in zwei Parallelansätzen durchgeführt. Ziel war neben einer zusätzlichen Parallelkontrolle der Schutz vor Kontamination und die Etablierung einer Rückfallebene durch eine zweite Probenlinie. Die Abbildungen 3-1, 3-5 und 3-6 zeigen schematisch die Schritte von der Amplifikation der FLG-Zielsequenz bis zur Analyse der Sequenz des exprimierten FLG-Peptids mittels Massenfingerprintanalyse. Zur besseren Übersicht erfolgt eine vereinfachte Darstellung. Versuchsreihen, die im Verlauf nicht

weitergeführt wurden, werden ebenso wie Wiederholungen (zum Beispiel die wiederholte Expression des Fusionsproteins) nicht abgebildet.

3.1. Rekombinante Expression des $FLG_{3880-4061}$ Fragments

3.1.1. Amplifikation der $FLG_{3880-4061}$-Gensequenz mittels PCR

Die DNA der Zielsequenz des *C*-terminalen Profilaggrin-Endes, im Folgenden als $FLG_{3880-4061}$ bezeichnet, umfasst 549 Basenpaare. Sie wurde zunächst mittels PCR amplifiziert. Zur Minimierung des Risikos unspezifischer Primerbindungen erfolgte die Amplifikation zweizeitig als Nested-PCR. Als Matrize diente eine aus humanen Keratinozyten (neonatale Vorhautepidermis) stammende cDNA, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Zhihong Wu. Durch eine Primär-PCR wurde in einem ersten Schritt mit Hilfe der sequenzspezifischen Primer Flg-cF und Flg-cR ein 614 bp großes Fragment amplifiziert. Dieses enthielt im Zentrum die 549 bp lange $FLG_{3880-4061}$-Zielsequenz und bildete das Ausgangsprodukt für die anschließende Sekundär-PCR. Hier kamen die Primer SUMO3-flg-cF und SUMO3-flg-cR mit nichtgenspezifischen Überhängen für den Einbau in das pSUMO3-Vektorsystem zur Verwendung.

Abbildung 3-2 (A) zeigt das Ergebnis der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung in einem 1,5%-Agarose-Gel. Bei den beiden Parallelansätzen der Bahnen 3 und 4 zeigte sich jeweils eine deutliche Bande zwischen 600 und 700 bp passend zur erwarteten Fragmentgröße von 614 bp. Beide Banden wurden aus dem Gel extrahiert, aufgereinigt und in 30 µl Tris-CL (10 mM) eluiert. Das so gewonnene 614 bp große Fragment wurde anschließend in der Sekundär-PCR als Matrize verwendet. Die PCR-Amplifikate aus der Sekundär-PCR zeigten sich in der gelelektrophoretischen Auftrennung in Form von kräftigen Banden zwischen 500 und 600 bp im 1,5%igem Agarose-Gel (Abbildung 3-2 B). Diese Banden stimmten mit der errechneten Fragmentlänge von 575 bp, bestehend aus einem 549 bp großen genspezifischen $FLG_{3880-4061}$-Anteil und 26 Basenpaaren aus genunspezifischen Primer-Anteilen, überein. Sie wurden aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurden die $FLG_{3880-4061}$-Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen *Bsa*I und *Not*I hydrolysiert, um sie für eine direkte Ligation in das pSUMO3-Vektorsystem vorzubereiten.

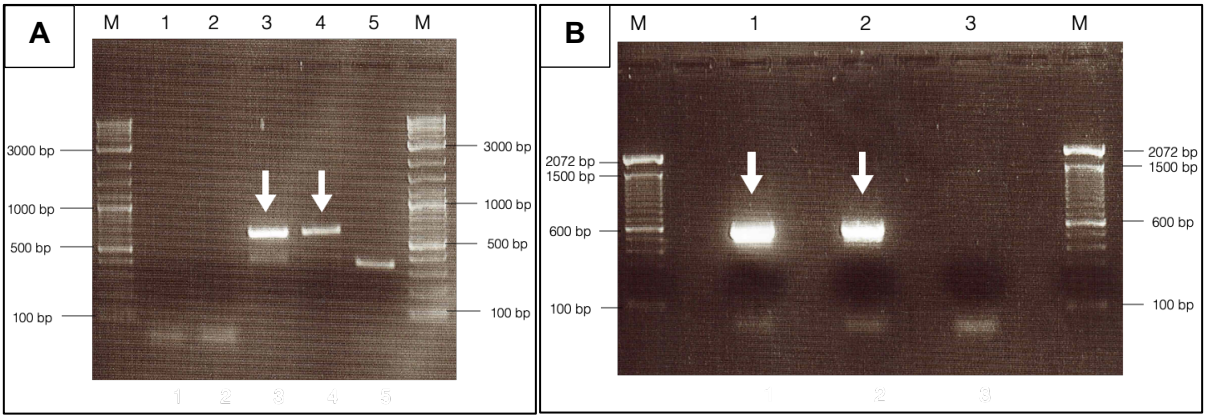


Abbildung 3-2. A) Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung der mittels „Standard-PCR" amlifizierten cDNA-Fragmente ($FLG_{3880-4061}$). *M: 2Log DNA-Leiter als DNA-Größenstandard. Bahnen 1 & 2: Ansatz 1 & 2 mit Primern des pSUMO-Systems (Jo-Sumo3 FLG-CF und Jo-Sumo3 FLG-CR), Bahnen 3 & 4: Ansatz 1 & 2 mit Standard-PCR Primern (Jo-FLG-CF & Jo-FLG-CR) zeigen die erwarteten Banden zwischen 600 und 700 bp passend zu der erwarteten Fragmentlänge von 614 bp. Bahn 5: PCR-Positiv-Kontrolle (GapDH, 360 bp). Die markierten Banden wurden zur Weiterverwendung ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.* ***B) Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung der mittels Nested-PCR amplifizierten Fragmente ($FLG_{3880-4061}$).*** *Beim Beladen des Gels wurde jeweils eine Tasche zwischen den Proben freigelassen, um Kontaminationen zu vermeiden und die spätere Gel-Extraktion zu erleichtern. M: 100-bp DNA-Leiter als Größenstandard. Bahn 1 & 2: Proben aus der „Nested"-PCR zeigen kräftige Banden zwischen 500 und 600 bp passend zur erwarteten Fragmentlänge von 575 bp. Bahn 3: PCR-Negativkontrolle (Wasser-Kontrolle ohne DNA-template). Die markierten Banden wurden zur Weiterverwendung ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.*

3.2. Klonierungen in verschiedenen Vektorsystemen und Zelllinien

Die Strategie zur Klonierung der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz in den Expressionsvektor pSUMO3 und die Expressionszelllinie *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen führte über verschiedene Zwischenschritte und musste im Verlauf immer wieder angepasst werden. Ursprünglich sollte das $FLG_{3880-4061}$-Insert nach PCR direkt in den pSUMO3-Expressionsvektor ligiert und in *E.coli* TOP10F'-Zellen transformiert werden. Anschließend sollte das Plasmid nach Plasmidpräparation in die Expressionszellinie *E.coli* BL21 (DE3) pLysS übertragen und danach das Zielpeptid exprimiert werden. Bereits die direkte Klonierung in den Expressionsvektor verlief nicht erfolgreich, sodass ein Zwischenschritt über einen reinen Klonierungsvektor eingefügt wurde. Auch hier gestalteten sich die Klonierungsversuche im in unserer Arbeitsgruppe etablierten pGEM-T-Vektorsystem nicht zufriedenstellend, so dass die Arbeit in diesem System eingestellt wurde und das pJet1.2/blunt-Vektorsystem als Zwischenvektor etabliert wurde. Neben der Expression in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS wurde im Verlauf auch in *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen exprimiert. Aus Gründen der Übersicht werden die Transformation in der Rosetta-gami2-Zelllinie unter 3.3.2 nachgereiht und die Ergebnisse von Klonierungen, die im Verlauf nicht weitergeführt wurden, im Anhang beschrieben (7.3).

3.2.1. Klonierung im pJet1.2/blunt- Vektorsystem

Das pJet1.2/blunt Vektorsystem wurde in dieser Arbeit als Klonierungsvektor für das $FLG_{3880-4061}$-Fragment eingesetzt, nachdem direkte Klonierungen in den Expressionsvektor und den pGEM-T-Zwischenvektor (7.3) nicht erfolgreich verliefen. Die Klonierung erfolgte in *E.coli* TOP10F'-Zellen.

Ligation und Transformation in *E.coli* TOP10F'-Zellen

Sowohl Ligation als auch Transformation wurden jeweils mit zwei Parallel-Ansätzen und mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Zur Vorbereitung der Ligation musste die Ausgangs-DNA im Vorfeld mit Hilfe des „DNA blunting Enzyme" aus dem CloneJET PCR Cloning Kit für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert werden. Die zuvor durch Hydrolyse mit *Bsa*I und *Not*I entstandenen Überhänge an den 3'-Enden („Sticky Ends") der Ausgangs-DNA wurden dadurch aufgefüllt und sogenannte „blunt ends" erzeugt. Die Ligation in den pJET 1.2/blunt-Vektor wurde mittels T4 Ligase durchgeführt.

Direkt im Anschluss erfolgte die Transformation in *E.coli* TOP10F'-Zellen (2.10.9). In allen LB-Nährmedien wurde entsprechend der vektorvermittelten Resistenz Carbenicillin (50 µg/ml) zur Selektion der Klone verwendet. Beide Transformationsansätze wurden jeweils in zwei unterschiedlichen Dosierungen (100 und 200 µl) auf insgesamt vier vorgewärmte LB-Nährböden ausplattiert (Platten 1-4) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Lediglich Platte 1 (Ligationsansatz A; 200 µl) wies dabei mit 17 Kolonien ein ausreichendes Bakterienwachstum auf. Auf Platte 2 (Ligationsansatz A; 100 µl) wuchsen drei Kolonien. Auf den Platten 3 (Ligationsansatz B; 200µl) und 4 (Ligationsansatz B; 100µl) wuchsen insgesamt vier Kolonien am Randbereich mit deutlich veränderter Morphologie. Insgesamt wurden zehn Bakterienkolonien gepickt (sechs aus Ligationsansatz A und vier aus Ligationsansatz B) und mittels Colony-PCR überprüft. Anschließend wurden die Amplifikate in 0,8%-igem Agarose-Gel elekrophoretisch aufgetrennt. Unter dem UV-Transilluminator zeigten alle aus Ligationsansatz A stammenden Kolonien Banden zwischen 600-800 bp. Passend dazu lag die berechnete Fragmentgröße bei etwa 680 bp (Abbildung 3-3 A). Die bereits makroskopisch von der Morphologie deutlich verschiedenen Kolonien aus dem Ligationsansatz B lieferten keine passenden Banden in der Colony-PCR.

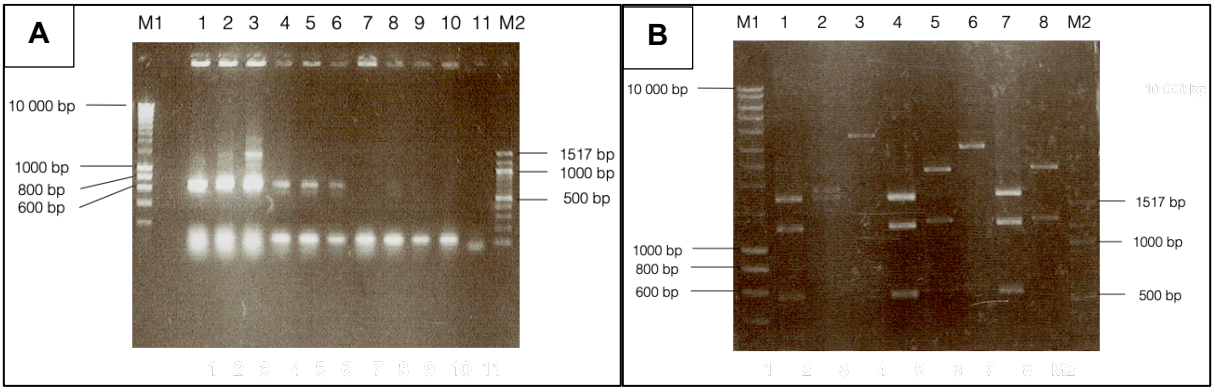


Abbildung 3-3 A) Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung der „Colony-PCR" von pJET 1.2/blunt transformierten E.coli TOP 10 Zellen. *M1: Bioline Hyperladder (SmartLadder)I als DNA-Größenstandard. Bahnen 1-6: Klone aus Ligationsansatz 1, alle Banden entsprechend etwa 600-800 bp, was der erwarteten Fragmentlänge von 680 bp entspricht. Bahnen 7-10: Klone aus Ligationsansatz 2, keine Banden detektiert. Bahn 11: PCR-Negativkontrolle (Wasserkontrolle). M2: TriDye 100 bp DNA Ladder als DNA Größenstandard.* ***B) Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung der Restiktionshydrolyse von pJET1.2-Vektor und PFLG$_{3880-4061}$ Fragment****. Aufgetragen wurde jeweils in Triplets. M1: Bioline HyperLadder (SmartLadder)I. Bahnen 2-4: Ligationsansatz 1 (Restriktionsenzyme in Bahn 1: BsaI/NotI, in Bahn 2 BsaI, in Bahn 3 NotI), Bahnen 4-6: Ligationsansatz 2 (Restriktionsenzyme in Bahn 4: BsaI/NotI, in Bahn 5 BsaI, in Bahn 6 NotI) Bahnen 7 & 8: Ligationsansatz 3 (Restriktionsenzyme in Bahn 7: BsaI/NotI, in Bahn 8 BsaI), M2: TriDye 100 bp-DNA Ladder als DNA-Größenstandard. Die Bahnen 1, 4 & 7 zeigen jeweils eine Banden zwischen der 500 und 600 bp passend zur erwarteten Fragmentgröße von 571 bp.*

Drei der *E.coli* TOP10F' Kolonien aus Ligationsansatz A wurden ausgewählt und damit je zwei LB-Flüssigkulturen (3 ml) beimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C auf der Schüttelplatte (200 Upm). Zur Extraktion der pJET 1.2-Vektoren mit inkludiertem FLG$_{3880-4061}$-Insert aus den TOP10F' *E.coli* Zellen wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt und das Ergebnis in 0,8%igem Agarose-Gel kontrolliert.

Das FLG$_{3880-4061}$-Insert wurde im nächsten Schritt mittels Restriktionshydrolyse durch die Restriktionsendonukleasen *Bsa*I und *Not*I stufenweise aus dem pJET 1.2-Vektor herausgelöst. Zur Überprüfung der korrekten Funktionsfähigkeit der Restriktionsenzyme wurden kleine Mengen des Lysats der einzelnen Kolonien nur mit jeweils einer der beiden Restriktionsendonukleasen verdaut. Im 1%-igen Agarose-Gel wurden diese Proben jeweils in den benachbarten Taschen zum vollständigen Verdau als Kontrolle eingebracht (Abbildung 3-3 B). Im Gel zeigten sich nach dem Verdau mit beiden Restriktionsenzymen in den Ansätzen für alle drei Kolonien Banden auf Höhe von 570 bp passend zur erwarteten Größe (571 bp) des geschnittenen Inserts. Diese Banden wurden ausgeschnitten, das Insert aus dem Gel extrahiert und anschließend eine Konzentrationsbestimmung der Insert-Menge im Eluat durchgeführt.

3.2.2. Klonierung im pSUMO3-Vektorsystem

Nachdem eine direkte Ligation des FLG$_{3880-4061}$-Fragments in das pSUMO3-Vektorsystem nicht erfolgreich verlief, erfolgte dieser Schritt nun nach Hydrolyse aus dem pJET1.2/blunt-Vektorsystem. Ziel der Ligation des FLG$_{3880-4061}$-Fragments in den pSUMO3-Vektor ist die

Expression und vereinfachte Aufreinigung des $FLG_{3880-4061}$-Peptids durch Erzeugung eines Fusionsproteins. Das Fusionsprotein wird aus der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz und einem pSUMO3-vektorspezifischen Anteil gebildet, der am *N*-terminalen Ende für einen „6xHistidin-Tag“ codiert und so eine effiziente Aufreinigung mittels immobilisierender Nickel-Affinitätschromatographie ermöglicht.

Ligation und Transformation in *E.coli* TOP10F‘-Bakterien

Im ersten Schritt erfolgte erneut die Ligation in den pSUMO3- Vektor (2.10.8). Verwendet wurden die $FLG_{3880-4061}$-Fragmente, die zuvor aus dem pJET 1.2/blunt-Vektor der drei Bakterienkulturen extrahiert wurden. Dabei wurde auf fabrikneuen pSUMO3-Vektor zurückgegriffen, der im Vorfeld der Ligation durch *Not*I hydrolysiert wurde. Es wurden drei Ligationsansätze angefertigt. Nach der Ligation wurde erneut wie unter 3.2.1 beschrieben transformiert, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Aufgrund der vektorvermittelten Resistenz des pSUMO3-Systems kam in allen Nährmedien Kanamycin (50 µg/ml) zur Verwendung. Zum Ausschluss von Kontaminationen und zum Nachweis der der Wirksamkeit des Antibiotikums wurden als Kontrollen zudem eine unbeimpfte LB-Platte und eine mit untransformierten *E.coli* TOP10F‘ und SOC-Medium beimpfte LB-Platte mit inkubiert. Auf allen mit transformierten *E.coli* TOP10F‘-Zellen beimpften LB-Platten zeigte sich ein reges Bakterienwachstum. Auf den beiden Negativkontrollen wuchsen keine Kolonien. Pro Ligationsansatz wurden jeweils drei Kolonien gepickt, auf eine Masterplatte übertragen und in eine Flüssigkultur übertragen. Abbildung 3-4 zeigt das Ergebnis der Colony-Check-PCR im 0,8% Agarose-Gel. Hier zeigten sich für alle ausgewählten Kolonien kräftige Banden im Bereich der 600 bp-Markerbande. Passend dazu war im Vorfeld eine erwartete Fragmentlänge von 646 bp berechnet worden, die sich aus der Zielsequenz (549 bp) und dem im PCR-Produkt enthaltenen Anteil des Vektors (97 bp) zusammensetzt (Bindestelle des vektorspezifischen Primers in der „T7 terminator“ Region). Anschließend wurden die Plasmide aus den drei Flüssigkulturen isoliert. Dazu wurde jeweils eine Flüssigkultur pro Ligationsansatz ausgewählt. Danach wurde eine Erfolgskontrolle in 1%-igem Agarose-Gel durchgeführt und die Proben der Plasmide aller drei Kolonien zur Sequenzierung gegeben. Hier wurde für das Insert einer Kolonie (Bezeichnung: Ligationsansatz B - TOP10F‘-Kolonie 6‘) eine Punktmutation der Base Alanin zu Cytosin im Bereich der Forward-Primer-spezifischen Sequenz festgestellt. Dabei handelte es sich zwar um eine stille Mutation, da beide Triplets (GCG und GCT) im revers-komplementären Basenstrang für die Aminosäure für Alanin codieren, die weitere Arbeit mit dieser Probe wurde dennoch vorerst zurückgestellt (Sequenzierungsdaten siehe 7.2.4).

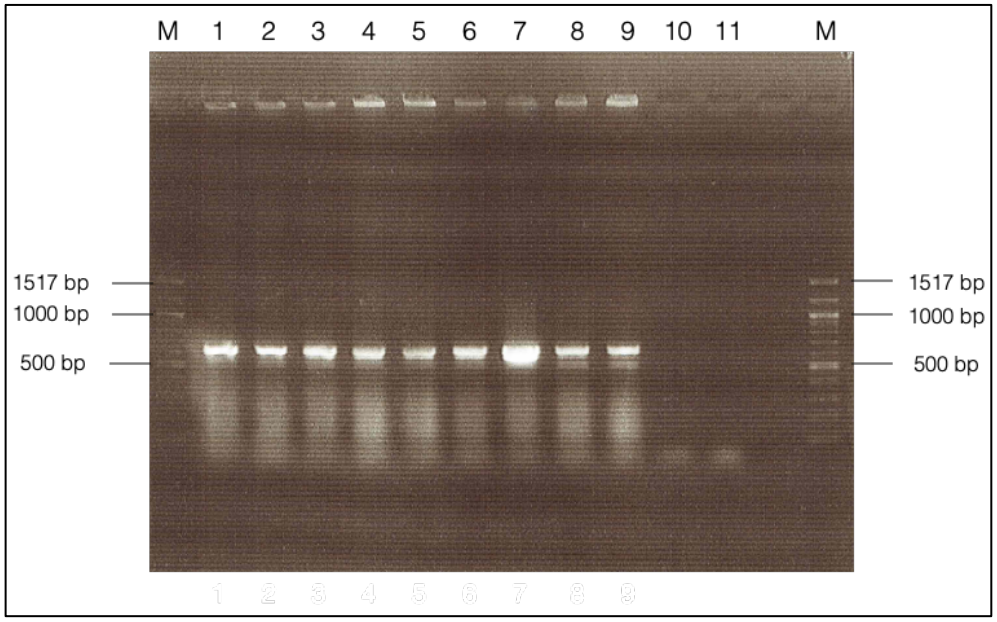


Abbildung 3-4 Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung der „Colony-PCR" von pSUMO3-transformierten E.coli TOP10 Zellen*. Für die PCR wurden die Primer Jo-Sumo3-flg CF und T7-short-term verwendet. M: TriDye 100 bp-Ladder als DNA-Größenstandard. Bahnen 1-3: Klone 1-3 aus Ligationsansatz A, Bahnen 4-6: Klone 4-6 aus Ligationsansatz B, Bahnen 7-9: Klone 7-9 aus Ligationsansatz C. Bahn 10: PCR-positiv Kontrolle aufgrund eines Pipettier-Fehlers ist hier keine Bande zu erkennen. Bahn 11: PCR-Negativkontrolle (Wasserkontrolle). Alle Proben (Bahnen 1-9) zeigen die erwarteten Banden (646 bp).*

Transformation in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Bakterien

Als Expressionszelllinie wurden *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen gewählt. Die Plasmide mit korrekter Basensequenz wurden in die *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert. Bei Resistenz der Zelllinie gegen Chloramphenicol und einer vektorvermittelten Resistenz gegen Kanamycin wurden LB-Medien mit entsprechenden Antibiotika verwendet (Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10). Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten aufgetragen und über Nacht inkubiert. Insgesamt wurden sechs Kolonien gepickt und auf eine Masterplatte übertragen. Der Erfolg der Transformation wurde mittels Colony-Check-PCR überprüft.

3.3. Expression der Fusionsproteine

Im Zuge der Arbeit erfolgten auch aufgrund der besonderen Beschaffenheit des Fusionsproteins mehrere Expressionsreihen in verschiedenen *E.coli*-Stämmen. Zum besseren Verständnis erfolgt die Darstellung der einzelnen Expressionen und der nachfolgenden Aufreinigungs- und Analyseschritte angelehnt an die chronologische Reihenfolge der Durchführung.

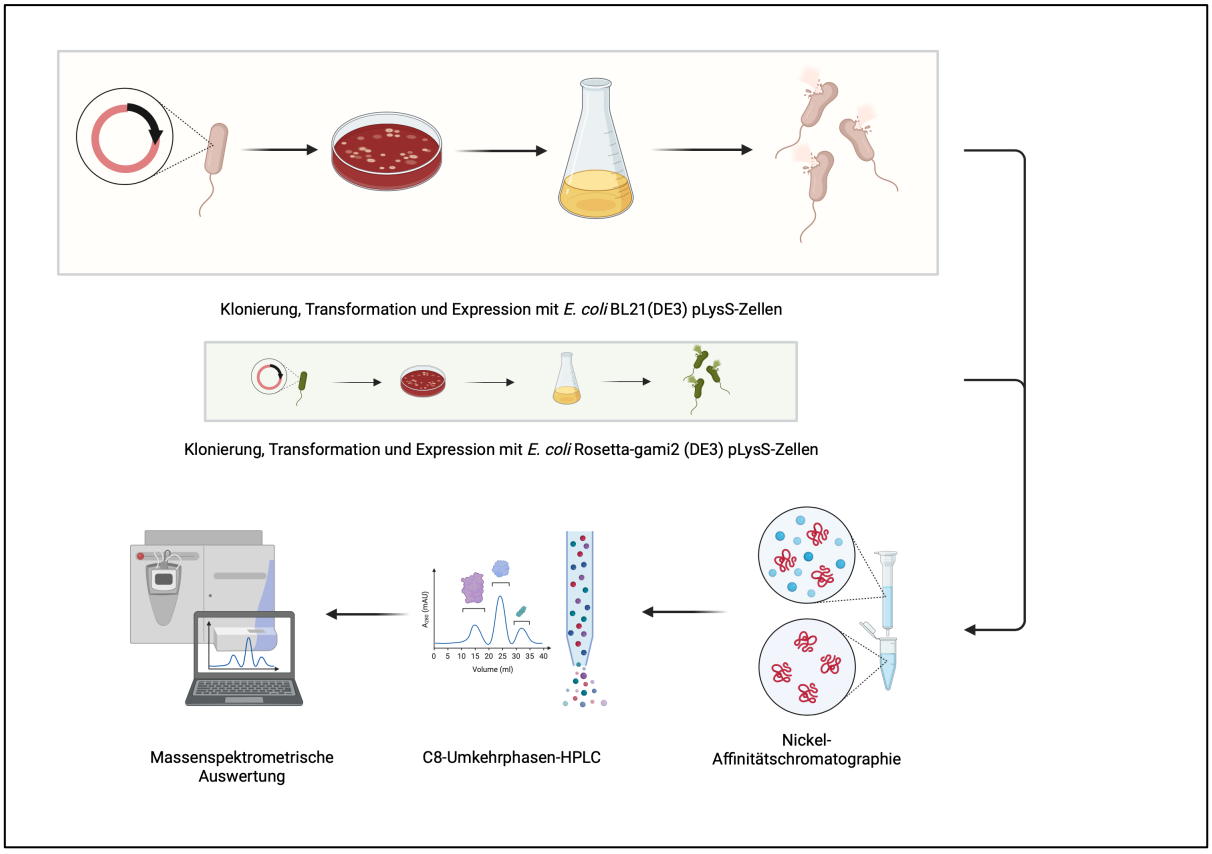


Abbildung 3-5 Methodisches Konzept – Teil 2 Proteinexpression. *Die im ersten Teil gewonnene DNA des Zielfragmentes wird im nächsten Schritt in kompetente Zellen transformiert und das Zielpeptid als Fusionsprotein (Zielfragment mit SUMO-tag) exprimiert. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich in BL21 (DE3) Zellen exprimiert. Ergänzend kam das Rosetta-gami2 (DE3) System zum Einsatz. Das so gewonnene Fusionsprotein wird mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt und durch C8-Umkehrphasen HPLC von anderen Proteinen getrennt. Anschließend erfolgt die massenspektrometrische Analyse des Proteins (siehe* ***Abbildung 3-6****). Abbildung erstellt mit BioRender.*

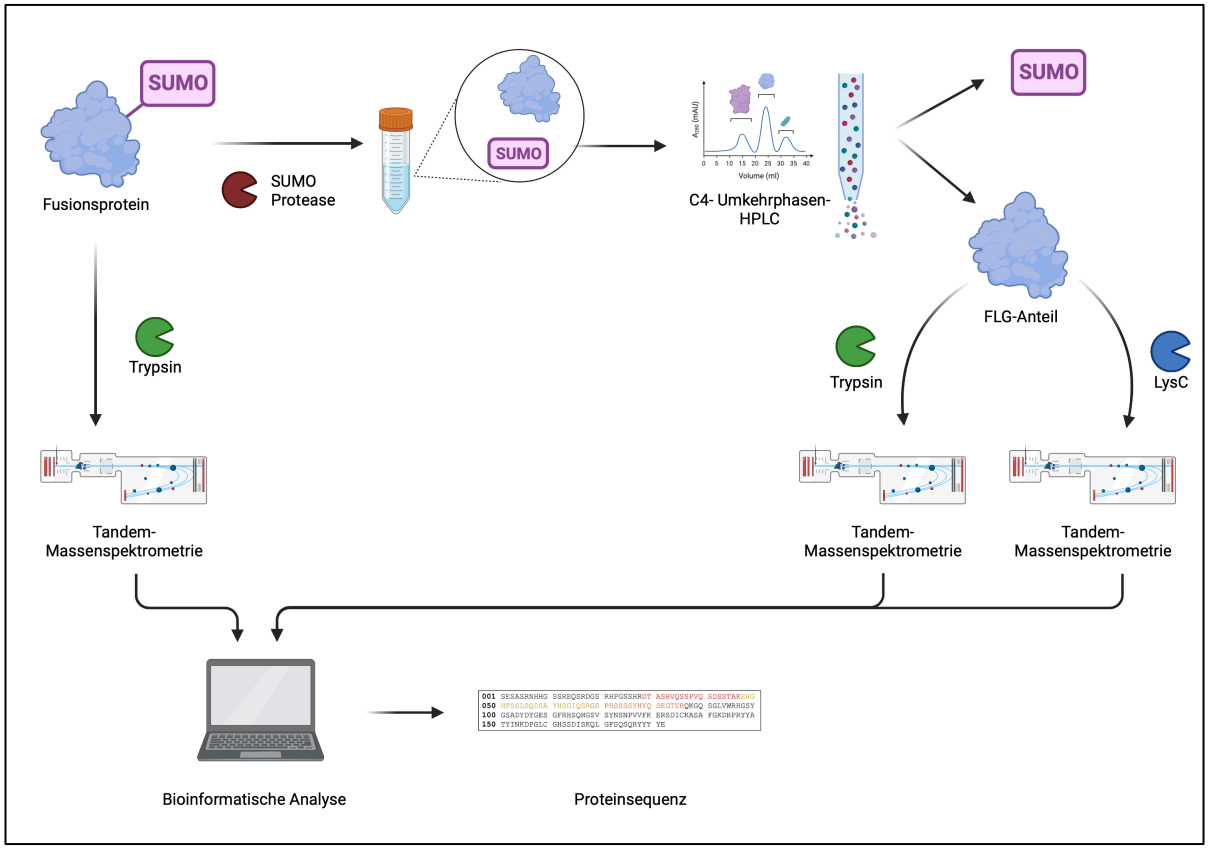


Abbildung 3-6 Methodisches Konzept – Teil 3. Proteinanalytik. *Das in der Proteinexpression gewonnene Fusionsprotein wird zunächst proteolytisch in seine Komponenten (Zielpeptid* $FLG_{3880\text{-}4061}$ *und SUMO-Tag) gespalten und die Fraktionen mittels C4-Umkehrphasen-HPLC getrennt. Bei wiederholt zu geringen Massen des Zielpeptids erfolgten weitere Analysen zur Bestimmung der Proteinsequenz. Dazu wird in zwei Ansätzen das Zielpeptid einmal mit Trypsin und einmal mit LysC verdaut und die entstehenden Fragmente mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert. In einem anderen Ansatz wird das gesamte Fusionsprotein mit Trypsin verdaut und ebenfalls eine Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt. Mithilfe von bioinformatischen Analysen lässt sich anhand der so gewonnen Daten die Proteinsequenz ableiten. Abbildung erstellt mit BioRender.*

3.3.1. Expressionen und Aufreinigung in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS

Nach Transformation des pSUMO3-Vektor samt $FLG_{3880-4061}$-Insert in die *E.coli* BL21 (DE3) pLysS- Zellen und Erfolgskontrolle mittels Colony-PCR wurden drei Bakterienkolonien ausgewählt, in Übernachtkulturen überführt, bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert und damit am folgenden Tag Expressionskulturen angesetzt. Die Proteinexpression wurde mit IPTG und wie unter 2.11.2 beschrieben durchgeführt. Die Zelllyse der Bakterien erfolgte durch „Freeze & Thaw"-Methode und anschließende Ultraschallbehandlung. Im nächsten Schritt wurde das Fusionsprotein durch immobilisierende Nickel-Affinitätschromatographie vom restlichen Überstand getrennt. Im Eluat wurde anschließend die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt und in Abhängigkeit von den gemessenen Konzentrationen vor C8-Umkehrphasen-HPLC aufkonzentriert oder verdünnt, um eine Proteinüberladung an der HPLC-Säule zu verhindern. An der C8-Säule wurde das Fusionsprotein von den übrigen Histidin-reichen Proteinen aus *E.coli* getrennt, die nach Interaktion mit der Nickelsäule im Eluat verbleiben konnten. Die einzelnen Proteinfraktionen wurden über einen Gradienten der beiden Puffer A (0,1% TFA in H_2O) und Puffer B (0,1% TFA in 100% Isopropanol) an der C8-HPLC-Säule aufgetrennt. Entsprechend ihrer Retentionszeit wurden die Proteine von der Säule eluiert und so fraktioniert. Das Chromatogramm der HPLC in Abbildung 3-7, angefertigt nach der ersten Proteinexpression, zeigt exemplarisch für die verschiedenen Expressionsreihen die Elution der verschiedenen Proteinfraktionen detektiert bei 215 nm Absorption. Das Fusionsprotein wurde bei etwa 24 Minuten von der HPLC-Säule eluiert, erkennbar am Peak zu diesem Zeitprunkt im Chromatogramm (markiert mit Pfeil).

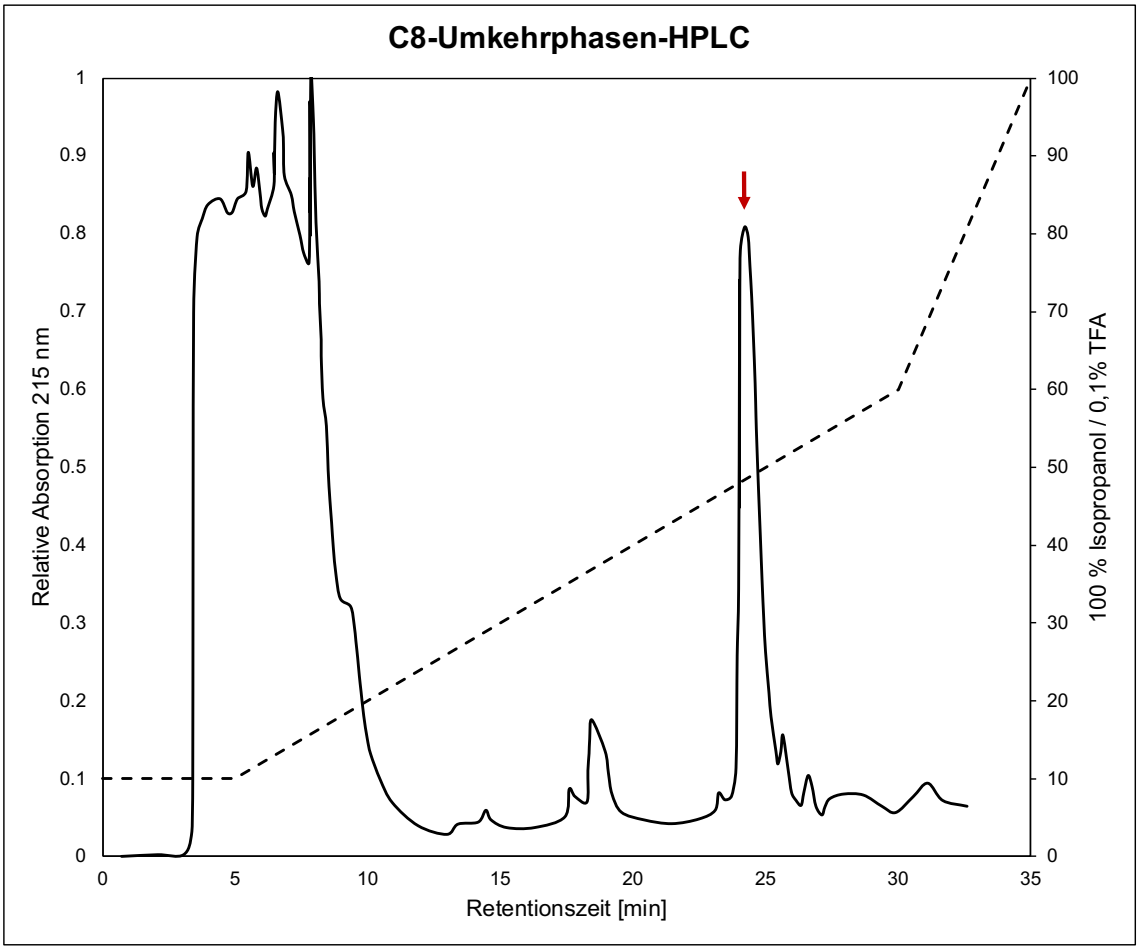


Abbildung 3-7 Repräsentatives Chromatogramm der C8-Umkehrphasen HPLC *des Fusionsproteins SUMO-FLG$_{3880-4061}$ aus rekombinanter Expression in E.coli BL21 pLysS. Gezeigt ist die relative Absorption (normiert auf den graphisch ermittelten Maximalwert; Primärachse links) bei 215 nm (durchgezogene Linie) im Gradientenverlauf (unterbrochene Linie). Auf der rechten Sekundärachse ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die zuvor über eine Nickel-Affinitätssäule aufgereinigte Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min auf die C8-Säule aufgetragen und mit einem H2O/0,1% TFA – 100% Isopropanol/0,1% TFA-Gradienten eluiert. Der Peak des Fusionsproteins ist mit einem Pfeil markiert.*

Die Massenbestimmung der jeweiligen Proteinfraktionen in den Eluaten wurde im Massenspektrometer durchgeführt. Im Vorfeld war für das FLG$_{3880-4061}$-Fusionsprotein anhand der Aminosäuresequenz über das ProtParam tool (www.expasy.org) des Swiss Institute of Bioinformatics eine Masse von 31.678 Da berechnet worden. Die massenspektrometrischen Analysen der Eluate mit dem mutmaßlichen Fusionsprotein zeigten jedoch reproduzierbar ein Protein mit deutlich reduzierter Masse von jeweils 17.397 Da (Abbildung 3-8). Untersucht wurden die Produkte aus zwei verschiedenen Kolonien, die nach Transformation des FLG$_{3880-4061}$-pSUMO3-Plasmids in die *E.coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen gepickt worden waren. Die Proben wurden während der Proteinexpression und den nachfolgenden Aufreinigungsschritten bis zur massenspektrometrischen Analyse durchgehend voneinander getrennt. Der Masseunterschied von 14.281 Da zwischen theoretisch errechneter und tatsächlich gemessener Molekülmasse ermöglichte damit keine Zuordnung des in Elution befindlichen Proteins.

Die weiteren Schritte erfolgten daher mit dem Ziel der genaueren Analyse dieses 17.397 Da schweren Proteins und dem Ausschluss möglicher Fehlerquellen vor und nach der Proteinexpression.

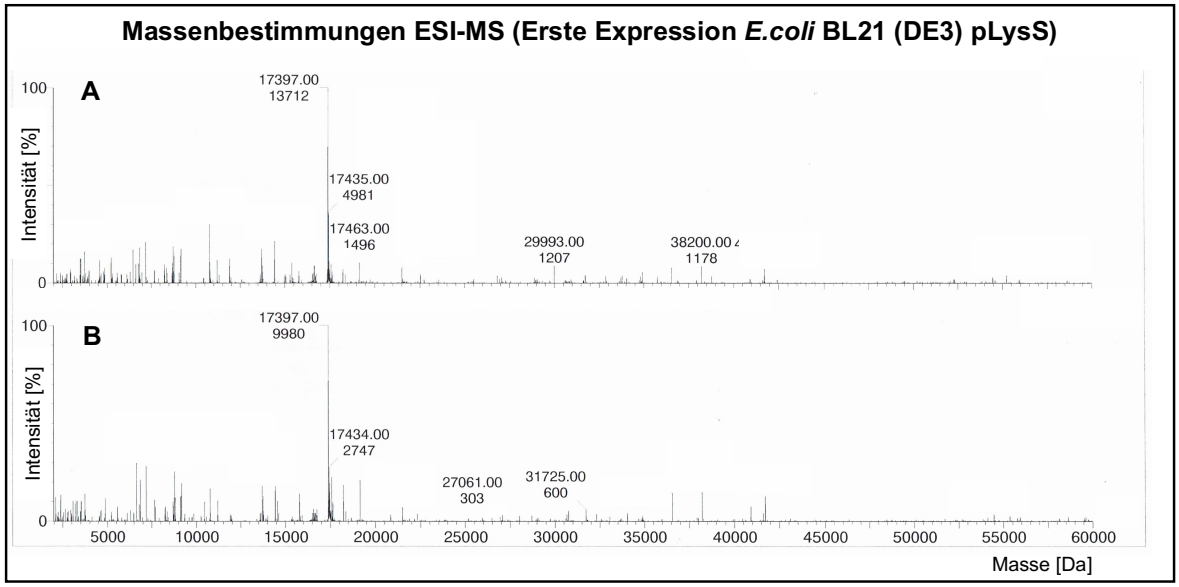


Abbildung 3-8 Exemplarische Massenbestimmungen zum Nachweis des pSUMO3-FLG$_{3880-4061}$ Fusionsproteins *mittels ESI-MS -Erste Expression in E.coli BL21 (DE3) pLysS. Dargestellt ist die „MaxEnt1"-Auswertung (nicht zentriert) nach Aufreinigung der exprimierten Fragmente durch C8-Umkehrphasen-HPLC nach der ersten von vier Expressionen in E.coli BL21 (DE3) pLysS. Die Masse in Dalton (Abszisse) ist gegen die Intensität in Prozent (Ordinate) aufgetragen. Die dargestellten Spektren stammen von zwei unterschiedlichen Expressionskulturen. Panel A: E.coli BL21 (DE3) pLysS Expression1 - Ligationsansatz A - Kolonie2. Panel B: E.coli BL21 (DE3) pLysS Expression1 - Ligationsansatz A - Kolonie 3. Es wurde jeweils eine Massen von 17.393 Da ermittelt, während im Vorfeld eine Masse von 31.678 Da für das komplette Fusionsprotein berechnet worden war.*

Im ersten Schritt wurde bei beiden *E.coli* BL21 (DE3) pLysS-Kolonien, die für die Proteinexpression verwendet wurden, eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die isolierten Plasmide wurden anschließend sequenziert (Sequenzierungsdaten siehe 7.2.5). Bereits im vorangegangen Schritt nach Klonierung des pSUMO3-Vektors samt FLG$_{3880-4061}$-Insert in die *E.coli* TOP10F'-Bakterien war eine Sequenzierung durchgeführt worden (7.2.4). Weitergearbeitet wurde nur mit Klonen mit korrekter Basenfolge. Die erneute Sequenzierung nach Klonierung in die *E.coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen erfolgte nun zum Ausschluss einer Neumutation innerhalb der Profilaggrin- oder der Vektorsequenz, als möglicher Ursache eines Transkriptionsstops durch z.B. mutationsbedingten Einbau eines Stopcodons in die Profilaggrin-Sequenz. Die Ergebnisse der Sequenzierung lieferten eine korrekter Basenfolge ohne Hinweise auf Mutationen.

Als weitere Maßnahme wurde die Proteinexpression inklusive der anschließenden Aufreinigungsschritte zum Ausschluss eines Anwenderfehlers wiederholt. Beide in der ersten Expression verwendeten *E.coli* BL21 (DE3) pLysS-Kolonien aus Ligationsansatz A fanden erneut Verwendung. Allerdings wurde bei der Expression des Fusionsproteins dieses Mal bei

beiden Kolonien nach der Zelllyse ein Proteaseinhibitor (2.1) verwendet, um eine enzymatische Spaltung des Fusionsproteins innerhalb der *E.coli*-Zellen nach Expression zu verhindern. Zudem erfolgte die Proteinexpression in zwei weiteren bisher nicht verwendeten Kolonien der BL21 (DE3) pLysC-Zelllinie. Diese Kolonien stammten aus dem Ligationsansatz B in *E.coli* TOP10F'. Dieser Ligationsansatz war ursprünglich aufgrund einer stillen Mutation im Bereich der Forward-Primer-spezifischen Sequenz (Ligationsansatz B - TOP10F'-Kolonie 6) nach der Sequenzierung nicht für die erste Proteinexpression verwendet worden (3.2.2).
Für die zweite Proteinexpression wurde das Protokoll leicht abgewandelt. Um eine höhere Bakteriendichte zu erreichen, erfolgte die Inkubation der Flüssigkulturen vor Induktion der Expression dieses Mal nicht bei Raumtemperatur, sondern bei 37 °C im Wärmeschrank auf der Schüttelplatte. Die weiteren Schritte der Expression und Aufreinigung erfolgten analog zum weiter oben beschriebenen Procedere (3.3.1). Die Massenspektrometrie zeigte für das erwartete Fusionsprotein nach Nickel-Affinitätschromatographie und C8-Umkehrphasen-HPLC wie in der Expressionsreihe zuvor exakt eine Masse von 17.396 Da für alle vier Analyte (Abbildung 3-9) und damit erneut nicht die erwartete Masse von 31.678,0 Da. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden insgesamt vier Expressionsreihen in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS durchgeführt. Alle zeigten kongruente Ergebnisse.

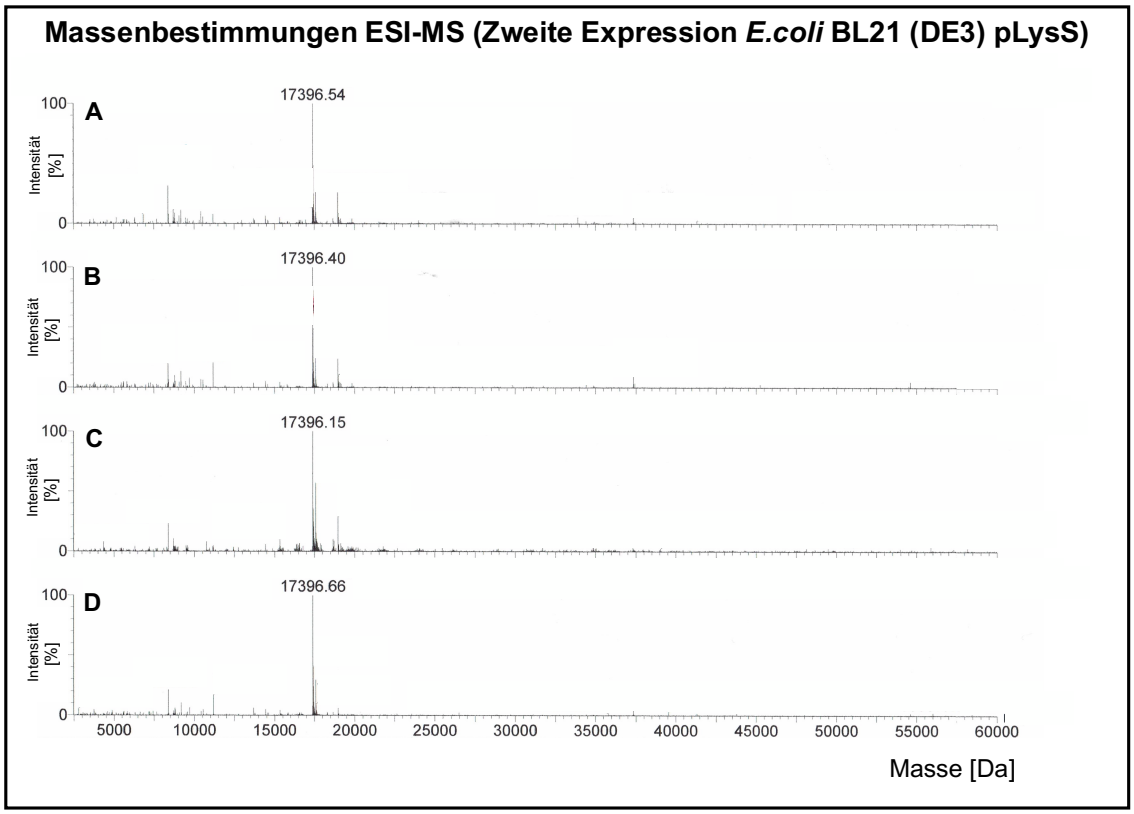


Abbildung 3-9 Massenbestimmungen zum Nachweis des pSUMO3-FLG$_{3880-4061}$ Fusionsproteins *mittels ESI-MS – Zweite Expression in E.coli BL21 (DE3) pLysS. Dargestellt ist die „MaxEnt1"-Auswertung nach Aufreinigung der exprimierten Fragmente durch C8-Umkehrphasen-HPLC. Die Masse in Dalton (Abszisse) ist gegen die Intensität in Prozent (Ordinate) aufgetragen. Die dargestellten Spektren stammen von unterschiedlichen Expressionskulturen. Panel A: E.coli BL21 (DE3) pLysS Expression2 - Ligationsansatz A - Kolonie2. Panel B: E.coli BL21 (DE3) pLysS Expression2 - Ligationsansatz A – Kolonie3. Panel C: E.coli BL21 (DE3) pLysS Expression2 - Ligationsansatz B – Kolonie4. Panel D: E.coli BL21 (DE3) pLysS Expression2 - Ligationsansatz B – Kolonie5. Es wurde erneut jeweils eine Masse von 17.393 Da ermittelt.*

3.3.2. Transformation in *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen

Es ließ sich reproduzieren, dass in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen nur ein Protein mit deutlich reduzierter Masse exprimiert werden konnte. Es bestand deshalb der Verdacht, dass es bei der Expression in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS zu einer spezifische Verkürzung des Fusionsproteins kommen könnte. Zum Ausschluss einer Expressionssystem-bedingten Ursache erfolgte der Wechsel der Expressionszellinie auf *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen. Im Gegensatz zu *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen verfügen *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3)-Zellen über ein erweitertes Spektrum an tRNAs für „rare codons". Bei heterologer Genexpression wie in diesem Fall eines humanen Peptids in prokaryothischen Zellen, kann es durch unterschiedliche Häufigkeiten in der Codonverwendung zwischen humanen Zellen und dem Expressionswirt bei gehäufter Inanspruchnahme sehr seltener tRNAs zu einem Abbruch während der Translation kommen (Gouy & Gautier 1982). Die Rosetta-gami2-Zellen verfügen deshalb über das zusätzliche Plasmid pRARE2, das die genomischen Sequenzen zur Bildung

der sieben seltensten tRNA in *E.coli* bereitstellt (Competent cells – User Protocol – Novagen 2011).

Für die Transformation durch Elektroporation wurden die drei Plasmide verwendet, die zuvor aus den *E.coli* TOP10F'-Bakterien isoliert und deren Basensequenzen bereits sequenziert worden waren (7.2.4 und 7.2.5). Alle drei Plasmide stammten aus unterschiedlichen Ligationsansätzen. Nach Transformation wurde die Inkubation bei 37 °C über Nacht auf LB-Agarplatten durchgeführt, die mit den Antibiotika Chloramphenicol, Tetracyclin und Kanamycin gegossen worden waren. Die Resistenzen für Choloamphenicol und Tetrazyclin waren dabei über die *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zelllinie, die Resistenz für Kanamycin über den pSUMO3-Vektor vermittelt. Auf allen Platten kam es zu ausreichendem Bakterienwachstum. Es wurden pro Transformationsansatz je drei Kolonien gepickt und diese in Flüssigkulturen übertragen. Der Erfolg der Transformation wurde erneut mittels Colony-PCR bestätigt (Abbildung 3-10).

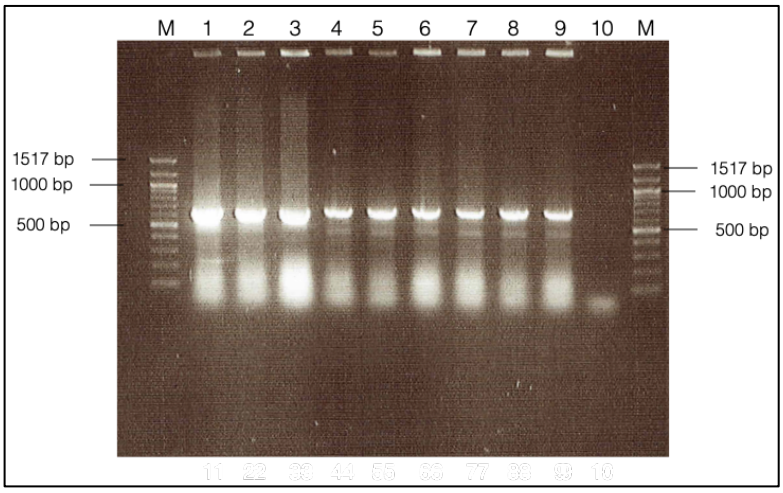


Abbildung 3-10 Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung der „Colony-PCR" von pSUMO3-transformierten E.coli Rosetta-gami2-Zellen. *Für die PCR wurden die Primer Jo-Sumo3-FLG CF und T7-short-term verwendet. Bahn M: TriDye 100 bp DNA-Größenstandard. Bahnen 1-9: Colony-PCRs der 9 gepickten Kolonien, jeweils drei Kolonien pro Ansatz sind nebeneinander aufgetragen. Bahn 10: PCR-Negativkontrolle (Wasserkontrolle). Alle Kolonien (Bahnen 1-9) zeigen die erwartete Bande von ca. 646 bp und damit die erfolgreiche Transformation.*

3.3.3. Expressionen und Aufreinigung in *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen

Die Proteinexpression in den *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3)-Zellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll zur Proteinexpression in den *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen. Insgesamt wurden drei Bakterienkulturen ausgewählt und in eine mit den passenden Antibiotika versetzte Expressionskultur überführt. Jede Kultur entstammte dabei einem anderen Ligationsansatz. Die Bakteriendichte wurde erneut durch OD_{600nm}-Messung überprüft und schließlich auf 0,1 angeimpft. Es ist anzumerken, dass das Bakterienwachstum der Rosetta-gami-Zellen deutlich

langsamer verlief als das Wachstum der BL21-Zellen. So mussten die Expressionskulturen nach Inkubation über Nacht bei 37° im Wärmeschrank aufgrund zu geringen Wachstums eine weitere Nacht bei Raumtemperatur inkubiert werden. Aus diesem Grund wurde nicht, wie ursprünglich geplant, auf eine OD_{600nm} von 0,02, sondern wie oben beschrieben mit einer höheren Bakteriendichte (OD_{600nm} von 0,1) angeimpft. Die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG wurde bei einer OD_{600nm} von 0,6-0,9 gestartet. Inkubation, Zentrifugation, Bakterienaufschluss und die Aufreinigung mittels immobilisierender Nickel-Affinitätschromatographie und C8-Umkehrpahsen-HPLC erfolgten analog zur Verfahrensweise bei den *E.coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen. Abbildung 3-11 zeigt die Ergebnisse der Massenspektrometrie nach Aufreinigung über der C8-HPLC-Säule. Analysiert wurde wie bereits unter 3.3.1 beschrieben jeweils das Eluat der größten Proteinfraktion pro HPLC-Lauf. Im Gegensatz zu den Massenspektrometerdaten nach Expression in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS bestand hier jedoch ein deutlich inhomogeneres Bild mit Proteinen verschiedener Massen im analysierten Eluat. Auch die dominante Proteinfraktion der vorangegangenen Expressionen mit einer Masse von 17.396 Da war erneut nachweisbar. Zudem konnte keine größere Proteinfraktion mit einer Masse von 31678.0 Da aufgezeigt werden, sodass die Arbeit in den *E.coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen beendet wurde.

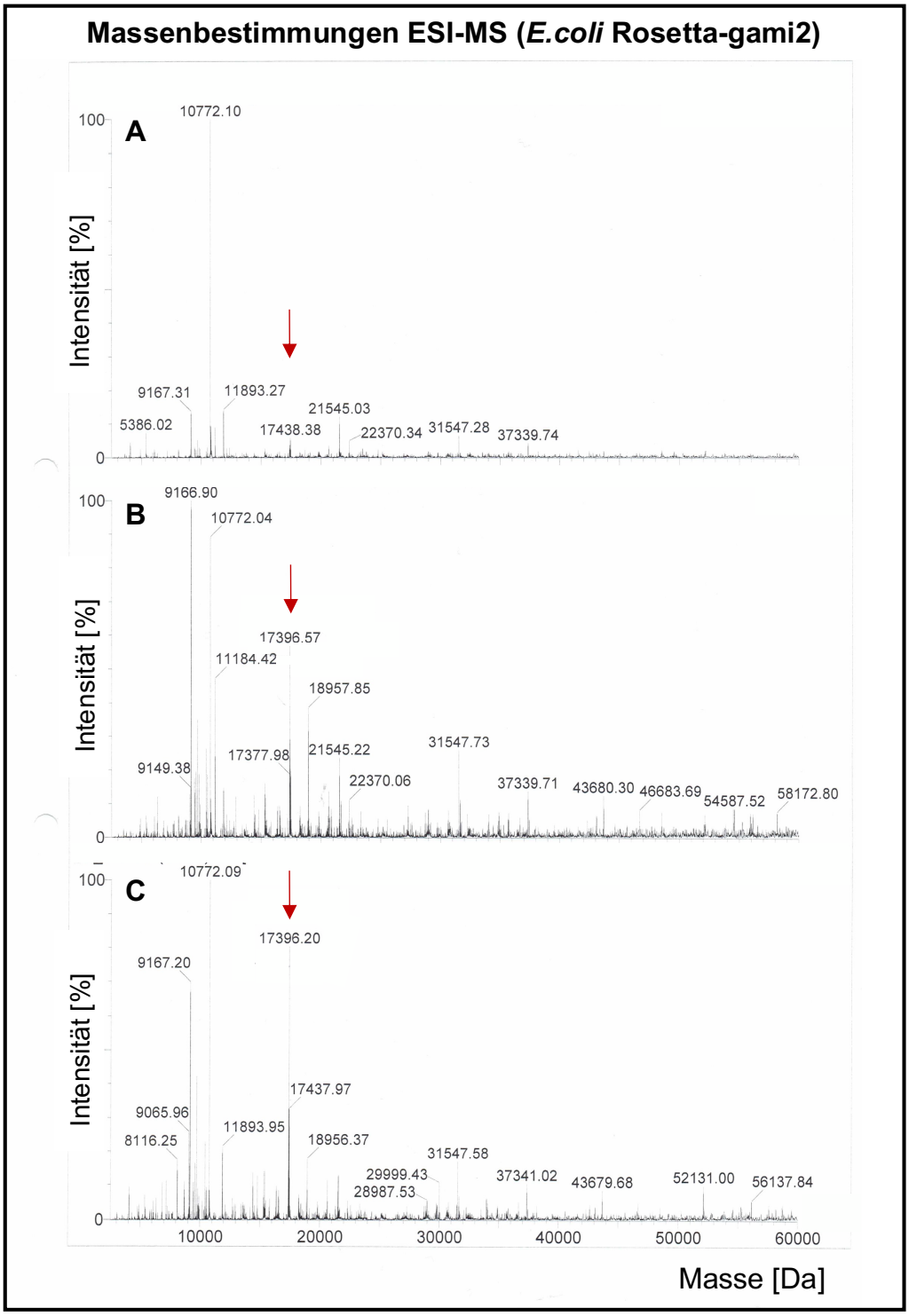


Abbildung 3-11 Massenbestimmungen zum Nachweis des pSUMO3-FLG$_{3880-4061}$ Fusionsproteins *mittels ESI-MS –Expression in E.coli Rosetta-gami2 (DE3) pLysS. Dargestellt ist die „MaxEnt1"-Auswertung nach Aufreinigung der exprimierten Fragmente durch C8-Umkehrphasen-HPLC. Die Masse in Dalton (Abszisse) ist gegen die Intensität in Prozent (Ordinate) aufgetragen. Die dargestellten Spektren stammen jeweils aus unterschiedlichen Expressionskulturen. Panel A: E.coli Rosetta-gami2 (DE3) pLysS Expression1 - Ligationsansatz A – Kolonie1. Panel B: E.coli Rosetta-gami2 (DE3) pLysS Expression1 – Ligationsansatz B – Kolonie4. Panel C: E.coli Rosetta-gami2 (DE3) pLysS Expression1 - Ligationsansatz C – Kolonie7. Mit Pfeil ist der in E.coli BL21 (DE3) pLysS dominante Massepeak von 17.396 Da markiert. Eine Masse von 31.678 Da berechnet für das komplette Fusionsprotein findet sich nicht.*

3.3.4. Proteinanalyse nach Expression in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS

In den Expressionsreihen in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS wurde in allen Expressionskulturen ein Protein mit einer Masse 17.396 Da exprimiert. Diese Masse war signifikant geringer als die Masse, die für das Fusionsprotein über das ProtParam tool (www.expasy.org) des Swiss Institute of Bioinformatics errechnet worden war. Der Proteinexpression wurden daher weitere Analyseschritte zur Charakterisierung des exprimierten Proteins angeschlossen.

Dazu wurde bei dem Expressionsprotein ein Peptid-Mapping durchgeführt. Das Protein wird dafür mittels Protease gespalten, diese Spaltfragmente anschließend durch Nanospray-Ionisierung ionisiert und im Massenspektrometer gemessen, um Hinweise auf die Aminosäuresequenz zu erhalten. Zuvor musste die Probe nach Aufreinigung an der C8-Umkehrphasen-HPLC lyophilisiert werden. Anschließend wurde die Probe mit Ammoniumhydrogencarbonat gepuffert und die Proteinkonzentration durch Extinktion bei 280 nm bestimmt. Zur Vorbereitung wurden mögliche Disulfidbrücken der Probe durch Reduktion mit DTT gespalten und mögliche SH-Gruppen mit Iodacetamid alkyliert. Als Spaltungsreagenz wurde die Serinprotease Trypsin gewählt. Der Verdau wurde bei 37 °C über Nacht durchgeführt. Aufgereinigt wurde die Probe unmittelbar vor der MS-MS-Sequenzierung über eine POROS™-Affinitätssäule (Thermo Fisher Scientific). Die Selektion, Fragmentierung und Massenbestimmung der ionisierten Proben im Massenspektrometer erfolgten wie unter 2.12.8 beschrieben. Die Peptidmassenfingerprint-Analyse der detektierten Peptidfragmente mit Hilfe der Mascot-Software (https://www.matrixscience.com) erbrachte den Nachweis von Aminosäure- Teilsequenzen aus dem Profilaggrin-Zielpetid $FLG_{3880-4061}$ und dem pSUMO3-Fusionstag mit sehr hoher statistischer Wahrscheinlichkeit (Tabelle 3.1 und Abbildung 3-12). Damit konnte das Expressionsprotein als Fusionsprotein identifiziert werden. Der Masseunterschied von 14.281 Da zwischen theoretischer und massenspektrometrisch bestimmter Masse ist daher am ehesten über eine Verkürzung des Fusionsproteins erklärbar.

Tabelle 3.1 Peptidmassenfingerprint-Analyse des Fusionsproteins (Trypsinverdaut) – Detektierte Peptidfragmente

Peptide-Sequenz	***Aminosäureposition (Fusionsprotein)***	***Gen***
EGVKTENDHINLK	17-29	SUMO3-like
TENDHINLK	21-29	SUMO3-like
VAGQDGSVVQFK	30-41	SUMO3-like
DTASHVQSSPVQSDSSTAK	130-148	Filaggrin - Homo sapiens
EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSR	149-169	Filaggrin - Homo sapiens
GSPHSSSSYHYQSEGTER	170-187	Filaggrin - Homo sapiens

```
001 GHHHHHHGGM SEEKPKEGVK TENDHINLKV AGQDGSVVQF KIKRHTPLSK
050 LMKAYCERQG LSMRQIRFRF DGQPINETDT PAQLEMEDED TIDVFQQQTG
100 GSESASRNHH GSSREQSRDG SRHPGSSHRD TASHVQSSPV QSDSSTAKEH
150 GHFSSLSQDS AYHSGIQSRG SPHSSSSYHY QSEGTERQKG QSGLVWRHGS
200 YGSADYDYGE SGFRHSQHGS VSYNSNPVVF KERSDICKAS AFGKDHPRYY
250 ATYINKDPGL CGHSSDISKQ LGFSQSQRYY YYE
```

Legende:

Graue Grundierung:	Fusionstag	Identifizierte Fragmente 1-6:
Keine Grundierung:	$FLG_{3880-4061}$	Farbliche Akzenturierung der Sequenz

Abbildung 3-12 Sequenz des Fusionsproteins mit farblicher Darstellung von in der Peptidmassenfingerprintanalyse identifizierten Peptidfragmenten.

3.4. Proteolyse und Aufreinigung des trunkierten $FLG_{3880-4061}$

Nachdem im Peptid-Mapping der Verdacht bestätigt werden konnte, dass es sich beim exprimierten Protein um ein trunkiertes Fusionsprotein von $FLG_{3880-4061}$ handelt, wurde das $FLG_{3880-4061}$-Teilfragment im Folgenden durch Hydrolyse mit der SUMO Protease 2 vom pSUMO3-Fusionstag gespalten. Die Trennung von $FLG_{3880-4061}$-Teilfragment, Fusionstag und Protease wurde über C4-Umkehrphasen-HPLC erreicht. Abbildung 3-13 zeigt ein entsprechendes Chromatogramm. Ab einer Retentionszeit von 24 Minuten wurde das Profilaggrin-Teilfragment von der Säule eluiert (mit Pfeilen markiert). Der Peak ab Minute 31 repräsentierte die Elution des pSUMO3-Fusionstag. Ab etwa Minute 14 und 17 zeigten sich zuvor bereits die Einspritzpeaks von reduziertem und oxidiertem DTT.

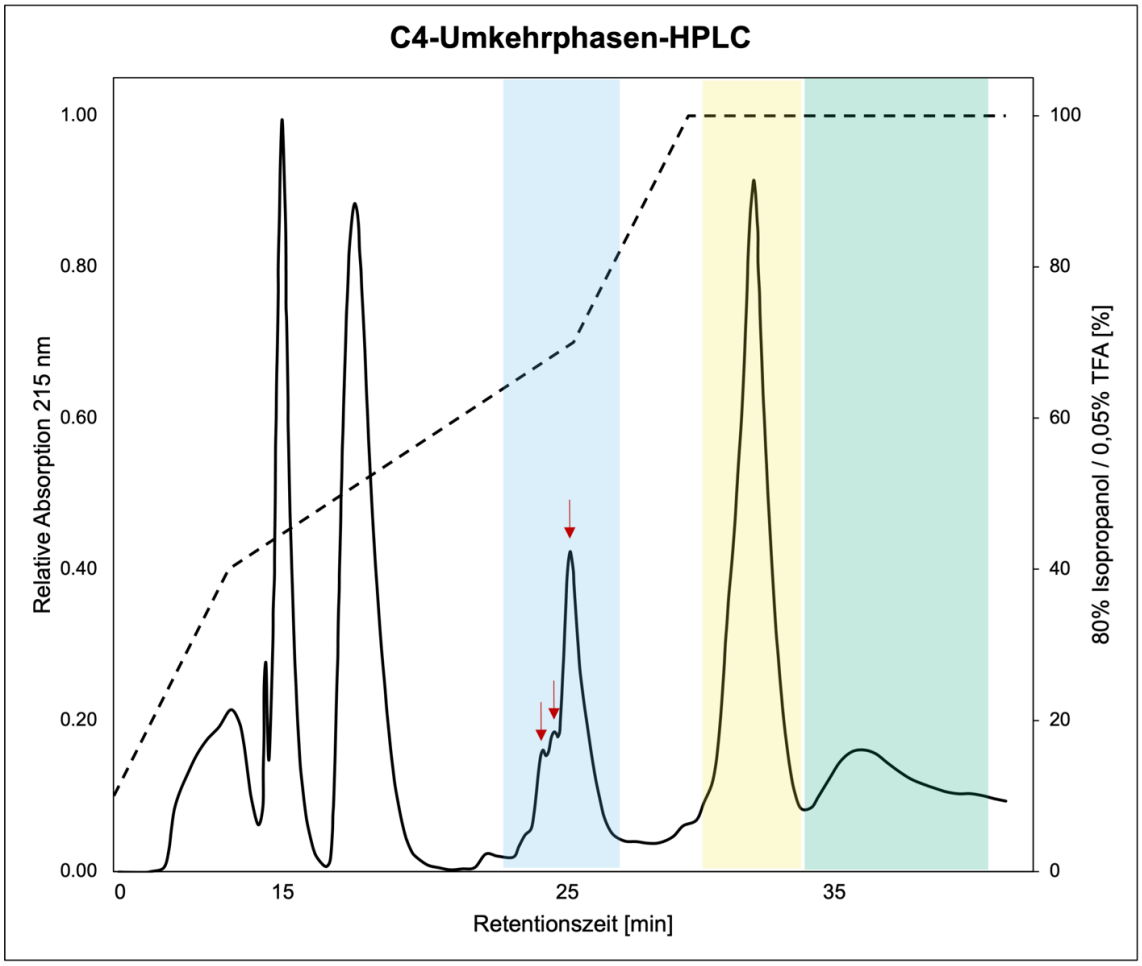


Abbildung 3-13 Chromatogramm der C4-Umkehrphasen-HPLC der SUMO Protease 2-behandelten Proben des pSUMO3- FLG$_{3880-4061}$-Fusionsproteins. *Gezeigt ist die relative Absorption (normiert auf den graphisch ermittelten Maximalwert; Primärachse links) bei 215 nm (durchgezogene Linie) im Gradientenverlauf (unterbrochene Linie). Auf der rechten Sekundärachse ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurden mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen und mit einem H2O/0,05%Trifluoressigsäure-80%Isopropanol/0,05% Trifluoressigsäure- Gradienten eluiert. Der Peak (blau) bei etwa 24 Minuten beinhaltetet das trunkierte FLG$_{3880-4061}$.Die roten Pfeile markieren den Hauptpeak und zwei kleine Nebenpeaks. Der Peak (gelb) ab Minute 31 beinhaltet den pSUMO3-Fusionstag. Der grüne Peak wurde bei unklarer Zuordnung ebenfalls massenspektrometrisch analysiert (**Abbildung 3-14**).*

Die Massen der aufgetrennten Proben wurde im Massenspektrometer bestimmt (Abbildung 3-14). Hier konnte dem Eluat mit dem vermutete pSUMO3-Fusionstag ab Minute 31 (gelb, Panel B) eine Masse von 11.518,0 Da zugeordnet werden, passend zur theoretisch berechneten Masse des pSUMO3-Fusionstag von 11.518,8 Da. Der Masseunterschied von 0,8 Da von errechneter zu gemessener Masse ist über die Eichung des Massenspektrometers erklärbar.

Für das Protein, welches ab einer Retentionszeit von 24 Minuten (blau, Panel C) eluiert wurde, konnte eine Masse von 5.894,8 Da bestimmt werden. Die Addition mit der Masse des pSUMO3-Fusionstags ergibt eine Gesamtmasse von 17.412,8 Da. In den verschiedenen ESI-MS-Analysen nach C8-Umkehrphasen-HPLC war für das gesamte Fusionsprotein zuvor immer wieder Massen um 17.396,6 Da bestimmt worden. Die Massedifferenz von etwas mehr

als 16 Da ist dabei durch die Addition von H_2O im Rahmen der Hydrolyse des Fusionsproteins mit anschließender Ionisierung und Wasserstoffatomverlust in der Massenspektrometrie erklärbar.

In Anbetracht der Tatsache, dass eine Molekülmasse von 20.177,2 Da für das vollständige $FLG_{3880-4061}$-Peptid bisher nicht detektiert werden konnte, erfolgte zusätzlich die massenspektrometrische Analyse des breitbasigen Peaks (grün, Panel A) ab Minute 34. Die Analyse zeigt für diesen Peak jedoch ein heterogenes Proteingemisch ohne Nachweis der entsprechenden Molekülmasse für das vollständige $FLG_{3880-4061}$-Peptid.

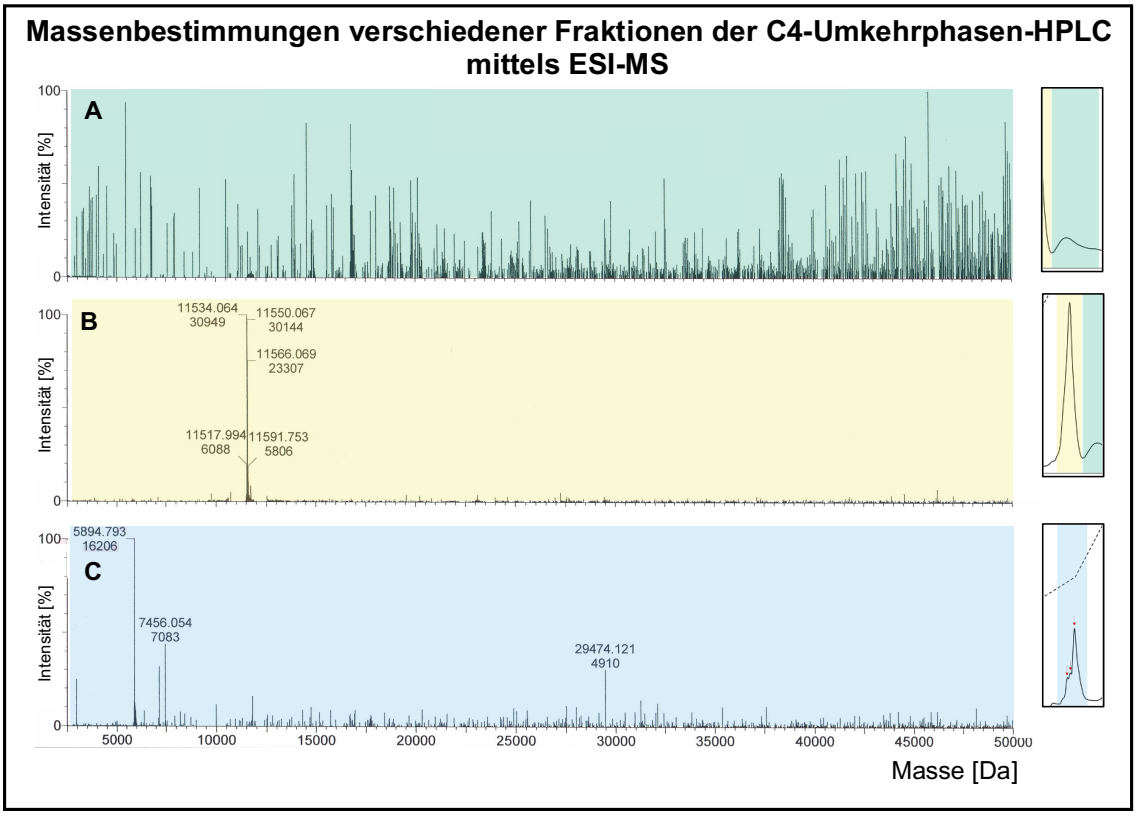


Abbildung 3-14 Massenbestimmungen verschiedener Peaks nach C4-Umkehrphasen-HPLC mittels ESI-MS. *Dargestellt ist die „MaxEnt1"-Auswertung nach Hydrolyse des pSUMO3-$FLG_{3880-4061}$-Fusionsproteins und Aufreinigung durch C4-Umkehrphasen-HPLC. Die Masse in Dalton (Abszisse) ist gegen die Intensität in % (Ordinate) aufgetragen. Die farbliche Darstellung der Massenspektren entspricht jeweils der Farbgebung des jeweils analysierten Peaks (**Abbildung 3-13**). Panel A: HPLC-Peak ab Minute 34 mit heterogenem Massenspektrum ohne dominanten Massepeak. Panel B: HPLC-Peak ab Minute 31 mit dominanten Massepeaks ab 11.518,0 Da (berechnete Masse des Fusionstag 11.518,8 Da). Panel C: HPLC-Peak ab Minute 24 mit Dominanter Masse von 5.894,8 Da (berechnete Masse des $FLG_{3880-406}$1-Peptids 20.177,2 Da).*

Ein 12%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel diente als zusätzliche Kontrolle und zur Veranschaulichung der Einzelschritte von der Proteinexpression über die Aufreinigung bis zur Hydrolyse von pSUMO3-Fusionstag und $FLG_{3880-4061}$-Teilfragment (Abbildung 3-15). Um eine möglichst effiziente Detektion auch geringer Proteinmengen zu gewährleisten, wurden in einer Doppelfärbung eine Zink-Imidazol Färbung mit einer kolloidalen Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung kombiniert. In den Bahnen 1 und 2 sind die bakteriellen Proteine vor und nach der

Induktion mit IPTG zu sehen. In der Bahn 3 ist das lyophylisierte Fusionsprotein aufgetragen, bei dem massenspektrometrisch eine Masse von 17,4 kDa ermittelt worden war. Hier zeigte sich eine kräftige Bande oberhalb Markerbande, die 26 kDA repräsentiert. In Bahn 4 lief das nach Hydrolyse gespaltene $FLG_{3880-4061}$-Teilfragment (5,8 KDa) in etwa auf Höhe der 10 kDa Markerbande. Für das Gesamtfragment $FLG_{3880-4061}$ wäre jedoch eine Masse von 20,2 kDA erwartet worden, sodass auch die SDS-PAGE ein trunkiertes $FLG_{3880-4061}$-Teilfragment bestätigte. Der pSUMO3-Fusionstag (11,5 kDa) wurde in Bahn 5 aufgetragen und zeigte eine Bande oberhalb der 15 kDa Markerbande. Somit liefen die Banden für das Fusionsprotein, den Fusionstag und das Profilaggrin-Teilfragment in Bezug zur Markerbahn alle oberhalb der erwarteten Referenzpunkte. Ein Phänomen, dass bereits in verschiedenen Arbeiten der AG Schröder beobachtet werden konnte (u.a. (Hansmann 2008, Babian 2010, Laudenbach 2018). Laut Manual des pSUMO3-Vektors (Lifesensors) läuft der Fusionstag mit einer Masse von 11,5 kDA im SDS-PAGE bei etwa 20 kDA, was auch die kürzere Laufweite des Fusionsproteins erklären würde. Ein Erklärungsansatz dafür ist die Reduktion der Proteinlaufweite durch basische Aminosäuren. Mit einem erhöhten Anteil der basischen Aminosäure Histidin in der Polyhistidin-Sequenz am Ende des Fusionstags, welche für die Metallionen-Affinitätschromatographie benötigt wird, erklärt sich hier die kürzere Laufweite. Dieser Erklärungsansatz kann auch für das Profilaggrin-Teilfragment in Betracht gezogen werden, das reich an basischen Aminosäuren ist. Insgesamt ist zu beachten, dass die eingesetzte Proteinmenge der in Bahn 2 aufgetragenen Zellproteine nach Induktion mit IPTG im Vergleich zu Bahn 1 deutlich zu gering ausgefallen ist, sodass sich hier im Vergleich von Bahn 1 und Bahn 2 keine genauen Aussagen treffen lassen.

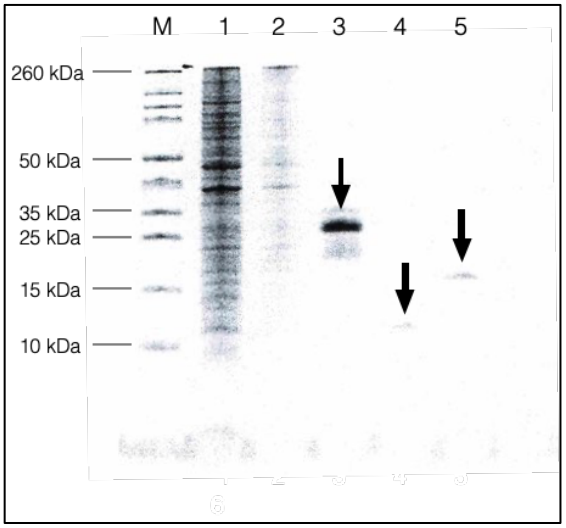


Abbildung 3-15 Polyacrylamid-Gel nach SDS-PAGE *und Doppelfärbung mit Zink-Imidazol, sowie mit einer kolloidalen Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung. Größenstandard M: „Spektra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder". Bahn 1: Bakterielle Proteine vor Induktion mit IPTG. Bahn 2: Bakterielle Proteine nach Induktion mit IPTG. Bahn 3: lyophylisiertes Fusionsprotein. Bahn 4: Nach Hydrolyse gespaltenes* $FLG_{3880\text{-}4061}$*-Teilfragment. Bahn 5: pSUMO3-Fusionstag.*

Das Profilaggrin-Teilfragment zeigte in allen massenspektrometrischen Analysen und in der SDS-Page eine deutlich geringere Masse als erwartet. Um Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz des Teilfragments und damit gegebenenfalls auch auf die Genese der Verkürzung ziehen zu können, wurde das Teilfragment in zwei getrennten Ansätzen mit den Serinproteasen Trypsin und LysC verdaut und die Aminosäuresequenz der Fragmente anschließend jeweils in der Tandem-Massenspektrometrie durch Peptidmassenfingerprint-Analyse untersucht.

3.4.1. Trypsinverdau und MS-MS-Sequenzierung

Im ersten Ansatz wurde Trypsin als Spaltungsreagenz verwendet. Die Trennung und Aufreinigung der proteolytisch gespaltenen Fragmente fand an der C2/C18-HPLC-Säule statt (Abbildung 3-17). Im Massenspektrometer wurden die Fragmente anschließend ionisiert und weiter fragmentiert. Im ersten Schritt erfolgten die Massebestimmungen der jeweiligen Fragmente. Über eine Datenbanksuche wurden den bestimmten Massen durch ein "Mass-Mapping" die wahrscheinlichste Aminosäuresequenz zugeordnet. Anschließend wurden die Moleküle weiter fragmentiert. Die dort gemessenen charakteristischen Fragmentspektren wurden danach mit den Fragmentspektren verglichen, die die Database Search Software MASCOT (www.matrixscience.com) vorher für die im "Mass-Mapping" bestimmte Aminosäuresequenzen ermittelt hatte.

Für das trunkierte $FLG_{3880\text{-}4061}$-Peptid konnten in der massenspektrometrischen Analyse nach Trypsinverdau mit hohem Siginifikanzniveau mehrere Profilaggrin-Fragmente identifiziert werden (Abbildung 3-16, Tabelle 3.2 und 7.3.2). Die Aminosäuresequenzen aller

nachgewiesenen Fragmente lagen innerhalb der $FLG_{3880-4061}$-Peptidsequenz. Sie deckten lückenlos eine Teilsequenz von 58 AS innerhalb der 182 AS umfassenden $FLG_{3880-4061}$-Gesamtsequenz ab. Die berechnete Masse dieser Teilsequenz über 58 AS lag bei 6222.37 Da.

Tabelle 3.2 Peptidmassenfingerprint-Analyse von trunk. $FLG_{3880-4061}$ (Trypsinverdaut) – Detektierte Peptidfragmente

Peptid-Sequenz	***AS-Position ($FLG_{3880-4061}$)***	***AS-Pos. 1-182***	***Gen***
DTASHVQSSPVQSDSSTAKEHGHFSSL	3908-3933	29-55	Filaggrin – H. s.
DTASHVQSSPVQSDSSTAK	3908-3926	29-47	Filaggrin – H. s.
SPVQSDSSTAK	3916-3926	37-47	Filaggrin – H. s.
PVQSDSSTAK	3917-3926	38-47	Filaggrin – H. s.
EHGHFSSL	3927-3934	48-55	Filaggrin – H. s.
EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSR	3927-3947	48-68	Filaggrin – H. s.
EHGHFSSLSQDSAYHSGIQS	3927-3946	48-67	Filaggrin – H. s.
SSLSQDSAYHSGIQS	3932-3946	53-67	Filaggrin – H. s.
GSPHSSSSYHYQSEGTER	3948-3965	69-87	Filaggrin – H. s.
PHSSSSYHYQSEGTER	3950-3965	71-87	Filaggrin – H. s.

```
001 SESASRNHHG SSREQSRDGS RHPGSSHRDT ASHVQSSPVQ SDSSTAKEHG
050 HFSSLSQDSA YHSGIQSRGS PHSSSSYHYQ SEGTERQKGQ SGLVWRHGSY
100 GSADYDYGES GFRHSQHGSV SYNSNPVVFK ERSDICKASA FGKDHPRYYA
150 TYINKDPGLC GHSSDISKQL GFSQSQRYYY YE
```

Abbildung 3-16 Sequenz von $FLG_{3880-4061}$ mit farblicher Darstellung von in der Peptidmassenfingerprintanalyse identifizierten Peptidfragmenten nach Trypsinverdau.

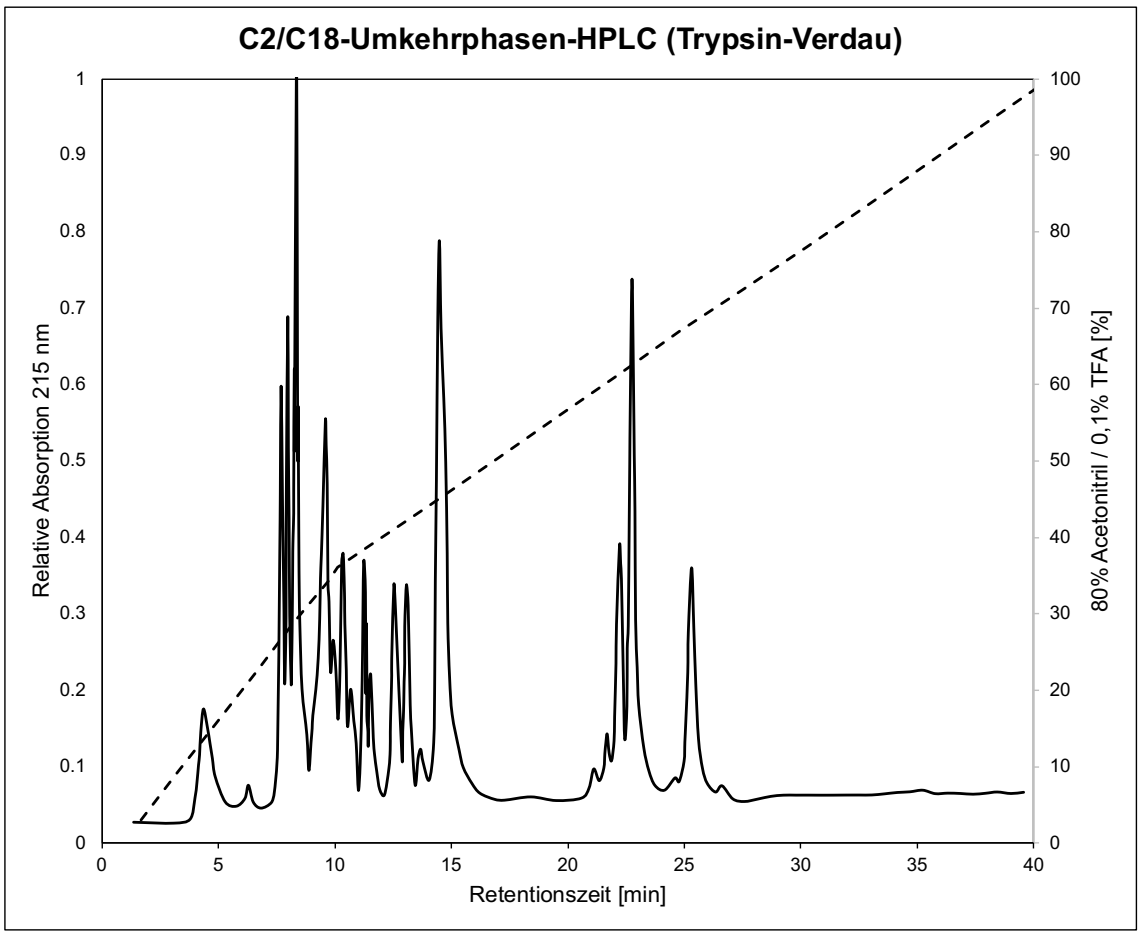


Abbildung 3-17 Chromatogramm der C2/C18-Umkehrpgasen-HPLC nach Trypsinverdau des trunkierten Profilaggrin-Proteins FLG$_{3880-4061}$. *Gezeigt ist die relative Absorption (normiert auf den graphisch ermittelten Maximalwert; Primärachse links) bei 215 nm (durchgezogene Linie) im Gradientenverlauf (unterbrochene Linie). Auf der rechten Sekundärachse ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min auf die C2/C18-Säule aufgetragen und mit einem H_2O/Acetonitril Gradienten von Puffer A (0,1% TFA in H_2O) zu Puffer B (0,1% TFA in 80% Acetonitril (v/v)) eluiert. Anschließend erfolgte die Peptidmassenfingerprint-Analyse der einzelnen Peaks mittels Tandem-Massenspektrometrie.*

3.4.2. LysC-Verdau und MS-MS-Sequenzierung

Der zweite Verdau zur Aminosäuresequenz-Analyse des FLG$_{3880-4061}$-Teilfragments wurde mit der Endopotease LysC durchgeführt. Diese Protease wurde gewählt, weil sie sie im Vergleich zu Trypsin innerhalb der Aminosäuresequenz von FLG$_{3880-4061}$ deutlich weniger Schnittstellen besitzt und so in der Theorie deutlich längere Teilfragmente generieren sollte. Die Fragmentenden der Teilfragmente sollten in Kombination mit den Daten aus dem Trypsinverdau Rückschlüsse auf Beginn und Ende des FLG$_{3880-4061}$-Teilfragments liefern und damit auch auf die gesamte exprimierte Aminosäuresequenz ermöglichen. Auch die C4-Umkehrphasen-HPLC-Fraktion mit dem vermuteten pSUMO3-Fusionstag (3.4) wurde vorbereitet, mit LysC verdaut und anschließend Tandem-massenspektrometrisch untersucht. Die Proben wurden nach dem Verdau ebenfalls mittels C2/C18-HPLC aufgereinigt und die Proteinfraktionen getrennt (Abbildung 3-19). Anschließend erfolgte die weitere Analyse der

Aminosäuresequenz wie oben beschrieben im Massenspektrometer. Wie bereits in der Analyse des Trypsinverdaus ließen sich erneut signifikant Peptidfragmente innerhalb der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz nachweisen. Die Fragmente deckten dabei lückenlos eine Aminosäuresequenz von 53 Aminosäuren ab. Die berechnete Masse dieser Teilsequenz lag bei 5562,72 Da. Die Probe mit dem vermuteten Fusionstag lieferte wie erwartet den Nachweis von Peptidfragmenten aus dem pSUMO3-Tag, sodass hier eine fehlerhafte Allokation der Probe ausgeschlossen werden konnte und dieser HPLC-Peak kein Fragment von $FLG_{3880-4061}$ darstellt (Daten siehe 7.3.3).

Tabelle 3.3: Peptidmassenfingerprint-Analyse von trunk. $FLG_{3880-4061}$ (LysC-verdaut) – Detektierte Peptidfragmente

Peptid-Sequenz	***AS-Position ($FLG_{3880-4061}$)***	***AS-Pos. 1-182***	***Gen***
DGSRHPGSSHRDTASHVQSSPVQ SDSSTAK	3897-3926	18-47	Filaggrin – H.s.
EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSRGS	3927-3949	48-70	Filaggrin – H.s.
EHGHFSSLSQDSAYHSGIQS	3927-3946	48-67	Filaggrin – H.s.
EHGHFSSLSQDSAYH	3927-3941	48-62	Filaggrin – H.s.
EHGHFSSL	3927-3934	48-55	Filaggrin – H.s.

```
001 SESASRNHHG SSREQSRDGS RHPGSSHRDT ASHVQSSPVQ SDSSTAKEHG
050 HFSSLSQDSA YHSGIQSRGS PHSSSSYHYQ SEGTERQKGQ SGLVWRHGSY
100 GSADYDYGES GFRHSQHGSV SYNSNPVVFK ERSDICKASA FGKDHPRYYA
150 TYINKDPGLC GHSSDISKQL GFSQSQRYYY YE
```

Abbildung 3-18 Sequenz von $FLG_{3880-4061}$ mit farblicher Darstellung von in der Peptidmassenfingerprintanalyse identifizierten Peptidfragmenten nach LysC-Verdau.

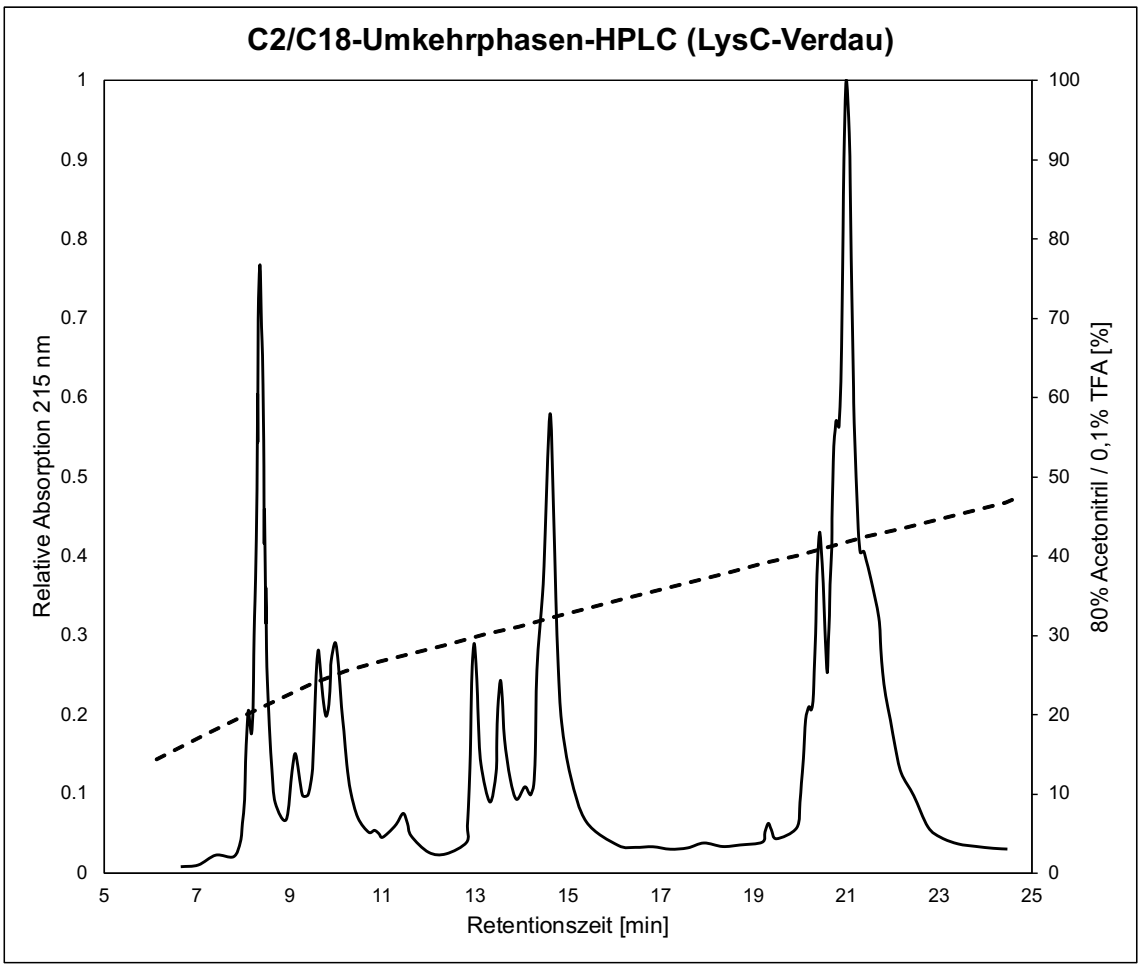


Abbildung 3-19 Chromatogramm der C2/C18-Umkehrpgasen-HPLC nach LysC-Verdau des trunkierten Profilaggrin-Proteins FLG$_{3880-4061}$. *Gezeigt ist die relative Absorption (normiert auf den graphisch ermittelten Maximalwert; Primärachse links) bei 215 nm (durchgezogene Linie) im Gradientenverlauf (unterbrochene Linie). Auf der rechten Sekundärachse ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min auf die C2/C18-Säule aufgetragen und mit einem H_2O/Acetonitril Gradienten von Puffer A (0,1% TFA in H_2O) zu Puffer B (0,1% TFA in 80% Acetonitril (v/v)) eluiert. Anschließend erfolgte die Peptidmassenfingerprint-Analyse der einzelnen Peaks mittels Tandem-Massenspektrometrie.*

3.4.3. Auswertung MS-MS-Sequenzierung

Die Kombination der identifizierten Sequenzdaten aus dem Trypsin- und aus dem LysC-Verdau (Abbildung 3-20) zeigte, dass der größte Teil der Aminosäuresequenz mit 42 Aminosäuren in beiden MS-MS-Analysen nachweisbar war (grün). Nach *N*-terminal waren in der Peptidmassenfingerprintanalyse nach LysC-Verdau elf zusätzliche Aminosäuren gegenüber dem Trypsinverdau nachweisbar (gelb). Dafür ließen sich nach *C*-terminal 16 Aminosäuren identifizieren, die nur nach Trypsinverdau gefunden werden konnten (blau). Die Gesamtsequenz aller nachgewiesenen Aminosäuren umfasst lückenlos eine Sequenz von 69 Aminosäuren.

Ein Vergleich der massenspektrometrisch bestimmten Masse von 5894.8 Da des trunkierten FLG$_{3880-4061}$-Fragments nach Aufreinigung an der C4-HPLC (3.4) mit theoretischen

berechneten Massen für die identifizierten Aminosäuresequenzen nach Trypsin- und LysC-Verdau zeigt eine deutliche Diskrepanz. Es wurden Masseberechnungen für Aminosäuresequenzen durchgeführt, die nach Hydrolyse mit Trypsin (3.4.1) und mit LysC (3.4.2) identifiziert worden waren. Die Masse der 58 Aminosäuren-langen Sequenz nach Trypsin-Hydrolyse wurde mit 6222.37 Da berechnet; die errechnete Masse der 53 Aminosäuren-langen Sequenz nach LysC-Verdau lag bei 5562.72 Da. Außerdem wurde die Masse der Sequenz berechnet, die alle 69 nachgewiesenen Aminosäuren beider Hydrolysen abdeckte. Sie lag bei 7396.5 Da. Die Berechnungen erfolgten erneut mit Hilfe des „ProtParam"-Tools (https://web.expasy.org/protparam/). Die berechneten Massen lagen damit zum Teil deutlich über der massenspektrometrisch bestimmten Masse des trunkierten $FLG_{3880-4061}$-Fragments. Das ist insofern bemerkenswert, da sowohl die Probe für die Massenspektrometrie des $FLG_{3880-4061}$-Teilfragements, als auch die Proben für die hydrolytische Spaltung durch Trypsin und LysC aus demselben Eluat nach C4-Umkehrphasen-HPLC stammten.

In den MS-MS-Sequenzierungen nach Trypsin- und LysC-Hydrolyse konnten wie erwartet keine Aminosäuresequenzen das *C*-Terminus von $FLG_{3880-4061}$ nachgewiesen werden, sodass die Reduktion der Masse des $FLG_{3880-4061}$-Fragments durch eine Verkürzung am *C*-terminalen Ende sehr wahrscheinlich ist. Auffällig ist jedoch, dass sich auch der *N*-terminale Beginn der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz nicht in den MS-MS-Sequenzen nachweisen ließ.

Da die berechneten Massen der mittels Peptidmassenfingerprintanalyse identifizierten Aminosäuresequenzen teils deutlich größer sind als die massenspektrometrisch bestimmte Masse des $FLG_{3880-4061}$-Teilpeptids, bleibt die genaue Aminosäuresequenz des $FLG_{3880-4061}$-Teilfragements weiterhin nicht vollständig geklärt.

```
001 SESASRNHHG SSREQSRDGS RHPGSSHRDT ASHVQSSPVQ SDSSTAKEHG
050 HFSSLSQDSA YHSGIQSRGS PHSSSSYHYQ SEGTERQKGQ SGLVWRHGSY
100 GSADYDYGES GFRHSQHGSV SYNSNPVVFK ERSDICKASA FGKDHPRYYA
150 TYINKDPGLC GHSSDISKQL GFSQSQRYYY YE
```

Abbildung 3-20 Kombinierte farbliche Darstellung der in den Peptidmassenfingerprintanalysen *(3.4.1 und 3.4.2) identifizierten Sequenzen von $FLG_{3880-4061}$. Nur nach LysC-Hydrolyse identifizierte Sequenzen gelb dargestellt. Nur nach Trypsinverdau identifizierte Sequenzen blau dargestellt. Sequenzen die nach beiden Hydrolysen identifiziert werden konnten grün dargestellt.*

3.5. Antimikrobielle Testung

Da sich das $FLG_{3880-4061}$-Fragment trotz mehrerer Expressionsreihen, dem Einsatz von Proteaseinhibitoren und der Wahl verschiedener *E.coli*-Stämme nicht vollständig rekombinant exprimieren ließ, konnte keine antimikrobielle Testung des $FLG_{3880-4061}$-Peptids erfolgen.

3.6. Analyse der Aminosäuresequenz

Bei der Analyse der Aminosäuresequenz von $FLG_{3880-4061}$ zur Bestimmung des Verhältnisses von „Unordnung-fördernden Aminosäuren“ (Arginin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Lysin, Prolin, Serin) gegenüber „Struktur-bildender“ Aminosäuren“ (Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Valin) kam mit 71,5% zu 18,6% eine deutliche Dominanz „Unordnung-fördernden Aminosäuren“ zur Darstellung. Der Vergleich des *N*-terminalen ($FLG_{3880-3970}$) mit dem *C*-terminalen Anteils ($FLG_{3971-4061}$) konnte zeigen, dass das Übergewicht an „Unordnung-fördernden Aminosäuren“ *N*-terminal signifikant stärker ausgeprägt ist (Abbildung 3-21, Exakter Fisher Test zweiseitiger *P*-Wert: 0,0005). Verglichen wurden $FLG_{3880-3970}$ und $FLG_{3891-4061}$ anhand hälftiger Teilung von $FLG_{3880-4061}$. Die Teilung orientierte sich nicht an Sequenzmotiven in der Aminosäurestruktur von $FLG_{3880-4061}$.

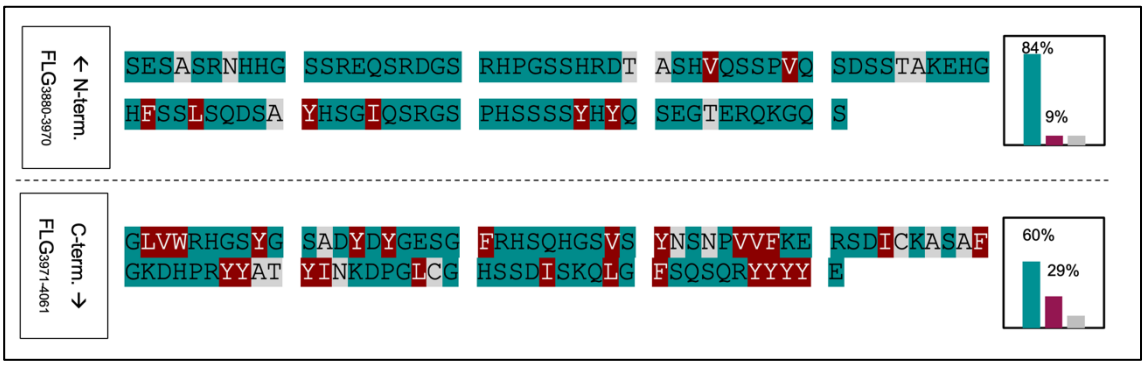


Abbildung 3-21 Verteilung „Unordnung-fördernde"- und „Strukturbildende“ Aminosäuren innerhalb $FLG_{3880-4061}$: *Die Anzahl „Unordnung-fördernde“ Aminosäuren ist innerhalb des untersuchten FLG-Teilpeptids inhomogen verteilt und im C-terminalen Ende (hier repräsentiert durch $FLG_{3891-4061}$) deutlich schwächer ausgeprägt als im N-terminalen Teil ($FLG_{3880-3970}$). Verteilung: 75 zu 8 „Unordnung-fördernde“ zu „Strukturbildende“ Aminosäuren in $FLG_{3880-397}$ und 55 zu 26 „Unordnung-fördernde“ zu „Strukturbildende“ Aminosäuren in $FLG_{3891-4061}$ (Exakter Fisher Test, zweiseitiger P-Wert 0.0005).*

4. Diskussion

Auch mehr als 30 Jahre nach der strukturellen Charakterisierung von Profilaggrin durch Presland, Haydock, et al 1992 ist die Funktion des *C*-Terminus dieses „S100-Fused-Type-Proteins“ weiterhin weitgehend unklar (Hinbest, Kim et al. 2020). Neben einer Funktion in der Prozessierung von Profilaggrin in seine Filaggrin-Monomere (Sandilands, Sutherland et al. 2009) wird für den *C*-Terminus von Profilaggrin ähnlich dem *C*-Terminus von Filaggrin-2 eine antimikrobielle Aktivität diskutiert (Hansmann, Schröder et al. 2015, Hinbest, Kim et al. 2020). Diese Arbeit widmet sich der Expression und Aufreinigung des 182 Aminosäuren langen Fragments $FLG_{3880-4061}$, welches den 157 Aminosäuren langen *C*-Terminus (Position 3904-4061) enthält. Ziel war es, das Expressionsverhalten von $FLG_{3880-4061}$ zu beleuchten und anschließend auf antimikrobielle Eigenschaften zu untersuchen.

Die technische Umsetzung der genannten Zielsetzung für das $FLG_{3880-4061}$-Fragment erforderte eine weitreichende Optimierung der bestehenden Laborprotokolle und wird im folgenden Absatz diskutiert.

Die Klonierungsprozesse mit dem $FLG_{3880-4061}$-Fragment gestalteten sich anspruchsvoll. So war eine direkte Ligation in den Expressionsvektor pSUMO3 mit anschließender Transformation in *E.coli* TOP10F‘-Zellen wiederholt nicht erfolgreich. Als Konsequenz daraus sollte das $FLG_{3880-4061}$-Fragment über einen Zwischenvektor in die *E.coli*-Zellen kloniert werden. Jedoch war auch hier die Arbeit mit dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten pGEM-T-Vektorsystem wiederholt nicht erfolgreich (7.3). Nach Plasmidpräparation und dem Versuch der Restriktionshydrolyse des $FLG_{3880-4061}$-Fragments aus dem Plasmid zeigte sich, dass es in der Kolonie lediglich zu einem spontanen Ringschluss des pGEM-T-Vektors kam. Das $FLG_{3880-4061}$-Fragment war nicht in den Vektor ligiert worden. Die Wiederholung des Verdaus erbrachte das gleiche Ergebnis. Ein Anwenderfehler war dabei auszuschließen, weil sowohl die Klonierung als auch der spätere Verdau als Parallelansatz mit Proben der Laborpartnerin (Babian 2010) durchgeführt worden waren und dort erfolgreich verliefen (Bilder siehe 7.3). Bei der Wiederholung der Klonierung im pGEM-T-System im Anschluss kam es nach Ligation und Transformation gar nicht erst zur Anzucht kompetenter Klone. Erst durch Testung und Etablierung des pJet 1.2/blunt-Vektorsystems gelangen Ligation und Transformation in *E.coli*-TOP10F‘. Nach der Etablierung fand dieses System auch für weitere Arbeiten ähnlicher Fragestellung in unserer Arbeitsgruppe Verwendung (K. Garske 2016, B. Laudenbach 2018, K. Metzner 2020).

Nach komplikationsloser Ligation des $FLG_{3880-4061}$-Fragments in das pSUMO3-Expressionsvektorsystem und Klonierung in die Expressionszelllinien zeigte sich in den massenspektrometrischen Analysen nach Expression jeweils eine deutliche Reduktion der Masse des exprimierten Proteins. *In silico* war für das Fusionsprotein eine Masse von 31.678 Da berechnet worden, die massenspektrometrisch bestimmte Masse lag nur bei

17.396 Da. Die MS-MS-Analyse der Aminosäuresequenz zeigte, dass es sich bei dem Protein um ein trunkiertes Fusionsprotein handelte. Zudem konnte dargestellt werden, dass es sich bei der Verkürzung nicht um ein Zufallsprodukt handelte. Sie trat reproduzierbar in verschiedenen Klonen aus unterschiedlichen Ligationsansätzen auf. Die Expression in *E.coli* BL21(DE3) pLysS wurde insgesamt viermal durchgeführt. Jeweils wurde nur das trunkierte Fusionsprotein mit 17.396 Da exprimiert. Sowohl auf Ebene der *E.coli* TOP10F'-Zellen als auch in den *E.coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen wurde eine DNA-Sequenzierung der Plasmide durchgeführt (7.2.4 und 7.2.5). Jeweils zeigte sich eine korrekte Ligation mit vollständiger genomischer Sequenz für $FLG_{3880-4061}$. Die Verwendung von Proteaseinhibitoren in der Aufreinigung führte ebenfalls nicht zur Expression des vollständigen Fusionsproteins. Auch hier ergab die massenspektrometrische Analyse die Reduktion der Proteinmasse auf 17.396 Da, sodass eine posttranslationale Verkürzung des Fusionsproteins durch proteolytische Spaltung innerhalb der *E.coli*-Zellen unwahrscheinlich erscheint. Der Wechsel der Expressionszelllinie von *E.coli* BL21(DE3) pLysS zu *E.coli* Rosetta-gami2 erfolgte wegen der Arbeitshypothese eines möglichen Expressionsabbruchs aufgrund möglicher „Rare Codons" in der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz (3.3.2.).

In der *in silico*-Analyse des Basensequenzabschnitts des Profilaggrin-Gens, der für $FLG_{3880-4061}$ codiert, fanden sich zwei Basentriplets mit sehr seltener Codonverwendung. Das Triplett `agg` codiert für Arginin und wird an den Aminosäurepositionen 86 und 147 verwendet. Es tritt in Zellen des *E.coli* B-Stamms mit einer Frequenz von 2,1 auf 1000 besonders selten auf (Codon Usage Database – www.kazusa.or.jp/codon/ und Henaut, 1996). Für dieses Codon verfügen die Rosetta-gami2-Zellen durch das pRARE2-Plasmid über die entsprechende genetische Information zur Bildung der passenden tRNA (Anhang Abbildung 7-4). Die massenspektrometrische Analyse zweier Klone zeigte ebenfalls einen größeren Peak mit einer Masse von 17.396 Da für das exprimierte Protein und damit dieselbe Proteinmasse, die in den *E.coli* BL21(DE3) pLysS Expressionen für das trunkierte Fusionsprotein bestimmt worden war. Eine Beobachtung, die gegen einen Expressionsstopp im Rahmen einer „Rare Codon Usage" sprechen würde.

Allerdings verliefen sowohl die Transformation mittels Elektroporation als auch die spätere Expression mit den elektrokompetenten *E.coli* Rosetta-gami2-Zellen nicht zufriedenstellend. Der Transformationserfolg hängt von verschiedenen Einflussfaktoren vor, während und nach dem eigentlich Transformationsprozess ab. Hier seien als Beispiele für mögliche Einflussfaktoren die Qualität der Expressionszellen und der Nährboden sowie die Stärke des elektrischen Feldes der Elektroporation genannt. Die Transformation in die elektrokompetenten *E.coli* Rosetta gami2-Zellen gelang in dieser Arbeit erst im zweiten Versuch. Zum Ausschluss von Qualitätsmängeln der Nährböden erfolgte die Anfertigung neuer Agarplatten mit passenden Antibiotika. Trotzdem kam es im zweiten Versuch nur zu einem überschaubaren Bakterienwachstum mit wenigen Kolonien pro Transformationsansatz,

obwohl in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich mit dem Rosetta-gami2- Zellsystem und der Elektroporation gearbeitet wurde (Junge 2011). Im Vergleich zu den Elektroporationsbedingungen in der Arbeit von A. Junge wurden Elektroküvetten mit geringerem Volumen und deshalb niedrigere Spannungen für die Erzeugung der elektrischen Feldstärke in den Elektroporationszyklen verwendet. Dower und Miller konnten 1988 bei Etablierung der Methode in *E.coli* zeigen, dass die Stärke des elektrischen Feldes sowohl Einfluss auf die Effizienz der Transformation als auch auf das Überleben der *E.coli*-Zellen hatte. Die maximale Transformations-Effizienz wurde erst erreicht, wenn etwa 50-75% der *E.coli*-Zellen abgetötet wurden (Dower, Miller et al. 1988). Auch das Bakterienwachstum nach erfolgreicher Transformation mit positiven Klonen in der Colony-PCR zeigte sich im Vergleich zur Arbeit bei A. Junge und im Vergleich zum Wachstum der *E.coli* BL21(DE3) pLysS nach chemischer Transformation deutlich verlangsamt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die eingesetzte Feldstärke bei der Elektroporation hätte optimiert werden können. Nach verlängerter Inkubationszeit der Rosetta-gami2-Expressionskulturen zum Erreichen einer ausreichenden Bakteriendichte konnten die Proteinexpression und Aufreinigung an der C8-Umkehrphasen-HPLC erfolgreich durchgeführt werden. Die Massebestimmung mittels Massenspektrometrie nach MaxEnt1-Auswertung zeigte jedoch, dass der Eluationspeak in der HPLC mehrere Proteinfraktionen enthielt, von denen ebenfalls keiner der erwarteten Proteinmasse des Fusionsproteins von 31.678 Da entsprach. Während in den Proteinexpressionen in den *E.coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen ein Peptid mit einer Masse von 17.396 Da dominierte, das im weiteren Verlauf als trunkiertes Fusionsprotein identifiziert werden konnte, fand sich in der Massenspektrometrie nach C8-Umkehrphasen-HPLC in *E.coli* Rosetta-gami2 ein inhomogeneres Bild. Alle drei Klone stammten aus verschiedenen Ligationsansätzen und zeigten multiple Massepeaks. Während einige Massen nur in einzelnen Klonen nachweisbar waren, waren insbesondere die zwei größten Massepeaks von 9.167 Da und 10.772 Da in allen drei Proben nachweisbar. Auch die aus den BL21-Zellen bekannte Peptidmasse von 17.396 Da ließ sich als größere Proteinfraktion in zwei der drei Klone identifizieren. Die Peptide lagen jedoch in den drei Ansätzen in unterschiedlichen Mengenanteilen vor. Das Vorkommen identischer Peptidmassen in verschiedenen klonalen Kolonien zeigt, dass die Expression dieser Proteine reproduzierbar und ihre Expression somit vermutlich spezifisch ist. In der Betrachtung der Massenspektren aller Proben nach Expression in *E.coli* Rosetta-gami2 fiel auf, dass sich die relative Intensität der Basispeaks kaum von den übrigen Peaks der Probe und vom Background abheben (siehe insbesondere Panel B und Panel C in Abbildung 3-14). Dies könnte darauf hindeuten, dass absolut gesehen nur wenig Protein exprimiert wurde. All diese Gründe führten letztendlich dazu, dass die Arbeit mit *E.coli* Rosetta-gami2 nicht fortgesetzt wurde.

Nach der proteolytischen Spaltung des $FLG_{3880-4061}$-Fusionsproteins wurden Fusionstag und $FLG_{3880-4061}$-Teilfragment durch C4-Umkehrphasen-HPLC voneinander getrennt. Anschließend wurden im Massenspektrometer die Massen des Fusionstags und des Profilaggrin-Teilfragments bestimmt. Das Massenspektrum des Fusionstags (Abbildung 3-14 Panel B) zeigte nach MaxEnt 1-Auswertung für den Basispeak mit der höchsten Intensität eine Masse von 11.534,1 Da. Berechnet wurde für den Fusionstag jedoch eine Masse von 11.518,8 Da. Auch ein Peak mit einer Masse von 11.518,0 Da konnte im Massenspektrometer detektiert werden. Dabei handelte es sich um den Peak mit der vierthöchsten Intensität im Spektrogramm. Auffällig war, dass sich die Massen der Peaks mit den vier höchsten Intensitäten, nämlich 11.518,0 Da, 11.534,1 Da, 11.550,1 Da und 11.566,1 Da, im Spektrogramm nur um jeweils 16 Da unterschieden. Ein Masseunterschied von 16 Da wäre zum Beispiel durch ein Addukt von Sauerstoff im Rahmen einer Oxidation erklärbar, da die Sauerstoffmasse 15,995 Da beträgt. Bei Betrachtung der Aminosäuresequenz des Fusionstags zeigt sich, dass dieser insgesamt vier Mal die Aminosäure Methionin enthält. Die hydrophobe Aminosäure Methionin lässt sich an ihrer Schwefelgruppe leicht zu Methioninsulfoxid oxidieren und dient damit sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten als Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies. Zusammen mit Cystein-Aminosäuren dienen Methionine als angeborenes Antioxidationssystem (Kim, Weiss et al. 2014). Die Interpretation des Massenspektrums (Abbildung 3-14 Panel B) der Probe mit dem vermuteten Fusionstag lässt mit den vier höchsten Intensitäten zwischen 11.518,0 und 11.566,1 Da daher den Schluss zu, dass es sich bei dem analysierten Peptid um den Fusionstag mit erwarteter Masse von 11.518,8 Da in verschiedenen Oxidationsstufen handelt. Ein Masseunterschied von 0,8 Da zwischen berechneter und gemessener Masse wäre dabei zum Beispiel durch die Eichung des Massenspektrometers erklärbar. Eine später durchgeführte Peptidmassenfingerprint-Analyse der vermuteten Fusionstag-Fraktion erbrachte den Nachweis von pSUMO3-Fragmenten mit hoher Signifikanz (Anhang 7.3.3).

Für das Profilaggrin-Teilfragment wurde nach Proteolyse vom Fusionstag und nach Aufreinigung eine massenspektrometrische Masse von 5.894,8 Da ermittelt (Abbildung 3-14 Panel C). Das vollständige $FLG_{3880-4061}$-Peptid hätte nach Berechnung eine Masse von 20.177,2 Da aufweisen sollen. Sequenzierungsdaten der eingesetzten Klone zeigten die korrekten Basenfolgen der Zielsequenz innerhalb der Expressionsvektoren ohne Hinweise auf Mutationen, sodass als Ursache für diese relevante Trunkierung des Zielpeptids vor allem Translationsabbrüche oder eine posttranslationale Prozessierung, wie Spaltung oder Autolyse des Zielpeptids, in Betracht zu ziehen sind. So kommt es beispielsweise bei Hornerin, ebenfalls einem Protein der „S100 fused-type“ Proteinfamilie, bei pH 6,5 nach Translation zu autolytischen Prozessen mit Bildung mehrerer Hornerin-Fragmente, während das Protein in saurer Umgebung (pH 2,0) vollständig nachweisbar bleibt (Wu, Meyer-Hoffert et al. 2009). Um Rückschlüsse auf mögliche Mechanismen der Verkürzung ziehen zu können, wurde das

verkürzte $FLG_{3880-4061}$-Peptid sowohl mit Trypsin als auch mit LysC proteolytisch gespalten und die Aminosäuresequenz der gewonnenen Fragmente nach Aufreinigung auf der C2/C18-HPLC-Säule (Abbildung 3-17 und Abbildung 3-19) mittels MS-MS-Sequenzierung analysiert.
Nach Trypsinverdau (3.4.1) konnten in der Tandem-Massenspektrometrie die Sequenzen von insgesamt zehn verschiedenen Fragmenten aus der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz mit statistischer Signifikanz identifiziert werden (Tabelle 3.2). Alle gefundenen Aminosäuresequenzen konzentrieren sich auf einen Sequenzabschnitt von insgesamt 58 Aminosäuren, beginnend an Position FLG_{3908} und endend an Position FLG_{3965} aus der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz und decken diesen Abschnitt lückenlos ab. Nach LysC-Verdau (3.4.2) konnten die Aminosäuresequenzen insgesamt fünf verschiedener Fragmente aus der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz ermittelt werden (Tabelle 3.3). Hier decken die identifizierten Fragmente lückenlos einen Sequenzabschnitt von 53 Aminosäuren von Position FLG_{3897} bis zur Position FLG_{3949} ab.
Die nach Trypsin- und LysC-Verdau massenspektrometrisch identifizierten Aminosäuresequenzen überschneiden sich in einem Abschnitt von 42 Aminosäuren und sind beide im *N*-terminalen Anteil der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz lokalisiert. Nach der Position FLG_{3965} konnte kein weiterer Aminosäuresequenzabschnitt nachgewiesen werden, sodass das die Trunkierung des $FLG_{3880-4061}$-Peptids *C*-terminal von Position FLG_{3965} erfolgt sein muss. In Kombination decken die nach den beiden Proteolysen identifizierten Fragmente eine Sequenz von 69 Aminosäuren von Position FLG_{3897} bis FLG_{3965} ab. Die berechnete Molekülmasse für diesen Abschnitt beträgt 7.396,6 Da. Das ist insofern bemerkenswert, da für den Basispeak in der Massenspektrometrie nach proteolytischer Spaltung von Fusionstag und $FLG_{3880-4061}$-Teilpeptid eine deutlich geringere Masse von 5.894,8 Da für das Teilpeptid ermittelt worden war und das FLG-Fragment des Basispeaks somit nicht alle im Peptidmassenfingerprint sequenzierten FLG-Aminosäurefragmente beinhalten kann.
Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen wäre, dass der Elutionspeak ab Minute 24 der C4-Umkehrphasen-HPLC zum Beispiel durch Translationsabbrüche an verschiedenen Punkten während der Expression mehrere unterschiedlich lange FLG-Moleküle enthalten haben könnte. Bei der Betrachtung des Chromatogramms der C4-Umkehrphasen-HPLC (Abbildung 3-13) zeigen sich innerhalb des Elutionspeaks ab Minute 24 kleine „Unterpeaks“ (markiert durch Pfeile) als mögliche Hinweise auf verschiedene Moleküle mit sehr ähnlichem Elutionspunkt. Ein ähnlicher Elutionszeitpunkt in der HPLC deutet methodenbedingt bei ähnlicher Molekülgröße auf ähnliche chemische und strukturelle Eigenschaften der eluierten Substanzen hin, wie dies bei exprimierten Peptiden des gleichen Ursprungs mit unterschiedlichem Zeitpunkt des Translationsabbruchs der Fall wäre. So zeigt die Analyse des Massenspektrums nach Trennung von Fusionstag und $FLG_{3880-4061}$-Teilpeptid an der C4-Umkehrphasen-HPLC neben dem dominanten Basispeak für die Masse von 5.894,8 Da weitere Peaks mit relevanten Intensitäten (Abbildung 3-14 Panel C). Diese könnten darauf hinweisen, dass zum Elutionszeitpunkt ab Minute 24 mehrere Moleküle von der Säule eluiert

und zusammen aufgefangen worden waren. Im Massenspektrum weist der Peak mit der zweithöchsten Intensität nach dem Basispeak eine Masse von 7.456,1 Da auf. Diese Masse liegt mit einem Unterschied von 59,5 Da bemerkenswert nah an der berechneten Masse von 7.396,6 Da für ein hypothetisches $FLG_{3897-3965}$ -Teilpeptid, welches von Anfang bis Ende alle in der MS-MS-Sequenzierungen nachgewiesene FLG-Aminosäuresequenzen enthalten würde. Eine Elution verschiedener FLG-Fragmente zum selben Zeitpunkt bliebe auch deshalb unbemerkt, weil vor der Durchführung der proteolytischen Spaltung der im Eluat befindlichen Fragmente durch Trypsin und LysC nach der C4-HPLC keine weiteren Aufreinigungsschritte erfolgten. Die weitere Auftrennung der Proben an der C2/C18-HPLC-Säule fand erst nach der Proteolyse und vor Durchführung der MS-MS-Sequenzierung statt.
Alternativ könnten Fehler in der massenspektrometrischen Analyse der charakteristischen Fragmentspektren im Rahmen der Aminosäuresequenzierung als Ursache für die Diskrepanz der bestimmten Masse des Basispeaks und der berechneten Masse aller detektierten FLG-Fragmente diskutiert werden.
Auffällig bleibt, dass weder Fragmente vom *N*-terminalen Beginn des $FLG_{3880-4061}$ Peptids noch vom *C*-terminalen Ende detektiert werden konnten. Eine posttranslationale Prozessierung des $FLG_{3880-4061}$ Peptids als Ursache der Verkürzung kann somit weiterhin nicht ausgeschlossen werden.

Die Zielsetzung innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestand in der Expression von Profilaggrin-Fragmenten charakteristischer Domänen des 4061 Aminosäuren umfassenden Filaggrin-Precursors Profilaggrin und der Untersuchung dieser Peptide auf antimikrobielle Eigenschaften. Das in dieser Arbeit untersuchte 182 Aminosäuren lange Profilaggrin-Peptid $FLG_{3880-4061}$ charakterisiert das *C*-terminale Profilaggrin-Ende. Seine Aminosäuresequenz beginnt bereits an Aminosäureposition 3880 innerhalb der trunkierten Filaggrin-Einheit vor dem eigentlichen 157 Aminosäuren umfassenden *C*-Terminus von Profilaggrin (Abbildung 1-2).
Trotz nicht geklärter Funktion scheint der *C*-Terminus bei der Prozessierung von Profilaggrin in die Filaggrin-Monomere eine entscheidende Rolle zu spielen. Wie bereits unter 1.8. eingehend erörtert, konnten Mutationsanalysen zeigen, dass Nullmutationen innerhalb des Filaggrin-Gens zu erblichen Formen der *Ichthyosis vulgaris* führen können und starke Prädiktoren für die Entwicklung einer atopischen Dermatitis und von allergischem Asthma darstellen (Sandilands, O'Regan et al. 2006). So konnte gezeigt werden, dass auch beim Auftreten von Nullmutationen nahe des *C*-terminalen Profilaggrinendes weiterhin kein prozessiertes Filaggrin detektiert werden konnte. Obwohl diese trunkierten Profilaggrine nach Expression über einen Großteil ihrer Filaggrin-*Repeat*s verfügten, zeigten die Träger der Mutation das klinische Bild einer *Ichthyosis vulgaris* (Sandilands, Terron-Kwiatkowski et al. 2007).

Neben der Beteiligung am Prozess der proteolytischen Abspaltung der Filaggrin-Monomere könnte der *C*-Terminus ähnlich der *C*-terminalen Einheit des strukturverwandten Filaggrin-2 über antimikrobielle Eigenschaften verfügen. Filaggrin-2 stammt ebenfalls aus der Familie der „S100 fused-type"-Proteine. In unserer Arbeitsgruppe konnte hier mittels rekombinanter Expression für den *C*-Terminus im radialen Plattendiffusionstest eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien nachgewiesen werden. Neben einer Wirksamkeit gegen *E.coli* zeigte sich insbesondere eine starke Wirksamkeit gegen *Pseudomonas aeruginosa* und weitere *Pseudomonas* Spezies. Die antimikrobielle Wirksamkeit des *C*-Terminus konnte in Kombination mit dem vorangestellten B(14)-*Repeat* durch eine gemeinsam rekombinant exprimiertes Peptid sogar noch gesteigert werden. Dabei konnte die antimikrobiell wirksame Komponente eindeutig dem *C*-Terminus zugeordnet werden. Allein verfügte das B(14)-*Repeat* über keine antimikrobielle Wirksamkeit. Bemerkenswert ist, dass die antimikrobielle Wirksamkeit nicht, wie häufig bei anderen AMP's, über Porenbildung in der Bakterienhülle vermittelt wird, sondern über einen Eingriff in die bakterielle Replikation erfolgt (Hansmann, Schröder et al. 2015).

Ein weiterer Ansatz zur genaueren Untersuchung der Eigenschaften von $FLG_{3880-4061}$ wäre die chemische Synthese verschiedener Peptid-Regionen oder sogar des gesamten Peptids durch Fragment-Kondensation. Ähnlich den Analysen zu verschiedenen Hornerin-Fragmenten (Latendorf, Gerstel et al. 2019) könnte $FLG_{3880-4061}$ so z.B. auf antimikrobielle Eigenschaften oder hinsichtlich autolytischer Prozesse untersucht werden. Insbesondere könnten so Informationen zu den *C*-terminalen $FLG_{3880-4061}$-Regionen gewonnen werden, die nicht rekombinant exprimiert werden konnten.

Ursprünglich war es geplant, den *C*-Terminus von Profilaggrin in Form des $FLG_{3880-4061}$ Peptids auf antimikrobielle Eigenschaften zu untersuchen. Wie oben diskutiert war eine vollständige rekombinante Expression aus ungeklärten Gründen nicht erfolgreich.

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Fragestellung, ob die Struktur und Aminosäuresequenz von $FLG_{3880-4061}$ Rückschlüsse auf das Potential für eine mögliche antimikrobielle Wirksamkeit erlauben. Die Datenlage über eine mögliche antimikrobielle Wirksamkeit des *C*-Terminus von Profilaggrin ist spärlich. Sie beschränkt sich bisher lediglich auf rudimentäre Hinweise aus *in silico* Analysen (Hinbest, Kim et al. 2020). Vergleicht man die typischen Eigenschaften hinsichtlich Länge, Nettoladung, Aminosäurezusammensetzung und Tertiärstruktur erfüllt $FLG_{3880-4061}$ nur bedingt das Profil „klassischer" Antimikrobieller Peptide (1.6). Mit einer Länge von 182 Aminosäuren ist $FLG_{3880-4061}$ deutlich länger als der überwiegende Teil der bekannten Antimikrobiellen Peptide. Die theoretische Berechnung des Isoelektrischen Punktes (pI-Wert), dem pH-Wert, bei dem sich die Ladungen der sauren und basischen Aminosäuren ausgleichen und die Nettoladung des Moleküls null beträgt, liegt für $FLG_{3880-4061}$ mit 7,87 nah am neutralen pH-Wert von 7. Die Vergleiche mit Profilaggrin-

Peptiden, für die in unserer Arbeitsgruppe eine antimikrobielle Aktivität festgestellt werden konnte, zeigen, dass die meisten Peptide bei neutralem pH-Wert deutlich kationischer sind (Schulz 2010, Karsch 2011, Hartnagel 2018). Lediglich das Peptid $FLG_{2849-2900}$ (Hartnagel 2018) mit einer antimikrobiellen Aktivität gegen *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* weist einen niedrigeren pI-Wert von 7,21 auf. Allerdings zeigte $FLG_{2849-2900}$ seine antimikrobielle Aktivität erst im sauren Milieu bei pH 5 und war bei neutralem pH nicht antimikrobiell wirksam.

$FLG_{3880-4061}$ verfügt bei neutralem pH nur über geringe kationische Eigenschaften. Der prozentuale Anteil der basischen Aminosäuren Histidin (8%), Lysin (3%) und Arginin (6%) an der Gesamtsequenz ist nur geringgradig gesteigert. Die Oberfläche der gesunden Haut weist jedoch je nach Lokalisation einen pH zwischen pH 4,1 und 5,8 auf (Proksch 2018). Die basischen Gruppen kationischer AMPs liegen im sauren pH-Milieu der Haut überwiegend protoniert vor und können so mit negativ geladenen bakteriellen Lipidmembranen interagieren (Hancock & Chapple 1999, Rydengard, Olsson et al. 2007). Am Beispiel Histidin-reicher Peptide konnte gezeigt werden, dass diese ihre bakterizide Wirkung anders als bei neutralem pH-Wert von 7,4 erst in saurem pH-Milieu vermitteln können (Kacprzyk, Rydengard et al. 2007). Auch die Mitglieder der Gruppe der kationischen intrinsisch ungeordneten Antimikrobiellen Peptide (CIDAMPs, 1.7) entfalten ihr hohes antimikrobielles Potential erst im physiologisch sauren pH-Milieu (pH 5.5) der Hautoberfläche. Für die Vermittlung ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit benötigen diese Fragmente, die anhand des S100 „fused-type"-Proteins Hornerin entdeckten wurden, keine amphipathische Tertiärstruktur, sondern liegen als kurze lineare Peptide vor.

Ihr hoher Anteil „Unordnung-fördernder Aminosäuren" (Arginin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Lysin, Prolin, Serin) gegenüber einem niedrigen Anteil „Struktur-bildender" Aminosäuren" (Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Valin) ist ein entscheidender Einflussfaktor auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit (Latendorf, Gerstel et al. 2019). Wie beschrieben (1.7) sind weitere „S100 Fused Type" Proteine wie beispielsweise Profilaggrin als „intrinsisch ungeordnete Peptide" (IDP) identifiziert oder enthalten „intrinsisch ungeordnete Peptidregionen" (IDPR). Analog zu Hornerin, welches zu 88,8% aus „Unordnung-fördernden Aminosäuren" besteht, während der Anteil „Ordnung-fördernder Aminosäuren" nur bei 7,8% liegt (Latendorf, Gerstel et al. 2019), zeigt auch die Analyse der Aminosäurezusammensetzung von $FLG_{3880-4061}$ mit 71,5% zu 18,6% ein deutliches Übergewicht der „Unordnung-fördernden Aminosäuren".

Auf den ersten Blick mag dies im Widerspruch zur oben beschriebenen Beteiligung des Profilaggrin *C*-Terminus an der Prozessierung von Profilaggrin in seine Filaggrin-Monomere stehen. Für diese Funktion wäre stattdessen ein höherer Anteil strukturfördernder Aminosäuren zu erwarten, die die Ausbildung einer spezifischen Tertiärstruktur ermöglichen.

Bei genauerer Betrachtung der Aminosäuresequenz von $FLG_{3880-4061}$ zeigt sich jedoch eine inhomogene Verteilung der „Unordnung-fördernden“ Aminosäuren (Abbildung 3-21). Während der *N*-terminale Teil von $FLG_{3880-4061}$ überwiegend aus „Unordnung-fördernden“ Aminosäuren besteht (82% zu 9% „strukturgebenden“ Aminosäuren), ist das Verhältnis im *C*-terminalen Ende deutlich ausgewogener (62% „Unordnung-fördernde“ zu 26% „strukturgebenden“ Aminosäuren).

Dies kann darauf hinweisen, dass $FLG_{3880-4061}$ über funktionell unterschiedliche Untereinheiten verfügt. Zum einen könnte die proteolytischen Spaltung von Profilaggrin unter Beteiligung des *C*-terminalen Anteils von $FLG_{3880-4061}$ erfolgen. Zum anderen lässt der lokal sehr hohe Gehalt an den Aminosäuren Serin und Histidin in Verbindung mit dem hohen Gehalt „Unordnung-fördernder“ Aminosäuren erwarten, dass im Rahmen der Degradierung von Profilaggrin (1.9) insbesondere Fragmente aus den *N*-terminalen Anteilen von $FLG_{3880-4061}$ unter hautspezifischen Bedingungen wie saurem pH und Abwesenheit löslicher Proteine ähnlich anderer kationische FLG-Fragmente als CIDAMPS die antimikrobielle Barrie der Haut stärken können.

Zusammengefasst ist trotz der überwiegend guten Charakterisierung Profilaggrins und Kenntnis über die Funktion seiner Untereinheiten bisher wenig über die Funktion des *C*-Terminus bekannt. Diese Arbeit kann mit der Erarbeitung und Diskrimination der Problemfelder in der Expression als Grundlage für die Planung vertiefender Arbeiten dienen. Unter anderem scheint eine Expression des *C*-Terminus in kleineren Untereinheiten als dem 182 Aminosäuren-langen $FLG_{3880-4061}$ sinnvoll, um die Problematik der Expressionsabbrüche zu umgehen und die Charakteristika möglicher funktioneller Untereinheiten besser beleuchten zu können. Insbesondere vor dem geringen Kenntnisgrad zur Funktion des *C*-terminalen Profilaggrinendes erscheint eine Fortführung der Forschungen lohnend.

5. Zusammenfassung

Die menschliche Haut ist durch ihre große Kontaktfläche zur Umwelt als Grenzorgan starken physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Einflüssen ausgesetzt. Auf der Epidermis beherbergt sie das Mikrobiom der Haut mit einer Vielzahl von Mikroorgansimen. Obwohl in der Hautflora neben kommensalen Bakterien, Pilzen und Viren auch pathogene Mirkoorganismen leben, kommt es nur selten zu Infektionen.

Profilaggrin hat als *Precursor* für das Hautstrukturprotein Filaggrin einen integralen Anteil an der Bildung einer effizienten Hautbarriere. Die Aggregation von Filaggrin mit den zellulären Intermediärfilamenten bildet die Grundlage für die Ausbildung des „Cornified Cell Envelope“ als elementarem Baustein der physikalischen Barriere. Im Rahmen der Desquamation führt die Degradierung von Filaggrin über Histidin zur Urocaninsäure an der Hautoberfläche zur Ausbildung des natürlichen Säureschutzmantels der Haut als Teil der chemischen Barriere. Darüber hinaus konnten in vorangegangen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe für mehrere Profilaggrin-Fragmente des *N*-Terminus und aus der Region der Filaggrin-*Repeats* antimikrobielle Eigenschaften gezeigt werden. Profilaggrin scheint daher auch an der Abwehr pathogener Mikroorgansimen und damit an der Bildung einer biochemischen Hautbarriere beteiligt zu sein.

Trotz umfangreicher Kenntnisse zu Prozessen und Funktionen des *N*-Terminus und der Filaggrin-*Repeats* im Rahmen der epidermalen Differenzierung ist die wissenschaftliche Datenlage zur Funktion des *C*-Terminus von Profilaggrin insgesamt spärlich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das *C*-terminale Fragment $FLG_{3880-4061}$ rekombinant exprimiert und anschließend auf antimikrobielle Eigenschaften untersucht werden. MS-Analysen zeigten, dass bei den wiederholten rekombinanten Expressionen in verschiedenen Vektorsystemen statt des Zielpeptids $FLG_{3880-4061}$ ein trunkiertes Peptidfragment aus der *N*-terminalen Region des *C*-Terminus entstanden war. Welche Mechanismen zu dieser reproduzierbaren Verkürzung des Fragments beigetragen haben gilt es weiter zu erforschen. Die Analyse der Aminosäuresequenz von $FLG_{3880-4061}$ identifizierte darüber hinaus insbesondere den *N*-terminalen Anteil des Peptids als „intrinsisch ungeordnete Peptidregion“. Mit einem hohen Anteil „Unordnung-fördernder Aminosäuren“ und einem geringen Anteil „strukturbildender Aminosäuren“ weist $FLG_{3880-4061}$ Merkmale eines kationisch intrinsisch ungeordneten Antimikrobiellen Peptids (CIDAMP) auf. Es ist daher möglich, dass Fragmente des *C*-Terminus als CIDAMPs die antimikrobielle Barriere der Haut stärken.

6. Literaturverzeichnis

Alonso, L. & E. Fuchs (2003). "Stem cells of the skin epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1: 11830-11835.

Babian, S. (2010). Untersuchung zur Rolle des Profilaggrin-proteins FLG3605-3879 in der antimikrobiellen Hautabwehr. Dissertation (Dr. med.), Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Braun, K. M. & F. M. Watt (2004). "Epidermal label-retaining cells: background & recent applications." J Investig Dermatol Symp Proc 9(3): 196-201.

Browne, K., S. Chakraborty, R. Chen, M. D. Willcox, D. S. Black, W. R. Walsh & N. Kumar (2020). "A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides." Int J Mol Sci 21(19).

Byrd, A. L., Y. Belkaid & J. A. Segre (2018). "The human skin microbiome." Nat Rev Microbiol 16(3): 143-155.

Cabral, A., P. Voskamp, A. M. Cleton-Jansen, A. South, D. Nizetic & C. Backendorf (2001). "Structural organization & regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function." J Biol Chem 276(22): 19231-19237.

Candi, E., R. Schmidt & G. Melino (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in t he skin." Nat Rev Mol Cell Biol 6(4): 328-340.

Contzler, R., B. Favre, M. Huber & D. Hohl (2005). "Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation." J Invest Dermatol 124(5): 990-997.

Dale, B. A., R. B. Presland, S. P. Lewis, R. A. Underwood & P. Fleckman (1997). "Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape & nuclear integrity." J Invest Dermatol 108(2): 179-187.

Denecker, G., E. Hoste, B. Gilbert, T. Hochepied, P. Ovaere, S. Lippens, C. Van den Broecke, P. Van Damme, K. D'Herde, J. P. Hachem, G. Borgonie, R. B. Presland, L. Schoonjans, C. Libert, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, P. Vandenabeele & W. Declercq (2007). "Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage & water loss." Nat Cell Biol 9(6): 666-674.

Dower, W. J., J. F. Miller & C. W. Ragsdale (1988). "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res 16(13): 6127-6145.

Eckert, R. L., J. F. Crish & N. A. Robinson (1997). "The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation & cell differentiation." Physiol Rev 77(2): 397-424.

Elias, P. M. (2005). "Stratum corneum defensive functions: an integrated view." J Invest Dermatol 125(2): 183-200.

Elias, P. M., R. Gruber, D. Crumrine, G. Menon, M. L. Williams, J. S. Wakefield, W. M. Holleran & Y. Uchida (2013). "Formation & functions of the corneocyte lipid envelope (CLE)." Biochim Biophys Acta.

Elias, P. M., S. K. Ahn, M. Denda, B. E. Brown, D. Crumrine, L. K. Kimutai, L. Komuves, S. H. Lee & K. R. Feingold (2002). "Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers." J Invest Dermatol 119(5): 1128-1136.

Fallon, P. G., T. Sasaki, A. Sandilands, L. E. Campbell, S. P. Saunders, N. E. Mangan, J. J. Callanan, H. Kawasaki, A. Shiohama, A. Kubo, J. P. Sundberg, R. B. Presland, P. Fleckman, N. Shimizu, J. Kudoh, A. D. Irvine, M. Amagai & W. H. McLean (2009). "A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming." Nat Genet 41(5): 602-608.

Feingold, K. R. & P. M. Elias (2013). "Role of lipids in the formation & maintenance of the cutaneous permeability barrier." Biochim Biophys Acta.

Fernandez-Patron, C., E. Hardy, A. Sosa, J. Seoane & L. Castellanos (1995). "Double staining of coomassie blue-stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of coomassie blue-undetected proteins." Anal Biochem 224(1): 263-269.

Fleming, A. (1922). "On a remarkable bacteriolytic element found in tissues & secretions." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character 93(653): 306-317.

Fluhr, J. W., P. M. Elias, M. Q. Man, M. Hupe, C. Selden, J. P. Sundberg, E. Tschachler, L. Eckhart, T. M. Mauro & K. R. Feingold (2010). "Is the filaggrin-histidine-urocanic acid pathway essential for stratum corneum acidification?" J Invest Dermatol 130(8): 2141-2144.

Fuchs, E. (2007). "Scratching the surface of skin development." Nature 445(7130): 834-842.

Fuchs, E. & D. W. Cleveland (1998). "A structural scaffolding of intermediate filaments in health & disease." Science 279(5350): 514-519.

Gan, S. Q., O. W. McBride, W. W. Idler, N. Markova & P. M. Steinert (1990). "Organization, structure, & polymorphisms of the human profilaggrin gene." Biochemistry 29(40): 9432-9440.

Gerstel, U., T. Latendorf, J. Bartels, A. Becker, A. Tholey & J. M. Schröder (2018). "Hornerin contains a Linked Series of Ribosome-Targeting Peptide Antibiotics." Sci Rep 8(1): 16158.

Ghazizadeh, S. & L. B. Taichman (2001). "Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin." EMBO J 20(6): 1215-1222.

Gläser, R., B. Köten, M. Wittersheim & J. Harder (2011). "Psoriasin: key molecule of the cutaneous barrier?" J Dtsch Dermatol Ges 9(11): 897-902.

Gouy, M. & C. Gautier (1982). "Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity." Nucleic Acids Res 10(22): 7055-7074.

Hancock, R. E. & D. S. Chapple (1999). "Peptide antibiotics." Antimicrob Agents Chemother 43(6): 1317-1323.

Hancock, R. E. & G. Diamond (2000). "The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences." Trends Microbiol 8(9): 402-410.

Hansmann, B. (2008). Proteinexpressionsanalysen und Funktionsuntersuchungen von Ifapsoriasin in der menschlichen Haurt. Dissertation (Dr. rer.nat.), Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Hansmann, B., J. M. Schröder & U. Gerstel (2015). "Skin-Derived C-Terminal Filaggrin-2 Fragments Are Pseudomonas aeruginosa-Directed Antimicrobials Targeting Bacterial Replication." PLoS Pathog 11(9): e1005159.

Harder, J. & J. M. Schröder (2005). "Antimicrobial peptides in human skin." Chem Immunol Allergy 86: 22-41.

Harder, J., J. Bartels, E. Christophers & J. M. Schröder (1997). "A peptide antibiotic from human skin." Nature 387(6636): 861.

Harder, J., R. Gläser & J. M. Schröder (2007). "Human antimicrobial proteins effectors of i nnate i mmunity." J Endotoxin Res 13(6): 317-338.

Hartnagel, A. (2018). Untersuchung zur Rolle der Filaggrin-Domänen FLG764-903 und FLG2849-2900 in der kutanen Abwehr. Dissertation (Dr. med.), Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Henaut, A. D., A (1996). "Analysis & Predictions from Escherichia coli Sequences, or E. coli In Silico." Escherichia coli & Salmonella typhimurium Cellular & Molecular Biology 2.

Hinbest, A. J., S. R. Kim, S. A. Eldirany, I. B. Lomakin, J. Watson, M. Ho & C. G. Bunick (2020). "Structural properties of target binding by profilaggrin A & B domains & other S100 fused-type calcium-binding proteins." J Dermatol Sci 100(1): 39-49.

Hoffjan, S. & S. Stemmler (2007). "On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis & psoriasis." Br J Dermatol 157(3): 441-449.

Houben, E., K. De Paepe & V. Rogiers (2007). "A keratinocyte's course of life." Skin Pharmacol Physiol 20(3): 122-132.

Hsu, C. H., C. Chen, M. L. Jou, A. Y. Lee, Y. C. Lin, Y. P. Yu, W. T. Huang & S. H. Wu (2005). "Structural & DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes & DNA." Nucleic Acids Res 33(13): 4053-4064.

Ishida-Yamamoto, A., H. Takahashi, R. B. Presland, B. A. Dale & H. Iizuka (1998). "Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with

fragmented DNA in normal human skin & loricrin keratoderma." Lab Invest 78(10): 1245-1253.
Izadpanah, A. & R. L. Gallo (2005). "Antimicrobial peptides." J Am Acad Dermatol 52(3 Pt 1): 381-390; quiz 391-382.
Jackson, B., C. M. Tilli, M. J. Hardman, A. A. Avilion, M. C. MacLeod, G. S. Ashcroft & C. Byrne (2005). "Late cornified envelope family in differentiating epithelia--response to calcium & ultraviolet irradiation." J Invest Dermatol 124(5): 1062-1070.
Jenssen, H., P. Hamill & R. E. Hancock (2006). "Peptide antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev 19(3): 491-511.
Junge, A. (2011). Untersuchungen zur Rolle von Ifapsoriasin- /Filaggrin-2-Peptiden in der antimikrobiellen Hautabwehr. Dissertation (Dr. med.), Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
Kacprzyk, L., V. Rydengard, M. Morgelin, M. Davoudi, M. Pasupuleti, M. Malmsten & A. Schmidtchen (2007). "Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions." Biochim Biophys Acta 1768(11): 2667-2680.
Kagan, B. L., M. E. Selsted, T. Ganz & R. I. Lehrer (1990). "Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes." Proc Natl Acad Sci U S A 87(1): 210-214.
Kalinin, A., L. N. Marekov & P. M. Steinert (2001). "Assembly of the epidermal cornified cell envelope." J Cell Sci 114(Pt 17): 3069-3070.
Kang, D. (2002). "Highly Sensitive & Fast protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." Bull. Korean Chem. Soc. 23(11): 1511-1512.
Karsch, D. (2011). Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG91-122 und FLG 87-197 in der kutnanen Abwehr. Dissertation (Dr. med.), Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
Kim, G., S. J. Weiss & R. L. Levine (2014). "Methionine oxidation & reduction in proteins." Biochim Biophys Acta 1840(2): 901-905.
Koehbach, J. & D. J. Craik (2019). "The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides." Trends Pharmacol Sci 40(7): 517-528.
Komuves, L., Y. Oda, C. L. Tu, W. H. Chang, C. L. Ho-Pao, T. Mauro & D. D. Bikle (2002). "Epidermal expression of the full-length extracellular calcium-sensing receptor is required for normal keratinocyte differentiation." J Cell Physiol 192(1): 45-54.
Krieg, P., M. Schuppler, R. Koesters, A. Mincheva, P. Lichter & F. Marks (1997). "Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein." Genomics 43(3): 339-348.
Kypriotou, M., M. Huber & D. Hohl (2012). "The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins & the 'fused genes' family." Exp Dermatol 21(9): 643-649.
Langerhans, P. (1868). "Ueber die Nerven der menschlichen Haut." Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und klinische Medicin: 14.
Latendorf, T., U. Gerstel, Z. Wu, J. Bartels, A. Becker, A. Tholey & J. M. Schroder (2019). "Cationic Intrinsically Disordered Antimicrobial Peptides (CIDAMPs) Represent a New Paradigm of Innate Defense with a Potential for Novel Anti-Infectives." Sci Rep 9(1): 3331.
Laudenbach, B. (2018). Untersuchung zur Rolle der Filaggrin-Peptide FLG146-199 und FLG146-200 in der kutanen Abwehr. Dissertation (Dr. med.), Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
Lee, S. C., I. G. Kim, L. N. Marekov, E. J. O'Keefe, D. A. Parry & P. M. Steinert (1993). "The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, & an intermediate filament-associated (cross-linking) protein." J Biol Chem 268(16): 12164-12176.
Levy, V., C. Lindon, Y. Zheng, B. D. Harfe & B. A. Morgan (2007). "Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding." FASEB J 21(7): 1358-1366.
Leyvraz, C., R. P. Charles, I. Rubera, M. Guitard, S. Rotman, B. Breiden, K. Sandhoff & E. Hummler (2005). "The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8." J Cell Biol 170(3): 487-496.

Lippens, S., G. Denecker, P. Ovaere, P. Vandenabeele & W. Declercq (2005). "Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification." Cell Death Differ 12 Suppl 2: 1497-1508.

List, K., R. Szabo, P. W. Wertz, J. Segre, C. C. Haudenschild, S. Y. Kim & T. H. Bugge (2003). "Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1." J Cell Biol 163(4): 901-910.

Lonsdale-Eccles, J. D., D. C. Teller & B. A. Dale (1982). "Characterization of a phosphorylated form of the intermediate filament-aggregating protein filaggrin." Biochemistry 21(23): 5940-5948.

Lorand, L. & R. M. Graham (2003). "Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions." Nat Rev Mol Cell Biol 4(2): 140-156.

Lüllmann-Rauch (2012). Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart, Thieme.

Lyle, S., M. Christofidou-Solomidou, Y. Liu, D. E. Elder, S. Albelda & G. Cotsarelis (1998). "The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 & defines the location of human hair follicle stem cells." J Cell Sci 111 (Pt 21): 3179-3188.

Madison, K. C. (2003). "Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis." J Invest Dermatol 121(2): 231-241.

Makino, T., M. Takaishi, M. Morohashi & N. H. Huh (2001). "Hornerin, a novel profilaggrin-l ike protein & differentiation-specific marker isolated from mouse skin." J Biol Chem 276(50): 47445-47452.

Marenholz, I., A. Volz, A. Ziegler, A. Davies, I. Ragoussis, B. P. Korge & D. Mischke (1996). "Genetic analysis of the epidermal differentiation complex (EDC) on human chromosome 1q21: chromosomal orientation, new markers, & a 6-Mb YAC contig." Genomics 37(3): 295-302.

Markova, N. G., L. N. Marekov, C. C. Chipev, S. Q. Gan, W. W. Idler & P. M. Steinert (1993). "Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein." Mol Cell Biol 13(1): 613-625.

Matsui, T., K. Miyamoto, A. Kubo, H. Kawasaki, T. Ebihara, K. Hata, S. Tanahashi, S. Ichinose, I. Imoto, J. Inazawa, J. Kudoh & M. Amagai (2011). "SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing." EMBO Mol Med 3(6): 320-333.

McKinley-Grant, L. J., W. W. Idler, I. A. Bernstein, D. A. Parry, L. Cannizzaro, C. M. Croce, K. Huebner, S. R. Lessin & P. M. Steinert (1989). "Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin & localization of the gene to chromosome region 1q21." Proc Natl Acad Sci U S A 86(13): 4848-4852.

Menon, G. K., S. Grayson & P. M. Elias (1985). "Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry." J Invest Dermatol 84(6): 508-512.

Mischke, D., B. P. Korge, I. Marenholz, A. Volz & A. Ziegler (1996). "Genes encoding structural proteins of epidermal cornification & S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21." J Invest Dermatol 106(5): 989-992.

Moniaga, C. S., G. Egawa, H. Kawasaki, M. Hara-Chikuma, T. Honda, H. Tanizaki, S. Nakajima, A. Otsuka, H. Matsuoka, A. Kubo, J. Sakabe, Y. Tokura, Y. Miyachi, M. Amagai & K. Kabashima (2010). "Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state & by topical application with Dermatophagoides pteronyssinus extract." Am J Pathol 176(5): 2385-2393.

Moravej, H., Z. Moravej, M. Yazdanparast, M. Heiat, A. Mirhosseini, M. Moosazadeh Moghaddam & R. Mirnejad (2018). "Antimicrobial Peptides: Features, Action, & Their Resistance Mechanisms in Bacteria." Microb Drug Resist 24(6): 747-767.

Nakamura, Y. G., T.; Ikemura, T. (2000). "Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000." Nucleic Acids Res 28.

Nemes, Z. & P. M. Steinert (1999). "Bricks & mortar of the epidermal barrier." Exp Mol Med 31(1): 5-19.

Nomura, T., A. Sandilands, M. Akiyama, H. Liao, A. T. Evans, K. Sakai, M. Ota, H. Sugiura, K. Yamamoto, H. Sato, C. N. Palmer, F. J. Smith, W. H. McLean & H. Shimizu (

2007). "Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris & atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol 119(2): 434-440.

Pearton, D. J., B. A. Dale & R. B. Presland (2002). "Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear & cytoplasmic distribution." J Invest Dermatol 119(3): 661-669.

Pearton, D. J., W. Nirunsuksiri, A. Rehemtulla, S. P. Lewis, R. B. Presland & B. A. Dale (2001). "Proprotein convertase expression & localization in epidermis: evidence for multiple roles & substrates." Exp Dermatol 10(3): 193-203.

Presland, R. B., P. V. Haydock, P. Fleckman, W. Nirunsuksiri & B. A. Dale (1992). "Characterization of the Human Epidermal Profilaggrin Gene - Genomic Organization & Identification of an S-100-Like Calcium-Binding Domain at the Amino Terminus." J Biol Chem 267(33): 23772-23781.

Presland, R. B., J. A. Bassuk, J. R. Kimball & B. A. Dale (1995). "Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin." J Invest Dermatol 104(2): 218-223.

Presland, R. B., D. Boggess, S. P. Lewis, C. Hull, P. Fleckman & J. P. Sundberg (2000). "Loss of normal profilaggrin & filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris." J Invest Dermatol 115(6): 1072-1081.

Presland, R. B., J. R. Kimball & B. A. Dale (1992). "The Epidermal Protein Profilaggrin Contains an S-100-Like Ef Hand Domain at Its Amino Terminus." Mol Biol Cell 3: A354-A354.

Proksch, E. (2018). "pH in nature, humans & skin." J Dermatol 45(9): 1044-1052.

Rawlings, A. V. & C. R. Harding (2004). "Moisturization & skin barrier function." Dermatol Ther 17 Suppl 1: 43-48.

Resing, K. A., C. Thulin, K. Whiting, N. al-Alawi & S. Mostad (1995). "Characterization of profilaggrin endoproteinase 1. A regulated cytoplasmic endoproteinase of epidermis." J Biol Chem 270(47): 28193-28198.

Ruhrberg, C., M. A. Hajibagheri, D. A. Parry & F. M. Watt (1997). "Periplakin, a novel component of cornified envelopes & desmosomes that belongs to the plakin family & forms complexes with envoplakin." J Cell Biol 139(7): 1835-1849.

Rydengard, V., A. K. Olsson, M. Morgelin & A. Schmidtchen (2007). "Histidine-rich glycoprotein exerts antibacterial activity." FEBS J 274(2): 377-389.

Sakabe, J., M. Yamamoto, S. Hirakawa, A. Motoyama, I. Ohta, K. Tatsuno, T. Ito, K. Kabashima, T. Hibino & Y. Tokura (2013). "Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes." J Biol Chem 288(24): 17179-17189.

Sandilands, A., A. Terron-Kwiatkowski, P. R. Hull, G. M. O'Regan, T. H. Clayton, R. M. Watson, T. Carrick, A. T. Evans, H. Liao, Y. Zhao, L. E. Campbell, M. Schmuth, R. Gruber, A. R. Janecke, P. M. Elias, M. A. van Steensel, I. Nagtzaam, M. van Geel, P. M. Steijlen, C. S. Munro, D. G. Bradley, C. N. Palmer, F. J. Smith, W. H. McLean & A. D. Irvine (2007). "Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent & rare mutations in ichthyosis vulgaris & atopic eczema." Nat Genet 39(5): 650-654.

Sandilands, A., C. Sutherland, A. D. Irvine & W. H. McLean (2009). "Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function & disease." J Cell Sci 122(Pt 9): 1285-1294.

Sandilands, A., G. M. O'Regan, H. Liao, Y. Zhao, A. Terron-Kwiatkowski, R. M. Watson, A. J. Cassidy, D. R. Goudie, F. J. Smith, W. H. McLean & A. D. Irvine (2006). "Prevalent & rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris & predispose individuals to atopic dermatitis." J Invest Dermatol 126(8): 1770-1775.

Sato, H. & J. B. Feix (2006). "Peptide-membrane interactions & mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides." Biochim Biophys Acta 1758(9): 1245-1256.

Schittek, B. (2012). "The multiple facets of dermcidin in cell survival & host defense." J Innate Immun 4(4): 349-360.

Schröder, J. M. & J. Harder (2006). "Antimicrobial skin peptides & proteins." Cell Mol Life Sci 63(4): 469-486.

Schulz, C. (2010). Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG87-122 und FLG123-200 in der kutanen Abwehr. Dissertation (Dr. med.), Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Schwarz, T. (2005). "Mechanisms of UV-induced immunosuppression." Keio J Med 54(4): 165-171.

Segre, J. A. (2006). "Epidermal differentiation complex yields a secret: mutations in the cornification protein filaggrin underlie ichthyosis vulgaris." J Invest Dermatol 126(6): 1202-1204.

Steinert, P. M., J. S. Cantieri, D. C. Teller, J. D. Lonsdale-Eccles & B. A. Dale (1981). "Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments." Proc Natl Acad Sci U S A 78(7): 4097-4101.

Steven, A. C., M. E. Bisher, D. R. Roop & P. M. Steinert (1990). "Biosynthetic pathways of filaggrin & loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes." J Struct Biol 104(1-3): 150-162.

Tarcsa, E., L. N. Marekov, G. Mei, G. Melino, S. C. Lee & P. M. Steinert (1996). "Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity & structural relationships of the natural substrates trichohyalin & filaggrin." J Biol Chem 271(48): 30709-30716.

Tornesello, A. L., A. Borrelli, L. Buonaguro, F. M. Buonaguro & M. L. Tornesello (2020). "Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties & Biological Activities." Molecules 25(12).

Uversky, V. N. (2013). "Disorder in the lifetime of a protein." Intrinsically Disord Proteins 1(1): e26782.

van Smeden, J., M. Janssens, G. S. Gooris & J. A. Bouwstra (2013). "The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function." Biochim Biophys Acta.

Wu, Z., B. Hansmann, U. Meyer-Hoffert, R. Glaser & J. M. Schroder (2009). "Molecular identification & expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family." PLoS One 4(4): e5227.

Wu, Z., U. Meyer-Hoffert, K. Reithmayer, R. Paus, B. Hansmann, Y. He, J. Bartels, R. Gläser, J. Harder & J. M. Schröder (2009). "Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin." J Invest Dermatol 129(6): 1446-1458.

Wu, Z., T. Latendorf, U. Meyer-Hoffert & J. M. Schroder (2011). "Identification of trichohyalin-like 1, an s100 fused-type protein selectively expressed in hair follicles." J Invest Dermatol 131(8): 1761-1763.

Yamazaki, M., K. Ishidoh, Y. Suga, T. C. Saido, S. Kawashima, K. Suzuki, E. Kominami & H. Ogawa (1997). "Cytoplasmic processing of human profilaggrin by active mu-calpain." Biochem Biophys Res Commun 235(3): 652-656.

Yan, X. & D. M. Owens (2008). "The skin: a home to multiple classes of epithelial progenitor cells." Stem Cell Rev 4(2): 113-118.

Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature 415(6870): 389-395.

Zhang, D., S. Karunaratne, M. Kessler, D. Mahony & J. A. Rothnagel (2002). "Characterization of mouse profilaggrin: evidence for nuclear engulfment & translocation of the profilaggrin B-domain during epidermal differentiation." J Invest Dermatol 119(4): 905-912.

7. Anhang

7.1. Plasmid- und Vektorkarten

- pGEM-T-Vektor
- pJet 1.2 Vektor
- pSUMO3-Vektor
- pRARE2-Plasmid (E.coli Rosetta-gami2 (DE3) pLysS

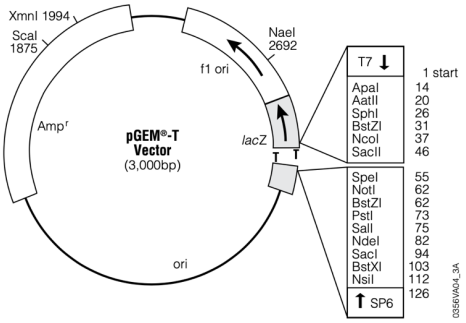


Abbildung 7-1 Schematische Darstellung des pGEM-T-Klonierungsvektors von Promega. *Schnittstellen für Restriktionsenzmye und für die Verwendung relevante Sequenzabschnitte sind vergrößert dargestellt. lacZ: lacZ kodierende Sequenz. Amp^r:Gen für die Ampicillin-Resistenz (aus Technical Manual pGEM-T-vector systems Promega).*

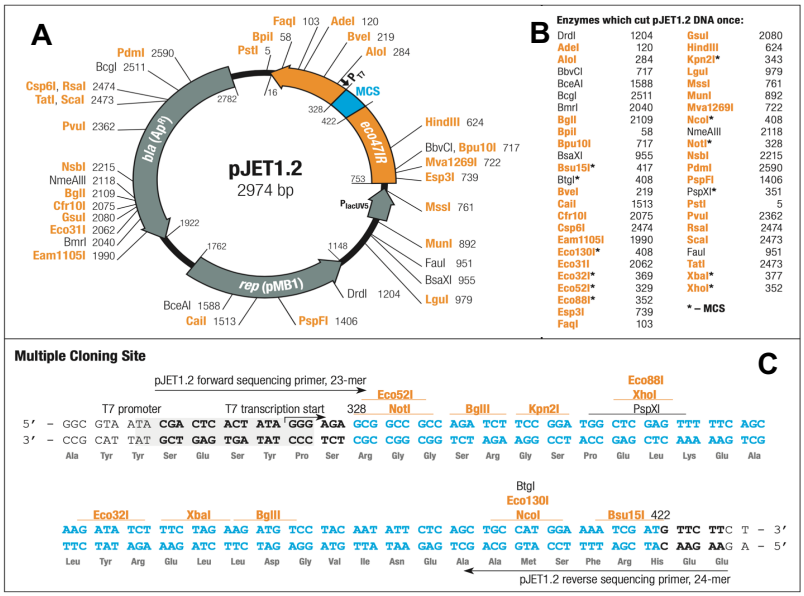


Abbildung 7-2 pJet 1.2 Vektor. A Schematische Darstellung des pJet 1.2 Klonierungsvektors *von Thermo Fisher Scientific.* ***B Übersichtstabelle und Schnittstellenlokalisation für Restriktionsenzyme*** *mit einer einzelnen Schnittstelle in der Vektorsequenz.* ***C Basensequenz der „Multiple Cloning Site“*** *inklusive T7-Promotorregion und charakteristischen Enzymschnittstellen (Aus „Phage & Plasmid DNA Maps“ für CloneJET PCR Cloning kit von Thermo Fisher Scientific).*

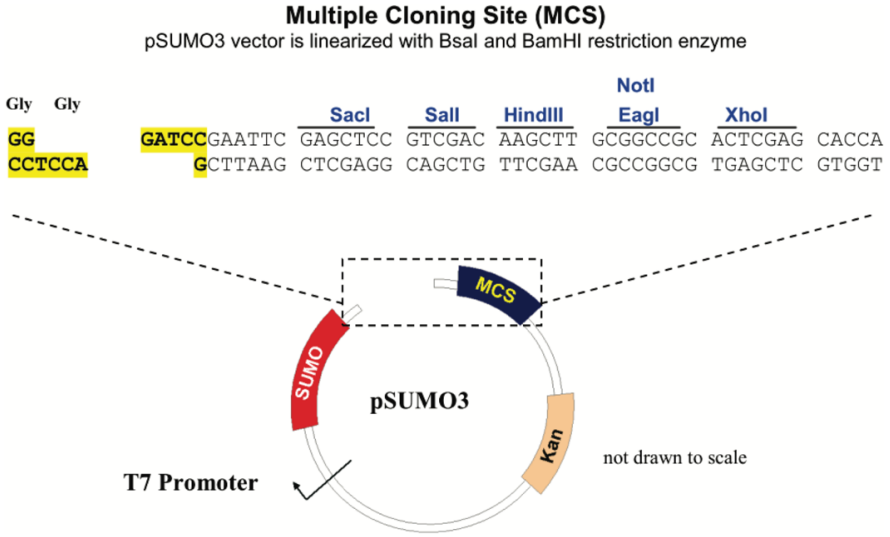
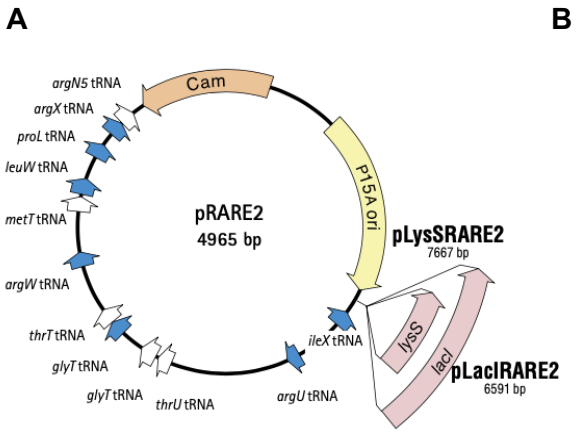


Abbildung 7-3 Schematische Darstellung des pSUMO3-Vektors von LifeSensors. *Für die Verwendung relevante Abschnitte sind vergrößert dargestellt. Kan: Gen für die Kanamycin-Resistenz. SUMO: SUMO3-Gensequenz. MCS: „Multiple Cloning Site“ mit Basensequenz und Schnittstellen für Restriktionsenzyme. (Aus Polylinker Map (pSUMO3 vector, T7 Kann) LifeSensors).*



B

Rare codons in *E. coli*

Amino acid	Codon	Fraction in all genes[6]	Fraction in Class II[7]
Arg	AGG	0.022	0.003
Arg	AGA	0.039	0.006
Arg	CGG	0.098	0.008
Arg	CGA	0.065	0.011
Arg	CGU	0.378	0.643
Arg	CGC	0.398	0.330
Gly	GGG	0.151	0.044
Gly	GGA	0.109	0.020
Gly	GGU	0.337	0.508
Gly	GGC	0.403	0.428
Ile	AUA	0.073	0.006
Ile	AUU	0.507	0.335
Ile	AUC	0.420	0.659
Leu	UUG	0.129	0.034
Leu	UUA	0.131	0.055
Leu	CUG	0.496	0.767
Leu	CUA	0.037	0.008
Leu	CUU	0.104	0.056
Leu	CUC	0.104	0.080
Pro	CCG	0.525	0.719
Pro	CCA	0.191	0.153
Pro	CCU	0.159	0.112
Pro	CCC	0.124	0.016

Abbildung 7-4 *A Schematische Darstellung des pRARE2-Plasmids der Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen von Novagen (Merck).* ***B Übersichtstabelle der Rare Codons in E.coli*** *mit Häufigkeitsangaben (Henaut 1996, Nakamura 2000) aus ‚Competent Cells Brochure' -Novagen -Merck Vers. 2021)*

7.2. Protein- und Nukleotidsequenzen

7.2.1. Nukleotidsequenz FLG 3880-4061

tctgagtctgcttccagaaaccatcatggatcttctcgggagcagtcaagagatggctccagacaccccggatcc
tctcaccgcgatacagccagtcatgtacagtcttcacctgtacagtcagactctagtaccgctaaggaacatggt
cactttagtagtctttcacaagattctgcgtatcactcaggaatacagtcacgtggcagtcctcacagttctagt
tcttatcattatcaatctgagggcactgaaaggcaaaaaggtcaatcaggtttagtttggagacatggcagctat
ggtagtgcagattatgattatggtgaatccgggtttagacactctcagcacggaagtgttagttacaattccaat
cctgttgttttcaaggaaagatctgatatctgtaaagcaagtgcgtttggtaaagatcatccaaggtattatgca
acgtatattaataaggacccaggtttatgtggccattctagtgatatatcgaaacaactgggatttagtcagtca
cagagatactattactatgagtaa

Anzahl der Basenpaare:	549 bp
Rot markierte Basen:	5'-Primer
Blau markierte Basen:	3'-Primer

7.2.2. Proteinsequenz des Fusionsproteins

GHHHHHHGGMSEEKPKEGVKTENDHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPI
NETDTPAQLEMEDEDTIDVFQQQTGGSESASRNHHGSSREQSRDGSRHPGSSHRDTASHVQSSPVQSDSSTAKEH
GHFSSLSQDSAYHSGIQSRGSPHSSSSYHYQSEGTERQKGQSGLVWRHGSYGSADYDYGESGFRHSQHGSVSYNS
NPVVFKERSDICKASAFGKDHPRYYATYINKDPGLCGHSSDISKQLGFSQSQRYYYYE

Anzahl der Aminosäuren:	283
Molekulargewicht:	31678.0 Da
Theoretischer pI-Wert:	6.96
Extinktionskoeffizient:	27975 l • mol^{-1} • cm^{-1}

7.2.3. Proteinsequenz $FLG_{3880-4061}$

SESASRNHHGSSREQSRDGSRHPGSSHRDTASHVQSSPVQSDSSTAKEHGHFSSLSQDSAYHSGIQSRGSPHSSS
SYHYQSEGTERQKGQSGLVWRHGSYGSADYDYGESGFRHSQHGSVSYNSNPVVFKERSDICKASAFGKDHPRYYA
TYINKDPGLCGHSSDISKQLGFSQSQRYYYYE

Anzahl der Aminosäuren:	182
Molekulargewicht:	20177.2 Da
Theoretischer pI-Wert:	7.87
Extinktionskoeffizient:	26485 l • mol^{-1} • cm^{-1}

7.2.4. Sequenzierungsdaten n. Ligation und Transformation in *E.coli* TOP10F‘ (Kol.1 + Kol.6)

CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

```
SeqA Name        Len(nt)  SeqB Name        Len(nt)  Score
=========================================================
1    Original    549      2    Kolonie1    549      100
1    Original    549      3    Kolonie6    549      99
2    Kolonie1    549      3    Kolonie6    549      99
=========================================================

Original        TTACTCATAGTAATAGTATCTCTGTGACTGACTAAATCCCAGTTGTTTCGATATATCACT 60
Kolonie1        TTACTCATAGTAATAGTATCTCTGTGACTGACTAAATCCCAGTTGTTTCGATATATCACT 60
Kolonie6        TTACTCATAGTAATAGTATCTCTGTGACTGACTAAATCCCAGTTGTTTCGATATATCACT 60
                ************************************************************

Original        AGAATGGCCACATAAACCTGGGTCCTTATTAATATACGTTGCATAATACCTTGGATGATC 120
Kolonie1        AGAATGGCCACATAAACCTGGGTCCTTATTAATATACGTTGCATAATACCTTGGATGATC 120
Kolonie6        AGAATGGCCACATAAACCTGGGTCCTTATTAATATACGTTGCATAATACCTTGGATGATC 120
                ************************************************************

Original        TTTACCAAACGCACTTGCTTTACAGATATCAGATCTTTCCTTGAAAACAACAGGATTGGA 180
Kolonie1        TTTACCAAACGCACTTGCTTTACAGATATCAGATCTTTCCTTGAAAACAACAGGATTGGA 180
Kolonie6        TTTACCAAACGCACTTGCTTTACAGATATCAGATCTTTCCTTGAAAACAACAGGATTGGA 180
                ************************************************************

Original        ATTGTAACTAACACTTCCGTGCTGAGAGTGTCTAAACCCGGATTCACCATAATCATAATC 240
Kolonie1        ATTGTAACTAACACTTCCGTGCTGAGAGTGTCTAAACCCGGATTCACCATAATCATAATC 240
Kolonie6        ATTGTAACTAACACTTCCGTGCTGAGAGTGTCTAAACCCGGATTCACCATAATCATAATC 240
                ************************************************************

Original        TGCACTACCATAGCTGCCATGTCTCCAAACTAAACCTGATTGACCTTTTTGCCTTTCAGT 300
Kolonie1        TGCACTACCATAGCTGCCATGTCTCCAAACTAAACCTGATTGACCTTTTTGCCTTTCAGT 300
Kolonie6        TGCACTACCATAGCTGCCATGTCTCCAAACTAAACCTGATTGACCTTTTTGCCTTTCAGT 300
                ************************************************************

Original        GCCCTCAGATTGATAATGATAAGAACTAGAACTGTGAGGACTGCCACGTGACTGTATTCC 360
Kolonie1        GCCCTCAGATTGATAATGATAAGAACTAGAACTGTGAGGACTGCCACGTGACTGTATTCC 360
Kolonie6        GCCCTCAGATTGATAATGATAAGAACTAGAACTGTGAGGACTGCCACGTGACTGTATTCC 360
                ************************************************************

Original        TGAGTGATACGCAGAATCTTGTGAAAGACTACTAAAGTGACCATGTTCCTTAGCGGTACT 420
Kolonie1        TGAGTGATACGCAGAATCTTGTGAAAGACTACTAAAGTGACCATGTTCCTTAGCGGTACT 420
Kolonie6        TGAGTGATACGCAGAATCTTGTGAAAGACTACTAAAGTGACCATGTTCCTTAGCGGTACT 420
                ************************************************************

Original        AGAGTCTGACTGTACAGGTGAAGACTGTACATGACTGGCTGTATCGCGGTGAGAGGATCC 480
Kolonie1        AGAGTCTGACTGTACAGGTGAAGACTGTACATGACTGGCTGTATCGCGGTGAGAGGATCC 480
Kolonie6        AGAGTCTGACTGTACAGGTGAAGACTGTACATGACTGGCTGTATCGCGGTGAGAGGATCC 480
                ************************************************************

Original        GGGGTGTCTGGAGCCATCTCTTGACTGCTCCCGAGAAGATCCATGATGGTTTCTGGAAGC 540
Kolonie1        GGGGTGTCTGGAGCCATCTCTTGACTGCTCCCGAGAAGATCCATGATGGTTTCTGGAAGC 540
Kolonie6        GGGGTGTCTGGAGCCATCTCTTGACTGCTCCCGAGAAGATCCATGATGGTTTCTGGACGC 540
                ******************************************************** **

Original        AGACTCAGA 549
Kolonie1        AGACTCAGA 549
Kolonie6        AGACTCAGA 549
                *********
```

7.2.5.Sequenzierungsdaten E.coli BL21 (DE3) pLysS und E.coli TOP10F‘ (Kol.7)

CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	Original	549	2	T10Kolonie7	549	100
1	Original	549	3	BL21Kolonie2	549	100
1	Original	549	4	BL21Kolonie3	549	100
2	T10Kolonie7	549	3	BL21Kolonie2	549	100
2	T10Kolonie7	549	4	BL21Kolonie3	549	100
3	BL21Kolonie2	549	4	BL21Kolonie3	549	100

```
Original          TTACTCATAGTAATAGTATCTCTGTGACTGACTAAATCCCAGTTGTTTCGATATATCACT 60
T10Kolonie7       TTACTCATAGTAATAGTATCTCTGTGACTGACTAAATCCCAGTTGTTTCGATATATCACT 60
BL21Kolonie3      TTACTCATAGTAATAGTATCTCTGTGACTGACTAAATCCCAGTTGTTTCGATATATCACT 60
BL21Kolonie2      TTACTCATAGTAATAGTATCTCTGTGACTGACTAAATCCCAGTTGTTTCGATATATCACT 60
                  ************************************************************

Original          AGAATGGCCACATAAACCTGGGTCCTTATTAATATACGTTGCATAATACCTTGGATGATC 120
T10Kolonie7       AGAATGGCCACATAAACCTGGGTCCTTATTAATATACGTTGCATAATACCTTGGATGATC 120
BL21Kolonie3      AGAATGGCCACATAAACCTGGGTCCTTATTAATATACGTTGCATAATACCTTGGATGATC 120
BL21Kolonie2      AGAATGGCCACATAAACCTGGGTCCTTATTAATATACGTTGCATAATACCTTGGATGATC 120
                  ************************************************************

Original          TTTACCAAACGCACTTGCTTTACAGATATCAGATCTTTCCTTGAAAACAACAGGATTGGA 180
T10Kolonie7       TTTACCAAACGCACTTGCTTTACAGATATCAGATCTTTCCTTGAAAACAACAGGATTGGA 180
BL21Kolonie3      TTTACCAAACGCACTTGCTTTACAGATATCAGATCTTTCCTTGAAAACAACAGGATTGGA 180
BL21Kolonie2      TTTACCAAACGCACTTGCTTTACAGATATCAGATCTTTCCTTGAAAACAACAGGATTGGA 180
                  ************************************************************

Original          ATTGTAACTAACACTTCCGTGCTGAGAGTGTCTAAACCCGGATTCACCATAATCATAATC 240
T10Kolonie7       ATTGTAACTAACACTTCCGTGCTGAGAGTGTCTAAACCCGGATTCACCATAATCATAATC 240
BL21Kolonie3      ATTGTAACTAACACTTCCGTGCTGAGAGTGTCTAAACCCGGATTCACCATAATCATAATC 240
BL21Kolonie2      ATTGTAACTAACACTTCCGTGCTGAGAGTGTCTAAACCCGGATTCACCATAATCATAATC 240
                  ************************************************************

Original          TGCACTACCATAGCTGCCATGTCTCCAAACTAAACCTGATTGACCTTTTTGCCTTTCAGT 300
T10Kolonie7       TGCACTACCATAGCTGCCATGTCTCCAAACTAAACCTGATTGACCTTTTTGCCTTTCAGT 300
BL21Kolonie3      TGCACTACCATAGCTGCCATGTCTCCAAACTAAACCTGATTGACCTTTTTGCCTTTCAGT 300
BL21Kolonie2      TGCACTACCATAGCTGCCATGTCTCCAAACTAAACCTGATTGACCTTTTTGCCTTTCAGT 300
                  ************************************************************

Original          GCCCTCAGATTGATAATGATAAGAACTAGAACTGTGAGGACTGCCACGTGACTGTATTCC 360
T10Kolonie7       GCCCTCAGATTGATAATGATAAGAACTAGAACTGTGAGGACTGCCACGTGACTGTATTCC 360
BL21Kolonie3      GCCCTCAGATTGATAATGATAAGAACTAGAACTGTGAGGACTGCCACGTGACTGTATTCC 360
BL21Kolonie2      GCCCTCAGATTGATAATGATAAGAACTAGAACTGTGAGGACTGCCACGTGACTGTATTCC 360
                  ************************************************************

Original          TGAGTGATACGCAGAATCTTGTGAAAGACTACTAAAGTGACCATGTTCCTTAGCGGTACT 420
T10Kolonie7       TGAGTGATACGCAGAATCTTGTGAAAGACTACTAAAGTGACCATGTTCCTTAGCGGTACT 420
BL21Kolonie3      TGAGTGATACGCAGAATCTTGTGAAAGACTACTAAAGTGACCATGTTCCTTAGCGGTACT 420
BL21Kolonie2      TGAGTGATACGCAGAATCTTGTGAAAGACTACTAAAGTGACCATGTTCCTTAGCGGTACT 420
                  ************************************************************

Original          AGAGTCTGACTGTACAGGTGAAGACTGTACATGACTGGCTGTATCGCGGTGAGAGGATCC 480
T10Kolonie7       AGAGTCTGACTGTACAGGTGAAGACTGTACATGACTGGCTGTATCGCGGTGAGAGGATCC 480
BL21Kolonie3      AGAGTCTGACTGTACAGGTGAAGACTGTACATGACTGGCTGTATCGCGGTGAGAGGATCC 480
BL21Kolonie2      AGAGTCTGACTGTACAGGTGAAGACTGTACATGACTGGCTGTATCGCGGTGAGAGGATCC 480
                  ************************************************************

Original          GGGGTGTCTGGAGCCATCTCTTGACTGCTCCCGAGAAGATCCATGATGGTTTCTGGAAGC 540
T10Kolonie7       GGGGTGTCTGGAGCCATCTCTTGACTGCTCCCGAGAAGATCCATGATGGTTTCTGGAAGC 540
BL21Kolonie3      GGGGTGTCTGGAGCCATCTCTTGACTGCTCCCGAGAAGATCCATGATGGTTTCTGGAAGC 540
BL21Kolonie2      GGGGTGTCTGGAGCCATCTCTTGACTGCTCCCGAGAAGATCCATGATGGTTTCTGGAAGC 540
                  ************************************************************

Original          AGACTCAGA 549
T10Kolonie7       AGACTCAGA 549
BL21Kolonie3      AGACTCAGA 549
BL21Kolonie2      AGACTCAGA 549
                  *********
```

7.2.6. *In silico*-Analyse des FLG-*C*-Terminus

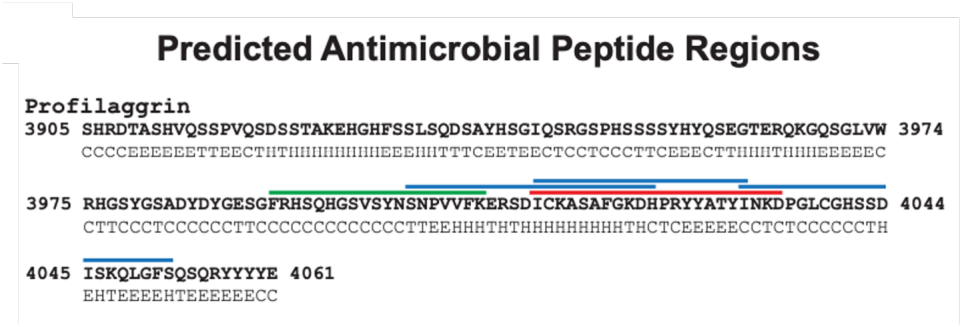


Abbildung 7-5 In silico Vorhersage von Peptidregionen mit möglicher antimikrobieller Wirksamkeit. *Farbbalken oberhalb der Sequenzen repräsentieren computerberechnete Voraussagen für eine antimikrobielle Peptidregionen. Die Farbgebung repräsentiert die verschiedenen Vorhersage-Algorhythmen: Rot: Random Forest Grün: Discriminant Analysis Blau: Artificial Neural Network Schwarz: Support Vector Machine (keine Treffer) (aus (Hinbest, Kim et al. 2020).*

7.3. Klonierung im pGEM-T-Vektorsystem

Nach frustraner direkter Ligation der $FLG_{3880-4061}$-Zielsequenz in das pSUMO3-Vektorsystem mit anschließender Transformation sollte die $FLG_{3880-4061}$-Sequenz als Zwischenschritt in den Klonierungsvektor pGEM-T von Promega ligiert und in *E.coli* TOP10F'-Zellen transformiert werden. Das System ist in unserer Arbeitsgruppe etabliert und wurde in vorangegangenen Arbeiten mit Profilaggrin-Peptiden erfolgreich eingesetzt (Babian 2010, Schulz 2010, Karsch 2011). Die Klonierungen mit der $FLG_{3880-4061}$-Sequenz gestalteten sich im pGEM-T-Vektorsystem jedoch deutlich erschwert, sodass dieses System im Verlauf zugunsten des pJET 1.2/blunt-Vektorsystems (3.2.1) aufgegeben wurde.

Die Ligation (2.10.8) in den pGEM-T-Vektor und die Transformationen (2.10.9) wurden jeweils mit zwei Parallel-Ansätzen und einer Negativkontrolle nach Protokoll des Herstellers (pGEM-T Vector Systems Technical Manual - Promega) mittels T4-Ligase durchgeführt. Zur Transformation in *E.coli* TOP10F'-Zellen wurde in allen LB-Nährmedien entsprechend der vektorvermittelten Resistenz Carbenicillin (50 µg/ml) zur Selektion der Klone verwendet. Beide Transformationsansätze wurden in den Dosierungen 100 µl und 200 µl auf insgesamt vier vorgewärmte LB-Nährböden ausplattiert (Platten 1-4) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Insgesamt zeigte sich ein spärliches Bakterienwachstum. Aus Ligationsansatz 1 konnten lediglich drei Kolonien kultiviert werden. Wachstum zeigte sich lediglich auf dem Nährboden, der mit 200 µl des Transformationsansatzes beimpft worden war. Auf den Platten 3 (Ligationsansatz 2; 100 µl) und 4 (Ligationsansatz 2; 200 µl) wuchsen jeweils vier Kolonien. Die als Negativkontrolle ausplattierte Wasserprobe führte wie erwartet nicht zu Bakterienwachstum. Insgesamt wurden sechs Bakterienkolonien gepickt (jeweils 3 aus Ligationsansatz 1 und aus Ligationsansatz 2) und in Flüssigkulturen überführt. Zwei der drei Kolonien aus Ligationsansatz 1 wuchsen in der Flüssigkultur nicht an, sodass nur vier Kolonien (1x Ligationsansatz 1 und 3x Ligationsansatz 2) mittels Colony-PCR überprüft werden

konnten. Im 0,8%-igen Agarose-Gel zeigte lediglich Kolonie 1 (Ligationsansatz 1) unter dem UV-Transilluminator bei berechneter Fragmentgröße von etwa 820 bp (572 bp Insert und etwa 250 bp Vektoranteil) eine Bande im Bereich der 800 bp Markerbande (Abbildung 7-6) Die drei Kolonien aus dem Ligationsansatz 2 lieferten keine Banden in der Colony-PCR. Auch in der Wiederholung der Colony-PCR zum Ausschluss eines Anwenderfehlers konnten für die Kolonien von Ligationsansatz 2 keine Banden detektiert werden.

Nach Plasmidpräparation (2.10.10) mit anschließender Kontrolle im 0,8%-igen Agarose-Gel sollte das $FLG_{3880-4061}$-Insert mittels Restriktionshydrolyse (2.10.12) durch die Restriktionsenzymen *Bsa*I und *Not*I stufenweise aus dem Plasmid herausgelöst werden. Der Vektordoppelverdau wurde als Parallelversuch mit den Proben der Laborpartnerin S. Babian angesetzt, die in ihrer Arbeit ebenfalls mit dem pGEM-T-Vektorsystem und mit Schnittstellen für die gleichen Restriktionsenzyme arbeitete (Babian 2010). Zur Überprüfung der korrekten Funktionsfähigkeit der Restriktionsenzyme wurden kleine Mengen des präparierten Vektors mit jeweils nur einer der beiden Restriktionsendonukleasen verdaut. In Abbildung 7-6 B ist das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung im 1%-igen Agarose-Gel zu sehen. Erwartet wurden nach vollständiger Hydrolyse drei Banden, da der pGEM-T-Vektor mit Insert insgesamt über drei Schnittstellen für *Bsa*I (2x) und eine *Not*I (1x) verfügen sollte. Anstelle der erwarteten drei Banden zeigten sich lediglich zwei Banden. Die erwartete dritte Bande zwischen 500 und 600 bp als Hinweis auf eine vollständige Hydrolyse des Inserts (549 bp) aus dem Vektor zeigte sich nicht. Das Laufmuster beider Banden nach Doppelverdau mit *Bsa*I und *Not*I glich dem Laufmuster der Kontrolle, die lediglich mit *Bsa*I hydrolysiert worden war. Im Vergleich dazu gelang bei den Proben von S. Babian aus demselben Versuch ein vollständiger Verdau mit drei Banden. Durch Wiederholung des Versuchs konnte ein Anwenderfehler ausgeschlossen werden. Ergänzende Analysen bestätigten den Verdacht einer nicht funktionstüchtigen *Not*I-Schnittstelle a.e. aufgrund einer Punktmutation im Schnittstellenbereich.

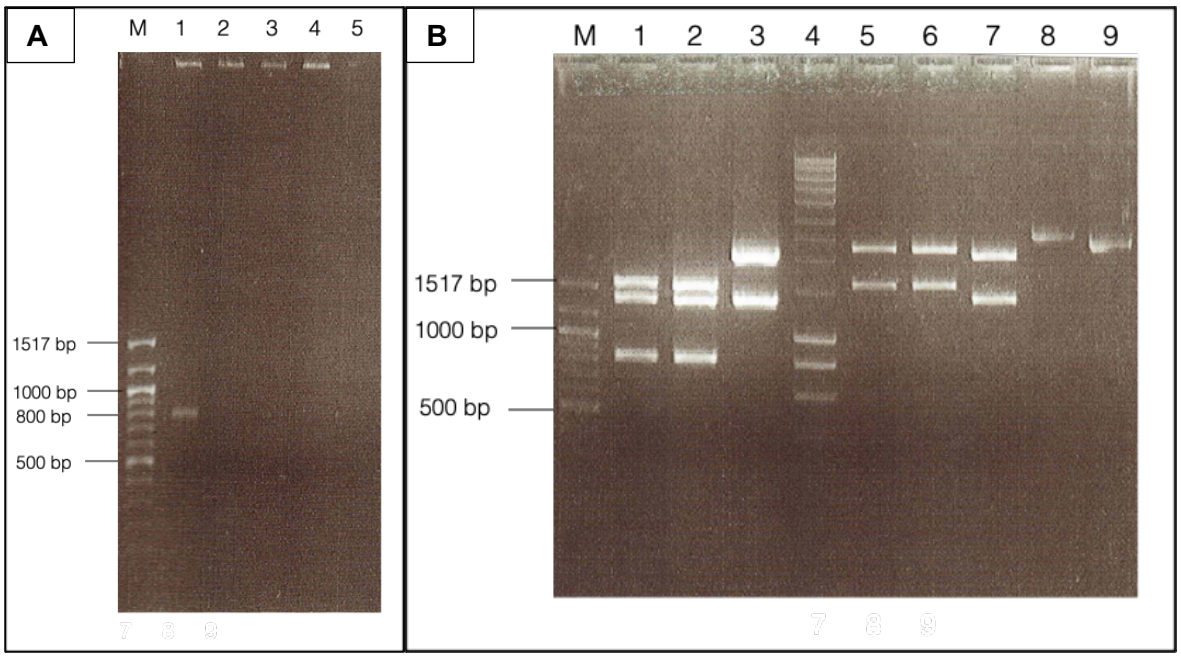


Abbildung 7-6 A) Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung der „Colony-PCR" von pGEM-T transformierten E.coli TOP10F' Zellen. *Lane M: 100 bp TriDye DNA-Größenstandard. Lane 1: Klon aus Ligationsansatz 1 mit erwarteter Bandengröße bei ca. 800 bp Lane 2-4: Klone aus Ligationsansatz 2 ohne Nachweis einer Bande im Bereich von 800 bp.* ***B) Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung der Restiktionshydrolyse von pGEM-T-Vektor und FLG$_{3880-4061}$ Fragment.*** *Lane M: 100 bp TriDye DNA-Größenstandard Lane 1-2: Restriktionsverdau mit BsaI und NotI Probe 1 + 2 (S. Babian), Lane 3: Restriktionsdoppelverdau mit BsaI und NotI Ansatz 1 (J. Hartmann), Lane 4: Smartladder DNA-Größenstandard, Lane 5-6: Restriktionseinzelverdau mit BsaI Probe 1 + 2 (S. Babian), Lane 7: Restriktionseinzelverdau mit BsaI Ansatz 1 (J. Hartmann), Lane 8: pGEM-T-Vektor und Insert S. Babian unverdaut, Lane 9 pGEM-T-Vektor und FLG$_{3880-4061}$ (J. Hartmann) unverdaut. Für den Restriktionsdoppelverdau mit BsaI und NotI in den Lanes 1-3 wurden jeweils 3 Banden erwartet, die den drei Fragmenten des Vektors nach Lyse entsprechen. Lane 3 mit Ansatz 1 (J. Hartmann) zeigt lediglich 2 Banden. Eine Bande für die erwartete spezifische Fragmentlänge für FLG$_{3880-4061}$ von 570 bp fehlt.*

7.3.1.Trypsinverdau – trunkiertes Fusionsprotein

Bei der Peptidmassenfingerprint-Analyse des trunkierten Fusionsproteins kamen beim Trypsinverdau die MassLynx-Software (www.waters.com) und die Mascot-Software (www.matrixscience.com) zum Einsatz Abbildung 6-6 liefert eine Übersicht über die identifizierten Fragmente (Mascot-Suche).

Referenzdatenbank: Swissprot 56.5 (402482 sequences; 145232059 residues)

Timestamp: 1 Dec 2008 at 14:45:20 GMT

FILA_HUMAN **Mass:** 434922 **Score:** 332 **Queries matched:** 5

Filaggrin OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
19	644.5753	1930.7042	1930.8868	-0.1827	0	(135)	3.1e-11	1	R.DTASHVQSSPVQSDSSTAK.E
20	966.3840	1930.7534	1930.8868	-0.1334	0	161	9.2e-14	1	R.DTASHVQSSPVQSDSSTAK.E
21	644.6053	1930.7942	1930.8868	-0.0927	0	(120)	1.3e-09	1	R.DTASHVQSSPVQSDSSTAK.E
22	666.2353	1995.6842	1994.8354	0.8487	0	66	0.00022	1	R.GSPHSSSSYHYQSEGTER.Q
23	777.6353	2329.8842	2329.0472	0.8370	0	108	1.3e-08	1	K.EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSR.G

SMO3L_DANRE **Mass:** 10676 **Score:** 244 **Queries matched:** 8
Small ubiquitin-related modifier 3-like OS=Danio rerio GN=sumo3l PE=2 SV=1
Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
7	542.2340	1082.4534	1082.5356	-0.0822	0	65	0.00061	1	K.TENDHINLK.V
8	361.8353	1082.4842	1082.5356	-0.0514	0	(22)	12	1	K.TENDHINLK.V
9	542.2540	1082.4934	1082.5356	-0.0422	0	(65)	0.00065	1	K.TENDHINLK.V
10	361.8453	1082.5142	1082.5356	-0.0214	0	(18)	31	1	K.TENDHINLK.V
12	617.7740	1233.5334	1233.6354	-0.1019	0	(90)	2e-06	1	K.VAGQDGSVVQFK.I
13	617.7740	1233.5334	1233.6354	-0.1019	0	92	1.4e-06	1	K.VAGQDGSVVQFK.I
17	499.8853	1496.6342	1495.7630	0.8711	1	(80)	1.6e-05	1	K.EGVKTENDHINLK.V
18	499.8953	1496.6642	1495.7630	0.9011	1	87	3.4e-06	1	K.EGVKTENDHINLK.V

Abbildung 7-7 Mascot Search Results des Fusionsproteinsproteins mit Identifikation von Fragmenten aus dem Filaggrin-Gen (FLG) und aus dem sumo3-like-Gen (sumo3l)

7.3.2. Trypsinverdau – trunkiertes $FLG_{3880-4061}$

Bei der Peptidmassenfingerprint-Analyse des trunkierten $FLG_{3880-4061}$ kamen beim Trypsinverdau die MassLynx-Software (www.waters.com) und die Mascot-Software (www.matrixscience.com) zum Einsatz. Abbildung 7-8 liefert eine Übersicht der identifizierten Fragmente mit Trypsin-typischen- und „semi-tryptischen“-Schnittstellen.

Für die Peptidmassenfingerprint-Analyse des trunkierten $FLG_{3880-4061}$ wurden beim LysC-Verdau sowohl die MassLynx-Software (www.waters.com), die Mascot-Software (www.matrixscience.com) als auch die „Global Proteome Machine“ (GPM – www.thegpm.org) eingesetzt. Es konnten Fragmente mit LysC-Typischen-Schnittstellen und „semi-LysC“-Schnittstellen identifiziert werden.

Jo4Tr: Fragmentanalyse: Peptide-Mapping & MSMS-Analyse **A**

Trypsinverdau

Probe (Trypsin-verdaut, mit Poros behandelt)

MS Analyse (Mass-Mapping)

MSMS Analyse ausgewählter Ionen

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
644 - 662	966.4840	1930.9534	1930.8868	0.0666	0	R.DTASHVQSSPVQSDSSTAK.E (Ions score 165)
644 - 662	644.6653	1930.9742	1930.8868	0.0873	0	R.DTASHVQSSPVQSDSSTAK.E (Ions score 109)
644 - 662	966.5240	1931.0334	1930.8868	0.1466	0	R.DTASHVQSSPVQSDSSTAK.E (Ions score 165)
644 - 670	942.9153	2825.7242	2825.2853	0.4389	1	R.DTASHVQSSPVQSDSSTAKEHGHFSSL.S (Ions score 163)
652 - 662	553.3140	1104.6134	1105.5251	-0.9117	0	S.SPVQSDSSTAK.E (Ions score 38)
653 - 662	510.2840	1018.5534	1018.4931	0.0603	0	S.PVQSDSSTAK.E (Ions score 75)
653 - 662	510.3040	1018.5934	1018.4931	0.1003	0	S.PVQSDSSTAK.E (Ions score 78)
663 - 670	457.2440	912.4734	912.4090	0.0645	0	K.EHGHFSSL.S (Ions score 41)
663 - 670	457.7540	913.4934	912.4090	1.0845	0	K.EHGHFSSL.S (Ions score 33)
663 - 682	725.3953	2173.1642	2172.9461	0.2181	0	K.EHGHFSSLSQDSAYHSGIQS.R (Ions score 98)
663 - 683	1165.4940	2328.9734	2329.0472	-0.0737	0	K.EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSR.G (Ions score 65)
663 - 683	777.7553	2330.2442	2329.0472	1.1970	0	K.EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSR.G (Ions score 93)
668 - 683	861.9940	1721.9734	1721.7969	0.1766	0	F.SSLSQDSAYHSGIQSR.G (Ions score 80)
684 - 701	666.3453	1996.0142	1994.8354	1.1787	0	R.GSPHSSSSYHYQSEGTER.Q (Ions score 104)
684 - 701	500.0160	1996.0349	1994.8354	1.1994	0	R.GSPHSSSSYHYQSEGTER.Q (Ions score 101)
686 - 701	617.8353	1850.4842	1850.7820	-0.2978	0	S.PHSSSSYHYQSEGTER.Q (Ions score 21)

- Durch MSMS Analyse wurden Profilaggrin-Fragmente in dieser Probe identifiziert
- Einige der identifizierten Fragmente sind „semitryptisch", d.h. haben nur eine tryptische Schnittstelle, während das andere Fragmentende eine Trypsin-untypische Schnittstelle aufweist.

Jo4LC Fragmentanalyse: Peptide-Mapping & MSMS-Analyse **B**

Probe (Trypsin-verdaut, mit Poros behandelt)

MS Analyse (Mass-Mapping)

MSMS Analyse ausgewählter Ionen

1. Q16824_HUMAN Mass: 85127 Score: 393 Queries matched: 9 **MASCOT**
Profilaggrin (Fragment).- Homo sapiens (Human).
Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
19	457.1940	912.3734	912.4090	-0.0355	0	41	1	1	K.EHGHFSSL.S
20	457.7040	913.3934	912.4090	0.9845	0	(29)	18	1	K.EHGHFSSL.S
27	553.2740	1104.5334	1105.5251	-0.9917	0	29	18	1	S.SPVQSDSSTAK.E
35	666.3140	1330.6134	1329.5586	1.0549	0	17	2.7e+02	1	K.EHGHFSSLSQDS.A
38	568.2453	1701.7142	1700.7179	0.9963	0	36	2.7	1	K.EHGHFSSLSQDSAYH.S
43	725.3253	2172.9542	2172.9461	0.0081	0	127	1.7e-09	1	K.EHGHFSSLSQDSAYHSGIQS.R
44	597.2860	2385.1149	2386.0686	-0.9538	1	20	87	1	K.EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSRG.S
45	825.7153	2474.1242	2473.1007	1.0235	1	145	2.5e-11	1	K.EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSRGS.P
46	825.7153	2474.1242	2473.1007	1.0235	1	(145)	2.7e-11	1	K.EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSRGS.P

spectr	log(e)	log(I)	m+h	delta	z		sequence	GPM
38.1	-7.5	4.34	3105.433	2.129	4	eqsr 3897	DGSRHPGSSHRDTASHVQSSPVQSDSSTAK	3926 ehgh
32.1	-6.6	3.09	3105.433	2.089	4	eqsr 3897	DGSRHPGSSHRDTASHVQSSPVQSDSSTAK	3926 ehgh
46.1	-16.6	5.65	2474.108	1.023	3	stak 3927	EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSRGS	3949 phss
4.1	-9.9	5.98	2474.108	1.023	3	stak 3927	EHGHFSSLSQDSAYHSGIQSRGS	3946 rgsp
8.1	-12.2	5.53	2173.9533	0.00813		stak 3927	EHGHFSSLSQDSAYHSGIQS	3949 phss
9.1	-3.6	4.04	1701.725	0.996	3	stak 3927	EHGHFSSLSQDSAYH	3941 sgiq
5.1	-2.9	5.75	913.416	-0.0362		stak 3927	EHGHFSSL	3934 sqd

- Das nach Lys C-verdau resultierende Fragmentpattern unterscheidet sich von dem nach Trypsin-Verdau
- Durch MSMS Analyse wurden Profilaggrin-Fragmente in dieser Probe identifiziert.
- Die identifizierten Fragmente sind meist „semi-LysC", d.h. haben nur eine Lys C Schnittstelle, während das andere Fragmentende eine Lys-C-untypische Schnittstelle aufweist.
- Ein Fragment mit Trypsin-typischen Schnittstellen wurde identifiziert (M+H: 3105)

Abbildung 7-8 A) *Übersicht der Identifizierten Fragmente mit tryptischen und semi-trypischen Fragmenten nach Trypsinverdau und Peptidmassenfingerprint-Analyse.* ***B)*** *Übersicht der Identifizierten Fragmente mit LysC-typischen und semi-LysC-typischen Schnittstellen nach LysC-Verdau und Peptidmassenfingerprint-Analyse.*

7.3.3.LysC-Verdau – pSUMO3-Fusionstag

Für die Peptidmassenfingerprint-Analyse des vermuteten pSUMO3-Fusionstag wurden beim LysC-Verdau sowohl die MassLynx-Software (www.waters.com) als auch die Mascot-Software (www.matrixscience.com) eingesetzt. Es konnten Fragmente aus der pSUMO3-Sequenz des Fusionstag identifiziert werden.

Mascot Search Results:

Match to: **SUMO3_HUMAN** Score: **349**
Small ubiquitin-related modifier 3 OS=Homo sapiens GN=SUMO3 PE=1 SV=2 Found in search of Jo3LC-perl-merge.mgf

Matched peptides shown in **Bold Red**

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence	
8 - 20	499.6253	1495.8542	1495.7630	0.0911	1	K.EGVKTENDHINLK.V	(Ions score 16)
8 - 20	499.9653	1496.8742	1495.7630	1.1111	1	K.EGVKTENDHINLK.V	(Ions score 105)
12 - 20	542.2940	1082.5734	1082.5356	0.0378	0	K.TENDHINLK.V	(Ions score 32)
12 - 20	361.8753	1082.6042	1082.5356	0.0686	0	K.TENDHINLK.V	(Ions score 42)
12 - 20	542.3140	1082.6134	1082.5356	0.0778	0	K.TENDHINLK.V	(Ions score 79)
21 - 32	617.8340	1233.6534	1233.6354	0.0181	0	K.VAGQDGSVVQFK.I	(Ions score 123)
21 - 32	617.8640	1233.7134	1233.6354	0.0781	0	K.VAGQDGSVVQFK.I	(Ions score 115)
35 - 41	419.7740	837.5334	837.4821	0.0514	0	K.RHTPLSK.L	(Ions score 23)
35 - 41	419.7740	837.5334	837.4821	0.0514	0	K.RHTPLSK.L	(Ions score 8)

Tabelle 6-1: Peptidmassenfingerprint-Analyse des Fusionstag (LysC-verdaut) – Detektiertem Peptidfragmente

Peptide-Sequenz	***Aminosäureposition (Fusionsprotein)***	***Gen***
EGVKTENDHINLK	17-29	SUMO3-like
TENDHINLK	21-29	SUMO3-like
VAGQDGSVVQFK	30-41	SUMO3-like
RHTPLSK	44-50	SUMO3-like

```
001 GHHHHHHGGM SEEKPKEGVK TENDHINLKV AGQDGSVVQF KIKRHTPLSK
050 LMKAYCERQG LSMRQIRFRF DGQPINETDT PAQLEMEDED TIDVFQQQTG
100 G
```

Abbildung 7-9 Sequenz des pSUMO3-Fusionstags mit farblicher Darstellung von in der Peptidmassenfingerprintanalyse identifizierten Peptidfragmenten.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen „beiden“ Doktorvätern bedanken. Ein großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung und Geduld auch über die aktive Karriere hinaus. Prof. Dr. med. T. Schwarz danke ich herzlich für die Chance meine Dissertation zu vollenden und die freundliche weitere Betreuung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Britta Hansmann bedanken. Liebe Britta, vielen Dank für Deine hervorragende Unterstützung, Deine Ideen und den wissenschaftlichen Austausch im Labor und am Schreibtisch. Danke, dass Deine Tür immer offenstand, auch in den arbeitsintensivsten Zeiten Deiner eigenen Dissertation. Deine positive und lösungsorientierte Denkweise hat mir insbesondere in den schwierigen Phasen sehr geholfen und hat einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Joachim Bartels für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der massenspektrometrischen Analysen. Claudia und Jutta möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der HPLC danken.

Ein großes Dankeschön für die Unterstützung, den Austausch und den Spaß an und während der Laborarbeit geht an Jan, Manfred, Ties, Uli und Zhihong sowie an das gesamte Team im wissenschaftlichen Labor der Dermatologie in der Schittenhelmstraße 7.

Ganz herzlich möchte ich Dennis Karsch und Christian Schulz für die gemeinsame Zeit im Labor, am Schreibtisch und in der Freizeit danken. Meine beiden Kommilitonen waren mit ihren Dissertationen nicht nur Wegbereiter, sondern mit Rat und Tat die hilfsbereitesten Freunde, die man sich wünschen kann.

Auch Ole Jaeschke gehört für den Input und die Tipps in der Korrekturphase ein großes "Dankeschön"! Du bist als Experte in der organischen Chemie und neben der Wissenschaft als Freund ein Ass im Ärmel.

Das größte Dankeschön gebührt meiner Frau Alina Hartmann, die mich fortwährend unterstützt hat, in den schwersten Phasen unermüdlich den Blick auf das Positive gerichtet hat und die am Ende durch meine Arbeit den Leidensweg einer Dissertation ein (langes) zweites Mal durchleben musste. Liebe Alina, Du hast mir mit deiner objektiven Perspektive gezeigt, dass der Berg mit dem Namen „Dissertation“ nicht unbesteigbar ist und hast mich aus meiner

kleinen Höhle geholt. Ohne Dich hätte ich diese Arbeit wahrscheinlich nicht fertig gestellt und ich würde Dir immer noch abends mein Leid darüber klagen ;-D DANKE Du bist ne Wucht!

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken! Meinen Kindern Bruno und Lene danke ich für jede schöne Stunde und die Ablenkung. Meinen Eltern Gunda und Joachim, meiner Schwester Julika mit Ehemann Julian und meinem Bruder Lukas danke ich für die Unterstützung, die positiven Worte und besonders auch dafür manchmal eben nicht nachgefragt zu haben, wie es denn mit der Doktorarbeit gerade so läuft. Meinen Schwiegereltern Karin und Wolfgang mit Mathilda und Jan danke ich für die Hilfe in allen Lebenslagen und das Rückenfreihalten für den einen oder anderen kinderfreien Tag am Schreibtisch. Diese Tage habe ich regelmäßig mit meinem unbekannten Freund Mladen Solomun virtuell bei subtropischen Temperaturen in Tulum in Mexico verbracht. Danke! Du hast mich mit Deinen Melodien, Deinem unvergleichlichen Timing und deiner Energie immer wieder direkt zu meinem produktivsten Selbst geführt.

9. Erklärung

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

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

Bisher erfolgte Teilpublikation:

Behrendt, F., Hartmann, J., Babian, S., Karsch, D., Schulz, C., Latendorf, T., Hansmann, B., Wu, Z., Schröder, J.-M., 2010. Profilaggrin constitutively provides a basal antimicrobial reservoir for the skin. J. Invest. Dermatol. 130 (S2), S32, Abstract 189.