

Untersuchungen zur Bedeutung von RNase 7 in der kutanen Abwehr

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

FRANZISKA RADEMACHER

Kiel, 2018

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Harder

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2018

Zum Druck genehmigt:

gez. Prof. Dr. Frank Kempken, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epitheliale Abwehr	1
1.2	Chronologie und Bedeutung der Antimikrobiellen Peptide	2
1.3	Antimikrobielle Peptide der Haut	4
1.4	RNase 7 - Regulation, Struktur und Funktion	6
2	ZIELSETZUNG	12
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Material	13
3.1.1	Geräte	13
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	15
3.1.4	Lösungen/Puffer/Medien	17
3.1.5	Antikörper	19
3.1.6	sonstige Agenzien	20
3.1.7	Oligonukleotide	20
3.1.8	Humane Zellen	21
3.1.9	Bakterienstämme	21
3.1.10	Plasmide	21
3.1.11	Software	22
3.2	Methoden	22
3.2.1	Zell- und mikrobiologische Methoden	22
3.2.1.1	Kultivierung humaner Keratinozyten	22
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen	23
3.2.1.3	Stimulation von Keratinozyten	23
3.2.1.3.1	Lebendstimulation mit Bakterien	24
3.2.1.4	Herstellung von Bakterienüberständen	24
3.2.1.5	Transiente Transfektion von Keratinozyten	25
3.2.1.5.1	RNA-Interferenz	25
3.2.1.5.2	Dual-Luciferase® Reporter Assay	25
3.2.1.6	Anlegen eines 3D-Hautäquivalents	27
3.2.1.6.1	Stimulation des 3D-Hautäquivalents	28
3.2.1.7	<i>Ex vivo</i> Stimulationsversuche	29
3.2.1.8	Immunhistochemische Färbungen	30
3.2.1.9	Antimikrobieller Test	31
3.2.2	Proteinnachweisanalysen	32
3.2.2.1	Sandwich-ELISA	32
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	33
3.2.3.1	mRNA-Isolation	33
3.2.3.2	Erststrang-cDNA-Synthese	33
3.2.3.3	Quantitative Echtzeit-PCR	34
4	ERGEBNISSE	36
4.1	RNase 7 wird konstitutiv in den oberen Schichten der Haut exprimiert	36
4.2	RNase 7 wirkt antimikrobiell gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
4.3	Regulation der RNase 7 Expression	39
4.3.1	RNase 7 wird durch <i>P. aeruginosa</i> -Bakterienkulturüberstände induziert	39
4.3.2	Beteiligung des EGFR bei der Induktion der RNase 7 Expression	40
4.3.2.1	RNase 7 Expression wird durch EGFR-Liganden in Keratinozyten induziert	40
4.3.2.2	Eine EGFR-Blockade hemmt die <i>P. aeruginosa</i> -induzierte RNase 7 Expression in Keratinozyten	42
4.3.2.3	EGFR-Inaktivierung durch Cetuximab hemmt die <i>P. aeruginosa</i> -induzierte RNase 7 Expression in 3D-Hautäquivalenten und <i>ex vivo</i> Hautexplantaten	42

4.3.2.4	<i>P. aeruginosa</i> -vermittelte AMP Induktionen werden unterschiedlich reguliert	44
4.3.2.5	Metalloproteasen sind an <i>P. aeruginosa</i> -vermittelter EGFR-Aktivierung beteiligt	45
4.3.2.6	<i>P. aeruginosa</i> vermittelt über ADAM17 und EGFR-Aktivierung RNase 7 Expression in Keratinozyten	46
4.3.2.7	TLR5 ist an der <i>P. aeruginosa</i> -vermittelten RNase 7 Expression in Keratinozyten beteiligt	47
4.4	Die Bedeutung von RNase 7 für die Wundheilung	52
5	DISKUSSION	57
5.1	Regulation der RNase 7 Expression	57
5.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> und RNase 7	59
5.2.1	Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
5.2.2	Induktion der RNase 7 Expression	61
5.2.3	Regulation der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -vermittelten RNase 7 Expression über den EGFR	62
5.2.4	Regulation der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -vermittelten RNase 7 Expression über TLR5	66
5.2.5	Regulation der <i>P. aeruginosa</i> -vermittelten RNase 7 Expression über NF- κ B	68
5.3	Die Rolle von RNase 7 in der Wundheilung	71
6	ZUSAMMENFASSUNG	73
7	SUMMARY	75
8	LITERATUR	77
	ABKÜRZUNGEN	85
	ABBILDUNGEN	88
	TABELLEN	90
	DANKSAGUNG	91
	ERKLÄRUNG	92
	LEBENS LAUF	93
	ANHANG	94

1 Einleitung

1.1 Epitheliale Abwehr

In unserem Lebensraum gibt es eine erhebliche Anzahl von potentiell pathogenen Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze oder Viren, die permanent Pflanzen, Tiere und Menschen besiedeln. Die Epithelien der Organismen bilden dabei die größte Barriere für diese Erreger. Die Haut als eines der größten Epithelien des Menschen bildet im gesunden Zustand ein ideales Schutzsystem gegen mögliche Infektionen durch pathogene Mikroorganismen. Sie zeichnet sich durch einen dreischichtigen Aufbau aus, wobei die untere Subcutis aus Bindegewebe und Fett vor allem als Isolationsschicht dient. Die darüber liegende Dermis besteht im Wesentlichen aus Bindegewebe durchzogen von feinen Blutkapillaren und dem Ursprung von Schweiß- und Talgdrüsen. Die oberste Schicht, die Epidermis, besteht partiell aus Langerhans- und Merkel-Zellen sowie Melanozyten die in einen mehrschichtigen Keratinozytenverband eingelagert sind. Die Keratinozyten migrieren und differenzieren von innen nach außen und werden letztlich im Prozess der Stratifizierung als tote Kerneozyten von der Hautoberfläche abgestoßen. So werden durch stetige Regeneration anhaftende Erreger abgestoßen oder durch das Vorhandensein einer aus langkettigen Fettsäuren bestehenden Lipidbarriere ein Anhaften bzw. Eindringen dieser gänzlich verhindert. Der sogenannte Säureschutzmantel trägt aufgrund seines niedrigen pH-Wertes zusätzlich dazu bei Mikroorganismen abzuwehren (Wikramanayake et al. 2014). Abbildung 1.1 zeigt eine vereinfachte, schematische Darstellung des Aufbaus der Epidermis. Aufgelagert auf der Basalmembran (*Lamina basale*), welche die Dermis von der Epidermis abgrenzt, liegt das *Stratum basale* wo sich durch mitotische Zellteilungsprozesse Keratinozyten regenerieren. Das angrenzende *Stratum spinosum* dient der anfänglichen Differenzierung der Keratinozyten, sie bilden hier abgeflachte mehrlagige Zellstapel. Der Calcium-Ionen Gradient der Epidermis erreicht von innen nach außen eine maximale Zunahme, außerdem ändert sich der Protein- und Lipidgehalt der Zellen, sodass es im *Stratum granulosum* zu einer starken Differenzierung der Keratinozyten und zur Bildung von Keratohyalin granula kommt. Im anschließenden *Stratum corneum* kommt es zur vollständigen Kornifizierung der Zellen und Desquamation der toten Keratinozyten.

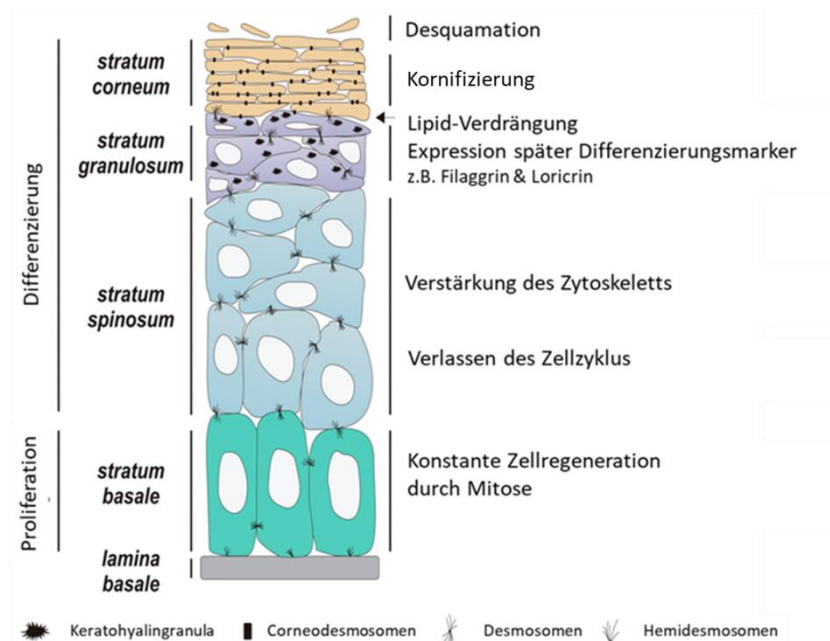


Abbildung 1.1: Aufbau der Epidermis. Modifiziert nach (Denecker et al. 2008)

Eine solche physikalisch-mechanische und chemische Barriere allein ist jedoch nicht vollständig in der Lage die natürliche Integrität der Haut zu gewährleisten. Dazu sind weitere Faktoren notwendig.

Immunmodulatorisch kommt es durch das Zusammenspiel von Effektorzellen wie eosinophilen oder neutrophilen Granulozyten, Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten nach einer Infektion zu Reparations- und Abwehrmechanismen. Dies erklärt aber nicht, warum dabei zum Beispiel auf der Haut, eine gewisse konstante Mikroflora persistiert, die keine Infektionen verursacht. Hier scheinen weitere Effektormoleküle, die sogenannten antimikrobiellen Peptide, eine wichtige Schutzfunktion zu erfüllen (Schröder 1999).

1.2 Chronologie und Bedeutung der Antimikrobiellen Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind kleine, induzierbare Polypeptide, meist kürzer als 50 Aminosäuren. Sie gehören zur Immunabwehr eines Organismus und besitzen die Fähigkeit inhibierend auf Mikroorganismen zu wirken. Sie tragen meist positive Ladungen (Aminosäuren wie Arginin und Lysin) und sind meist amphiphatisch. Die positiv geladenen Teile der AMP interagieren mit der negativ geladenen Oberfläche der Bakterienmembranen. Bisher wurden über 2700 AMP sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich identifiziert und jährlich kommen etwa 100 dazu. Diese Menge an Daten hat dazu geführt, dass seit 2003 eine AMP Online-Datenbank (<http://aps.unmc.edu/AP/>) existiert (Melo et al. 2009, Wang et al. 2016, Tossi et al. 2000).

Ein chemisches System zur Abwehr von Bakterien hatte bereits 1922 Alexander Fleming entdeckt und beschrieben, er gab der Entdeckung den Namen Lysozym. Das aus Nasensekret isolierte Lysozym war in der Lage antibakteriell gegen *Micrococcus lysodeikticus* (heute: *Micrococcus luteus*) zu wirken (Fleming 1922). Dieses Enzym ist eine Muramidase, welche die Hydrolyse der β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetyl-D-Muraminsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin in der Peptidoglycanschicht der bakteriellen Zellwand katalysiert und das Bakterium schließlich lysiert. Lysozym kommt in sämtlichen Körpersekreten vor. Diese Entdeckung war ein Vorreiter für die Erforschung der AMP.

AMP wurden seither in allen bisher untersuchten Organismen entdeckt. So besitzen Pflanzen eine physikalische Barriere in Form von Lipidschichten aber zusätzlich eine chemische Barriere, ohne über ein eigenes Immunsystem zu verfügen. Diese chemische Barriere zeichnet sich durch die kontinuierliche Bildung von AMP durch die Epithelien aus. Das erste AMP aus Pflanzen, ein Thionin, wurde bereits 1942 von Balls *et al.* aus dem Endosperm von Weizen isoliert. Die AMP der Pflanzen richten sich vorrangig gegen Pilze und Bakterien, jedoch gibt es auch Erkenntnisse über AMP, die direkt gegen Herbivoren gerichtet sind (Stolz et al. 2013).

Auch bei Insekten ist die Produktion von AMP bereits sehr gut erforscht. So konnten 1979 aus den Puppen der Seidenspinner (*Hyalophora cecropia*) die Cecropine isoliert werden, diese sind in der Lage bakterielle Membranen zu lysieren. (Hultmark et al. 2005). Ebenso wurden bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bereits 20 AMP in deren Epithelien und Fettzellen identifiziert, die aus sieben unterschiedlichen Familien (Dipericine, Attacine, Drosocine, Cecropine, Defensine, Drosomycine und Metchnikowine) kommen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Kontakt mit Pilzen Drosomycin ausgeschüttet wird, welches lokal an der Stelle des Pilzkontaktes auftritt und dort antimykotisch agiert (Fehlbaum et al. 1994, Zhang and Zhu 2009).

Vorreiter für die heutige Forschung an humanen AMP der Haut war jedoch Dr. Michael Zasloff, der in den 1980er Jahren afrikanischen Krallenfröschen für seine Versuche Oozyten entfernte. Nachdem die Frösche mit frischen Operationswunden zurück in den verschmutzten Laborteich gesetzt wurden, beobachtete er, dass sie keinerlei Infektionen entwickelten. Er vermutete, dass die Froschhaut über AMP verfügen muss, die sie vor Gefahren durch Mikroorganismen und damit einhergehenden Infektionen schützen. Es gelang ihm, aus den Schleimdrüsen der Froschhaut neue, konstitutiv exprimierte AMP zu isolieren, die er Magainine (hebräisch: Schutzschild) nannte. Diese weisen ein breites Spektrum antimikrobieller Aktivität auf. Sie wirken sowohl auf Gram-positive als auch auf Gram-negative Bakterien, Pilze und Protozoen bereits in geringen Konzentrationen hemmend (Zasloff 1987). Synthetische Analoge des Magainin 2 (Pexiganan-Acetat) werden bereits bei infizierten, diabetischen Fußulzera in

klinischen Studien eingesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Therapeutikum nur in hohen Dosen, an der Grenze zur Toxizität, *in vivo* antimikrobiell wirksam ist, gab es bisher keine Zulassung als Medikament. (Lipsky et al. 2008, Gottler and Ramamoorthy 2009).

Zasloff gelang es des Weiteren erstmals induzierbare AMP aus einem Tier zu isolieren. Es war beobachtet worden, dass durch Gräserverzehr verletzte Rinderzungen keine Entzündungen aufwiesen. Das Linguale Antimikrobielle Peptid (LAP), produziert vom Rinderzungenepithel, sowie das „enteric beta-defensin“ (EBD) (Rinderhaut) und das Tracheale Antimikrobielle Peptid (TAP) (Rinderlunge) zeichnen sich durch ihr breites Wirkungsspektrum aus und sind durch Stimulation mit den Mikroorganismen selbst oder durch Botenstoffe, die durch inflammatorische Reize vom Körper ausgesendet werden, induzierbar (Diamond et al. 1991, Schonwetter et al. 1995).

1995 gelang es aus dem Blutplasma von Dialysepatienten das erste humane beta-Defensin (β -Defensin) zu isolieren (Bensch et al. 1995). Humanes β -Defensin-1 (hBD-1) wird vorrangig im Urogenitaltrakt und den Nieren gebildet und ist antimikrobiell aktiv gegenüber Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*). Allerdings ist das hBD-1 kein induzierbares AMP, sondern wird konstitutiv exprimiert.

1.3 Antimikrobielle Peptide der Haut

Da man bereits wusste, dass es bei Entzündungsprozessen vermehrt zur Ausschüttung von AMP kommt und Patienten mit einer Schuppenflechte (Psoriasis) trotz starker Entzündungsherde nur sehr selten bakterielle Infektionen haben, lag die Vermutung nahe, dass auch die Haut ein eigenes, chemisches Abwehrsystem besitzt (Tabelle 1.1). 1997 gelang es schließlich der Arbeitsgruppe um Prof. Jens-Michael Schröder des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein aus Kiel, aus läsionalen Hautschuppen von Psoriasis-Patienten das erste AMP aus humaner Haut zu isolieren. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den 3 bis 5 kDa großen, kationischen β -Defensinen aus Rinderepithelien wurde es humanes β -Defensin-2 (hBD-2) genannt (Harder et al. 1997). Es ist 43 Aminosäuren lang. Charakteristisch weisen Defensine β -Faltblattstrukturen auf, sowie sechs Cystein-Reste, welche durch drei intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Aufgrund der jeweiligen Position der Disulfidbrücken unterscheidet man zwischen α - und β -Defensinen (Lehrer 2004). HBD-2 besteht aus drei antiparallelen β -Faltblättern mit drei verbundenen Disulfidbrücken zwischen Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys6. Es ist das erste identifizierte humane β -Defensin, an welchem die Induzierbarkeit durch z.B. Zytokine und Bakterien gezeigt wurde (Harder and Schröder 2005, Wehkamp et al.

2002, 2004). Ebenso ist hBD-2 in der Lage, Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und *Escherichia coli* (*E. coli*), sowie den Hefepilz *Candida albicans* abzutöten. Gegenüber Gram-positiven Bakterien besitzt hBD-2 hingegen deutlich schwächere antimikrobielle Aktivität (Harder et al. 1997, Schröder and Harder 1999, Zanger et al. 2010). Schröder und Kollegen konnten 2001 ein weiteres humanes β -Defensin isolieren und identifizieren, das humane β -Defensin-3 (hBD-3). Es stellte sich heraus, dass hBD-3 ein AMP ist, welches sich perspektivisch für einen medizinischen Einsatz eignen könnte, da es ein sehr breites antimikrobielles Spektrum gegenüber diversen Mikroorganismen aufweist, in geringen Dosen wirkt und sogar bei hohen Salzkonzentrationen wirksam bleibt (Harder et al. 2001). Ein ebenso induzierbares AMP wurde initial aus neutrophilen Granulozyten isoliert, das LL-37, welches durch das *CAMP*-Gen auf Chromosom 3 codiert wird und das einzige in der Haut exprimierte humane Cathelicidin ist. LL-37 weist ähnlich wie die Defensine eine breite antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Pilze und Hefen auf (Gudmundsson et al. 1996, Frohm et al. 1997). Da hBD-2, hBD-3 und LL-37 in gesunder Haut nur schwach exprimiert werden, kam die Fragestellung auf, ob die Haut bereits vor einer Entzündung kontinuierlich AMP synthetisiert, um eine natürliche, chemische Barriere aufzustellen. Gläser *et al.* identifizierten das S100 Protein Psoriasin als konstitutiv exprimiertes AMP welches vor allem gegen *E. coli* antimikrobiell aktiv ist. Psoriasin ist in chronischen Wunden und in Psoriasis hochreguliert, wobei in läsionaler Haut von Psoriasis-Patienten weniger Psoriasin vorhanden ist, dieses wirkt dort antifungal (Gläser et al. 2005, Hein et al. 2015). Es gelang schließlich der Arbeitsgruppe um Prof. Jürgen Harder ein neues AMP aus dem *Stratum corneum* gesunder Haut zu isolieren, welches konstitutiv sehr hoch exprimiert wird und antimikrobielle Aktivität gegenüber einem weitgefächertem Spektrum an Mikroorganismen aufweist. Dieses AMP wird aufgrund struktureller Ähnlichkeit der Ribonuklease A Superfamilie zugeordnet und als die Ribonuklease 7 (RNase 7) bezeichnet (Harder and Schröder 2002).

AMP	Lokalisation	induzierbar	Gram-positive Bakterien	Gram-negative Bakterien	Pilze, Hefen	Viren
β-Defensin-2	Epithelien	ja	-	+	+	+
β-Defensin-3	Epithelien	ja	+	+	+	+
Cathelicidin LL-37	Granulozyten, Epithelien	ja	+	+	+	+
RNase 7	Epithelien	ja	+	+	+	n.b.
Psoriasin	Epithelien	ja	+ (schwach)	+	+	n.b.

Tabelle 1.1: Übersicht einiger humaner AMP der Haut und deren antimikrobielle Aktivität. In der Haut wurden in den letzten 20 Jahren einige AMP identifiziert und isoliert, diese kommen in unterschiedlichen Konzentrationen vor, sind durch unterschiedliche Stimuli induzierbar und wirken auf verschiedene pathogene Erreger. Staffelung: (-) marginal antimikrobiell aktiv, (+) antimikrobiell aktiv, (n.b.) nicht bestimmt. Modifiziert nach (Schröder 2010)

1.4 RNase 7 - Regulation, Struktur und Funktion

Ribonukleasen (RNasen) sind Nukleasen, die die Hydrolyse von RNA in kleinere Fragmente katalysieren und hauptsächlich die Funktion des digestiven Abbaus von RNA besitzen, außerdem ist eine Vielzahl weiterer Funktionen bekannt. So sind einige RNasen zum Beispiel an der Angiogenese beteiligt (Li et al. 2013, Lin et al. 2012). In der RNase A Superfamilie sind bisher acht humane, ribonukleolytisch aktive RNasen (RNase 1 bis 8) und fünf humane inaktive RNasen (RNase 9 bis 13) beschrieben worden, von denen einige Vertreter nachweislich antimikrobielle Aktivität besitzen. Diese RNasen zeichnen sich durch eine typische dreidimensionale Konformation aus 6 bis 8 konservierten Cystein-Resten aus, welche jeweils durch Disulfidbrücken verknüpft sind. Die Mitglieder der humanen RNase A Superfamilie sind homolog zur bovinen Pankreasribonuklease RNase A. Sie sind auf Chromosom 14q11.2 in einem 368 kb Cluster lokalisiert. Die aktiven RNasen besitzen als katalytisches Zentrum eine hoch-konservierte Tertiärstruktur aus His₁₂, His₁₉ und Lys₄₁ (Sorrentino 2010, Dyer and Rosenberg 2006) (Abb 1.2).

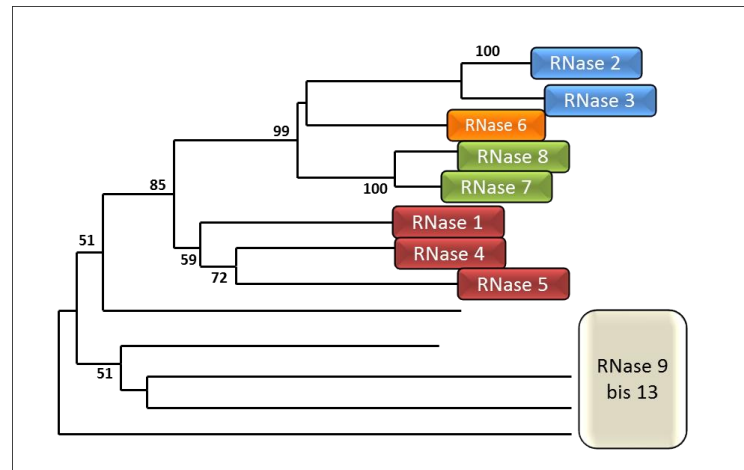


Abbildung 1.2: Phylogenetische Einteilung der RNasen der humanen RNase A Superfamilie. Aminosäure-Sequenzvergleiche ergaben eine phylogenetische Einteilung der acht ribonukleolytisch aktiven RNasen in vier Gruppen. RNase 2 und 3 (78 % identische Aminosäuresequenzen), sowie RNase 7 und RNase 8 (67 % identische Aminosäuresequenzen) bilden dabei jeweils das engste verwandtschaftliche Verhältnis zueinander (Dyer and Rosenberg 2006, Sorrentino 2010). Modifiziert nach (Dyer and Rosenberg 2006).

RNase 5, das Angiogenin, ist in der Lage durch Angiogenese aus bestehenden Blutgefäßen neu zu bilden und besitzt als weitere Fähigkeit antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (Riordan and Vallee 1988). Das eosinophile kationische Protein (engl. *eosinophil cationic protein*, ECP), RNase 3, und das „eosinophil-derived neurotoxin“ (EDN), RNase 2, besitzen ebenfalls antibakterielle, überdies auch antivirale Aktivität gegen RNA-Viren wie dem respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) (Pifferi et al. 2001). Außerdem besitzen sie antiparasitäre Aktivität gegenüber *Schistosoma mansoni* (sog. Pärchenegel, humanpathogene Eingeweidewürmer) (McLaren et al. 1981).

RNase 7 ist ein kationisches, lysinreiches 14,5 kDa großes Protein, welches sehr potente Ribonuklease-Aktivität besitzt (Abb 1.3). Es wird konstitutiv in verschiedenen Epithelien wie dem Urogenitaltrakt, den Tonsillen, dem Pharynx und der Plazenta exprimiert und ist die dominante RNase in humaner Haut. RNase 7 kann durch pro-inflammatorische Zytokine und Bakterien induziert werden und wirkt antimikrobiell gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen, sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien sowie auch gegen Pilze und Hefen (Harder and Schröder 2002, Spencer et al. 2011, Simanski et al. 2010, Köten et al. 2009). Es gibt kein Ortholog in Mäusen, sodass es schwierig ist, *in vivo* Studien zu RNase 7 durchzuführen (Cho et al. 2005).

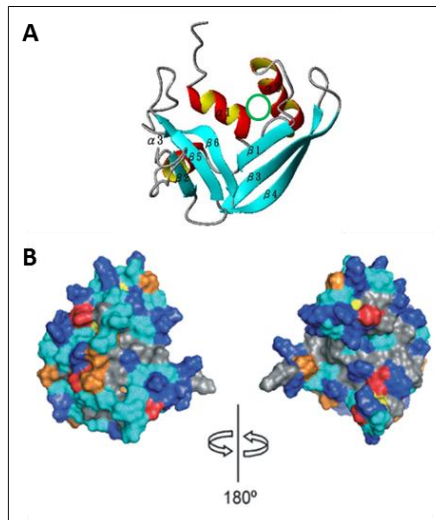


Abbildung 1.3: RNase 7 Struktur. A) NMR-spektroskopische Aufnahme von RNase 7. In rot-gelb dargestellt sind die drei α -Helices und in blau zwei antiparallele β -Faltblattstrukturen, in grün ist das katalytische Zentrum markiert. B) Molekularstruktur von RNase 7 als 180° Gebilde mit positiv und negativ geladenen Resten. Kationische Strukturen sind dunkelblau markiert, anionische Strukturen rot und hydrophobische Reste in grau dargestellt. Cystein-Reste sind gelb, Prolin-Reste sind orange und ungeladene Reste sind hellblau markiert. Modifiziert nach (Huang et al. 2007, Torrent et al. 2010).

Als dominante RNase der Haut kommt RNase 7 damit auch als antimikrobielles Protein in sehr großen Mengen vor, was vermuten lässt, dass RNase 7 möglicherweise auch eine wichtige Rolle in der Abwehr von Keimen während einer Infektion oder eines Inflammationsprozesses in der Haut spielt (Abb 1.4).

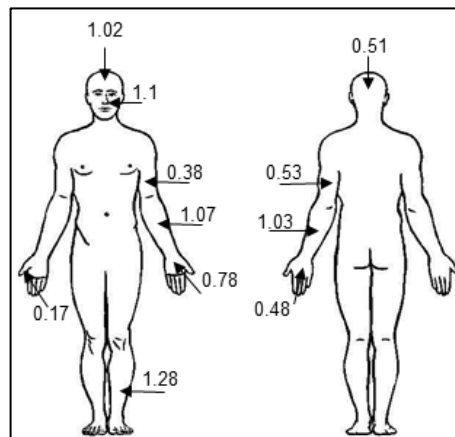


Abbildung 1.4: RNase 7 Konzentration in der humanen Haut. Die Abbildung zeigt die lokalisationsabhängigen RNase 7 Konzentrationen in der humanen Haut. Definierte Hautareale von 10 Probanden wurden mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (+ 150 mM NaCl, pH = 7,4) gespült. Die RNase 7 Proteinkonzentration [ng/cm²] wurde mittels RNase 7 ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von zehn Probanden. Übernommen aus (Rademacher et al. 2016).

Der Mechanismus der antimikrobiellen Aktivität der RNase 7 und die Identifizierung über welche Signalwege die Induktion vermittelt wird, sind noch nicht vollständig bekannt. So scheint die Ribonuklease-Aktivität keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 zu nehmen.

Huang *et al.* und auch Köten *et al.* konnten nachweisen, dass RNase 7-Mutanten, die keine Ribonuklease-Aktivität mehr besitzen, weiterhin in der Lage waren das Wachstum von *P. aeruginosa* und *Enterococcus faecium* einzudämmen (Huang *et al.* 2007, Köten *et al.* 2009). Spencer *et al.* konnten mittels Rasterkraftmikroskopie darstellen, dass RNase 7 die bakterielle Zellmembran von *P. aeruginosa*, *E. coli*, und *Enterococcus faecalis* permeabilisiert und aufbricht (Spencer *et al.* 2013). Dies war eine Bestätigung der Untersuchungen von Torrent *et al.*, die durch Ladungsversuche mit Liposomen schlussfolgerten, dass die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 auf elektrostatische Interaktionen zurückzuführen ist. RNase 7 ist in der Lage durch Bindung an die Lipopolysaccharide und dem Peptidoglycan der bakteriellen Zellmembran von *E. coli* und *S. aureus* diese zu depolarisieren und zu zerstören. Die bakterielle DNA wird daraufhin freigesetzt (Torrent *et al.* 2010). Aufgrund der Untersuchungen von Huang *et al.* und Torrent *et al.* ist es sehr wahrscheinlich, dass für die antimikrobielle Aktivität der RNase 7 und der anderen RNase A Superfamilienmitglieder die gleiche N-terminale Domäne verantwortlich ist. Für RNase 7 wurde gezeigt, dass dabei die Lysin-Reste K1, K3, K111 und K112 für die antimikrobielle Aktivität zuständig sind (Abb 1.5) (Huang *et al.* 2007, Torrent *et al.* 2013).

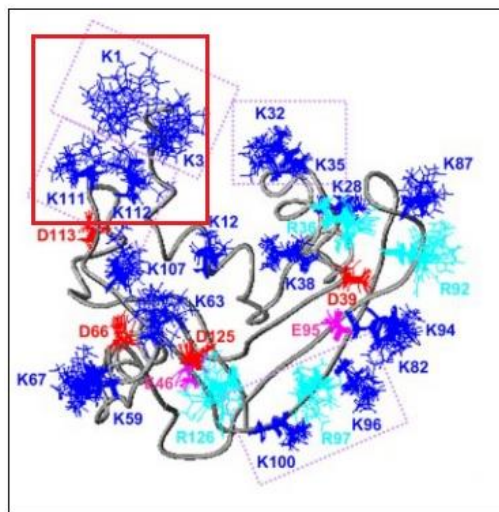


Abbildung 1.5: Kationische Cluster von RNase 7. Die Abbildung zeigt die Seitenkettenkonformation von RNase 7 mit den drei kationischen Clustern mit allen Lysin- (K, blau), Arginin- (R, cyan), Asparagin- (D, rot) und Glutamin-Resten (E, pink) aus einer NMR spektroskopischen Aufnahme. Vermutlich sind die in rot eingegrenzten Lysin-Reste K1, K3, K111 und K112 verantwortlich für die antimikrobielle Aktivität von RNase 7. Modifiziert nach (Huang *et al.* 2007).

Für die Klärung der verantwortlichen Signalwege bei der Induktion der RNase 7 Expression, gibt es bisher einige Ansätze, die jedoch noch nicht zu einer vollständigen Aufklärung geführt haben. RNase 7 wird in vielen Epithelien von einigen pro-inflammatorischen Zytokinen induziert, wie zum Beispiel Interleukin 1-beta (IL-1 β), Interleukin-17A (IL-17A) und Interferon-gamma (IFN γ) (Burgey *et al.* 2016, Mohammed *et al.* 2011, Simanski *et al.* 2013). Dabei identifizierten Mohammed *et al.* IL-1 β als potenten Induktor für RNase 7 Expression in humanen Epithelzellen

der Cornea welcher vermutlich über den MAP-Kinase-Signalweg (engl. *mitogen-activated protein*) agiert (Mohammed et al. 2011). Burgey *et al.* und Simanski *et al.* konnten zeigen, dass Kombinationen von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel IFN γ /IL-1 β und IFN γ /IL-17A, zu einer signifikant höheren Induktion von RNase 7 Expression in nasalen Epithelzellen und Keratinozyten führt (Burgey et al. 2015, Simanski et al. 2013). Dabei untersuchten Simanski *et al.* auch STAT3 (engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*) unter dem möglichen Gesichtspunkt einer Signalwegsbeteiligung und konnten zeigen, dass sowohl ein STAT3-Inhibitor als auch STAT3-spezifische siRNA zu einer signifikanten Reduktion der IFN γ /IL-17A vermittelten RNase 7 Expression in Keratinozyten führte, was eine Beteiligung der STAT3-Signalkaskade vermuten lässt. Dies war gleichzeitig ein spekulativer Erklärungsansatz für die häufig auftretenden *S. aureus*-Infektionen bei Menschen mit Hyper IgE-Syndrom (HIES), denn Minegishi *et al.* hatten gezeigt, dass bei Menschen, die an HIES leiden, häufig STAT3-Mutationen auftreten. HIES-Patienten wären also bei einer gestörten STAT3-Signalkaskade für RNase 7 Induktion, vermittelt durch pro-inflammatorische Zytokine, nicht vor einer *S. aureus* Infektion geschützt (Simanski et al. 2013, Minegishi et al. 2009). Häufig treten bei Diabetespatienten Infektionen des Urogenitaltraktes auf. RNase 7 ist eines der am stärksten vorkommenden AMP im Urogenitaltrakt (Spencer et al. 2011, Becknell et al. 2015). Eichler *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass Diabetespatienten, geringere Konzentrationen an RNase 7 im Urin aufweisen, als gesunde Kontrollpatienten. Diese geringen Konzentrationen konnten nach Insulingabe gesteigert werden. Da Insulin über den PI3K/AKT Signalweg über den IGF-1 (engl. *insulin-like growth factor-1*) agiert, haben Eichler *et al.* postuliert, dass Insulin-induzierte RNase 7 ebenfalls unter anderem über diesen Signalweg reguliert wird, welches sie durch Western-blot-Analysen nach und vor Insulingabe bestätigen konnten (Eichler et al. 2016). Firat *et al.* haben gezeigt, dass auch der Dermatophyt *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) in der Lage ist, RNase 7 in Keratinozyten zu induzieren, in Kombination mit pro-inflammatorischen Zytokinen war diese Induktion sogar signifikant stärker. Gleichmaßen wurde gezeigt, dass auch hBD-3 von *T. rubrum* induziert wird (Firat et al. 2014). Patienten, die während einer Tumortherapie mit EGFR (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*) hemmenden Medikamenten behandelt werden, leiden oft unter Infektionen mit Bakterien, Pilzen und auch Dermatophyten, die zum Teil schwer behandelbar sind (Eilers et al. 2010). Deshalb ist anzunehmen, dass ähnlich wie bei STAT3-Mutationen bzw. -Deletionen eine geringere Induzierbarkeit antimikrobieller Proteine vorliegt, wenn diese dem gestörten Signalweg unterliegen. So konnten Firat *et al.* unter Einsatz von spezifischen Inhibitoren und Antikörpern zeigen, dass die Induktion von hBD-3 und RNase 7 durch *T. rubrum* teils über den EGFR vermittelt wird (Firat et al. 2014). Wanke *et al.* zeigten, dass RNase 7 durch Stimulation mit EGFR-Liganden induziert wird und durch

EGFR-spezifische Inhibitoren und Antikörper diese Induktion inhibiert wird. Ebenso wurde eine Beteiligung des TLR-2 (engl. *Toll-like Receptor-2*) und NF- κ B (engl. *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) bei Bakterien-induzierter-RNase 7 Expression gezeigt. Es gibt also Hinweise dafür, dass verschiedene Signalwege bei der Signalvermittlung der RNase 7 Induktion in der kutanen Abwehr eine Rolle spielen (Wanke et al. 2011).

2 Zielsetzung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse der Signalvermittlung von RNase 7 unter der Betrachtung verschiedener, membrangebundener Rezeptoren und der resultierenden Signalwege.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, scheint der EGFR eine bedeutende Rolle bei der RNase 7 Induktion in Keratinozyten zu spielen. Die Signaltransduktion durch den EGFR gewinnt aufgrund des Einsatzes von EGFR-Antikörpern und -Inhibitoren in der humanen Tumorthherapie immer mehr an Bedeutung. In dieser Arbeit sollte mittels Stimulationsversuchen von primären Keratinozyten, 3D-Hautäquivalenten und *ex vivo* Hautexplantaten näher untersucht werden, inwieweit und durch welche Stimuli RNase 7 über den EGFR Signalweg und eventuell weiteren beteiligten Signalwegen agiert.

Des Weiteren ist die Rolle von RNase 7 als AMP der Haut noch nicht hinreichend definiert. Unter dem Gesichtspunkt neuer Analyseansätze sollte dies in dieser Arbeit untersucht werden. Ein Fokus wurde dabei auf die, bisher nicht beschriebene, Induzierbarkeit durch den Gram-negativen, nosokomialen Keim *Pseudomonas aeruginosa* und die resultierende Signalvermittlung gelegt.

Nach bisherigem Kenntnisstand kommt es bei Hautverwundung zu einer Freisetzung von RNA und damit einhergehend zur Aktivierung von Rezeptoren, wie TLR-3, und einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Es stellte sich daher die Frage, ob es, physiologisch betrachtet, zu einem erhöhten Infektionsschutz nach Hautverwundung kommt, wenn RNase 7 induziert wird und ob die Funktion als RNase dabei eine bisher unbekannte, wichtige Rolle für die kutane Abwehr und bei Wundheilungsprozessen spielt. Dabei sollte ebenfalls untersucht werden ob dem Ribonuklease-Inhibitor (RI), welcher in der Lage ist, durch Komplexbildung mit RNasen der RNase A Superfamilie, diese zu inaktivieren, dabei ebenfalls eine Bedeutung zukommen könnte. Darüber sollten Analysen mit RI- und RNase 7-spezifischer siRNA und Stimulationsversuche mit dem RNA Strukturanalogen poly I:C Aufschluss geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Produktname	Hersteller
CO ₂ Inkubatoren	Heraeus™ BB 16 Formascientific™ 3164	Heraeus (Holding) Thermo Scientific (Schwerte)
	CB 150I™	Binder (Tuttlingen)
Flüssigkeits-Absaugsystem	BVC professional	Vacuubrand (Wertheim)
Flüssigstickstofftank	Arpege 70	Air Liquide (Düsseldorf)
Koloniezählgerät	Synbiosis ProtoCol SR	Synoptics Ltd. (Cambridge, UK)
Mikroplattenreader	Sunrise™	Tecan (Crailsheim)
Mikroplattenwasher	ELx50™	BioTek (Bad Friedrichshall)
Mikroskope	Leitz DiaVert™	Leica (Wetzlar)
	Wilovert™ 30	Hund (Wetzlar)
	Zeiss 47 17 01-990	Zeiss (Jena)
	Olympus IX50	Olympus (Hamburg)
pH-Meter	pH 720 WTW	inoLab (Weilheim)
Photometer	Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
	NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Peqlab (Karlsruhe)
Pipettierhilfen	Pipetus™ akku	Hirschmann (Eberstadt)
	Accu jet pipette boy™	Brand (Wertheim)
	Pipetman™ 20; 200; 1000 µl	Gilson (Middleton, USA)
	Reference™ 2,5; 10; 100; 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
	Research™ 2,5; 10; 100; 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Präzisionswaage	KERN 822-33	Kern & Sohn (Balingen)
Real-Time PCR System	StepOne Plus™	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Sterilwerkbänke	Cytosafe™ 2004	Gelaire (Seven Hills, Australien)
	clanLAF™ VFR 1206 GS	Labogene (Lyngø, Dänemark)
Thermocycler	T3™	Biometra (Göttingen)
Thermomixer	5436	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer	Reax top	Heidolph (Schwabach)
Wasser-Filtrationssystem	TKA™ Smart2Pure™	Thermo Scientific (Schwerte)
Zentrifugen	Eppendorf 5810R, 5804R, 5424	Eppendorf (Hamburg)
	Heraeus Multifuge™ X3R	Heraeus (Holding)
	Heraeus Megafuge™ 1.0R	Heraeus (Holding)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-, 12- und 24-Loch-Flachbodenplatten (unbeschichtet)	Corning (Kaiserslautern)
96-Loch-Flachbodenplatten (NUNC™)	Thermo Scientific (Schwerte)
Belüftungsröhrchen (13 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Biopsiekassetten	Medite (Burgdorf)
Biopsiestanzen (3; 4; 5; 6 mm)	pfm medical (Köln)
Dako Pen	Dako (Hamburg)
Deep-well Companionplatten 6-well	BD Bioscience (Heidelberg)
Folie für qPCR Platten	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc (Wiesbaden)
Petrischalen (92 x 16 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (20; 100; 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen FilterTip (20; 100; 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Probenröhrchen (0,2/ 0,5/1,5/2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
qPCR 8er Deckel	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
qPCR 8er Streifen	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
qPCR 96-Well Flachbodenplatte halber Rahmen	Sarstedt (Nümbrecht)
Röhrchen aus PS mit Rundboden	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Einmalpipetten (2/5/10/25/50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Skalpelle (No. 11; 23)	pfm medical (Köln)
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm; 0,45 µm)	Roth (Karlsruhe)
Transferpipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Vernichtungsbeutel	Sarstedt (Nümbrecht)
Wägeschalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkultureinsätze (6-well; 3µm Porengröße)	BD Bioscience (Heidelberg)
Zellkulturflaschen (T25; T75)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber (Cell scraper™)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellsiebe (40 µm; 100 µm)	BD Bioscience (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen (2; 15; 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
2- Propanol	Roth (Karlsruhe)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Blut-Agar-Platten	bioMérieux (Nürtingen)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serum Albumin (BSA) fettsäurefrei	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Promocell (Heidelberg)
CASO Broth	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
cDNA-Synthese-Kit (PrimeScript™)	Takara Bio Europe (St.-Germain-en-Laye, Frankreich)
Chloroform ≥ 99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Collagen G	Biochrom (Berlin)
Crystal RNAmagic	Biolabproducts (Bebensee)
Demineralisiertes Wasser (VE-Wasser)	eigene Herstellung TKA™ Smart2Pure™
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dinatriumphosphat-Monohydrat (Na ₂ HPO ₄ ·xH ₂ O)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</i>	Promega (Mannheim)
Einfriermedium Cryo-SFM	Promocell (Heidelberg)
Ethanol ≥ 99,8 %	Roth (Karlsruhe)
Eukitt®	O. Kindler (Freiburg i. Breisgau)
Formalin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco (Eggenstein)
Gentamicin	Roth (Karlsruhe)
Hämalaun	Merck (Darmstadt)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco (Eggenstein)
L-Glutamin (200 mM)	Gibco (Eggenstein)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (H ₂ NaO ₄ P x H ₂ O)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	Gibco (Eggenstein)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco (Eggenstein)
Rabbit Serum (Normal)	Dako (Hamburg)
Roti®-ImmunoBlock	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl) 1N	Merck (Darmstadt)
Select Agar	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Swine Serum (Normal)	Dako (Hamburg)
SYBR-Green Premix Ex Taq TM	Takara Bio Europe (St.-Germain-en-Laye, Frankreich)
Transfektionsreagenz HiPerFect	Qiagen (Hilden)
Tris	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Triton X-100 1% w/w	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypsin/EDTA 0,05%	Gibco (Eggenstein)
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
VECTASTAIN® Elite ABC Kit (Standard)	Vector Laboratories Ltd (Peterborough, UK)
VECTOR® NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories Ltd (Peterborough, UK)
Xylolersatz Shandon™	Thermo Scientific (Hamburg)
Zitronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Medien:	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Low Glucose w/o L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate)	Biowest (Nuailé, Frankreich)
Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2) SupplementMix	Promocell (Heidelberg)
Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2) SupplementPack	Promocell (Heidelberg)
RPMI1640 (w/o L-Glutamine)	Gibco (Eggenstein)

3.1.4 Lösungen/Puffer/Medien

Zellkulturmedien

<i>DMEM (++)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 500 ml DMEM ○ 50 ml FCS ○ 5 ml L-Glutamin
<i>Vollmedium plus KGM2 (+++)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 500 ml KGM2 Basalmedium ○ Supplement Mix ○ 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S)
<i>Vollmedium KGM2 (++)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ KGM2 (+++) ohne Zugabe von P/S
<i>Minimalmedium KGM2 (-+)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ KGM2 (+++) ohne Zugabe von Supplement Mix und P/S
<i>Serum-freies-Keratinocyten-Differenzierungs-Medium SKDM</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 500 ml KGM2 Basalmedium ○ Supplement Pack ohne Rinderhypophysenextrakt (BPE) und Epinephrin ○ 25 mg Ascorbinsäure ○ 500 mg BSA (fettsäurefrei) ○ 575 µl 1M CaCl₂ ○ über 0,22 µm Sterilfilter filtrieren
<i>RPMI (+++)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 500 ml RPMI1640 ○ 50 ml FCS ○ 5 ml P/S

Bakterienkulturlösungen und -platten

<i>TSB Flüssigmedium</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 30 g CASO Broth ○ 1 l VE-Wasser ○ autoklavieren
<i>TSB-Agar-Platten</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ TSB-Flüssigmedium plus 15 g/l Select-Agar Einwaage ○ Autoklavieren und in Petrischalen gießen

Puffer / Lösungen für Immunhistochemie

<i>Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) (10x) pH = 7,6</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 50 mM Tris(60,5 g) ○ 1,5 M NaCl (87,6 g) ○ in 1000 ml VE-Wasser lösen ○ pH-Wert mit HCl einstellen ○ Gebrauchslösung (1x) 1:10 in VE-Wasser verdünnen
--	---

<i>TBS-T (0,05 %)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1 l TBS (1x) ○ Zugabe von 500 µl TWEEN® 20
<i>TBS/1 % BSA</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 25 ml TBS (1X) ○ Zugabe von 0,25 g BSA ○ in 1,5 ml Probenröhrchen aliquotieren ○ bei -20°C lagern
<i>TBS/12 % BSA</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100 ml TBS (1x) ○ Zugabe von 12 g BSA ○ im 15 ml Röhrchen bei 4°C lagern
<i>Citratpuffer 10 mM pH = 6</i>	<p>Zusammensetzung: 9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B + 450 ml VE-Wasser pH-Wert einstellen</p> <p>Stammlösung A:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 0,1 M Zitronensäure (21,01 g) in 1 l VE-Wasser lösen <p>Stammlösung B:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 0,1 M Natriumcitrat (29,41 g) in 1 l VE-Wasser lösen
<i>Hämalaun-Lösung</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 30 ml Hämalaun ○ 60 ml VE-Wasser ○ vor Gebrauch durch Faltenfilter filtrieren

Puffer / Lösungen für den ELISA

<i>Natriumcarbonatpuffer 0,05 M pH = 9,6</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 15 mM Natriumcarbonat (1,59 g/l) ○ 35 mM Natriumhydrogen-carbonat (2,93 g/l) ○ 1 l VE-Wasser ○ pH-Wert mit Ameisensäure einstellen
<i>Natriumphosphatpuffer (NaPP) 10 mM pH = 7,2</i>	<p>Zusammensetzung: 3,16 ml Lösung 1 + 6,84 ml Lösung 2 + auf 1l mit VE-Wasser auffüllen autoklavieren</p> <p>Lösung 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 1 M NaH₂PO₄ x H₂O (177,9 g) in 1 l VE-Wasser lösen <p>Lösung 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 1 M Na₂HPO₄ x H₂O (137,9 g) in 1 l VE-Wasser lösen

<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (10x) pH = 7,4</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2 g KCl ○ 2,4 g KH₂PO₄ ○ 26,8 g Na₂HPO₄ x H₂O ○ 80g NaCl ○ in 1000 ml VE-Wasser lösen ○ pH-Wert mit HCl einstellen ○ Gebrauchslösung (1x) 1:10 in VE-Wasser verdünnen
<i>Waschpuffer (WP) = PBS-T (0,05 %)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1 l PBS (1x) ○ Zugabe von 500 µl TWEEN® 20
<i>PBS/1 % BSA</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 25 ml PBS (1X) ○ Zugabe von 0,25 g BSA

3.1.5 Antikörper

Antikörper für Stimulationen und AMT

Antikörper	Hersteller/Referenz
RNase 7, polyklonal, Ziege	ZIKA-Kaninchenbetrieb (Gottin) (Köten et al. 2009)
Irrelevanter Antikörper, Ziege, IgG, Normalserum	ZIKA-Kaninchenbetrieb (Gottin)
Cetuximab (Erbitux), EGFR-Antikörper, monoklonal, IgG	Merck (Darmstadt)
Anti-hTLR5-IgA, monoklonal	Invivogen (Toulouse, Frankreich)

Antikörper für den ELISA

Primärantikörper	Hersteller/Referenz
RNase 7, polyklonal, Ziege	ZIKA-Kaninchenbetrieb (Gottin) (Köten et al. 2009)
Anti-Human BD-2, polyklonal, Ziege	PeptoTech (Hamburg)
Sekundärantikörper	Hersteller/Referenz
RNase 7, biotinyliert, polyklonal, Ziege	ZIKA-Kaninchenbetrieb (Gottin) (Köten et al., 2009)
Biotinylated Anti-Human BD-2, polyklonal, Ziege	PeptoTech (Hamburg)
Kit	Hersteller/Referenz
Human TNF-alpha DuoSet ELISA #DY210	R&D Systems (Abingdon, UK)

Antikörper für die Immunhistochemie

Primärantikörper	Hersteller/Referenz
RNase 7, polyklonal, Ziege	ZIKA-Kaninchenbetrieb (Gottin) (Köten et al. 2009)
Anti-Human BD-2, polyklonal, Ziege	PeptoTech (Hamburg)
Sekundärantikörper	Hersteller/Referenz
AffiniPure Rabbit Anti-Goat, biotinyliert, polyklonal, Ziege	Jackson Immuno Research (Suffolk, UK)

3.1.6 sonstige Agenzien

Agenzien	Hersteller/Referenz
rekombinante RNase 7	im Labor der Hautklinik exprimiert (Köten et al. 2009)
natürliche RNase 7	im Labor der Hautklinik isoliert
RNase 7-Mutante	im Labor der Hautklinik hergestellt (Köten et al. 2009)
Hornhautspäne (Kallus)	aus der kosmetischen Abteilung der Hautklinik
Marimastat, Metalloprotease-Inhibitor	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
poly I:C	Invivogen (Toulouse, Frankreich)
TGF α , HB-EGF	PeptoTech (Hamburg)
Tyrphostin AG1478, EGFR-Inhibitor	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

3.1.7 Oligonukleotide

siRNA

Hersteller	siRNA
Ambion®, Thermo Scientific (Hamburg)	Silencer® Select siRNA (10 μ M) ADAM17 (s13720) TLR5 (s14197) MyD88 (s9137) RNase 7 (s224956) Negativkontrolle No.1
ON-TARGETplus, Dharmacon (Freiburg)	ON-TARGETplus siRNA (20 μ M) SMARTpool RHN1 Non-targeting

Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
Reverse Transkriptase:	
Oligo (dT)	(T) ₁₈
qPCR:	
hBD2-for1	GCCTCTCCAGGTGTTTTTG
hBD2-ra	GAGACCACAGGTGCCAATTT
hBD3 f3	TGTTTGCTTTGCTCTTCCTGT
hBD3 r3	CGCCTCTGACTCTGCAATAA
Hs_ADAM17_1_SG	QuantiTect Primer Assay, Qiagen (Hilden)
MyD88 f1	GACTGCTCGAGCTGCTTACC
MyD88 r1	TCCTGCTGCTTGCTTCAAGAT
RP38 f1	TCAAGGACTTCTGCTCACA
RP38 r1	AAAGGTATCTGCTGCATCGAA
S2-31 (RNase7 forward)	GGAGTCACAGCACGAAGACCA
S-33rev (RNase7 reverse)	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA
TLR5-f2	GACCCTCTGCCCTAGAATAA
TLR5-r2	GAATTCCAAACACAGGACCG

3.1.8 Humane Zellen

Zellen	Hersteller/Referenz
NHEK Fibroblasten	Promocell (Heidelberg) isoliert aus der Dermis von Präputienspenden

3.1.9 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme waren in Glycerinstocks bei -80°C eingefroren und im Labor vorhanden.

Stamm	Referenz
PAK	(Bradley 1973)
PAKΔfliC	(Feldman et al. 1998)

3.1.10 Plasmide

Plasmid	Hersteller
<i>NF-κBluc</i>	Promega (Mannheim)
phRG-TK	Promega (Mannheim)

3.1.11 Software

<i>Statistiksoftware</i>	GraphPad Prism®5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)
<i>Kalkulations-/Darstellungssoftware</i>	Microsoft Excel 2010 Microsoft PowerPoint 2010 Microsoft Word 2010 (Microsoft, Redmond, USA)
<i>Gerätesoftware</i>	NanoDrop 1000 (Version 3.6.0) StepOnePlus™ Software (Version 2.1) ProtoCOL SR Software (Version 1.49) AxioVision Mikroskopsoftware

3.2 Methoden

3.2.1 Zell- und mikrobiologische Methoden

Alle zellbiologischen und mikrobiologischen Arbeiten wurden stets unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

3.2.1.1 Kultivierung humaner Keratinozyten

NHEK Zellen (Normale humane epidermale Keratinozyten; PromoCell, Heidelberg) sind primäre Keratinozyten aus juvenilen Präputien isoliert. Es handelte sich um einen Zellpool, bei dem die Keratinozyten von drei bis fünf Spendern vereint sind. Diese Zellen wachsen adhärent auf kollagenbeschichtetem Untergrund. Hierfür wurden Zellkulturflaschen mit einer Suspension aus 0,02 M Salzsäure und 1 %igem Rattenschwanz Kollagen Typ I beschichtet und nach ½ stündiger Inkubation bei 37°C zweimal mit PBS gewaschen. Für Versuche mit NHEK Zellen wurden alle Zellkulturplatten in gleicher Weise beschichtet. In den kollagenisierten Flaschen wurden die NHEK Zellen mit KGM2 (+++) Medium kultiviert.

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit frischem Medium gefüttert.

Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden regelmäßig unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

Wenn die Zellen eine Konfluenz von circa 80-90 % in den Flaschen erreicht hatten, wurden sie zur Subkultivierung mit Trypsin behandelt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 5 ml

0,05 % Trypsin/EDTA (T/E) versetzt. Nach circa 5-10 Minuten Inkubation bei 37°C wurde durch Mikroskopieren das Ablösen der Zellverbände kontrolliert. Das T/E-Zellgemisch wurde in FCS-haltigem DMEM (++) Medium aufgenommen (Neutralisation des toxischen Trypsins) und für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in KGM2 (+++ oder ++) Medium resuspendiert und in entweder neue Flaschen oder entsprechend der Versuchsanordnung in Platten oder Zellkultureinsätze ausgesät.

3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen länger aufbewahren zu können, wurde die Technik der Kryokonservierung angewandt. War in den Flaschen eine Konfluenz von circa 90 % erreicht wurden die Zellen wie zur Subkultivierung mit Trypsin behandelt, die Reaktion nach Inkubation mit FCS-haltigem DMEM (++) Medium abgestoppt und die Suspension bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1000 µl Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt.

Anschließend wurde das Röhrchen in ein Kryokonservierungsgefäß gegeben und in den -80°C Gefrierschrank gestellt. Die Gefriereschwindigkeit beträgt circa 1°C bis 3°C pro Minute. Nach erfolgtem Einfrierprozess wurde das Kryokonservierungsröhrchen bis zum Gebrauch im Stickstofftank gelagert.

3.2.1.3 Stimulation von Keratinozyten

Zur Stimulation wurden die Zellen je nach Versuchsanordnung in 6-, 12- oder 24-Loch-Flachbodenplatten ausgesät. Die Zellen wurden mit entsprechendem Medium, ohne Einsatz von Antibiotika (++), bis zum Erreichen der vorgesehenen Konfluenz kultiviert. Bei der Versuchsdurchführung wurde gänzlich auf Zusätze wie FCS oder Supplemente verzichtet (-, Minimalmedium), um Verfälschungen der Versuchsergebnisse durch undefinierte Faktoren bzw. EGFR-Liganden auszuschließen.

Als Stimuli wurden die in Abschnitt Material dargelegten Zytokine, Faktoren, Inhibitoren, Antikörper und lebende Bakterien, sowie die in 3.2.1.4 erläuterten Bakterienüberstände verwendet. Sie wurden entsprechend dem Versuchsaufbau in gewünschter Konzentration in Minimalmedium für eine Inkubationszeit von 4 bis 48 Stunden den Zellen zugesetzt, wobei 18 bis 24 Stunden die Regelinkubationszeit war. Die Stimulation erfolgte im Brutschrank bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂. Am nächsten Tag wurden die Überstände abgenommen, scharf abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden einmal mit PBS

gewaschen und entweder direkt in Crystal RNAmagic oder Lysis Puffer aufgenommen oder für spätere Verwendung trocken bei -80°C temporär eingefroren.

3.2.1.3.1 Lebendstimulation mit Bakterien

In dieser Arbeit wurden Keratinozyten in 24-Lochplatten mit lebenden Gram-negativen *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert. Hierzu wurden die Stämme PAK oder PAK Δ fliC, eine Flagellin-defiziente Mutante, verwendet. Diese wurden aus Glycerinstocks am Tag vor der Stimulation in 8 ml TSB-Flüssigmedium in Belüftungsröhrchen angeimpft und schüttelnd bei 200 upm und 37°C über Nacht inkubiert, parallel wurden die Bakterien auf Blut zur Reinheitskontrolle fraktioniert ausgestrichen. 250 μ l der Bakteriensuspension wurden am nächsten Morgen in 8 ml TSB Flüssigmedium überimpft und erneut vier Stunden schüttelnd inkubiert bis ungefähr eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Die Bakterien wurden daraufhin bei 3500 g 5 min abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen, nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in Minimalmedium aufgenommen und die OD₆₀₀ auf 0,2 eingestellt. Die Suspension wurde 1:20 verdünnt und 300 μ l auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Bakterien bei 350 g für 5 min auf die Zellen zentrifugiert und für vier Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend ein Mediumwechsel auf gentamicinhaltiges (200 μ g/ml) Minimalmedium vorgenommen, um extrazelluläre Bakterien zu entfernen bzw. abzutöten. Danach folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank. Zur Bestimmung der eingesetzten Bakterienzahl wurde die eingesetzte Bakteriensuspension 1:1000 in PBS verdünnt und zweimal je 50 μ l auf TSB-Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Beenden des Versuchs wurden die Überstände abgenommen, scharf abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und entweder direkt in Crystal RNAmagic oder Lysis Puffer aufgenommen oder für spätere Verwendung trocken bei -80°C temporär eingefroren.

3.2.1.4 Herstellung von Bakterienüberständen

Für einige Versuchsansätze wurden Bakterienüberstände benötigt. Hierzu wurden die Bakterien wie in 3.2.1.3.1 beschrieben, angeimpft und gleichermaßen mit Minimalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Anschließend wurde diese Suspension 1:10 in Minimalmedium verdünnt und in Petrischalen über Nacht im Brutschrank bei 37°C statisch inkubiert, als Kontrolle wurde nur KGM2 (-+ -) eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Suspension bei

8500 g 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände mittels 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter steril in Schraubdeckelröhrchen oder 15 bzw. 50 ml Röhren filtriert und bei -20°C gelagert.

3.2.1.5 Transiente Transfektion von Keratinozyten

3.2.1.5.1 RNA-Interferenz

Für einige Versuche wurden die Zellen vor Stimulation mit siRNA transfiziert. Dieses Verfahren der RNA-Interferenz ermöglicht es, gezielt mittels kurzer RNA Moleküle die mRNA eines Zielgens herunter zu regulieren um Hinweise auf die Relevanz des betroffenen Gens in einem bestimmten Stimulationsversuch zu erhalten (Elbashir et al. 2001).

Die Transfektion der Keratinozyten erfolgte vorrangig in 24-Loch-Flachbodenplatten bei einer Konfluenz von circa 70 %. Hierzu wurde zunächst ein Transfektionsansatz, bestehend aus 98,85 µl Minimalmedium, 1 µl HiPerFect Transfektionsreagenz und 10 nM siRNA pro Vertiefung, hergestellt. Der Ansatz wurde einmal gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Währenddessen wurden die entsprechenden Zellen einmal mit PBS gewaschen und in jedes Loch 250 µl Medium ohne Antibiotika (+++) eingegeben. Nach erfolgter Inkubation wurden in jedes Loch 100 µl des Transfektionsansatzes getropft. Die Zellen wurden im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit PBS und ein Mediumwechsel mit (++-) Medium. Die Platten wurden bis zur Stimulation im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.5.2 Dual-Luciferase® Reporter Assay

Luziferase-Reporter-Assays stellen eine Analysemethode eukaryotischer Genexpression durch Biolumineszenz-Reaktionen dar. In dieser Arbeit wurde das „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“ (Promega, Mannheim) eingesetzt. Dieses besitzt als experimentelles Reporter gen die sogenannte *Firefly*-Luziferase, welche aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* stammt. Als Kontroll-Reporter gen dient die sogenannte *Renilla*-Luziferase, die aus der Seefeder *Renilla reniformis* stammt und konstitutiv exprimiert wird. Durch Kotransfektion ist es möglich beide Reporter gene in einem System zu messen, da diese simultan exprimiert werden. Da beide Luziferasen unterschiedliche Substrate umsetzen ist eine Zuordnung zum experimentellen bzw. zum Kontroll-Reporter gen möglich (Abb 3.1).

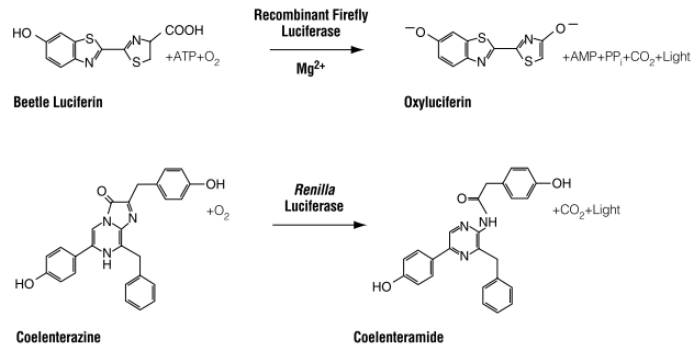


Abbildung 3.1: Biolumineszenzreaktionen katalysiert von *firefly* und *Renilla*-Luziferasen. Übernommen aus "technical manual Promega Dual-Luciferase® Reporter Assay System".

Für Luziferaseversuche wurden Keratinozyten mit den Reporter-Gen-Vektoren transfiziert. Hierzu wurde zunächst am Spektralphotometer die DNA-Konzentration der einzusetzenden Vektoren bestimmt und die benötigte Menge darüber berechnet. Der experimentelle Vektor, in diesem Fall *NF-κBluc*, wurde mit je 300 ng und der Kontroll-Vektor, *phRG-TK*, mit 30 ng pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte transfiziert.

Am Transfektionstag hatten die Keratinozyten einer 24-Loch-Flachbodenplatte eine Konfluenz von etwa 80 %. Pro Vertiefung wurde ein Transfektionsansatz von 100 µl benötigt. Es wurde ein Gesamtansatz für alle, zu transfizierenden Vertiefungen, hergestellt. Dazu wurde pro Loch 1 µl Fugene® HD Transfektionsreagenz und die entsprechend berechnete Menge Vektor pipettiert und mit KGM2 (-+-) auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde kurz gevortext und für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit 250 µl KGM2 (++-) versorgt und dann durch Zutropfen des Transfektionsansatzes mit den Plasmiden vereint. Die Zellen wurden im Brutschrank für 6 Stunden inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit PBS und ein Mediumwechsel mit KGM2 (++-) Medium. Die Platten wurden erneut im Brutschrank inkubiert bis die Zellen eine Mindestkonfluenz von 90 % aufwiesen, um wie in 3.2.1.3 beschrieben stimuliert zu werden.

Nach Stimulation erfolgte die Abnahme der Überstände und ein Waschschrift mit PBS. Anschließend erfolgte die Zelllyse durch Zugabe von 150 µl Lysepuffer (aus dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* Kit, 1:5 in demineralisiertem Wasser verdünnt) und einer Schüttelinkubation von 20 min bei RT. Nach der Lyse erfolgte die Biolumineszenzmessung nach Angaben des Herstellers mittels TD20/20 Luminometer. Die Berechnung der relativen Luziferaseaktivität (RLU, engl. *relative light unit*) erfolgte durch Bildung des Quotienten von *Renilla/firefly* Luziferaseaktivität.

3.2.1.6 Anlegen eines 3D-Hautäquivalents

Um sich der *in vivo*-Situation anzunähern, wurde in diesem Labor ein 3D-Hautäquivalent, modifiziert nach Mildner *et al.* (Mildner et al. 2006), etabliert. Dieses besteht im Wesentlichen aus einem Fibroblasten-Kollagen-Gerüst (Kollagenmatrix), welches Träger von differenzierten Keratinozyten ist, die ein Epidermisäquivalent ausbilden.

Zunächst wurde das Fibroblasten-Kollagen-Gerüst geschaffen. Dafür wurden je acht Teile Kollagen, ein Teil HBSS (10x) und ein Teil FCS (*engl. fetal calf serum*, fetales Kälberserum) mit 100.000 Fibroblasten/ml verwendet. Das Kollagen wurde in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt und vorsichtig, unter Schwenken, das HBSS hinzugegeben. Die saure Lösung wurde mittels 1M NaOH neutralisiert und anschließend bei 4°C zwischengelagert. Die Fibroblasten, wurden nun wie in 3.2.1.1 mit T/E abgedaut, zentrifugiert und in entsprechender Menge FCS aufgenommen. Die Kollagen- und die Fibroblasten-FCS-Lösung wurden nun durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vermischt.

Reagenz	Menge für 6,5 Zellkultureinsätze
Kollagen G Typ1	13 ml
HBSS (10x)	1625 µl
FCS	1625 µl
Fibroblasten	$1,63 \times 10^6$

Tabelle 3.1: Menge der Reagenzien für 6,5 Zellkultureinsätze

In eine spezielle 6-Lochplatte mit Vertiefungen für 17 ml Volumen pro Vertiefung wurden Polyethylen-Zellkultureinsätze mit einer Membran mit einem Porendurchmesser von 3 µm eingegeben. Auf die Membran der Zellkultureinsätze wurden je 2,5 ml Fibroblasten-Kollagen-Lösung gegeben, anschließend wurde die Platte für zwei Stunden bei 37°C ohne CO₂ inkubiert, damit die Masse gelieren konnte. Nach erfolgtem Gelieren wurden außen 14 ml und im Zellkultureinsatz 2 ml KGM2 (++) Medium gegeben und die Platte über Nacht bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium aus den Zellkultureinsätzen entfernt, pro zwei Zellkultureinsätze eine 100 % konfluente T75-Flasche NHEK wie in 3.2.1.1 zur Subkultivierung vorbereitet, das Pellet in 4 ml KGM2 (++) aufgenommen und je 2 ml in einen Zellkultureinsatz pipettiert. Die Inkubation zum Anheften der Keratinozyten auf der Kollagenmatrix erfolgte gleich der allgemeinen Zellkulturbedingungen über Nacht im Brutschrank. Am Tag drei wurde nur die Kollagenmatrix mittels einer Pipettenspitze vom Zellkultureinsatz abgelöst um die Spannung zu nehmen und Elastizität zu schaffen, sodass die Keratinozyten mit dem Fibroblasten-Kollagen-Gerüst interagieren konnten und zu Wachstum und Differenzierung angeregt wurden. Am Tag vier erfolgte die Luftexposition

der Keratinozyten, der sogenannte „Air Lift“. Dabei wird das ursprüngliche KGM2 (++-) sowohl außen als auch innen entfernt und nur außen durch Serumfreies-Keratinozyten-Differenzierungs-Medium (SKDM) zu je 10 ml ersetzt. Die Keratinozyten waren nun luftexponiert und werden nur noch durch das SKDM über die Kollagenmatrix versorgt. Zur Weiterkultivierung wurde die Platte bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert und alle zwei Tage das Medium gewechselt (Mildner et al. 2006) (Abb 3.2).

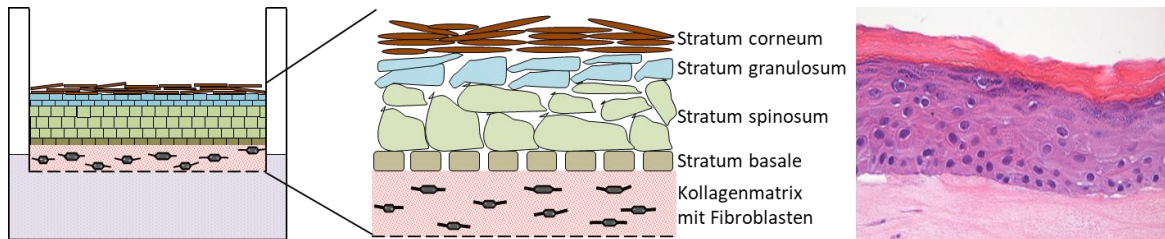


Abbildung 3.2: Aufbau eines 3D-Hautäquivalents. Übernommen aus (Rademacher et al. 2018).

3.2.1.6.1 Stimulation des 3D-Hautäquivalents

Nach sechs Tagen luftexponierter Kultur wurde das 3D-Hautäquivalent stimuliert. Hierzu wurden die Zellkultureinsätze in eine 6-Lochplatte mit 2,5 ml Volumen pro Vertiefung überführt. Außen wurden 1500 µl SKDM, angereichert mit den für den Versuch bestimmten Stimuli, eingegeben und die Hautäquivalente wurden je nach Versuchsaufbau von oben mit einer Bakteriensuspension wie in 3.2.1.3.1 beschrieben bzw. Bakterienüberständen mit jeweils 20 µl benetzt, als Kontrollen wurden entsprechend Kontrollmedium bzw. Kontrollüberstand eingesetzt. Die Stimulation erfolgte durch Inkubation über Nacht zu den allgemeinen Zellkulturbedingungen. Zum Beenden am nächsten Tag wurden die Unterstände aufgenommen und scharf abzentrifugiert. Die Zellkultureinsätze wurden einzeln auf eine glatte Fläche gelegt und mittels einer 6 mm Biopsiestanze einmal in der Mitte des Hautäquivalents gestanzt. Die Biopsie wurde einmal in der Mitte mittels Skalpell geteilt. Eine Hälfte wurde in 500 µl Crystal RNAmagic zur RNA Isolierung gegeben und die andere Hälfte in eine Biopsiekassette mit Schaumstoffeinlage überführt und anschließend bis zur Paraffineinbettung in Formalin gelagert. Die Paraffineinbettung, das anschließende Einblocken und Schneiden, sowie die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung erfolgten durch die MitarbeiterInnen des histologischen Rountinelabors der Hautklinik des UKSH, Campus Kiel.

3.2.1.7 *Ex vivo* Stimulationsversuche

Zusätzlich wurden *ex vivo*-Stimulationsexperimente mit humanen Hautexplantaten durchgeführt. Die nach plastischen Operationen und Amputationen anfallende, gesunde, humane Haut aus der Chirurgie des UKSH wurde direkt in PBS in sterilen Gefäßen gelagert und zur weiteren Verwendung für Stimulationsexperimente in die Hautklinik verbracht (Abb 3.3 A). Die Patienten hatten vorher durch Unterschrift der Weiterverwendung zu Forschungszwecken zugestimmt. Eine Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät des UKSH liegt hierzu vor (D 414/09; D442/16). Zunächst wurde das subkutane Gewebe der Hautexplantate abpräpariert und die Haut in circa 0,25 cm² große Stücke geschnitten (Abb 3.3 B). Anschließend wurde sterile Gaze in jede Vertiefung einer 12-Loch-Platte gelegt und mit 1200 µl KGM2 (++) getränkt (Abb 3.3 C). Je nach Stimulationsschema wurde dem Medium Antikörper, Inhibitor oder Vehikel zugesetzt. Die Hautstücke wurden mittig auf dem Mull platziert und mit 20 µl Bakteriensuspension OD₆₀₀= 0,2 so versehen, dass keine Keime nach unten durch die Gaze diffundieren konnten (Abb 3.3 D). Inkubation mit Minimalmedium diente zur Kontrolle. Nach Stimulation über Nacht wurde durch Ausplattieren von etwas Medium aus dem Unterstand kontrolliert, ob es zu Kontaminationen gekommen war. Der übrige Unterstand wurde scharf abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Die Hautstücke wurden für spätere immunhistochemische Untersuchungen in Formalin gelagert. Für eventuelle RNA-Isolierung wurde ein Teil in 500 µl RNAlater bei -20°C gelagert.

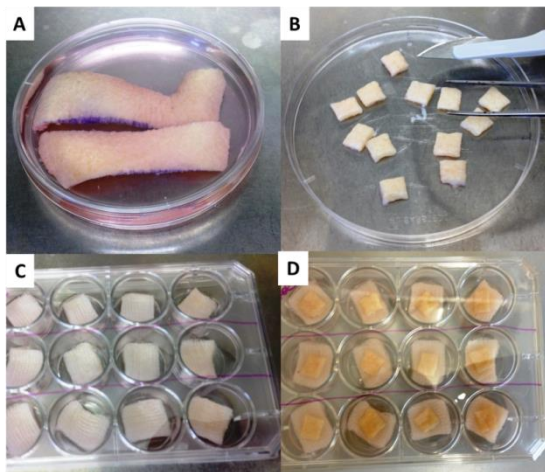


Abbildung 3.3: Prozedere eines *ex vivo* Stimulationsexperiments. Beschreibung im Text.

3.2.1.8 Immunhistochemische Färbungen

Um in Schnitten von 3D-Hautäquivalenten und *ex vivo* Hautexplantaten spezifische Antigene nachzuweisen, wurde die sogenannte IBRAB-Methode (engl. *indirect bridged avidin-biotin*) nach Hsu *et al.* angewendet. Dabei bindet zunächst ein Primärantikörper spezifisch an das Antigen, anschließend binden nacheinander ein Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper und ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC). Avidin bindet Biotin, welches Peroxidase-assoziiert ist und bildet damit eine Brücke zu dem biotinylierten Sekundärantikörper (Abb 3.4). Die Präparate werden schließlich mit einem Peroxidasesubstrat entwickelt (Hsu et al. 1981).

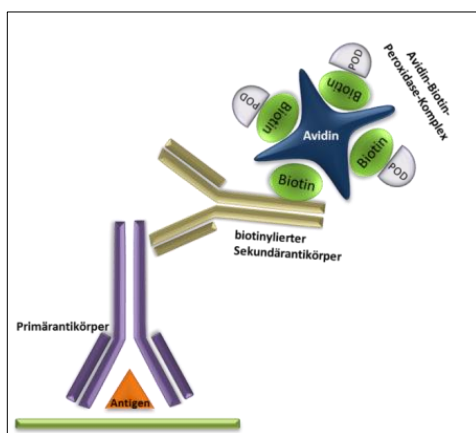


Abbildung 3.4: Modell der IBRAB-Methode nach Hsu *et al.* Erklärung im Text.

Die Präparate mussten zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden entsprechende Schnitte auf Objektträgern in einem Trockenschrank bei 63°C für eine Stunde hitzebehandelt und anschließend nach folgendem Schema über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert:

Reagenz	Zeit
Xylol	2 x 10 min
96 % Ethanol	2 x 2min
80 % Ethanol	2 x 2min
70 % Ethanol	2 x 2min
aqua dest.	10 min

Tabelle 3.2: absteigende Alkoholreihe

Einige Antigene werden durch Proteinquervernetzungen, entstanden durch Formalinfixierung und Paraffineinbettung, immuninaktiv und können nicht mehr durch einen Antikörper gebunden werden. Zur Demaskierung dieser Vernetzungen wurden die Schnitte anschließend in einem Dampfgarer für 20 min gekocht und für eine Stunde in Citratpuffer langsam abgekühlt. Nach kurzem Waschen mit demineralisiertem Wasser und TBS-T wurden die Schnitte mit dem Dako

Pen eingekreist und mit Normalserum (1:5 in H₂O) oder, je nach Sekundärantikörper, in TBS/12 % BSA für 20 min blockiert um unspezifische Bindungen zu verhindern. Für den RNase 7 Primärantikörper war es nötig, zusätzlich für 20 min mit Roti®-ImmunoBlock (1:10 in H₂O) zu blockieren, da es bei diesem Antikörper sonst häufig zu unspezifischen Bindungen kam oder die Signalstärke zu gering war. Nach dem Blockieren wurde der Primärantikörper in seiner vorgegebenen Verdünnung in TBS/1 % BSA auf die Präparate pipettiert und die Objektträger bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Die Negativkontrollen wurden in der Blockierungslösung gelassen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal für 3 min mit TBS-T gewaschen und anschließend der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper, verdünnt in TBS/1 % BSA dazu pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde der ABC-Komplex nach Herstellerangaben angesetzt und für mindestens 20 min zur Komplexbildung bei RT stehen gelassen. Nach erfolgter Inkubation wurde zweimal für 3 min mit TBS-T gespült und danach der ABC-Komplex für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde NovaRED Peroxidase hinzugegeben und maximal 4 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in TBS-T gewaschen und die Gegenfärbung mit Hämalaun und nachfolgendem siebenminütigem Bläuen mit Leitungswasser durchgeführt. Zum Abschluss wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und eingedeckelt. Die Ergebnisse der Färbung wurden mittels inversem Mikroskop und Kamera dokumentiert und gespeichert.

Reagenz	Zeit
70% Ethanol	2 x 10 min
96 % Ethanol	2 x 2min
Xylol	2 x 2min

Tabelle 3.3: aufsteigende Alkoholreihe

3.2.1.9 Antimikrobieller Test

Um zu überprüfen, ob ein AMP wirksam bestimmte Bakterien oder Pilze abtötet, wurde ein Antimikrobieller Test (AMT) durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst der zu testende Keim, hier PAK, zur Reinheitskontrolle auf eine Blutagarplatte fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Von dieser Platte wurden drei Kolonien in 8 ml TSB Flüssigkultur überimpft und über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde der Keim in verschiedenen Mengen zwischen 10 und 100 µl erneut in 8 ml TSB überimpft und solange inkubiert, bis eine der Verdünnungen die OD₆₀₀ von 0,2 erreicht hatte. NaPP/1 %TSB/0,05 %BSA Natriumphosphat-Puffer (NaP) 10⁻⁵fach verdünnt. Die zu testenden Substanzen (rekombinante RNase 7 (1 µg/µl), RNase 7 Antikörper,

irrelevanter Antikörper und Kallus (12 mg in NaP umgepuffert, pH = 7,2) wurden in gewünschter Konzentration in 25 µl NaP verdünnt und zu den 25 µl Bakteriensuspension gegeben. Es wurden jeweils Dreifachansätze hergestellt. Für die Wachstumskontrolle wurde eine 0 h und eine 3 h Kontrolle angelegt, dazu wurden je 25 µl NaP mit 25 µl der Bakteriensuspension versetzt und bei 37°C inkubiert (bei 0 h direkt ausplattiert). Nach erfolgter Inkubation wurden zu jedem Ansatz 200 µl NaP pipettiert und gemixt und je dreimal 50 µl auf TSB Agarplatten ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C. Nach 24 h erfolgte das Auszählen der koloniebildenden Einheiten (CFU) mit einem Koloniezählgerät.

3.2.2 Proteinnachweisanalysen

3.2.2.1 Sandwich-ELISA

Der Enzymgekoppelte Immunadsorptionstest bzw. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist eine Nachweismethode für Proteine, sowie Viren, Hormone und Toxine mit Hilfe spezifischer Antikörper durch einen Farbumschlag. Sie wurde 1971 von Engvall und Perlmann entwickelt (Engvall and Perlmann 1971).

Der sogenannte Sandwich-ELISA beruht auf dem Prinzip, das Antigen von zwei spezifischen Antikörpern, einem Fang- („capture“) und einem enzymgekoppelten (meist Merrettichperoxidase, „enzyme-linked“) Detektionsantikörper („detection“) binden zu lassen, es entsteht der sogenannte Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Die Quantifizierung erfolgt dann anschließend über die Bindung eines zum Enzym passenden, chromogenen Substrates, was in Folge zu einem Farbumschlag führt (Berg et al. 2002).

Der TNF α ELISA wurde entsprechend der Herstellerangaben nach Protokoll durchgeführt. Der RNase 7 und der hBD-2 ELISA wurde in unserem Labor selbst etabliert. Zur Durchführung des RNase 7 und hBD-2 ELISAs wurde zunächst eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit einer 1:3000 Verdünnung des spezifischen RNase 7-Antikörpers (hBD-2-Antikörper 1:500) in 0,05 M Natriumcarbonatpuffer zu jeweils 50 µl pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation erfolgte ein Blockierungsschritt zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit einer 1 %igen bovinen Serumalbumin Lösung (BSA) in PBS zu je 200 µl Volumen pro Vertiefung für eine Stunde bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (WP) wurden je Loch 50 µl der zu testenden Zellkulturüberstände gegeben, zusätzlich wurde vom zu messendem Antigen eine Standard-Konzentrationsreihe (rekombinante RNase 7: 0,3 bis 40 ng/ml; rekombinantes hBD-2: 0,078 bis 10 ng/ml verdünnt im entsprechenden Medium der Zellkulturüberstände) aufgetragen. Proben und Standards, bei

denen eine Verdünnung erforderlich war, wurden immer in Natriumphosphatpuffer/1 % BSA Lösung verdünnt. Die Platte wurde anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Platteninhalt verworfen und erneut dreimal mit WP gewaschen und anschließend mit, im Waschpuffer 1:7500 verdünntem, biotinyliertem RNase 7 Antikörper (hBD-2-Antikörper 1:2500) für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS. Nachfolgend wurde pro Loch 50 µl Peroxidase-konjugierter Avidin-Komplex, 1:10000 in WP verdünnt, für 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte ein abschließendes dreimaliges Waschen und die Zugabe von 100 µl des Substrates Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS). Der Farbumschlag wurde durch Messung der Extinktion bei 405 nm quantifiziert. Mittels Microsoft Excel® wurden die Mittelwerte aus Mehrfachansätzen der Extinktionen ermittelt. Aus den Standard-Konzentrationen wurde die lineare Regressionsgerade errechnet, aus denen sich der Proteingehalt der einzelnen Werte in ng/ml ergab.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 mRNA-Isolation

Die mRNA aus Keratinozyten wurde mit dem Reagenz Crystal RNAmagic nach Herstellerangaben, nach der sogenannten *single-step*-Methode von Chomczynski und Sacchi, isoliert. Das eingesetzte Reagenz lysiert die Zellen und das enthaltene Phenol löst die RNA aus dem Lysat. Durch Ausschütteln mit Chloroform und anschließender Zentrifugation kommt es zu einer Phasentrennung. Es bilden sich drei unterschiedlich gefärbte Phasen: oben klar (RNA), in der Mitte weiß (Protein), unten rot (DNA). Isopropanol fällt aus der klaren, wässrigen Phase die mRNA und nach zweimaligem Waschen mit Ethanol liegt die RNA als Pellet vor (Chomczynski and Sacchi 1987).

Das Pellet wurde in 16 µl pro Probe einer 24-Loch-Platte bzw. für 3D-Haut pro Häutchen in 30 µl destilliertem H₂O aufgenommen und die RNA-Konzentration und Reinheit bei einer Absorption von 260 nm und 280 nm bestimmt.

3.2.3.2 Erststrang-cDNA-Synthese

Mittels einer reversen Transkriptase wird zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese ist einzelsträngig.

Die Reaktion erfolgte mittels PrimeScript™ RT Reagent Kit nach Angaben des Herstellers. Für einen Reaktionsansatz wurde 0,5 µg RNA benötigt. Zu dieser wurde 2 µl Reaktionspuffer, welcher bereits dNTP (10 mM) und RNase-Inhibitor (40 U/µl) enthielt, 0,5 µl Oligo (dT) Primer (20 mM) und 0,125 µl PrimeScript RT gegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Synthese erfolgte im Thermocycler. Zunächst erfolgte ein Inkubationsschritt für 5 min bei 65°C, anschließend erfolgte die 30 minütige Synthese bei 42°C und abschließender Inkubation bei 85°C für 5 min. Die Proben wurden auf 4°C abgekühlt und mit 40 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt, dies entspricht einer Konzentration von 10 ng/µl cDNA. Die cDNA Proben wurden zur Lagerung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) interkaliert bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green in die PCR-Produkte. Dies ermöglicht die Detektion und Quantifizierung der Amplifikate in Echtzeit. Da die Fluoreszenz proportional zur entstandenen PCR-Produktmenge ansteigt, kann man die Expressionsraten spezifischer Gene miteinander vergleichen.

Zur Durchführung einer qPCR wurde zunächst ein Reaktionsansatz von 9 µl pro zu messender cDNA hergestellt. Dazu wurden jeweils 5,2 µl Premix (SYBR® Premix Ex Taq™ II), 3 µl RNase freies H₂O und jeweils 0,4 µl der genspezifischen Primer (10 µM, forward und reverse), je nach Menge der zu messenden Proben, in 96-Loch-PCR-Platten oder 8er PCR Streifen pipettiert. Anschließend wurde pro Loch 1 µl der zu messenden cDNA (10 ng) gegeben, die Platte mit Folie bzw. die Streifen mit Deckeln luftdicht verschlossen und für 1 min bei 200 g zentrifugiert. Die Genamplifikation wurde im „StepOne Plus Real-Time PCR System“ nach einem Zweischritt-*touchdown*-Programm durchgeführt:

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

Um unspezifische PCR-Produkte auszuschließen, wurden diese anschließend durch schrittweises Erhitzen von 60°C auf 95°C und 15 sekundiger Fluoreszenzmessungen, durch die Erstellung einer Schmelzkurve überprüft. Durch Heruntertitration von cDNA mit ausreichender

Expressionsmenge wurde für jedes Primerpaar im Vorfeld eine Standardkurve erstellt und die Regression mit in die Auswertung einbezogen. Als interner Standard wurde ein in Epithelzellen konstant exprimiertes, nicht reguliertes, sogenanntes „Housekeeping-gene“ eingesetzt, das ribosomale Protein L38 (RP38). Die Auswertung der qPCR erfolgte anschließend mittels Microsoft Excel®, dabei wurde der Quotient aus Standardtranskriptionslevel und des gemessenen Gens gebildet und es ergab sich die relative mRNA Expression. Statistische Analysen erfolgten mittels GraphPad Prism Software.

4 Ergebnisse

4.1 RNase 7 wird konstitutiv in den oberen Schichten der Haut exprimiert

Um darzustellen in welchen Schichten der humanen Haut RNase 7 exprimiert wird, wurden immunhistochemische Untersuchungen in einem *ex vivo* Hautexplantat und einem 3D-Hautäquivalent gemacht. Die deutliche Färbung des *Stratum corneum* und zum Teil des *Stratum granulosum* zeigt die konstitutive RNase 7 Expression in der Haut (Abb 4.1).

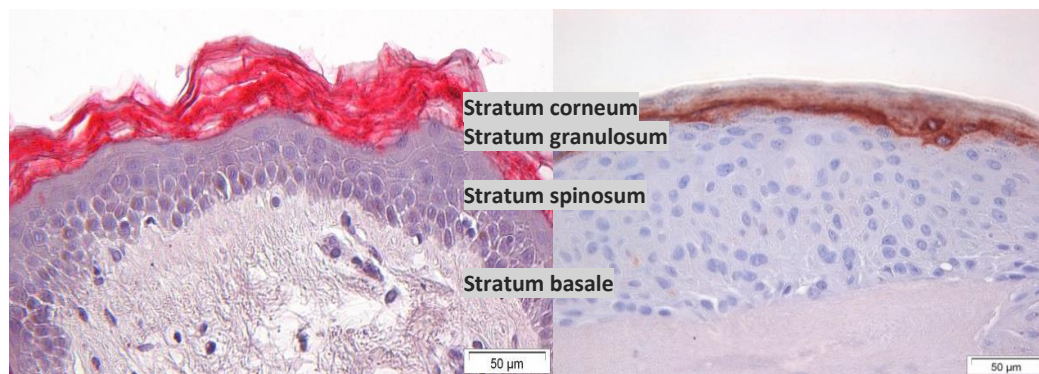


Abbildung 4.1: RNase 7 wird konstitutiv im *Stratum corneum* und *Stratum granulosum* humaner Haut exprimiert. Gezeigt ist die immunhistochemische Färbung mit RNase 7 spezifischem Antikörper eines *ex vivo* Hautexplantats (links) und eines 3D Hautäquivalentes (rechts), angezchtet aus primären humanen Keratinozyten (NHEK). Dargestellt ist die Aufnahme mit dem inversen Mikroskop Olympus IX50 in 200facher Vergrößerung.

4.2 RNase 7 wirkt antimikrobiell gegen *Pseudomonas aeruginosa*

RNase 7 gilt als die dominante RNase der Haut und als sehr potentes AMP. Bisher konnte diese potente antimikrobielle Aktivität mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, wie *S. aureus* oder *E. coli*, sowie Hefen wie *Candida albicans* (Harder and Schröder 2002), gezeigt werden. Um zu überprüfen, in welcher Konzentration RNase 7 antimikrobiell aktiv gegenüber dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) agiert, wurde ein antimikrobieller Test (AMT) mit rekombinanter RNase 7 durchgeführt. RNase 7 hemmt *P. aeruginosa* bereits in geringer Konzentration (2,5 µg/ml) vollständig in seinem Wachstum (Abb 4.2).

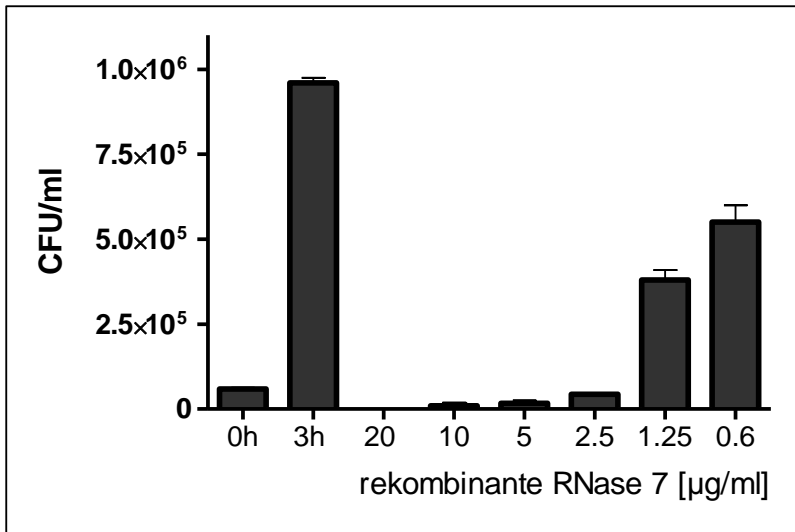


Abbildung 4.2: Rekombinante RNase 7 hemmt das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* dosisabhängig. *P. aeruginosa* wurde für 3 h mit verschiedenen Konzentrationen (0,6, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$) rekombinanter RNase 7 inkubiert. Als Vehikel wurde 0,01 %ige HAC eingesetzt. Anschließend wurden Triplikate aus 50 μl Ansätzen auf TSB-Agarplatten ausplattiert, über Nacht inkubiert und schließlich die CFU ausgezählt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativen Experiment.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die antimikrobielle Wirkung von rekombinanter RNase 7 auf *P. aeruginosa* durch RNase 7-spezifische Antikörper hemmen lässt. Dabei konnte deutlich signifikant belegt werden, dass spezifische RNase 7 Antikörper in der Lage sind, die antimikrobielle Aktivität der RNase 7 zu hemmen und das Wachstum von *P. aeruginosa* folglich nicht mehr beeinflusst wird (Abb 4.3 A). Da, wie bereits einleitend erwähnt, RNase 7 vorrangig im *Stratum corneum* humaner Haut exprimiert wird und von Harder *et al.* aus *Stratum corneum*-Extrakt isoliert wurde, wurde der Versuch mit *Stratum corneum*-Extrakt (Kallus) anstelle von RNase 7, unter Einsatz des RNase 7 blockierenden Antikörpers wiederholt (Harder and Schröder 2002, Köten et al. 2009). Der Versuch zeigte, dass RNase 7 so dominant in Kallus vorkommt, dass der antimikrobielle Effekt auf das Wachstum von *P. aeruginosa* deutlich wurde und diese Wachstumshemmung signifikant durch den RNase 7-spezifischen Antikörper aufgehoben werden konnte (Abb 4.3 B).

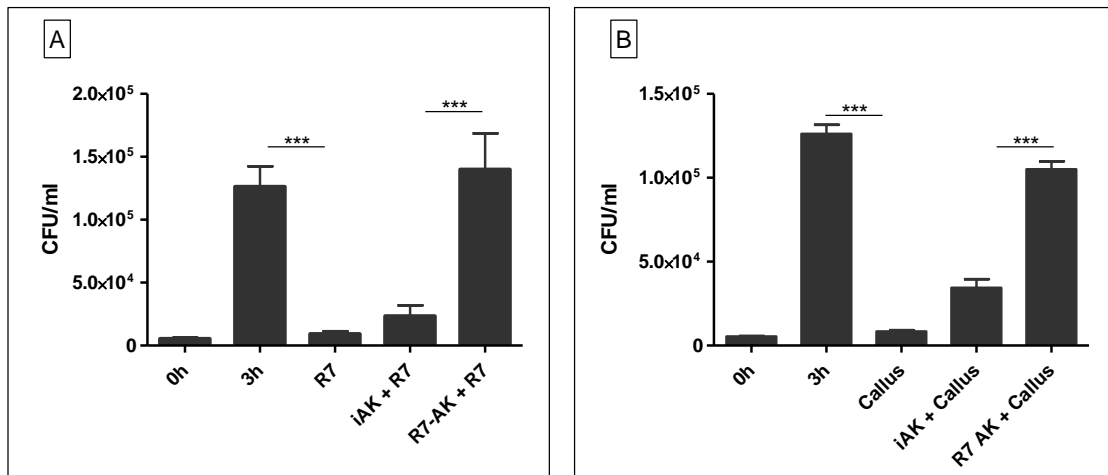


Abbildung 4.3: RNase 7 im *Stratum corneum* hemmt das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* wurde für 3 h mit A) 5 µg/ml rekombinanter RNase 7 und B) 5 µl Kallus, 12 mg umgepuffert in NaPP, sowie mit 0,1 mg/ml des spezifischen RNase 7 blockierenden Antikörpers und als negative Kontrolle mit 0,1 mg/ml eines irrelevanten Antikörpers inkubiert. Als Vehikel wurde 0,01 % HAc eingesetzt. Anschließend wurden Triplikate aus 50 µl Ansätzen auf TSB-Agarplatten ausplattiert, über Nacht inkubiert und schließlich die CFU ausgezählt. Daten sind Mittelwerte ±SEM aus Triplikaten von vier unabhängigen Experimenten. (***) $p < 0.001$ Student's t-Test).

Es konnte dargestellt werden, dass RNase 7, welche variabel in Konzentrationen von circa 4 bis 63 µg/ml (ermittelt durch ELISA, Daten nicht gezeigt) im humanen *Stratum corneum* vorkommt, das Wachstum von *P. aeruginosa* signifikant hemmt. Der RNase 7 blockierende Antikörper war in der Lage, die im *Stratum corneum* vorkommende RNase 7 zu inhibieren, so dass diese das Wachstum von *P. aeruginosa* nicht mehr inhibieren konnte (Abb 4.3 B).

4.3 Regulation der RNase 7 Expression

4.3.1 RNase 7 wird durch *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberstände induziert

Nachdem dargestellt werden konnte, dass RNase 7 antimikrobiell aktiv gegen *P. aeruginosa* wirkt, stellte sich die Frage, ob *P. aeruginosa* selbst, beziehungsweise sezernierte Produkte von *P. aeruginosa* die RNase 7 Expression induzieren. Um dies experimentell zu zeigen wurden postkonfluente, primäre, humane Keratinozyten (NHEK) mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen (PAK) stimuliert (Abb 4.4).

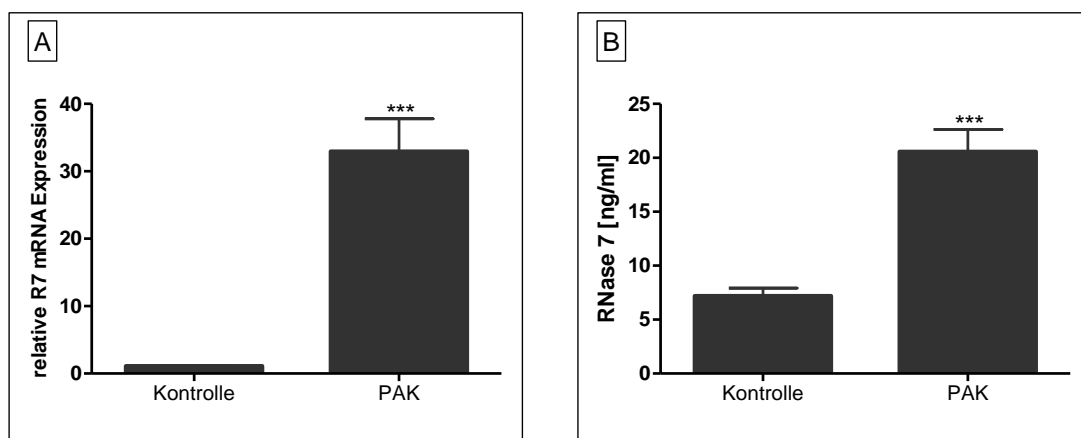


Abbildung 4.4: *Pseudomonas aeruginosa* Bakterienkulturüberstände induzieren RNase 7 Expression in primären Keratinozyten. Postkonfluente NHEK wurden mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen (PAK) im Verhältnis 1:10 in Minimalmedium (KGM2 --) für 18-24 h stimuliert. Als Vehikel wurde Kontrollüberstand eingesetzt. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RNase 7 mRNA Expression A) und die RNase 7 Proteinkonzentration B) durch RNase 7 ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von fünf unabhängigen Experimenten (***) $p < 0.001$ Student's t-Test).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die RNase 7 mRNA Expression (Abb 4.4 A), als auch die RNase 7 Proteinexpression (Abb 4.4 B) durch die Stimulation mit Bakterienkulturüberständen von *P. aeruginosa* induziert werden konnte. Auch lebende *P. aeruginosa* induzierten RNase 7 sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene (Daten nicht gezeigt), da Bakterienkulturüberstände aber signifikant RNase 7 Expression induzieren konnten, ist davon auszugehen, dass *P. aeruginosa* lösliche Faktoren sezerniert und in den Überstand abgibt, folglich also nicht leben muss, deshalb haben wir im weiteren Verlauf für „Monolayer“-Zellkulturversuche nur Bakterienkulturüberstände von *P. aeruginosa* eingesetzt. Lediglich für Versuche mit 3D-Hautäquivalenten und humanen Hautexplantaten wurden lebende *P. aeruginosa* verwandt, da mit diesen Modellen *in vivo* Bedingungen simuliert werden sollten.

4.3.2 Beteiligung des EGFR bei der Induktion der RNase 7 Expression

Bisher gibt es keinen eindeutigen Aufschluss über die genaue Regulation der RNase 7 Expression in Keratinozyten und welche Signalwege dabei eine Rolle spielen. Die Regulation der Induktion von RNase 7 durch *Pseudomonas aeruginosa* sollte im Folgenden näher untersucht werden.

4.3.2.1 RNase 7 Expression wird durch EGFR-Liganden in Keratinozyten induziert

Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren wie EGF (engl. *epidermal growth factor*) oder TGF α (engl. *transforming growth factor alpha*) in der Lage sind RNase 7 zu induzieren (Wanke et al. 2011). Dies sind Liganden, welche zunächst als membrangebundene Vorläuferproteine vorliegen und erst nach Spaltung („Shedding“) durch Metalloproteasen an den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) binden (Higashiyama and Nanba 2005). Der EGFR ist ein Transmembranprotein, welches eine extrazelluläre Ligandenbindungs-Domäne besitzt. Die Bindung der spezifischen, aktivierten Liganden führt zur Aktivierung des EGFR und folglich zum Auslösen der EGFR-Signalkaskade über Autophosphorylierungen (Bergin et al. 2008, Dicomillo et al. 2002). Wachstumsfaktoren werden u.a. bei Verwundung freigesetzt, die anschließende Induktion von AMP lässt vermuten, dass dem EGFR-Signalweg eine wichtige Rolle bei der kutanen Abwehr zuteilwird. Für hBD-3 wurde die Regulation über den EGFR-Signalweg bereits beschrieben (Sörensen et al. 2003).

Zunächst wurden NHEK mit HB-EGF (engl. *heparin-binding EGF-like growth factor*) und TGF α stimuliert. Untersuchungen der mRNA Expression der AMP ergaben eine deutlich signifikante, 20fache Induktion von RNase 7 und sogar eine 60fache Induktion von hBD-3. HBD-2, für das die Regulation über NF- κ B beschrieben wurde (Wehkamp et al. 2004), wurde hingegen nicht durch einen EGFR-Liganden induziert (Abb 4.5 A). Ebenso konnte dies auf Proteinebene im ELISA gezeigt werden. RNase 7 wurde signifikant exprimiert, hBD-2 hingegen nicht (Abb 4.5 B und C).

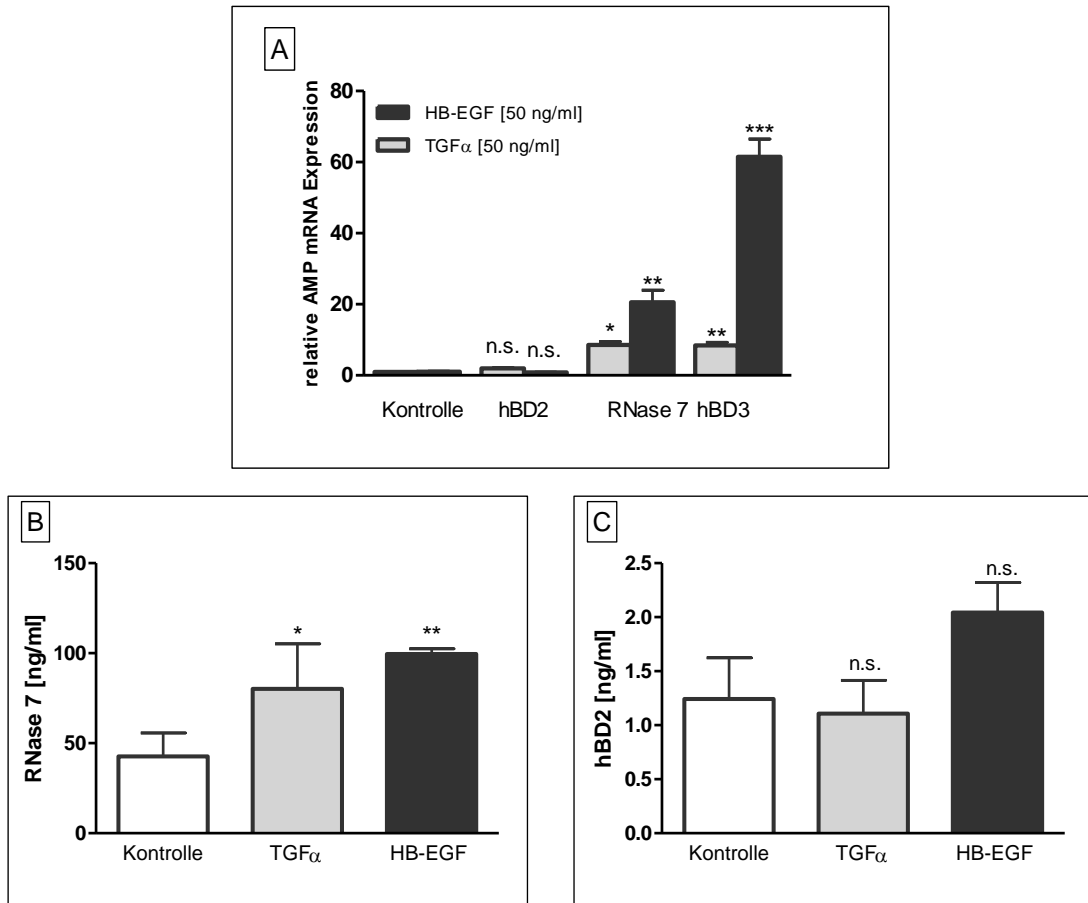


Abbildung 4.5: hBD-3 und RNase 7 werden durch EGFR-Liganden in humanen Keratinozyten induziert. Postkonfluente NHEK wurden mit TGF α oder HB-EGF (jeweils 50 ng/ml) in Minimalmedium (KGM2 $-/+$) für 20 h stimuliert. Als Vehikel wurde H₂O / 0.1% BSA verwendet. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative AMP mRNA Expression A) und die AMP-Proteinkonzentration B) und C) durch ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von zwei unabhängigen Experimenten (n.s. = nicht signifikant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Student's t-Test).

4.3.2.2 Eine EGFR-Blockade hemmt die *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression in Keratinozyten

Wir postulierten nun, wenn EGFR-Aktivierung eine Rolle bei der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression spielen könnte, müssten spezifische EGFR-Inhibitoren oder -Antikörper zu einer Verminderung dieser Expression führen. Deshalb wurden im nächsten Schritt NHEK mit PAK-Überständen stimuliert, zusätzlich wurden Keratinozyten gemeinsam mit PAK-Überständen und dem spezifischen EGFR-Antikörper Cetuximab beziehungsweise dem potenten EGFR-Inhibitor AG1478, ein Tyrosin-Kinase Inhibitor, inkubiert. Diese Stimulationsexperimente zeigten eine deutlich, signifikante Verminderung der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression durch Hemmung des EGFR, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abb 4.6 A und B).

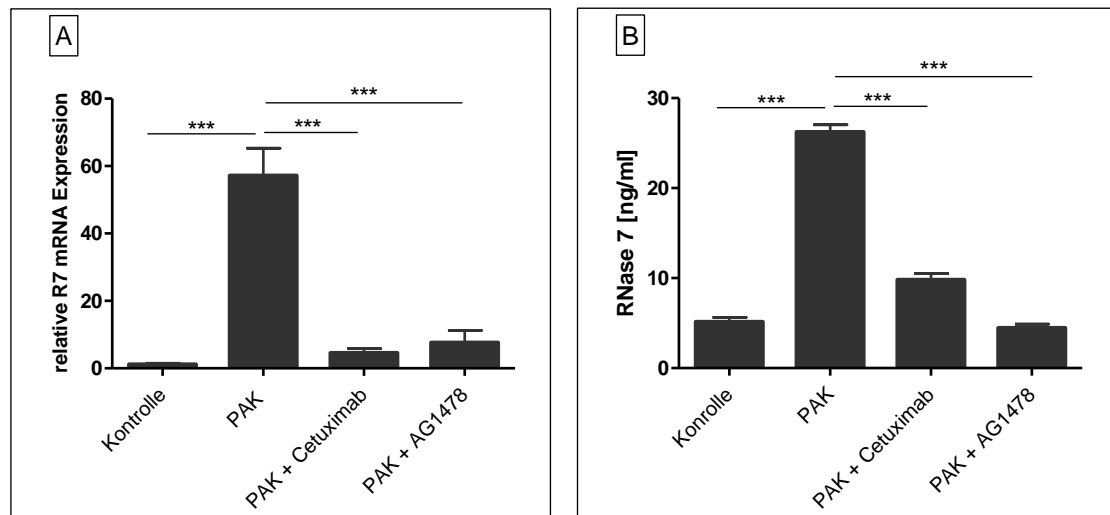


Abbildung 4.6: Die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression in Keratinozyten ist vom EGFR abhängig. Postkonfluente NHEK wurden mit PAK-Überständen im Verhältnis 1:10 verdünnt in Minimalmedium (KGM2 -+), sowie gemeinsam mit Cetuximab (20 µg/ml) oder AG1478 (10 µM) für 20 h stimuliert. Als Vehikel wurde NaCl für Cetuximab und DMSO für AG1478 verwendet. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RNase 7 mRNA Expression A) und die RNase 7 Proteinkonzentration B) durch ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte ±SEM aus Triplikaten von einem repräsentativem Experiment (***) $p < 0.001$ one-way ANOVA mittels der Tukey-Methode).

4.3.2.3 EGFR-Inaktivierung durch Cetuximab hemmt die *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression in 3D-Hautäquivalenten und *ex vivo* Hautexplantaten

Um zu analysieren, inwieweit die Ergebnisse aus den „Monolayer“-Zellkulturversuchen übertragbar auf eine stratifizierte Epidermis, wie einem dreidimensionalen (3D-) Hautäquivalent, sind, wurden 3D-Hautäquivalente mit lebenden *P. aeruginosa* und dem spezifischen

EGFR-Antikörper Cetuximab über Nacht stimuliert. Zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen wurde als Kontrolle ein irrelevanter Antikörper eingesetzt.

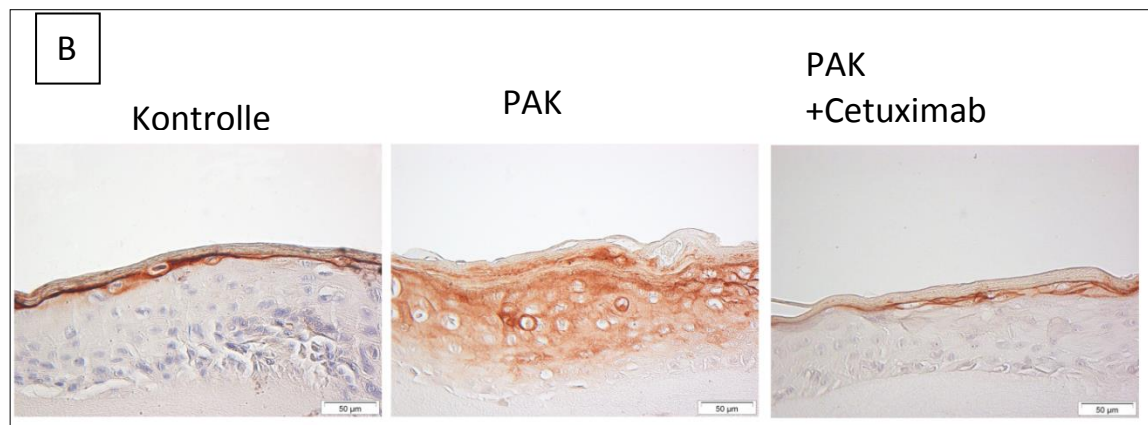
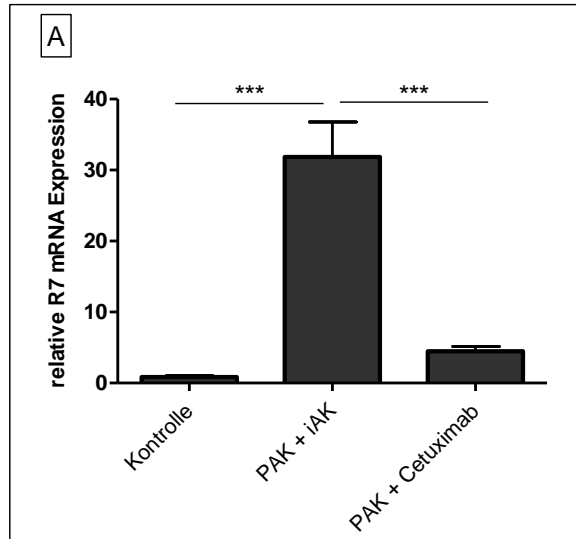


Abbildung 4.7: Die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression in 3D-Hautäquivalenten wird durch EGFR-Blockade inhibiert. 3D-Hautäquivalente wurden mit lebenden PAK ($1,4 \times 10^4$ CFU/20 μ L), sowie gemeinsam mit Cetuximab (20 μ g/ml) für 20 h inkubiert. Als Vehikel wurde ein irrelevanter Antikörper verwendet. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RNase 7 mRNA Expression (A) bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten (***) $p < 0.001$ Student's t-Test). Die RNase 7-Proteinexpression (B) wurde mittels immunhistochemischer RNase 7-Färbung repräsentativ von einem 3D-Hautäquivalent dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression auch in stratifizierter Epidermis durch Cetuximab gehemmt werden konnte (Abb 4.7 A und B). Letztendlich wurden *ex vivo* Hautexplantate für dieses Experiment herangezogen, um Analysen mit natürlicher Haut durchzuführen. Dabei konnten die vorangegangenen Ergebnisse in „Monolayer“- und 3D-Hautäquivalent-Experimenten bestätigt werden (Abb 4.8 A und B).

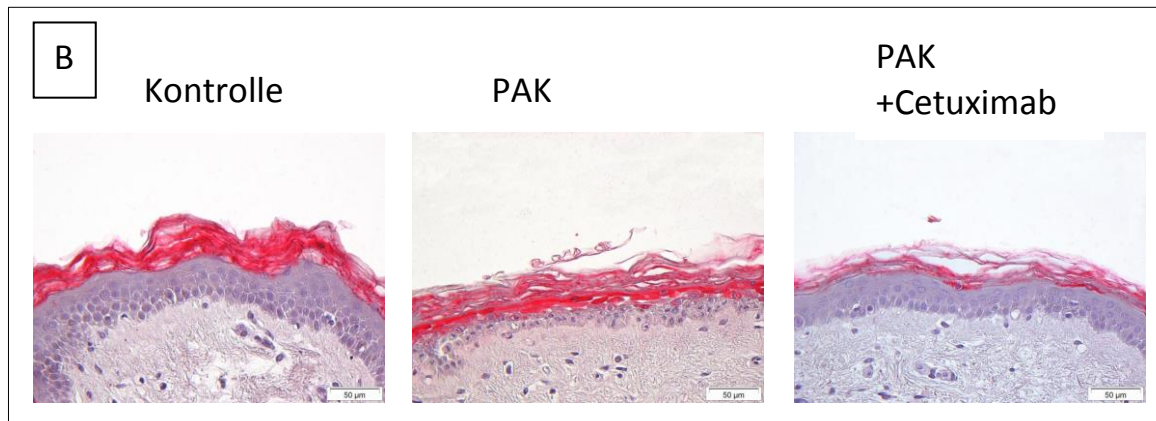
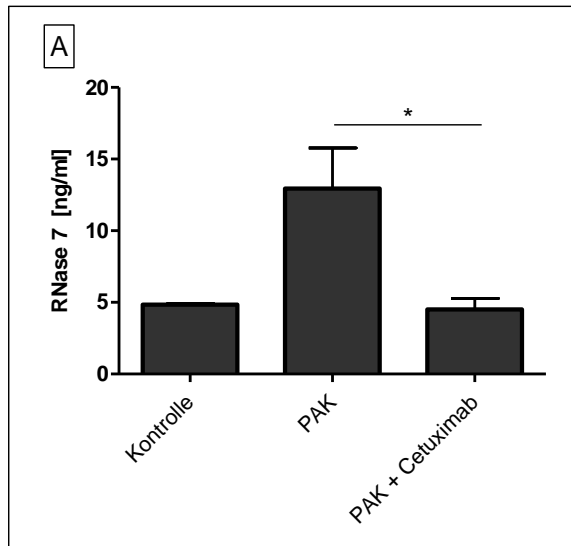


Abbildung 4.8: Die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression in einem *ex vivo* Hautexplantat wird durch EGFR-Blockade herunterreguliert. Ein *ex vivo* Hautexplantat wurde mit lebenden PAK ($7,9 \times 10^6$ CFU/ml), sowie gemeinsam mit Cetuximab (20 µg/ml) für 44 h inkubiert. Als Vehikel wurde NaCl für Cetuximab verwendet. Anschließend wurde mittels ELISA die RNase 7 Proteinkonzentration A) bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Duplikaten von einem repräsentativem Experiment (* $p < 0.05$ Student's t- test). Die RNase 7-Proteinexpression B) wurde mittels immunhistochemischer RNase 7-Färbung dargestellt.

4.3.2.4 *P. aeruginosa*-vermittelte AMP Induktionen werden unterschiedlich reguliert

Wie bereits erwähnt wurde für hBD-2 die Regulation über NF- κ B beschrieben (Wehkamp et al. 2004). Für hBD-3 wurde die Regulation über den EGFR-Signalweg von Sørensen *et al.* beschrieben (Sørensen et al. 2003). Um zu überprüfen, ob *P. aeruginosa* auch in der Lage ist weitere AMP zu induzieren und ob dem EGFR-Signalweg bei dieser Induktion eine Rolle zuteilwird, wurden die mit lebenden *P. aeruginosa* und dem spezifischen EGFR-Antikörper Cetuximab stimulierten 3D-Hautäquivalente auf hBD-2- und hBD-3-Induktion untersucht. Sowohl hBD-3 (Abb 4.9 A) als auch hBD-2 (Abb 4.9 B) wurden durch *P. aeruginosa* induziert, jedoch nur

die hBD-3-Induktion konnte signifikant durch den Einsatz des spezifischen EGFR-Antikörpers Cetuximab inhibiert werden. Die hBD-2-Induktion ließ sich nicht signifikant hemmen (Abb 4.9 B).

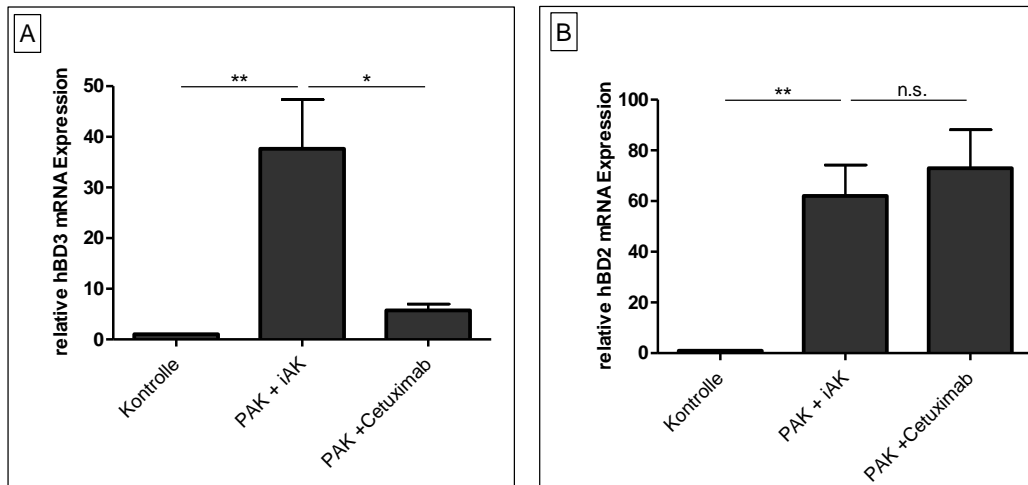


Abbildung 4.9: Die *P. aeruginosa*-vermittelte hBD-2- und hBD-3-Expressionen in 3D-Hautäquivalenten werden unterschiedlich reguliert. 3D-Hautäquivalente wurden mit lebenden PAK ($1,4 \times 10^4$ CFU/20 μ L), sowie gemeinsam mit Cetuximab (20 μ g/ml) für 20 h inkubiert. Als Vehikel wurde ein irrelevanter Antikörper verwendet. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative hBD-2 A) und hBD-3 B) mRNA Expression bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten (n.s. = nicht signifikant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ one-way ANOVA mittels der Tukey-Methode).

4.3.2.5 Metalloproteasen sind an *P. aeruginosa*-vermittelter EGFR-Aktivierung beteiligt

Um den EGFR zu aktivieren, müssen seine Liganden zuvor aktiviert werden. Dies erfolgt über Metalloproteasen wie ADAM17, welche als „Sheddasen“ ihre Substrate ektodermal prozessieren und aktivieren. So sind die Liganden dann in der Lage an den EGFR zu binden und die Signalkaskade auszulösen (Ockenga et al. 2014). Um die EGFR-Aktivierungsbeteiligung von Metalloproteasen zu bestätigen wurden NHEK mit PAK-Überständen stimuliert, zusätzlich gemeinsam mit PAK-Überständen und dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM). Aus diesen Stimulationsexperimenten resultierte eine signifikante Beteiligung von Metalloproteasen bei der PAK-induzierten RNase 7 Expression in Keratinozyten. Die *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant durch den Einsatz von Marimastat gehemmt (Abb 4.10 A und B).

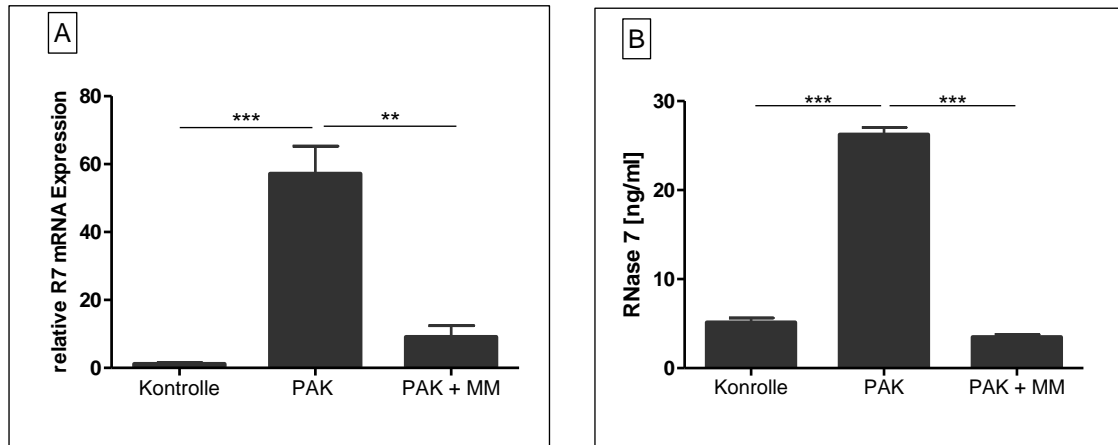


Abbildung 4.10: Die *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression wird durch Marimastat gehemmt. Postkonfluente NHEK wurden mit PAK-Überständen im Verhältnis 1:10 verdünnt in Minimalmedium (KGM2 --), sowie gemeinsam mit Marimastat (10 μ M) für 24 h stimuliert. Als Vehikel wurde DMSO verwendet. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RNase 7 mRNA Expression A) und die RNase 7 Proteinkonzentration B) durch ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativen Experiment (**p < 0.01; ***p < 0.001 Student's t-Test).

4.3.2.6 *P. aeruginosa* vermittelt über ADAM17 und EGFR-Aktivierung RNase 7 Expression in Keratinozyten

Es gibt verschiedene Metalloproteasen die als „Sheddasen“ für EGFR-Liganden proteolytisch aktiv sind. Diese sind vorrangig Mitglieder der Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen, den sogenannten ADAMs (engl. *a disintegrin and metalloprotease*). Am intensivsten untersucht wurden bisher ADAM10 und ADAM17 (Bergin et al. 2008, Higashiyama and Nanba 2005), wobei für ADAM17 bereits eingängig beschrieben wurde, dass es regulativ auf den EGFR einwirkt, indem es die Liganden nach Bedarf offeriert (Sunnarborg et al. 2002). Aufgrund dieser Tatsache wurden NHEK mit ADAM17-spezifischer siRNA transfiziert, wobei ein „Knock Down“ von 63 % erzielt werden konnte (Abb 4.11 A). Die Zellen wurden anschließend mit PAK-Überständen über Nacht stimuliert. Die signifikante Herunterregulation der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression, bestätigte die Beteiligung von ADAM17 bei der EGFR-Signalwegaktivierung (Abb 4.11 B und C).

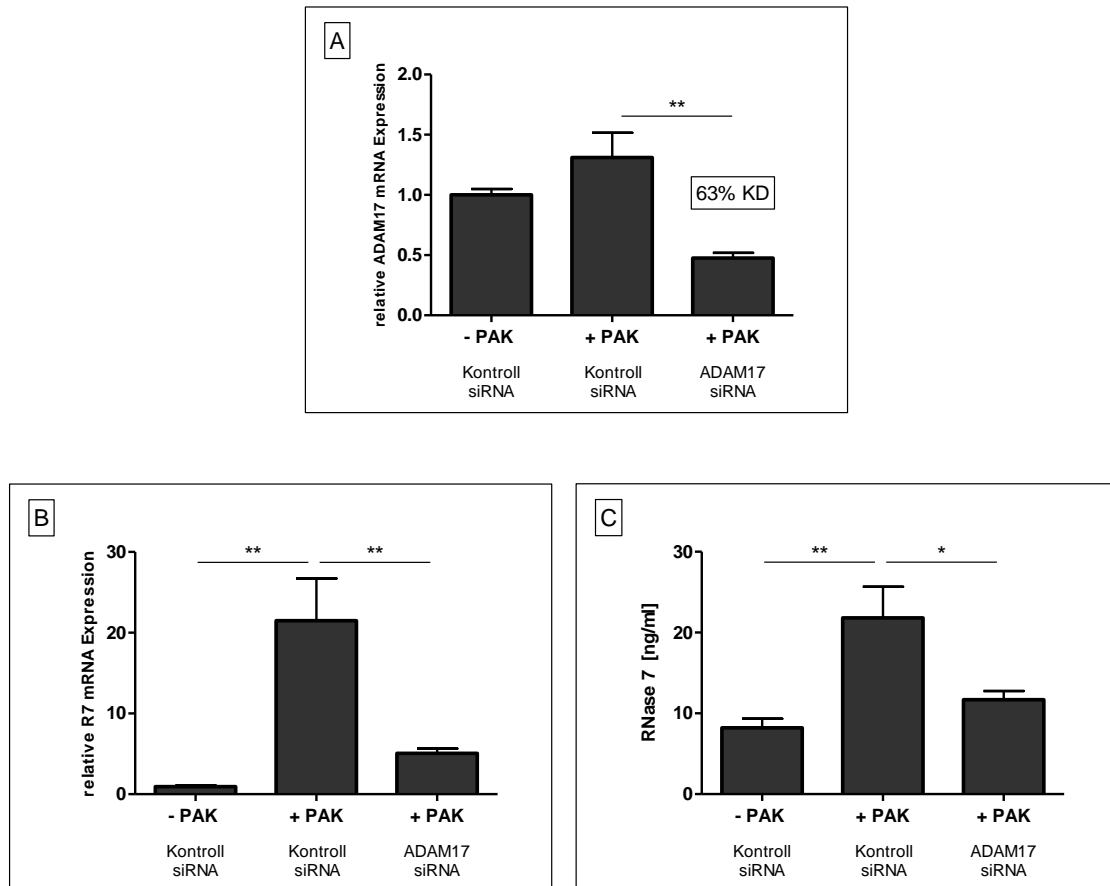


Abbildung 4.11: An der Regulation der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression ist die Metalloprotease ADAM17 beteiligt. NHEK wurden mit ADAM17-spezifischer siRNA in KGM2 (-/-) transfiziert, woraus ein „KnockDown“ von 63 % resultierte A). Die Zellen (etwa 100 % konfluent) wurden mit PAK-Überständen im Verhältnis 1:10, verdünnt in Minimalmedium (KGM2 -/-), für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RNase 7 mRNA Expression A) und die RNase 7 Proteinkonzentration B) durch ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von zwei unabhängigen Experimenten (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ Student's t-Test).

4.3.2.7 TLR5 ist an der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression in Keratinozyten beteiligt

Es wurde bereits für bronchiale Epithelzellen beschrieben, dass das von *P. aeruginosa* sezernierte Flagellin eine Toll-like Rezeptor 5 (TLR5) Aktivierung vermittelt und daraus resultierend der EGFR transaktiviert wird (Yu et al. 2012, Koff et al. 2008). Um zu überprüfen, ob TLR5 auch bei der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression in Keratinozyten beteiligt ist, wurden NHEK mit PAK-Überständen und einem spezifischen TLR5-Antikörper stimuliert, welches in einer signifikanten Reduktion der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase7-Expression resultierte (Abb 4.12 A und B). Um dieses Ergebnis zu manifestieren, wurden NHEK außerdem mit TLR5-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend mit PAK-Überständen stimuliert. Dieses Experiment konnte die Ergebnisse mit dem anti-TLR5-Antikörper bestätigen. Nach

Herunterregulation der TLR5-Genexpression konnte nach Stimulation mit PAK-Überständen eine signifikante Abnahme der RNase 7 Expression gemessen werden (Abb 4.12 E und D).

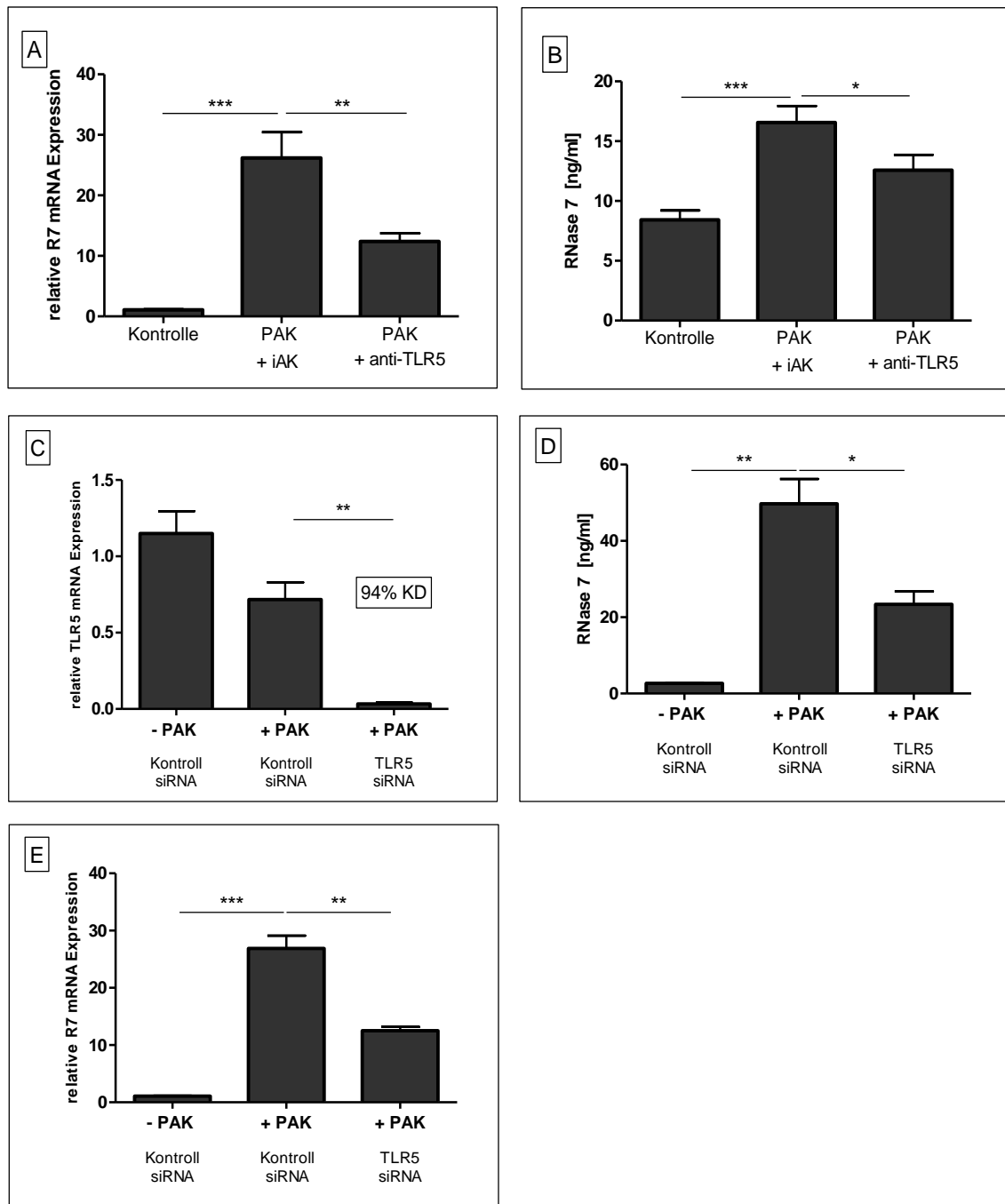


Abbildung 4.12: Die *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression wird durch TLR5-Antikörper und TLR5-spezifische siRNA negativ beeinflusst. Postkonfluente NHEK wurden mit PAK-Überständen im Verhältnis 1:10 stimuliert, verdünnt in Minimalmedium (KGM2 --), allein oder in Gegenwart eines anti-TLR5-Antikörpers für 24 h stimuliert A), B). 70 - 80 % konfluente NHEK wurden mit TLR5-spezifischer siRNA in KGM2 (--) transfiziert, woraus ein „KnockDown“ von 94 % resultierte C). Die Zellen (etwa 100 % konfluent) wurden mit PAK-Überständen im Verhältnis 1:10, verdünnt in Minimalmedium (KGM2 --), für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RNase 7 mRNA Expression A), E) und die RNase 7 Proteinkonzentration B), D) durch ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von zwei unabhängigen Experimenten (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Student's t-Test).

Aus der Tatsache, dass TLR5 auch an der Signaltransduktion von *P. aeruginosa*-vermittelter RNase 7 Expression beteiligt ist, war zu vermuten, dass das von *P. aeruginosa* sezernierte Flagellin dabei der entscheidende Faktor ist. Es ist bekannt, dass bakterielles Flagellin den TLR5-Signalweg aktiviert, da TLR5 als PRR (engl. *pattern recognition receptor* = Mustererkennungszepreptor) in der Lage ist über seine extrazelluläre LRR (engl. *leucine-rich repeats*) die sogenannten PAMPs (engl. *pathogen-associated molecular patterns*) binden kann. Das Flagellin von *P. aeruginosa* ist ein PAMP, das vom TLR5 erkannt werden kann und dann über Aktivierung von MyD88 (engl. *myeloid differentiation factor 88*) zur Signaltransduktion über NF- κ B führt (Tallant et al. 2004, Haney and Frederick 2014). Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden NHEK mit PAK-Überständen und PAK Δ fliC-Überständen stimuliert. PAK Δ fliC ist eine Flagellin-defiziente *P. aeruginosa*-Mutante. Wenn also Flagellin einer der entscheidenden Faktoren für die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression in Keratinozyten ist, war beim Einsatz der Mutante keine RNase 7 Expression zu erwarten.

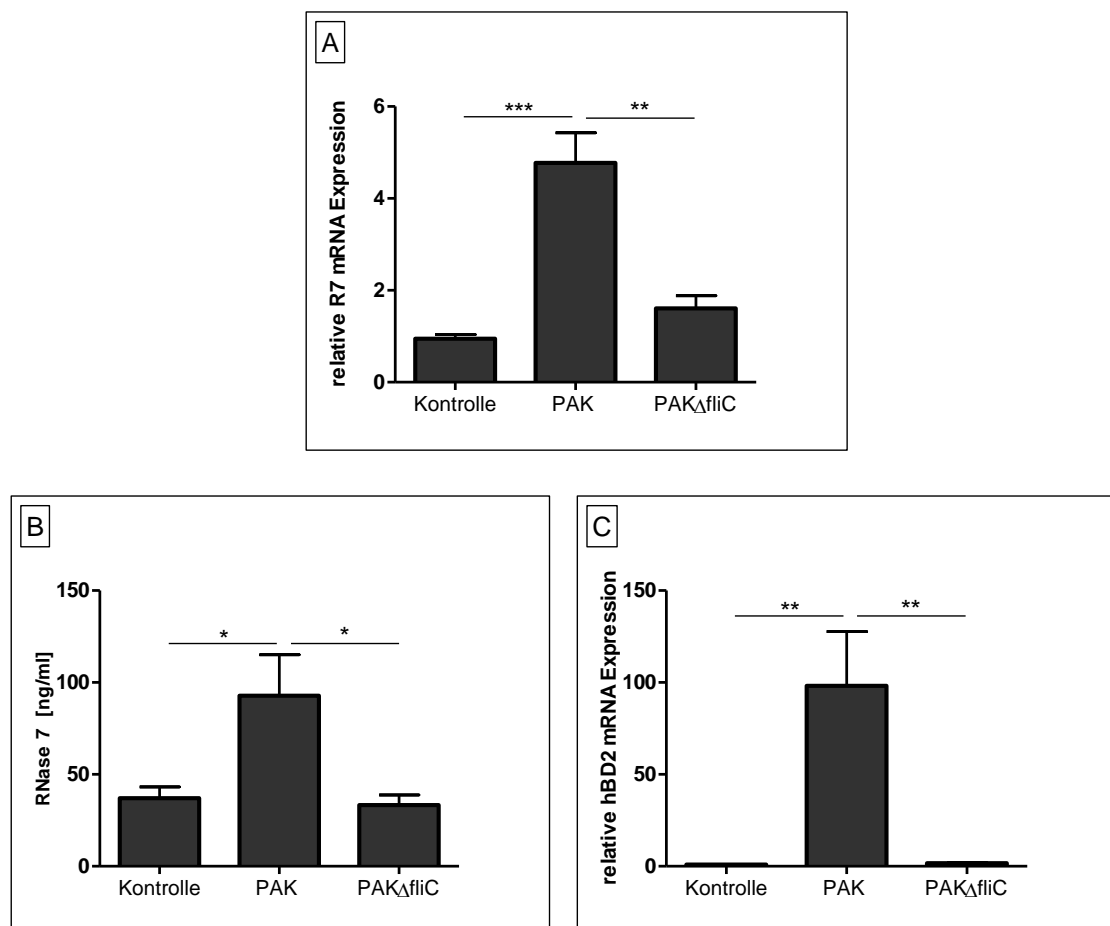


Abbildung 4.13: Die *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression ist Flagellin-abhängig. Postkonfluente NHEK wurden mit PAK- und PAK Δ fliC-Überständen im Verhältnis 1:10, verdünnt in Minimalmedium (KGM2 -+), für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RNase 7 A) und hBD-2 C) mRNA Expression und die RNase 7 Proteinkonzentration B) durch ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von zwei unabhängigen Experimenten (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Student's t-Test).

Abbildung 4.13 A und B zeigen, dass RNase 7 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durch PAK-Überstände induziert wurde. Durch PAK Δ fliC-Überstände konnte nahezu keine RNase 7 Expression mehr detektiert werden, was daraufhin deutet, dass das Flagellin von *P. aeruginosa* entscheidend für die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression ist. Für hBD-2 wurde bereits eine NF- κ B-vermittelte Signaltransduktion beschrieben (Wehkamp et al. 2004). Demnach war zu erwarten, dass hBD-2 nur von dem PAK-Überstand induziert wird und nicht von der Flagellin-defizienten Mutante. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die mit PAK- und PAK Δ fliC-Überständen stimulierten NHEK auf hBD-2-Induktion untersucht. hBD-2 wurde durch PAK-Überstände induziert und wie postuliert, war keine Induktion bei den NHEK, die mit PAK Δ fliC-Überständen stimuliert waren, detektierbar (Abb 4.13 C).

Da die Aktivierung von NF- κ B nach Aktivierung von TLR5 über MyD88-Aktivierung verläuft und es nun von Interesse war ob auch dieser Signalweg bei der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression von Bedeutung ist, wurden NHEK mit MyD88-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend mit PAK-Überständen stimuliert.

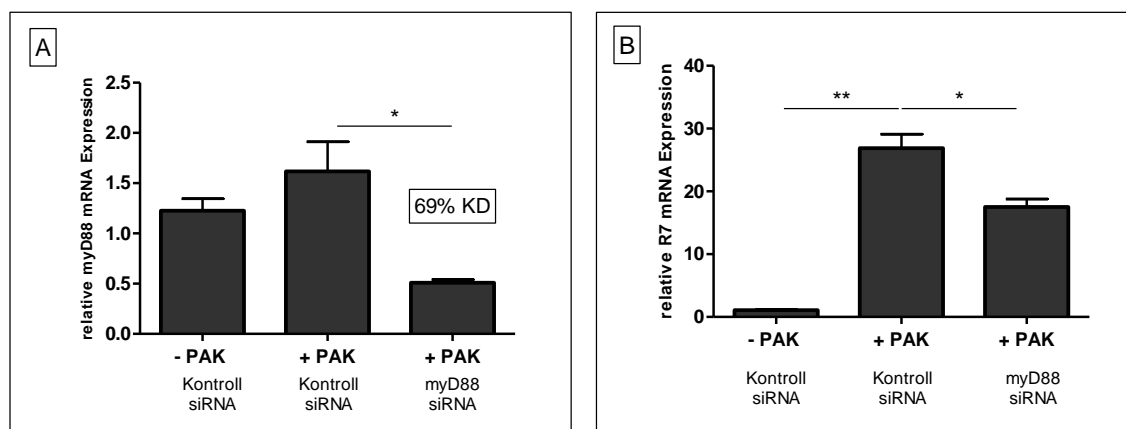


Abbildung 4.14: Die *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression wird durch MyD88-spezifischer siRNA negativ beeinflusst. NHEK wurden mit MyD88-spezifischer siRNA in KGM2 (-/-) transfiziert, woraus ein „KnockDown“ von 69 % resultierte A). Die Zellen (etwa 100 % konfluent) wurden mit PAK-Überständen im Verhältnis 1:10, verdünnt in Minimalmedium (KGM2 -/-), für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative MyD88 A) und RNase 7 B) mRNA Expression bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativem Experiment (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ Student's t-Test).

Die gezielte Herunterregulation von MyD88 mittels siRNA Transfektion resultierte in einem „KnockDown“ von 69 % (Abb 4.14 A). Nach Stimulation mit PAK-Überständen konnte eine signifikante Reduktion der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7-Expression ermittelt werden (Abb 4.14 B).

Um noch genauer Aufschluss über eine Signalwegsbeteiligung von TLR5 - MYD88 - NF- κ B bei der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression in Keratinozyten zu bekommen, wurden NHEK mit einem Luziferase gekoppeltem NF- κ B-Plasmid transfiziert und anschließend mit PAK-Überständen und gemeinsam mit dem EGFR-spezifischen Antikörper Cetuximab stimuliert.

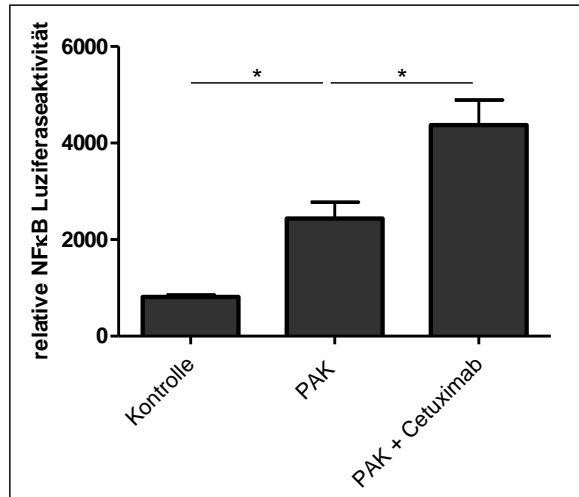


Abbildung 4.15: Die NF- κ B-Luziferaseaktivität wird durch Inhibition des EGFR verstärkt. NHEK wurden mit einem NF- κ B luciferase-Plasmid in KGM2 (-/-) transfiziert, phRG-TK *Renilla* Luziferase-Vektor wurde als Kontrollvektor kotransfiziert. Es erfolgte ein Mediumwechsel auf KGM2 (+/-) nach sechs Stunden. Die Zellen (etwa 90 % konfluent) wurden nach 48 h mit PAK-Überständen im Verhältnis 1:10, verdünnt in Minimalmedium (KGM2 +/-), sowie gemeinsam mit Cetuximab (20 μ g/ml) für 20h inkubiert. Anschließend wurde mittels „Dual-Luciferase-Kit“ und dem TD20/20 Luminometer die Lumineszenz gemessen. Die relative Luziferaseaktivität wurde durch Abgleich mit dem Kontrollvektor bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativem Experiment (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ Student's t-Test).

Die NF- κ B-Luziferaseaktivität nahm signifikant mit Inhibition des EGFR zu, was zeigt, dass beide Signalwege an der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase7-Expression beteiligt sind.

4.4 Die Bedeutung von RNase 7 für die Wundheilung

Harder *et al.* konnten bereits zeigen, dass die RNase 7 Expression bei *in vivo* Barrierestörungsversuchen, durch Mikroläsionen mittels der sogenannten „Tape-Stripping-Methode“ signifikant nach einer Stunde zunimmt (Harder et al. 2010). Lai *et al.* haben gezeigt, dass bei Hautverwundung entstehende, nekrotische Keratinozyten, mittels freigesetzter RNA, umgebende Keratinozyten aktivieren können und es durch Aktivierung von beispielweise TLR3 zu einer gesteigerten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-6 kommt (Lai et al. 2009). Gläser *et al.* konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* darstellen, dass UVB Strahlung zur Induktion von AMP führt (Gläser et al. 2009). Die erhöhte Freisetzung von RNase 7 nach Hautverwundungen und UVB Bestrahlung, lassen vermuten, dass RNase 7 in der Lage ist den Wundheilungsprozess durch Degradation der bei Verwundung freigesetzten RNA zu beeinflussen.

Um zu überprüfen, ob RNase 7 Einfluss auf die Wundheilung hat wurden NHEK mit rekombinanter und natürlicher RNase 7 sowie einer RNase 7-Mutante, welche keine Ribonuklease-Aktivität mehr besitzt (Köten et al. 2009), stimuliert um anschließend die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine zu messen. Leider gestalteten sich diese Versuche zunächst etwas schwierig, da keine bzw. nur qualitativ sehr schlechte RNA nach Stimulation und RNA Isolierung zu erhalten war. Nach Ausschluss aller möglichen Fehlerquellen konnten wir feststellen, dass RNase 7 nach Abnahme des Mediums, in ihrer Funktion als RNase, die RNA der NHEK degradierte (Abb 4.16). Dementsprechend war es zwingend nötig direkt nach Abnahme des Mediums, dass guanidiniumthiocyanat-haltige Lyseagenz Crystal RNAmagic auf die Zellen zu geben und diese zu lysieren, nur so konnte eine qualitativ gute mRNA Ausbeute erzielt werden.

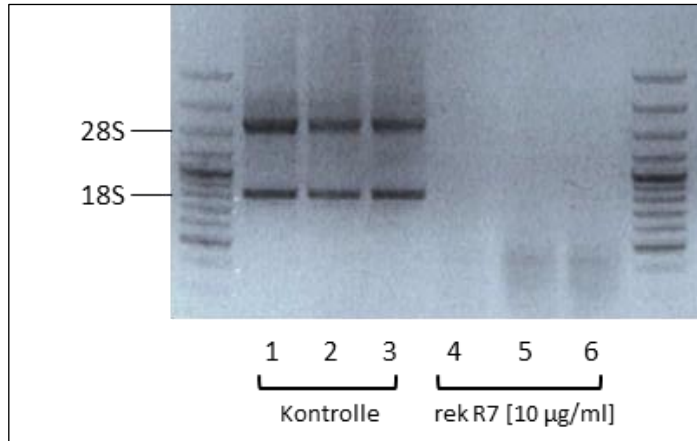


Abbildung 4.16: RNase 7 degradiert die RNA von NHEK nach Stimulation. Das RNA Agarosegel zeigt isolierte mRNA aus NHEK, welche zuvor mit rekombinanter RNase 7 stimuliert wurden und nicht direkt mit dem guanidiniumthiocyanat-haltigem Lysereagenz zur RNA Isolation lysiert wurden, sowie unstimulierte NHEK (Kontrolle).

Nachdem mRNA isoliert und revers transkribiert werden konnte, wurde die Induktion des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin 8 (IL-8) ermittelt. Wie in Abbildung 4.17 dargestellt, konnte eine signifikante Herunterregulation der IL-8 Genexpression detektiert werden, wenn NHEK mit RNase 7, sowohl natürlich als auch rekombinant, stimuliert wurden. Die zur Überprüfung der Hypothese eingesetzte RNase 7-Mutante erzielte diese Herunterregulation nicht, was darauf schließen lässt, dass die Ribonuklease-Aktivität der RNase 7 für diese Negativregulierung verantwortlich ist.

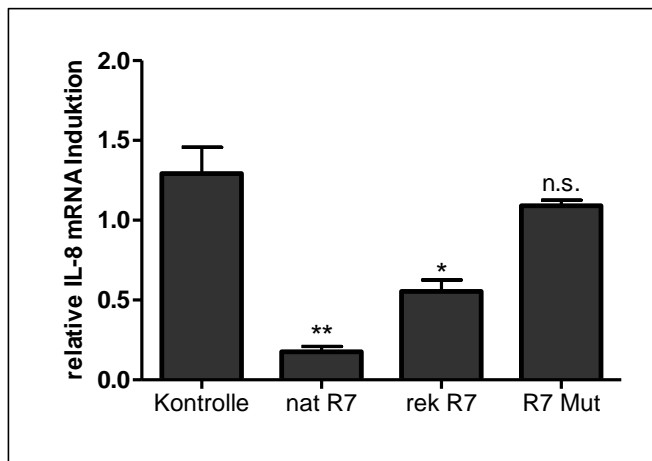


Abbildung 4.17: RNase7 hat Einfluss auf die Induktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8. Postkonfluente NHEK wurden mit 10 µg/ml natürlicher und rekombinanter RNase 7 und der RNase 7-Mutante in KGM2 (-/-) für 20 h inkubiert. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative IL-8 mRNA Expression bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativen Experiment (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s. = nicht signifikant Student's t-Test).

Im Rahmen von Verwundung der Haut kommt es zur Freisetzung von RNA. Um zu überprüfen, ob dabei auch RNase 7 Expression induziert wird und ob diese einen Einfluss auf die freigesetzte

RNA hat wurden NHEK mit poly I:C, einem Stimulus der strukturell analog zu doppelsträngiger RNA ist und als TLR3 Aktivator bekannt ist (Lai et al., 2009), stimuliert und nachfolgend die RNase 7 Expression gemessen (Abb 4.18). Außerdem wurde gleichzeitig mit natürlicher RNase 7 und poly I:C, einem RNA Strukturanalogen, stimuliert um zu analysieren inwieweit RNase 7 Einfluss auf poly I:C-vermittelte Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF α , hat (Abb 4.19).

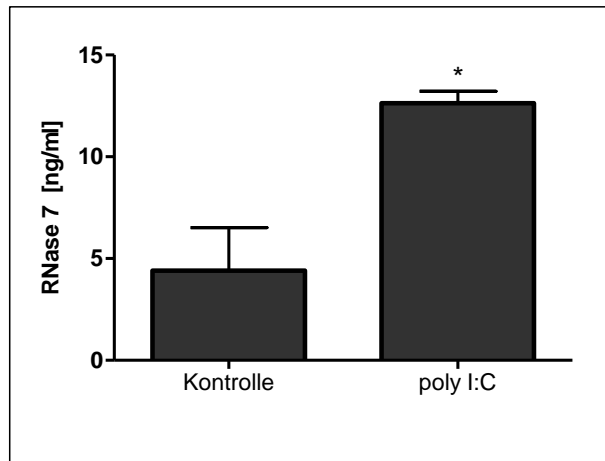


Abbildung 4.18: Poly I:C hat Einfluss auf die Induktion von RNase 7 Expression. Postkonfluente NHEK wurden mit 10 μ g/ml poly I:C in KGM2 (-+-) für 20 h inkubiert. Anschließend wurde mittels ELISA die RNase7 Proteinkonzentration bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativem Experiment (* $p < 0.05$ Student's t-Test).

Die Stimulation mit poly I:C führte zu einer erhöhten Sekretion von RNase 7 in den Keratinozyten.

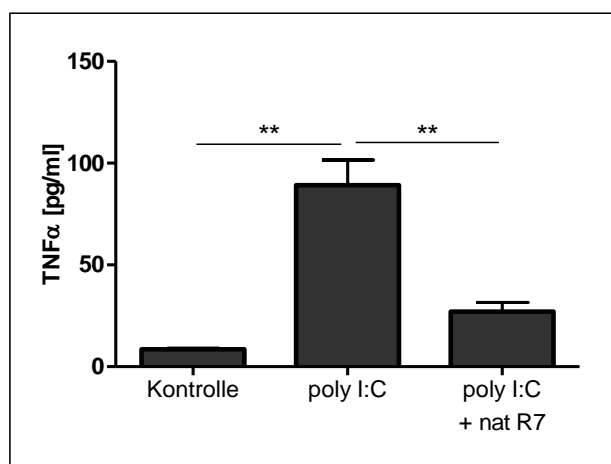


Abbildung 4.19: RNase 7 beeinflusst die poly I:C induzierte TNF α Expression. NHEK wurden mit 100 ng/ml poly I:C in KGM2 (-+-), sowie gemeinsam mit 100 ng/ml natürlicher RNase 7, für 19 h inkubiert. Anschließend wurde mittels ELISA die TNF α Proteinkonzentration bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativem Experiment (** $p < 0.01$ Student's t-Test).

Wie erwartet führte die Stimulation von Keratinozyten mit poly I:C auch zu einer erhöhten Freisetzung von TNF α , welche durch gleichzeitige Stimulation mit RNase 7 aufgehoben wurde, da RNase 7 poly I:C degradieren kann und damit keine TNF α Expression mehr induziert werden konnte (Abb 4.19).

Um den endogenen Einfluss von RNase 7 zu analysieren, wurden NHEK mit RNase 7-spezifischer siRNA behandelt. Diese gezielte Herunterregulation resultierte in einem hohen „KnockDown“ von 95 % der RNase 7 Expression (Abb 4.20 A). Durch anschließende Stimulation mit poly I:C sollte die TNF α Expression untersucht werden.

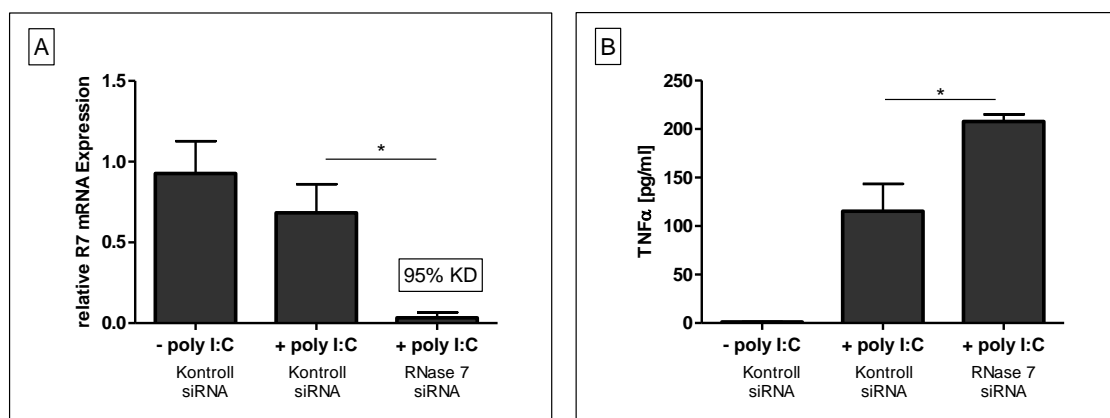


Abbildung 4.20: Die poly I:C-induzierte TNF α Expression wird durch RNase7-spezifische siRNA positiv beeinflusst. NHEK wurden mit RNase 7-spezifischer siRNA in KGM2 (-+-) transfiziert, woraus ein „KnockDown“ von 95 % resultierte A). Die Zellen (etwa 80 % konfluent) wurden mit poly I:C (100 ng/ml), verdünnt in Minimalmedium (KGM2 -+-), für 22 h stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RNase 7 mRNA Expression A) und die TNF α Proteinkonzentration B) durch ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativen Experiment (* $p < 0.05$ one-way ANOVA mittels der Tukey-Methode).

Es konnte gezeigt werden, dass reduzierte RNase 7 Expression zu einer erhöhten TNF α Expression nach Stimulation mit poly I:C führt (Abb 4.20 B). Dies veranschaulicht, dass RNase 7, mit der Funktion als RNase zu agieren, in der Lage ist, die RNA-induzierte Aktivierung von Keratinozyten zu regulieren.

Wie einleitend erwähnt kann der RI RNase 7 binden und inaktivieren. Deshalb wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob eine Herunterregulierung des RI durch spezifische siRNA einen Einfluss auf die poly I:C-induzierte TNF α Expression hat.

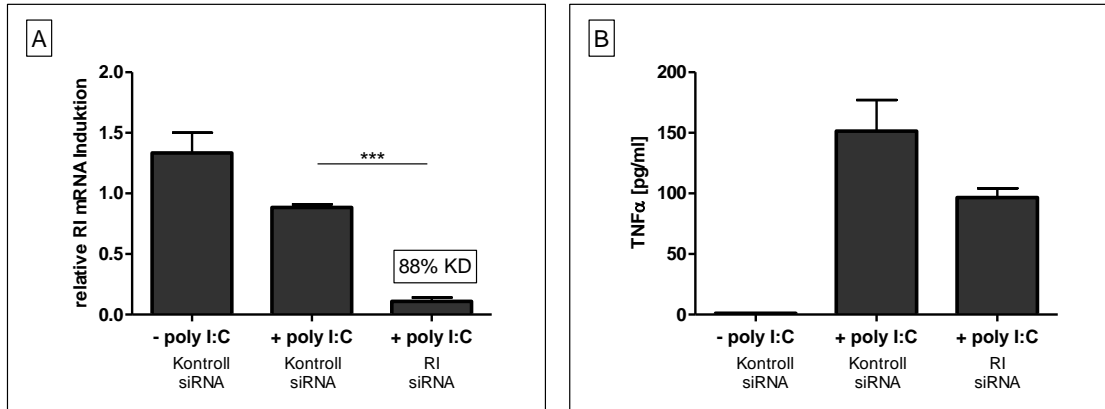


Abbildung 4.21: Die poly I:C-induzierte TNF α Expression wird durch RI-spezifische siRNA negativ beeinflusst. NHEK wurden mit RI-spezifischer siRNA in KGM2 (-+/-) transfiziert, woraus ein „KnockDown“ von 88 % resultierte A). Die Zellen (etwa 90 % konfluent) wurden mit poly I:C (100 ng/ml), verdünnt in Minimalmedium (KGM2 -+/-), für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die relative RI mRNA Expression A) und die TNF α Proteinkonzentration B) durch ELISA bestimmt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus Triplikaten von einem repräsentativen Experiment (***) $p < 0.001$ Student's t-Test)

Die gezielte Herunterregulation des RI durch spezifische siRNA resultierte in einem „KnockDown“ von 88 % (Abb 4.21 A). Nach Stimulation mit poly I:C konnte eine verringerte Freisetzung von TNF α in mit RI-siRNA behandelten NHEK detektiert werden (Abb 4.21 B).

5 Diskussion

In dieser Arbeit war es Ziel, einen Einblick in die Regulation der *Pseudomonas aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Induktion hinsichtlich verschiedener Signaltransduktionsmechanismen zu bekommen. Stimulationsversuche mit lebenden *P. aeruginosa* und *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen in „Monolayer“-NHEK-Kulturen, 3D-Hautäquivalenten und *ex vivo* Hautexplantaten ergaben eine deutliche Induktion der RNase 7 Expression. Anhand spezifischer Inhibitoren, Antikörper und siRNAs konnte eine Beteiligung des EGFR-Signalweges gezeigt werden. Ebenfalls konnte durch Antikörper und RNA-Interferenz-Versuche dargestellt werden, dass die Signalvermittlung über TLR5 an dieser Regulation beteiligt ist. Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass RNase 7 in der Funktion als Ribonuklease durch Degradation von RNA einen Einfluss auf die Wundheilung haben könnte. RNase 7 nimmt somit eine wichtige Rolle in der kutanen Abwehr ein.

5.1 Regulation der RNase 7 Expression

RNase 7 ist die dominante RNase der Haut. Sie wurde ursprünglich von Harder *et al.* aus humanen Hautschuppen isoliert (Harder and Schröder 2002). Des Weiteren wird RNase 7 in vielen weiteren Geweben zum Teil stark exprimiert (Harder and Schröder 2002, Spencer et al. 2011, Schuster et al. 2013). Immunhistochemische Untersuchungen der Haut ergaben die höchste Expression von RNase 7 in den oberen Schichten, dem *Stratum corneum* und dem *Stratum granulosum*. Dies ergaben auch Untersuchungen früherer Studien bei fetaler Haut des zweiten Schwangerschafts-Trimesters und der Haut von Patienten mit Atopischer Dermatitis und Psoriasis (Köten et al. 2009, Schuster et al. 2013, Harder et al. 2010). Die abundante, permanente Expression von RNase 7 in der humanen Haut führte zu der Hypothese, dass RNase 7 eine wichtige Rolle beim Schutz der Haut vor Infektionen spielen könnte.

Nach bisherigem Kenntnisstand wird die RNase 7 Expression in Keratinozyten, in anderen epithelialen Geweben und dem Urogenitaltrakt über mehrere Signalwege reguliert. RNase 7 kann durch Zytokine wie IL-1 β , IFN γ oder IL-17A sowohl in der Cornea, als auch in nasalem Gewebe, wie auch in Keratinozyten durch Aktivierung von Zytokinrezeptoren induziert werden (Burgey et al. 2016, Mohammed et al. 2011, Simanski et al. 2013). Mohammed *et al.* beschrieben eine IL-1 β -induzierte RNase 7 Expression in der Cornea durch Autophosphorylierung der Kinase TAK1 (engl. *transforming growth factor β -activated kinase-1*) mit anschließender Aktivierung des

MAPK-Signalweges (engl. *mitogen-activated protein kinase*) und darauffolgender Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF2 (Mohammed et al. 2011). Simanski *et al.* konnten zeigen, dass RNase 7, induziert durch IL-17A/IFN γ , über den STAT3-Signalweg reguliert wird (Simanski et al. 2013). Firat *et al.* haben die Induktion der RNase 7 Expression durch den Dermatophyten *Trichophyton rubrum* beschrieben und dabei eine EGFR-Signalwegbeteiligung dargestellt (Firat et al. 2014). Zuvor haben Wanke und Kollegen eine Staphylokokken-vermittelte RNase 7 Induktion gezeigt und dabei zwei beteiligte Signalwege aufgezeigt. Zum einen die *S. epidermidis*-vermittelte Induktion der RNase 7 Expression durch den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und einer gleichzeitigen Aktivierung des EGFR-Signalweges durch EGFR-Ligandenaktivierung und einer Aktivierung von NF- κ B. Zum anderen die *S. aureus*-vermittelte RNase 7 Induktion über den MAPK und Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT Signalweg (Wanke et al. 2011). Kürzlich konnten Eichler *et al.* zeigen, dass die Aktivierung des IGF-1 bei Diabetes mellitus-Patienten nach Insulingabe zu einer Steigerung der RNase 7 Expression im Urogenitaltrakt führt. Auch diese Aktivierung folgt dem PI3K/AKT Signalweg (Eichler et al. 2016). Abbildung 5.1 zeigt einen Überblick über die Regulation der RNase 7 Expression nach bisherigem Kenntnisstand.

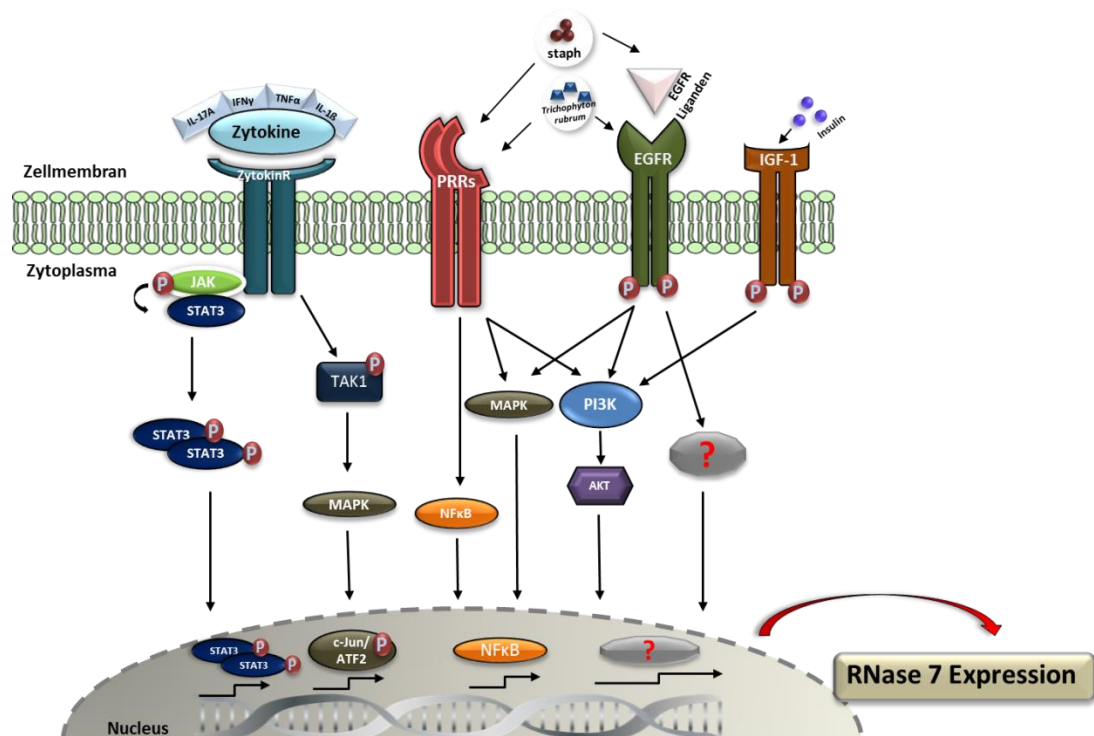


Abbildung 5.1: Regulation der RNase 7 Expression. Die Abbildung zeigt einen Überblick über den bisherigen Kenntnisstand der Regulation der RNase 7 Expression über verschiedene Signalwege durch verschiedene Induktoren. Modifiziert aus (Rademacher et al. 2016)

5.2 *Pseudomonas aeruginosa* und RNase 7

Pseudomonas aeruginosa ist ein Gram-negatives, 2-4 µm langes Stäbchenbakterium welches charakteristisch Flagellen und Pili aufweist (siehe Abbildung 5.2). Es kommt vor allem in Gewässern und im Boden als sogenannter Nasskeim vor. Aufgrund des weiteren Vorkommens in feuchten Milieus wie Sanitäreanlagen, aber auch z.B. Dialysegeräten in Krankenhäusern wird *P. aeruginosa* zu den nosokomialen Keimen gezählt und gefürchtet. Häufig treten *P. aeruginosa*-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten mit Zystischer Fibrose oder AIDS, vor allem als Pneumonien, auf. Des Weiteren ist *P. aeruginosa* häufig verantwortlich für das Auftreten von Urogenitalinfektionen und führt bei chronischen Wunden und akuten Brandwunden aufgrund seiner biofilmbildenden Eigenschaft oft zu starker Eiterbildung. Ein weiteres großes Problem ist die Tatsache, dass *P. aeruginosa* ein breites Spektrum an Antibiotikaresistenzen aufweist, was eine Therapie erschwert (Chiller et al. 2001, Poole 2011, Frank 2012).



Abbildung 5.2: Dreidimensionale Darstellung von *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptiert von (U.S. Centers for Disease Control and Prevention - Medical Illustrator – James Archer - ID#: 16876)

Besonders die Tatsache der hohen Infektiosität und der Multiresistenz gegenüber synthetischen Antibiotika machen *P. aeruginosa* zu einem interessanten Keim in der antimikrobiellen Forschung.

Aus vorangegangenen Daten war bereits bekannt, dass RNase 7 aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften in der Lage ist, *P. aeruginosa* zu eliminieren. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Expression von RNase 7 in Keratinozyten durch *P. aeruginosa* induziert werden konnte (Harder and Schröder 2002). Basierend auf diesen Daten sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Hypothese näher untersucht werden, dass RNase 7 für die kutane Abwehr gegen *P. aeruginosa* eine wichtige Funktion einnimmt. Insbesondere sollten dabei auch die, an der durch *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Induktion in Keratinozyten, beteiligten Signalwege identifiziert werden.

5.2.1 Die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 gegen *Pseudomonas aeruginosa*

RNase 7 ist die dominante RNase der humanen Haut und kommt variabel zwischen 4 und 63 µg/ml im *Stratum corneum* (Daten nicht gezeigt) vor. Harder *et al.* und Zhang *et al.* konnten in ihren Studien zeigen, dass RNase 7 eine starke Ribonuklease-Aktivität aufweist (Harder and Schröder 2002, Zhang *et al.* 2003). Die Funktion als enzymatisch RNA-abbauende RNase hat jedoch keinen Einfluss auf die weitgefächerte antimikrobielle Aktivität von RNase 7, was mittels des Einsatzes von Ribonuklease-Aktivität-defizienten Mutanten gezeigt werden konnte. Die RNase 7-Mutante, ohne Ribonuklease-Aktivität, war weiterhin in der Lage Bakterien abzutöten (Huang *et al.* 2007, Köten *et al.* 2009). Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass RNase 7 selbst in der Lage ist, *P. aeruginosa* bereits in geringen Konzentrationen (2,5 µg/ml) abzutöten. Da RNase 7 eine kationische Nettoladung besitzt, kann man vermuten, dass die Fähigkeit *P. aeruginosa* bei direktem Kontakt zu eliminieren, durch Interaktion mit der anionischen bakteriellen Zellmembran stattfindet. Einige Arbeiten konnten diese Interaktion bereits zeigen. Spencer und Kollegen haben mittels Rasterkraftmikroskopie darstellen können, dass RNase 7 die bakterielle Zellmembran von *P. aeruginosa*, *E. coli*, und *E. faecalis* permeabilisiert und aufbricht (Spencer *et al.* 2013). Die Untersuchungen von Torrent *et al.* zeigten zuvor, dass die antimikrobielle Aktivität von RNase 7 auf elektrostatische Interaktion zurückzuführen ist. Es wurde belegt, dass RNase 7 durch Depolarisation mittels Bindung an die Lipopolysaccharide und dem Peptidoglycan der bakteriellen Zellmembran, von *E. coli* und *S. aureus*, in der Lage ist, diese zu zerstören und die bakterielle DNA frei zu setzen (Torrent *et al.* 2010). Durch Analysen mit SYTOX® Green, einem Reagenz welches in die geschädigte Membran der Bakterienzellwand eindringt und dort mit der freien DNA interkaliert, haben Huang und Kollegen gezeigt, dass RNase 7 die bakterielle Zellmembran innerhalb weniger Minuten, nach Kontakt, permeabilisiert. Sie konnten des Weiteren durch Mutagenese-Versuche mit RNase 7 Mutanten zeigen, dass für die antimikrobielle Aktivität der RNase 7 und auch anderer RNase A Superfamilienmitglieder die gleiche N-terminale Domäne verantwortlich ist. Für RNase 7 wurde gezeigt, dass die Lysin-Reste K1, K3, K111 und K112 für die antimikrobielle Aktivität wichtig sind (siehe auch Abbildung 1.5) (Huang *et al.* 2007). Lin und Kollegen haben spezifisch für *P. aeruginosa* darstellen können, dass RNase 7 das anionische äußere Membranprotein Lipoprotein I (OprI, engl. *outer membrane protein I*) von *P. aeruginosa* durch seine kationischen Strukturen binden kann. Durch diese Bindung kommt es zum Verlust vormals gebundener Fettsäuren und Lipopolysaccharide und zur Internalisierung des OprI/RNase 7-Komplexes in die bakterielle Membran. Diese wird daraufhin permeabel. RNase 7 aggregiert im Zytosol anionische

Nukleinsäuren, welche vermutlich über Kondensation nach außen sekretiert werden. Final kommt es zur Destruktion von *P. aeruginosa* (Lin et al. 2010). Diese Interaktion könnte es *P. aeruginosa* schwierig machen, Resistenzen gegen RNase 7 zu entwickeln.

Die Bedeutung von RNase 7 in der kutanen Abwehr gegen *P. aeruginosa* konnte im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Ein antimikrobieller Test mit *Stratum corneum* Extrakt und dem RNase 7 Antikörper ergab, dass die durch das *Stratum corneum* initiierte Hemmung des *P. aeruginosa* Wachstums durch den neutralisierenden RNase 7 Antikörper fast vollständig aufgehoben werden konnte (siehe Abbildung 4.3). Diese Daten zeigen, dass RNase 7 an der Abwehr von *P. aeruginosa* im *Stratum corneum* maßgeblich beteiligt ist. Folglich ist anzunehmen, dass die Abundanz von RNase 7 in der gesunden Haut, dazu beiträgt, die Kolonisierung von *P. aeruginosa* effizient abzuwehren und mögliche Infektionen zu verhindern. Eine gestörte Hautbarriere, die nicht mehr in der Lage ist RNase 7 adäquat zu exprimieren, könnte ein Grund für die schwerwiegenden *P. aeruginosa* Infektionen bei immunsupprimierten Patienten sein. Diese Fakten machen RNase 7 zu einem wichtigen AMP in der kutanen Abwehr und zu einem Schlüsselpeptid eventueller, neuer Therapieansätze bei schwer behandelbaren *P. aeruginosa* Infektionen.

5.2.2 Induktion der RNase 7 Expression

Ein besonderes Merkmal der AMP ist ihre Induzierbarkeit. Damit schaffen sie es, durch Interaktion mit den ausgesendeten Signalen ihres Gewebes immer dann präsent zu sein, wenn es zu möglichen inflammatorischen Prozessen kommt und können dementsprechend als kleine „Wächter“ gezielt auf diese Gefahr einwirken. Es liegt demnach nahe zu vermuten, dass RNase 7 selbst, nicht nur abundant in der Haut vorkommt, sondern zusätzlich induziert wird, wenn es durch akute, pro-inflammatorische Signale und mikrobielle Bedrohung zu einem schnellen Mehrbedarf in der Haut kommt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die RNase 7 Expression neben pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN γ , IL-17A und IL-1 β (Burgey et al. 2016, Simanski et al. 2013, Mohammed et al. 2011) auch durch Mikroorganismen wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Enterococcus faecium* (Simanski et al. 2010, Köten et al. 2009, Harder and Schröder 2002) oder *Trichophyton rubrum* (Firat et al. 2014) induziert werden kann. Stimulationen von primären Keratinozyten mit lebenden *P. aeruginosa* (Daten nicht gezeigt) und *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen zeigten eine signifikante Induktion der RNase 7 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (siehe Abbildung 4.4).

Diese Daten zeigen eindeutig, dass *P. aeruginosa* selbst in der Lage ist Faktoren zu sezernieren, die RNase 7 induzieren.

5.2.3 Regulation der *Pseudomonas aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression über den EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, ErbB1, engl. *epidermal growth factor receptor*) ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) aus der Familie der ErbB-Rezeptoren. RTK besitzen eine intrinsische Enzymaktivität die durch Ligandenbindung aktiviert wird. Liganden für den EGFR sind unter anderem TGF α , EGF oder HB-EGF (Thiel and Rössler 2005). Diese Liganden liegen zunächst als membrangebundene Vorläuferproteine vor und binden nach Spaltung („Shedding“) durch Metalloproteasen an den EGFR (Higashiyama and Nanba, 2005). Anschließend kommt es über Autophosphorylierungen zum Auslösen der EGFR-Signalkaskade (Dicamillo et al., 2002; Bergin et al., 2008).

Der EGFR-Signalweg spielt in der Tumorthherapie seit Jahren eine wichtige Rolle, da viele Patienten mit Anti-EGFR-Therapeutika wie EGFR-Antikörpern (z.B. Cetuximab) oder Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (z.B. Gefitinib) behandelt werden. Der Hauptgrund dafür ist, dass der EGFR in fast allen Zellen stark exprimiert wird und seine Hauptaufgabe es ist, als Transmembranrezeptor Proliferation und Differenzierung zu induzieren und damit anti-apoptotisch zu agieren. In vielen Tumorgeweben ist der EGFR stark überexprimiert, sodass das Tumorzellwachstum durch EGFR-Aktivierung stark gefördert wird (Oda et al. 2005). Patienten, die eine Anti-EGFR-Therapie erhalten, leiden oft unter Hautausschlägen, Akne und bakteriellen Superinfektionen (Eilers et al. 2010, Eames et al. 2010). Dies resultiert wahrscheinlich daraus, dass bei einer Anti-EGFR-Therapie, auch in gesunden Geweben der EGFR ausgeschaltet wird und damit Zellproliferation und Differenzierung im gesamten Körper gestört wird. Die natürliche Barrierefunktion der Haut ist damit nicht mehr gewährleistet und die Haut ist anfälliger für Infektionen (Holcman and Sibilica 2015). Es ist anzunehmen, dass damit auch die Produktion von AMP, die über den EGFR reguliert werden, nicht mehr gewährleistet ist.

Dass der EGFR wichtig für die Homöostase der Haut ist, zeigten in der Vergangenheit bereits mehrere Arbeiten. Studien mit „Knockout“ Mäusen, die verschiedene EGFR-basierte „Knockouts“ aufwiesen, zeigten deutlich veränderte Phänotypen gegenüber den Wildtypmäusen. Die Haut der Mäuse kennzeichnete vor allem eine gestörte Wundheilung, Ausprägungen von psoriasis-ähnlichen Läsionen, sowie strukturelle und funktionelle Defekte der Haarfollikel (Schneider et al. 2008). Eine Studie von Campbell *et al.* zeigte die gravierenden Ausprägungen der gestörten Homöostase bei einem Kleinkind, welches unter einer sogenannten

„Loss-of-Function“-Mutation (Funktionsverlust-Mutation) des EGFR litt. Das Kind wies erheblich andauernde Infektionen der Haut, der Lunge und des Darms auf. Ähnlich wie bei Patienten mit Anti-EGFR-Therapie wies seine Hautoberfläche eine Vielzahl von Pusteln und Papeln auf und es trat großflächig Haarausfall auf. Das Kind starb im Alter von 2,5 Jahren aufgrund der kontinuierlichen, multiplen Infektionen (Campbell et al. 2014). Diese Daten belegen, dass der EGFR eine entscheidende Funktion bei der Homöostase der Haut einnimmt und wahrscheinlich essentiell für das Aufrechterhalten des Immunsystems ist.

Wie bereits erwähnt, muss der EGFR zunächst einen Wachstumsfaktor binden, um dadurch aktiviert zu werden. Da es Indizien dafür gibt, dass RNase 7 Expression partiell über den EGFR-Signalweg reguliert wird (Firat et al. 2014, Wanke et al. 2011), sollte zunächst eine Stimulation mit den Wachstumsfaktoren HB-EGF und TGF α Einblick darüber bringen, ob die RNase 7 Expression in Keratinozyten durch EGFR-Wachstumsfaktoren induziert wird. Es konnte dabei gezeigt werden, dass RNase 7 durch HB-EGF und TGF α induziert wird. Auch hBD-3, für das eine Regulation über den EGFR-Signalweg bereits von Sörensen *et al.* beschrieben wurde (Sörensen et al. 2003), wurde durch die EGFR-Wachstumsfaktoren induziert. Zum Vergleich konnte gezeigt werden, dass hBD-2, welches hauptsächlich über NF- κ B reguliert wird (Wehkamp et al. 2004), nicht durch EGFR-Wachstumsfaktoren allein induziert werden kann (siehe Abbildung 4.5). Johnston *et al.* beschrieben für hBD-2 eine EGFR-Aktivierung durch EGFR-Wachstumsfaktoren in Synergie mit IL-1 (Johnston et al. 2011). Dies lässt vermuten, dass eine Art Wechselbeziehung zwischen Zytokinen oder anderen pro-inflammatorischen Faktoren und EGFR-Wachstumsfaktoren besteht. Es wäre also möglich, dass es durch Synergien zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege bei der AMP Induktion kommt.

Um zu untersuchen, ob der EGFR-Signalweg auch an der Induktion von RNase 7 durch *P. aeruginosa* beteiligt ist, wurden NHEK mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen allein und gemeinsam mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen und Cetuximab stimuliert. Diese Daten zeigten eine signifikante Inhibition der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Ein ebenfalls eingesetzter Tyrosin-Kinase-Inhibitor, AG1478, der in der Lage ist, den EGFR in seiner Aktivität zu inhibieren, zeigte gleiche Ergebnisse (siehe Abbildung 4.6). Versuche mit lebenden *P. aeruginosa* in stratifizierter Epidermis in einem 3D-Hautäquivalent und in *ex vivo* Hautexplantaten, zeigten eine deutliche *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression in den oberen Schichten der Epidermis. Vor allem im *Stratum granulosum* und im 3D-Hautäquivalent auch im *Stratum spinosum* konnte die RNase 7 Expression durch lebende *P. aeruginosa* immunhistochemisch, im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen, dargestellt werden. Diese Ergebnisse belegten die Vermutung, dass

es, zur bereits vorhandenen Abundanz von RNase 7, bei Kontakt mit *P. aeruginosa* zu einer starken Induktion der RNase 7 Expression in allen differenzierenden Schichten der Haut kommt, was auf eine epidermale Abwehrreaktion gegenüber *P. aeruginosa* hindeutet. Das *Stratum basale* ist das proliferierende Gewebe der Epidermis. Die verstärkte Präsenz von AMP, durch Induktion, in den differenzierenden Schichten, stellt wahrscheinlich eine natürliche Barriere dar, was die kontinuierliche Regeneration der Keratinozyten im *Stratum basale* gewährleistet, während es in den differenzierten Schichten zur Abwehrreaktion durch AMP kommt. *P. aeruginosa* zusammen mit Cetuximab zeigte eine deutliche Abnahme der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression in stratifizierter Epidermis (siehe Abbildung 4.7 und 4.8). Wird RNase 7 also nicht mehr induziert, da der EGFR blockiert ist, wäre auch die, im gesunden Zustand vorhandene, Abundanz von RNase 7 nicht mehr gewährleistet und somit wäre die Haut bereits bei Erstkontakt mit potentiellen Pathogenen nicht mehr in der Lage, durch abundante AMP, antimikrobielle Aktivität zu vermitteln. Diese Ergebnisse belegen, dass die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression zum Teil über den EGFR-Signalweg reguliert wird. Der EGFR ist damit ein wichtiges Molekül für die RNase 7 Expression in Keratinozyten.

In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde überprüft, ob andere in der kutanen Abwehr wichtige AMP über *P. aeruginosa* induziert werden können und ob diese Induktion ebenfalls über den EGFR-Signalweg reguliert wird. Für hBD-3 wurde eine Regulierung über den EGFR bereits mehrfach für verschiedene Epithelien gezeigt (Sörensen et al. 2003, Shuyi et al. 2011). Für hBD-2 wurde bisher eine Regulation über NF- κ B (Wehkamp et al. 2004), sowie in Synergie mit IL-1 auch eine Regulation über EGFR (Johnston et al. 2011) beschrieben. Eine Arbeit von Steubesand *et al.* untersuchte die durch *Candida albicans* induzierte hBD-2 und hBD-3 Expression im Rahmen einer Ösophagitis. Dabei wurde gezeigt, dass die hBD-2 Expression, vermittelt über *Candida*, nicht über den EGFR reguliert wird (Steubesand et al. 2009). Da in der vorliegenden Arbeit bereits ein Vergleich mit EGFR-Wachstumsfaktoren gezeigt hat, dass hBD-2 nicht induziert wird, wurde dieser Vergleich auch für die Versuche mit *P. aeruginosa* und Cetuximab im 3D-Hautäquivalent herangezogen. Dabei konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* in der Lage war, sowohl hBD-3 als auch hBD-2 zu induzieren, aber nur die hBD-3 Expression durch Cetuximab gehemmt wurde (siehe Abbildung 4.9). Diese Daten bestätigen, dass der EGFR für die Expression von hBD-3, im Gegensatz zu hBD-2, von wichtiger Bedeutung ist.

Um einen weiteren Einblick in die Bedeutung des EGFR-Signalweges für die RNase 7 Expression zu erhalten, wurde zunächst untersucht, ob auch Metalloproteasen an der, über den EGFR regulierten, *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression beteiligt sind. Um an den EGFR binden zu können, müssen die EGFR-Liganden zuvor aktiviert werden. Dies geschieht über

Metalloproteasen, den sogenannten „Sheddasen“, die ihre Substrate ektodermal abschneiden, dabei werden diese Substrate aktiviert und sind in der Lage an den EGFR zu binden (Ockenga et al. 2014). „Monolayer“-NHEK Versuche mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen und Marimastat (MM), einem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor, zeigten eine signifikante Inhibition der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (siehe Abbildung 4.10). Dieses Resultat lässt vermuten, dass *P. aeruginosa* Faktoren sezerniert, die in der Lage sind, Metalloproteasen zu aktivieren, die durch „Shedding“ EGFR-Liganden aktivieren. Diese Liganden binden dann an den EGFR und lösen die EGFR-Signalkaskade aus, was schließlich zur RNase 7 Expression führt.

Es gibt, wie bereits erwähnt, verschiedene Metalloproteasen, die als „Sheddasen“ für EGFR- Liganden proteolytisch aktiv sind. Mitglieder der Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen, den sogenannten ADAMs (engl. *a disintegrin and metalloprotease*) sind dabei häufig für den EGFR beschrieben worden. ADAMs sind Typ I Transmembranproteine, die zu einer Untergruppe der Zink-abhängigen Metalloproteasen, den Metzinkinen gehören. Die Domänenstruktur der ADAMs zeichnet sich charakteristisch durch sieben verschiedene Domänen aus (Pro-, Metalloprotease-, Disintegrin-, Cystein-reichen-, EGF-like-, Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne) (Seals and Courtneidge 2003). Am intensivsten untersucht wurden bisher ADAM10 und ADAM17 (Bergin et al. 2008, Higashiyama and Nanba 2005), wobei für ADAM17 bereits eingängig beschrieben wurde, dass es regulativ auf den EGFR einwirkt, indem es die Liganden nach Bedarf proteolytisch freisetzt (Sunnarborg et al. 2002, Scheller et al. 2011, Zunke 2017). Es stellte sich die Frage, ob ADAM17 an der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression beteiligt ist. Durch gezielte Herunterregulation von ADAM17 mittels spezifischer siRNA und anschließender Stimulation mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen konnte eine signifikante Hemmung der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression in NHEK erzielt werden (siehe Abbildung 4.11). Diese Daten sind im Einklang mit den bereits von Shao und Nadel gezeigten Ergebnissen, dass die *P. aeruginosa*-vermittelte Mucin (MUC5AC) Expression in Lungen-Epithelzellen über Aktivierung von ADAM17 verläuft (Shao and Nadel 2005). Die bisherigen Ergebnisse lieferten ein vorläufiges Zwischenergebnis für die Untersuchungen zur Regulation der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression in humaner Haut. Abbildung 5.3 zeigt eine hypothetische Signalvermittlung dieser Regulation.

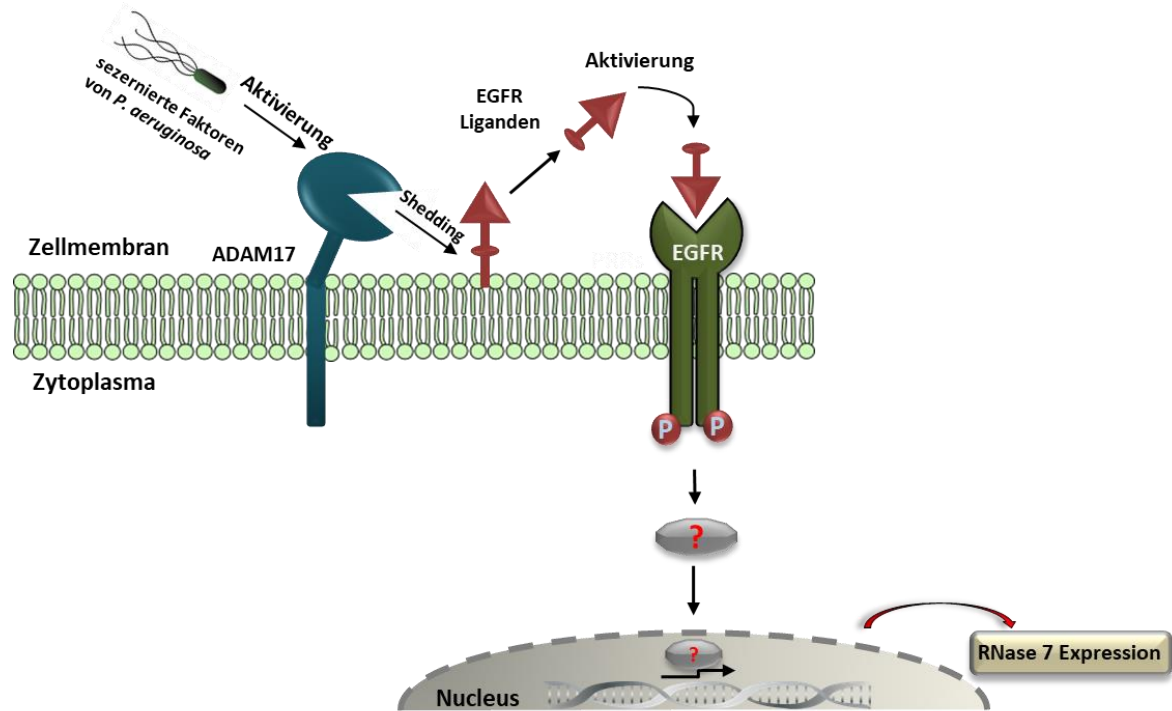


Abbildung 5.3: Regulation der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression über den EGFR. Die Abbildung zeigt die hypothetische *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen. Sezernierte Faktoren von *P. aeruginosa* aktivieren ADAM17, welches dann membranständige EGFR-Liganden ektodermal schneidet und dadurch aktiviert. Die aktivierten EGFR-Liganden sind daraufhin in der Lage den EGFR zu aktivieren und die Signalkaskade zur RNase 7 Expression auszulösen.

5.2.4 Regulation der *Pseudomonas aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression über TLR5

Da sowohl lebende *P. aeruginosa* als auch *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberstände die RNase 7 Expression in Keratinozyten induzieren, ist davon auszugehen, dass *P. aeruginosa* Faktoren sezerniert, die diese Expression hervorrufen. Ein möglicher Faktor könnte das von *P. aeruginosa* sezernierte Flagellin sein, welches als PAMP an den Mustererkennungsrezeptor (PRR) TLR5 binden kann und dadurch die Signalkaskade des TLR5-Signalweges auslöst (Tallant et al. 2004). Toll-like Rezeptoren sind membranspannende PRR des Immunsystems. Sie besitzen N-terminal die sogenannten Leucin-reichen Sequenzen (LRR, engl. *leucine rich repeats*) und C-terminal die sogenannte TIR-Domäne, die aufgrund der Homologie zum IL-1-Rezeptor als Toll/IL-1R homologe Domäne bezeichnet wird. Nach Bindung von PAMP, geht von der TIR-Domäne ein Signal zur Anlagerung von MyD88 aus, welches ebenfalls eine TIR-Domäne besitzt. Von da aus wird die Signalkaskade aktiviert, die über Phosphorylierungen von IRAK (engl. *IL-1 receptor associated kinase*) 1 und 4, TRAF6 (engl. *TNF receptor associated factor 6*) und TAK1 (engl. *TGF β activated kinase 1*) zur Aktivierung des IKK Komplexes führt. Diese Aktivierung

resultiert in der Phosphorylierung des I κ B (engl. *inhibitor of kappa B*) der nun den vormals inaktiven, gebundenen NF- κ B (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) entlässt, welcher nun in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor agiert (Takeda and Akira 2004, Haney and Frederick 2014). Koff *et al.* und Yu *et al.* beschrieben bereits eine Transaktivierung des EGFR durch Flagellin-induzierte TLR5 Aktivierung von *P. aeruginosa* in bronchialen Epithelzellen (Koff *et al.* 2008, Yu *et al.* 2012). Deshalb lag es nahe, dass auch die Expression von RNase 7 in Keratinozyten durch sezernierte Faktoren von *P. aeruginosa* über TLR5 vermittelt werden könnte. NHEK wurden sowohl mit TLR5-spezifischer siRNA als auch mit einem spezifischen anti-TLR5 Antikörper behandelt und mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen stimuliert. Das Blockieren bzw. die Herunterregulation von TLR5 hatten zur Folge, dass es in beiden Versuchen zu einer signifikanten Inhibition der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene kam (siehe Abbildung 4.12). Flagellin ist demnach wahrscheinlich einer der sezernierten Faktoren von *P. aeruginosa*, der in der Lage ist über TLR5 die RNase 7 Expression in Keratinozyten zu induzieren. Dies wurde durch Versuche mit einer Flagellin-defizienten *P. aeruginosa*-Mutante (PAK Δ fliC) bestätigt. Hier zeigte sich, dass es zu keiner RNase 7 Expression mehr kam, wenn *P. aeruginosa* kein Flagellin mehr produziert. Dieser Versuch erklärte auch die Induktion von hBD-2 durch *P. aeruginosa*. So wurde hBD-2 lediglich von *P. aeruginosa*-Überständen und nicht von Überständen der Flagellin-defizienten Mutante induziert (siehe Abbildung 4.13). Dies deckt sich mit einer Studie von Scharf *et al.*, die zeigten, dass auch hBD-2 durch das Flagellin von *Legionella pneumophila* in Lungen-Epithelzellen über TLR5 Aktivierung und NF- κ B induziert wird (Scharf *et al.* 2010).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es vermutlich durch das Flagellin von *P. aeruginosa* zur Aktivierung von TLR5 kommt und daraus resultierend die Expression von RNase 7 induziert wird. Koff *et al.* haben beschrieben, dass es zu einer indirekten Aktivierung von ADAM17 durch Duox1 (engl. *dual oxidase 1*), ein NADPH Oxidase Homolog, kommt. Duox1 ist bekannt dafür reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) zu generieren, die wiederum in der Lage sind, ADAM17 zu aktivieren. ADAM17 aktiviert daraufhin TGF α durch „Shedding“ und nach Bindung des EGFR durch das aktive TGF α wird die EGFR-Signalkaskade ausgelöst (Koff *et al.* 2008). Man kann vermuten, dass es durch die Aktivierung des TLR5 bei der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression in Keratinozyten auch zu einer Transaktivierung von EGFR kommen könnte, ähnlich wie von Koff *et al.* beschrieben. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass diese TLR5 – ROS - ADAM17-vermittelte Transaktivierung des EGFR auch für die Induktion von RNase 7 durch *P. aeruginosa* zutrifft, eine Hypothese, die in weiteren Untersuchungen verifiziert werden muss. Ebenso müsste in weiteren Studien der Frage nachgegangen werden, ob noch andere, durch *P. aeruginosa*, sezernierte Faktoren in der Lage

sind, RNase 7 zu induzieren und welche Signalwege dabei involviert sind. Xu und Kollegen haben für das von *P. aeruginosa* sezernierte Pyocyanin in Lungen-Epithelzellen gezeigt, dass es oxidativen Stress über ROS auslöst, und dass dieser Mechanismus ebenfalls zur Aktivierung des EGFR-Signalweges führt (Xu et al. 2013). Dies deckt sich mit der von Koff *et al.* beschriebenen Aktivierung von ADAM17 über ROS. Es könnte somit auch z.B. das Pyocyanin von *P. aeruginosa* in der Lage sein, RNase 7 über den EGFR-Signalweg zu induzieren, eine Hypothese die in weiteren Versuchen abgeklärt werden muss. Abbildung 5.4 zeigt eine zusammenfassende Zwischenhypothese der bis hierhin gezeigten Daten.

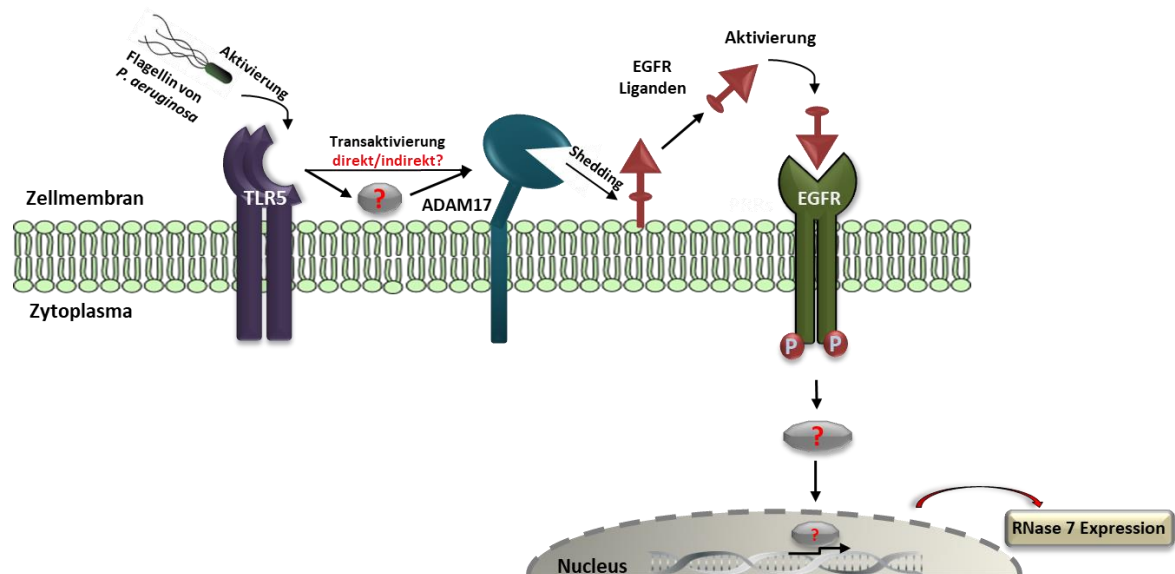


Abbildung 5.4: Hypothetische Regulation der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression über Transaktivierung von TLR5 und EGFR. Die Abbildung zeigt die hypothetische *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression nach vorangegangenen Ergebnissen. Flagellin von *P. aeruginosa* aktiviert TLR5. Über direkte oder indirekte Aktivierung von ADAM17 kommt es zum „Shedding“ der EGFR-Liganden. Die aktivierten EGFR-Liganden binden und aktivieren den EGFR, daraufhin wird die Signalkaskade zur RNase 7 Expression ausgelöst.

5.2.5 Regulation der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression über NF- κ B

Da bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B über TLR5 und MyD88 aktiviert wird, stellte sich die Frage, ob NF- κ B bei der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression ebenfalls eine Rolle spielt. Dies wurde durch Stimulationsversuche mit MyD88-spezifischer siRNA untersucht. Primäre Keratinozyten, die mit MyD88-spezifischer siRNA behandelt wurden, zeigten eine signifikant verminderte RNase 7 Induktion nach Stimulation mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberstand. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ein MyD88/NF- κ B-abhängiger weiterer Signalweg bei der RNase 7 Expression durch *P. aeruginosa* involviert ist. Wanke *et al.* hatten bereits gezeigt, dass *Staphylococcus epidermidis*-vermittelte RNase 7 Expression in

Keratinocyten durch TLR2 Blockierung und NF- κ B-Inhibition gehemmt werden kann, jedoch die *Staphylococcus aureus*-vermittelte RNase 7 Expression nicht (Wanke et al. 2011). Dies lässt darauf schließen, dass die Regulation der bakteriellen Induktion der RNase 7 Expression abhängig von den sezernierten Faktoren des Pathogens sein könnte. So sind es vermutlich pathogen-spezifische Faktoren, die RNase 7 in Keratinocyten induzieren können und dann unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Um einen weiteren Einblick in diese Signaltransduktion zu bekommen, müssten zukünftig die einzelnen Faktoren identifiziert werden, die die RNase 7 Expression vermitteln. Dazu könnten zunächst die Überstände der Bakterien hinsichtlich ihrer Größe separiert werden und durch nachfolgende HPLC-Aufreinigungen weiter aufgereinigt werden. Aktive Fraktionen, die zu einer RNase 7 Induktion führen, könnten dann massenspektrometrisch analysiert werden.

Die oben aufgeführten Ergebnisse führten zur Hypothese, dass sowohl der EGFR- als auch der TLR5 - MyD88 - NF- κ B Signalweg an der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression beteiligt sind. Es stellt sich somit die Frage, ob diese Signalwege miteinander gekoppelt über Transaktivierung agieren, oder auch voneinander unabhängig die *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression vermitteln können. EGFR-Inhibitionsversuche mit einem Luziferase-gekoppelten NF- κ B-Genreporter-Plasmid lieferten eine mögliche Antwort auf diese Hypothese. So führte die Blockierung des EGFR während der Stimulation mit *P. aeruginosa*-Bakterienkulturüberständen zu einer signifikanten Verstärkung der NF- κ B-Luziferaseaktivität.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es eine Wechselbeziehung zwischen zwei Signalwegen bei der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression gibt. Zum einen wird die RNase 7 Expression über den EGFR vermittelt, dies geschieht in Abhängigkeit von der Aktivierung von ADAM17. Zum anderen kann ADAM17 aber auch über TLR5 aktiviert werden, dabei ist auch eine Signalvermittlung über NF- κ B möglich. Der EGFR scheint die NF- κ B Aktivität zu inhibieren. Wird der EGFR blockiert, kommt es zu einer Aktivierung von NF- κ B und der TLR5 - NF- κ B Signalweg führt zur RNase 7 Expression. Da allerdings die RNase 7 Expression bei einer EGFR-Blockade nahezu vollständig inhibiert wurde, ist es naheliegend zu vermuten, dass der EGFR-Signalweg der dominante Signalweg für die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression in Keratinocyten ist und ein zweiter Signalweg über NF- κ B eventuell nur unter bestimmten Bedingungen aktiviert wird. Es könnte sein, dass mehrere sezernierte Faktoren von *P. aeruginosa* gleichzeitig durch Aktivierung der beiden Signalwege agieren. Ist allerdings nur z.B. Flagellin als sezernierter Faktor vorhanden, wird eventuell eine Signalvermittlung über TLR5 - MyD88 - NF- κ B bevorzugt und nur bedingt über den EGFR vermittelt. Sind aber Faktoren anwesend, die

vorrangig ADAM17 aktivieren, wäre es denkbar, dass nur der EGFR-Signalweg die RNase 7 Expression vermittelt. Diese Hypothesen müssten durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ebenso wäre es interessant zu wissen wie die „downstream“-Mechanismen der *P. aeruginosa*-vermittelten RNase 7 Expression beim EGFR-Signalweg verlaufen. Dazu wären weiterführende Westernblot Analysen denkbar um mit Antikörpern Phosphorylierungen der einzelnen „downstream“ aktivierten Signalvermittler zu identifizieren. Abschließend ergibt sich die in Abbildung 5.5 dargestellte, hypothetische Regulation für die *P. aeruginosa*-vermittelte RNase 7 Expression in Keratinozyten.

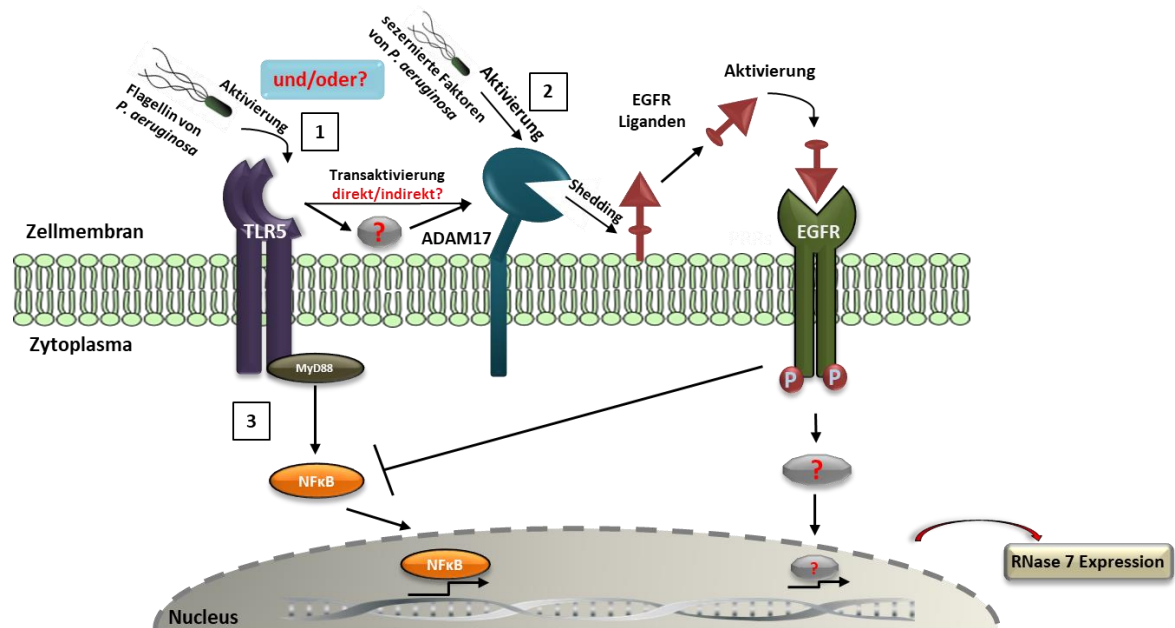


Abbildung 5.5: Hypothetische Regulation der *P. aeruginosa*-induzierten RNase 7 Expression. Die Abbildung zeigt die hypothetische *P. aeruginosa*-induzierte RNase 7 Expression. Flagellin von *P. aeruginosa* aktiviert TLR5. Über direkte oder indirekte Aktivierung von ADAM17 kommt es zum „Shedding“ der EGFR-Liganden (1). Andere Faktoren von *P. aeruginosa* aktivieren ADAM17, EGFR-Liganden werden daraufhin geschnitten und aktiviert (2). Die freigesetzten EGFR-Liganden aktivieren den EGFR und die Signalkaskade zur RNase 7 Expression wird ausgelöst. Flagellin von *P. aeruginosa* aktiviert TLR5, es kommt zur Aktivierung von MyD88 und anschließender NF-κB Freisetzung, welches in den Zellkern transloziert und die RNase 7 Expression vermittelt (3).

5.3 Die Rolle von RNase 7 in der Wundheilung

Die Verwundung der Haut stellt für das Immunsystem eine erhebliche Gefahr dar. Die Störung der natürlichen Hautbarriere ermöglicht es pathogenen Mikroorganismen in den Organismus einzudringen und dort teils schwerwiegende Entzündungsprozesse und Infektionen auszulösen. Deshalb ist es für den Organismus von großer Bedeutung, eine gestörte Hautbarriere möglichst schnell wiederherzustellen bzw. durch das Bereitstellen von z.B. AMP einen effektiven Wirkmechanismus zu initiieren, der potentiell pathogene Mikroorganismen abwehrt und pro-inflammatorische Prozesse moduliert. Wundheilung ist ein komplexer Prozess aus zellulären und molekularen Mechanismen, der generell in drei ineinander übergreifende Phasen unterteilt wird: der inflammatorischen-, der proliferativen Phase und der abschließenden Maturation. Während der inflammatorischen Phase, die direkt nach Auftreten der Barriestörung beginnt, kann es bei einer Dauer von 3-5 Tagen zu einer Infektion durch pathogene Mikroorganismen kommen (Eming et al. 2007, Singer and Clark 1999). Neben der Induktion von Wachstumsfaktoren wie TGF α oder EGF und Zytokinen wie IL-1 β , sowie der vermehrten Anreicherung von neutrophilen Granulozyten kommt es auch zur Induktion von verschiedenen AMP (Roupé et al. 2010). Dass RNase 7 in der Wundheilung eine bedeutende Rolle spielen könnte, zeigen Studien von Harder *et al.*, die eine RNase 7 Freisetzung nach Mikroläsionen mittels „Tape-Stripping“ bereits nach einer Stunde nachweisen konnten. Gläser *et al.*, konnten eine Induktion der RNase 7 Expression nach UVB Bestrahlung zeigen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Harder et al. 2010, Gläser et al. 2009). Bei Hautverwundung kommt es unter anderem zur Freisetzung von RNA. Lai *et al.* konnten in der Vergangenheit zeigen, dass bei Hautverwundung entstehende nekrotische Keratinozyten mittels freigesetzter RNA umgebende Keratinozyten aktivieren können. Dies geschieht durch Aktivierung von TLR3 worauf es zu einer gesteigerten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-6 kommt (Lai et al., 2009). Wie einleitend erwähnt, ist RNase 7 durch seine Ribonuklease-Aktivität in der Lage, RNA zu degradieren. Somit könnte RNase 7 regulativ Einfluss auf die im Rahmen von Hautverwundungen freiwerdende RNA nehmen. Die freiwerdende RNA würde durch RNase 7 degradiert und dies hätte einen negativen Einfluss auf die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine. Stimulationsversuche mit natürlicher und rekombinanter RNase 7, sowie einer Ribonuklease-defizienten rekombinanten Mutante konnten zeigen, dass RNase 7 mit aktiver Ribonuklease-Aktivität die Genexpression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 inhibieren kann. Die Ribonuklease-defiziente Mutante zeigte diesen Effekt nicht, was den Schluss zulässt, dass RNase 7 die RNA degradiert und dabei regulativ Einfluss auf die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine hat. Keratinozyten, die mit dem RNA-Strukturanalogon und

TLR-3-Aktivatoren poly I:C (Lai et al. 2009) stimuliert wurden, zeigten eine RNase 7 Induktion. Dies bestätigt die Hypothese, dass es durch die im Rahmen von Verwundung freigesetzte RNA zur Induktion der RNase 7 Expression kommen kann. Gleichzeitig kam es bei Stimulation mit poly I:C auch zu einer vermehrten TNF α Expression, welche durch Zugabe von natürlicher RNase 7 inhibiert wurde (siehe Abbildung 4.19). RNase 7 hat die RNA durch seine Funktion als RNase degradiert und damit gleichzeitig die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine unterbunden. Versuche mit poly I:C in Keratinozyten, die mit RNase 7 spezifischer siRNA behandelt wurden, bestätigten dies. Ist RNase 7 herunterreguliert kommt es durch Stimulation mit RNA zu einer Aktivierung der Keratinozyten und folglich zu einer erhöhten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, da RNase 7 die RNA nicht mehr degradiert. Unsere Daten lassen den Schluss zu, dass RNase 7 vermutlich einen starken regulativen Einfluss auf die RNA-vermittelte Entzündungsreaktion nach Hautverwundung hat. Diese Hypothese muss in weiteren Versuchen verifiziert werden.

Der RNase-Inhibitor (RI) bildet aufgrund seiner hufeisenförmigen Struktur starke, nicht kovalente Komplexe mit RNasen. Diese Komplexe werden als eine der stärksten, überhaupt vorkommenden, biologischen Verbindungen bezeichnet (Dickson et al. 2005). Abtin *et al.* zeigten diese Komplexbildung für RNase 5 und RNase 7 und demonstrierten, dass beide RNasen sowohl ihre antimikrobielle- als auch ihre Ribonuklease-Aktivität verlieren, wenn sie an den RI gebunden sind (Abtin et al. 2009). Der RI liegt vorrangig in den tieferen epidermalen Schichten in großen Mengen vor, wo er vermutlich RNasen bindet und inaktiviert. Man nimmt an, dass dieser Komplex, im Rahmen der Differenzierung der Keratinozyten, proteolytisch im *Stratum corneum* gespalten wird und dadurch die RNasen sowohl antimikrobiell aktiv sein können, als auch in ihrer Funktion als RNase agieren können (Zasloff 2009, Abtin et al. 2009). Die proteolytische Spaltung des RI-RNase 7-Komplexes wurde auch für den Urogenitaltrakt von Spencer *et al.* beschrieben (Spencer et al. 2014). In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch Herunterregulierung des RI mittels spezifischer siRNA eine gesteigerte TNF α Expression nach Stimulation mit poly I:C detektiert. Dieses Resultat lässt vermuten, dass der RI bei Verwundung aus den tieferen Hautschichten migrieren könnte und durch Komplexbildung mit RNase 7 und eventueller weiterer RNasen zur Modulierung der Entzündungsreaktion beiträgt. Ob die Bindung des RI an RNase 7 im Rahmen von Verwundungen tatsächlich zu einer gesteigerten pro-inflammatorischen Zellantwort führt, müssen weitere Studien zeigen. Dazu könnten Analysen der Wundflüssigkeit dienen, indem man diese auf die Präsenz von RI und RNase 7 sowie den RI-RNase 7-Komplex untersucht.

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten gelangten antimikrobielle Proteine (AMP) immer mehr in den Fokus medizinischer Forschung, da aufgrund der häufig auftretenden Antibiotikaresistenzen von Bakterien ein großer Bedarf an wirkungsvollen alternativen antimikrobiellen Substanzen besteht. Außerdem wird zunehmend deutlicher, dass eine Dysregulation bzw. Dysfunktion von AMP mit dem Auftreten bestimmter infektiöser und entzündlicher Erkrankungen assoziiert ist.

RNase 7 ist die dominante RNase der Haut und eines der AMP mit dem größten Wirkungsspektrum, sowohl gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, als auch gegen Pilze und Hefen. Es wird konstitutiv exprimiert und ist selbst durch pro-inflammatorische Zytokine und Bakterien induzierbar. Diese vielfältigen Eigenschaften machen RNase 7 zu einem sehr interessanten AMP für die Forschung und ggf. auch für die zukünftige Entwicklung neuer Therapiestrategien. Verschiedene Arbeiten suggerieren, dass RNase 7 wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Abwehr von Keimen während einer Infektion oder eines Inflammationsprozesses in der Haut spielt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RNase 7 bereits in geringer Dosierung antimikrobiell gegen *Pseudomonas aeruginosa* wirkt. Zusätzlich kann die Expression von RNase 7 in Keratinozyten auch durch *P. aeruginosa* selbst induziert werden. Hinsichtlich der Aufklärung der beteiligten Signaltransduktionswege konnte mit Hilfe von Antikörpern, Inhibitoren und siRNA eine Signalvermittlung sowohl über den EGFR- als auch über den TLR5-Signalweg gezeigt werden. Dabei konnte die EGFR-vermittelte Signaltransduktion auch im *ex vivo* Hautmodell sowie einem 3D-Hautäquivalent gezeigt werden. Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass es möglicherweise auch zu einer Transaktivierung des EGFR nach TLR5 Aktivierung und der Aktivierung der Metalloprotease ADAM17 kommt. Diese Hypothese muss in weiteren Versuchen näher untersucht werden.

RNA wird bei Verwundung frei und induziert pro-inflammatorische Zytokine, die im weiteren Verlauf einer Verwundungsreaktion zu einer vermehrten Entzündung beitragen können. Dass RNase 7 auch eine immunmodulatorische Rolle bei der Wundheilung spielen könnte, zeigten *in vitro* Versuche mit dem RNA-Strukturanalogen poly I:C. RNase 7 ist, aufgrund seiner RNase-Eigenschaften, in der Lage RNA zu degradieren und hemmt die RNA-vermittelte Induktion pro-inflammatorischer Zytokine. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Ribonuklease-Inhibitor (RI) durch Komplexbildung mit RNase 7 eine regulatorische Rolle bei der

Entzündungsreaktion spielen könnte. Diese Zusammenhänge müssen in weiteren Studien näher betrachtet und analysiert werden.

Zusammenfassend untermauern die hier dargestellten Daten, dass RNase 7 eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Pathogenen und der Modulation von Entzündungsprozessen nach Verwundung einnimmt. Ein vertieftes Verständnis der Bedeutung von RNase 7 in der kutanen Abwehr könnte zu neuen Konzepten für die Therapie und Prophylaxe von Hautinfektionen und Entzündungen führen.

7 Summary

In the last decades medical sciences focused stronger on antimicrobial peptides (AMP) because of the urgent need of effective alternative antimicrobial substances to combat the increasing number of bacteria with acquired antibiotic resistances. There is also evidence that dysfunctions and dysregulations of AMP are associated with the occurrence of infective and inflammatory diseases.

RNase 7 is the dominant RNase in human skin and one of the AMP with the highest range of efficacy against gram-positive and gram-negative bacteria, fungi and yeast. RNase 7 is expressed constitutively and additionally inducible by pro-inflammatory cytokines as well as by bacteria. These versatile properties suggest that RNase 7 is a very promising AMP for research and may be a suitable AMP for the future development of new therapy strategies. Different studies suggest that RNase 7 presumably plays an important role in the defense against microorganisms during infective and inflammatory processes in human skin.

These data confirmed that RNase 7 is antimicrobially active against *Pseudomonas aeruginosa* in low micromolar concentrations. While constitutively expressed, RNase 7 levels are further inducible by *P. aeruginosa* in keratinocytes. However, the involved signaling pathways are only scarcely investigated. The use of antibodies, inhibitors and siRNA revealed a participation of the EGFR- as well as the TLR5-signaling pathways in the *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 expression in keratinocytes. The participation of the EGFR-mediated signaling was subsequently shown in an *ex vivo* skin model and in a 3D skin equivalent. Furthermore, these results point to a potential EGFR transactivation upon activation of TLR5 and the metalloprotease ADAM17.

It is known that RNA is released upon wounding and is able to induce pro-inflammatory cytokines which may trigger inflammation in injury processes. *In vitro* experiments with poly I:C, a structural analogue of RNA, suggest that RNase 7 may play an immunomodulatory role during wound healing. Because of its capacity to degrade RNA, RNase 7 is able to inhibit the induction of RNA-mediated pro-inflammatory cytokines. It was also demonstrated that the complex formation of the ribonuclease inhibitor (RI) with RNase 7 may play a regulatory role during inflammation. These hypotheses remain to be proven in further studies

Taken together, the results of this thesis substantiate that RNase 7 engages an important role in skin defense and modulation of inflammatory processes in wounding. A better understanding of

the importance of RNase 7 in cutaneous defense could lead to new concepts for therapy and prophylaxis of skin diseases and infections.

8 Literatur

- Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Ghannadan, M., Harder, J., Schröder, J.-M., and Tschachler, E. (2009) "Degradation by Stratum Corneum Proteases Prevents Endogenous RNase Inhibitor from Blocking Antimicrobial Activities of RNase 5 and RNase 7." *The Journal of Investigative Dermatology* 129, 2193–2201
- Becknell, B., Eichler, T.E., Beceiro, S., Li, B., Easterling, R.S., Carpenter, A.R., James, C.L., McHugh, K.M., Hains, D.S., Partida-Sanchez, S., and Spencer, J.D. (2015) "Ribonucleases 6 and 7 Have Antimicrobial Function in the Human and Murine Urinary Tract." *Kidney International* 87 (1), 151–61
- Bensch, K.W., Raida, M., Mägert, H.-J., Schulz-Knappe, P., and Forssmann, W.-G. (1995) "HBD-1: A Novel β -Defensin from Human Plasma". *FEBS Letters* 368 (2), 331–335
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002) "Immunology Provides Important Techniques with Which to Investigate Proteins". in *Biochemistry*. 5th editio. New York: W H Freeman, Section 4.3
- Bergin, D.A., Greene, C.M., Sterchi, E.E., Kenna, C., Geraghty, P., Belaaouaj, Abderrazzaq, Belaaouaj, Abderazzaq, Taggart, C.C., O'Neill, S.J., and McElvaney, N.G. (2008) "Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by a Novel Metalloprotease Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (46), 31736–44
- Bradley, D.E. (1973) "The Adsorption of the Pseudomonas Aeruginosa Filamentous Bacteriophage Pf to Its Host". *Can J Microbiol* 19 (5), 623–631
- Burgey, C., Kern, W. V, Römer, W., and Rieg, S. (2016) "Differential Induction of Innate Defense Antimicrobial Peptides in Primary Nasal Epithelial Cells upon Stimulation with Inflammatory Cytokines, Th17 Cytokines or Bacterial Conditioned Medium from Staphylococcus Aureus Isolates." *Microbial Pathogenesis* 90, 69–77
- Burgey, C., Kern, W. V, Römer, W., Sakinc, T., and Rieg, S. (2015) "The Innate Defense Antimicrobial Peptides HBD3 and RNase7 Are Induced in Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Classical Inflammatory Cytokines but Not Th17 Cytokines." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 17 (5), 353–9
- Campbell, P., Morton, P.E., Takeichi, T., Salam, A., Roberts, N., Proudfoot, L.E., Mellerio, J.E., Aminu, K., Wellington, C., Patil, S.N., Akiyama, M., Liu, L., McMillan, J.R., Aristodemou, S., Ishida-Yamamoto, A., Abdul-Wahab, A., Petrof, G., Fong, K., Harnchoowong, S., Stone, K.L., Harper, J.I., Irwin McLean, W.H., Simpson, M.A., Parsons, M., and McGrath, J.A. (2014) "Epithelial Inflammation Resulting from an Inherited Loss-of-Function Mutation in EGFR." *The Journal of Investigative Dermatology* 134 (10), 2570–2578
- Chiller, K., Selkin, B.A., and Murakawa, G.J. (2001) "Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin". *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 6 (3), 170–174
- Cho, S., Beintema, J.J., and Zhang, J. (2005) "The Ribonuclease A Superfamily of Mammals and Birds: Identifying New Members and Tracing Evolutionary Histories". *Genomics* 85 (2), 208–220
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) "Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction". *Analytical Biochemistry* 162

(1), 156–159

- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W.L., and Bevins, C.L. (1991) "Tracheal Antimicrobial Peptide, a Cysteine-Rich Peptide from Mammalian Tracheal Mucosa: Peptide Isolation and Cloning of a cDNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (9), 3952–6
- Dicamillo, S.J., Carreras, I., Panchenko, M. V., Stone, P.J., Nugent, M.A., Foster, J.A., and Panchenko, M.P. (2002) "Elastase-Released Epidermal Growth Factor Recruits Epidermal Growth Factor Receptor and Extracellular Signal-Regulated Kinases to Down-Regulate Tropoelastin mRNA in Lung Fibroblasts". *Journal of Biological Chemistry* 277 (24), 18938–18946
- Dickson, K.A., Haigis, M.C., and Raines, R.T. (2005) "Ribonuclease Inhibitor: Structure and Function." *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 80, 349–74
- Dyer, K.D. and Rosenberg, H.F. (2006) "The RNase a Superfamily: Generation of Diversity and Innate Host Defense." *Molecular Diversity* 10 (4), 585–97
- Eames, T., Grabein, B., Kroth, J., and Wollenberg, A. (2010) "Microbiological Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Therapy-Associated Paronychia". *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 24 (8), 958–960
- Eichler, T.E., Becknell, B., Easterling, R.S., Ingraham, S.E., Cohen, D.M., Schwaderer, A.L., Hains, D.S., Li, B., Cohen, A., Metheny, J., Tridandapani, S., and Spencer, J.D. (2016) "Insulin and the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway Regulate Ribonuclease 7 Expression in the Human Urinary Tract." *Kidney International* 90 (3), 568–79
- Eilers, R.E., Gandhi, M., Patel, J.D., Mulcahy, M.F., Agulnik, M., Hensing, T., and Lacouture, M.E. (2010) "Dermatologic Infections in Cancer Patients Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Therapy." *Journal of the National Cancer Institute* 102 (1), 47–53
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) "Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells." *Nature* 411 (6836), 494–8
- Eming, S.A., Krieg, T., and Davidson, J.M. (2007) "Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms". *Journal of Investigative Dermatology* 127 (3), 514–525
- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G". *Immunochemistry* 8 (9), 871–874
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W.F., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (1994) "Insect Immunity. Septic Injury of *Drosophila* Induces the Synthesis of a Potent Antifungal Peptide with Sequence Homology to Plant Antifungal Peptides." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (52), 33159–63
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., and Prince, A. (1998) "Role of Flagella in Pathogenesis of *Pseudomonas Aeruginosa* Pulmonary Infection." *Infection and Immunity* 66 (1), 43–51
- Firat, Y.H., Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Brasch, J., and Harder, J. (2014) "Infection of Keratinocytes with *Trichophyton Rubrum* Induces Epidermal Growth Factor-Dependent RNase 7 and Human Beta-Defensin-3 Expression." *PloS One* 9 (4), e93941
- Fleming, A. (1922) "On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions".

- Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 93 (653), 306–317
- Frank, D. (2012) “Research Topic on *Pseudomonas Aeruginosa*, Biology, Genetics, and Host–pathogen Interactions”. *Frontiers in Microbiology* 3 (January), 2011–2012
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H., and Gudmundsson, G.H. (1997) “The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders”. *Journal of Biological Chemistry* 272 (24), 15258–15263
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.-M. (2005) “Antimicrobial Psoriasis (S100A7) Protects Human Skin from *Escherichia Coli* Infection”. *Nature Immunology* 6 (1), 57–64
- Gläser, R., Navid, F., Schuller, W., Jantschitsch, C., Harder, J., Schröder, J.M., Schwarz, A., and Schwarz, T. (2009) “UV-B Radiation Induces the Expression of Antimicrobial Peptides in Human Keratinocytes in Vitro and in Vivo.” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 (5), 1117–23
- Gottler, L.M. and Ramamoorthy, A. (2009) “Structure, Membrane Orientation, Mechanism, and Function of Pexiganan--a Highly Potent Antimicrobial Peptide Designed from Magainin.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (8), 1680–1686
- Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., and Salcedo, R. (1996) “The Human Gene FALL39 and Processing of the Cathelin Precursor to the Antibacterial Peptide LL-37 in Granulocytes”. *European Journal of Biochemistry* 238 (2), 325–332
- Haney, C.H. and Frederick, M. (2014) “Innate Immunity in Plants and Animals”. *The Biochemist* 36 (10), 40–45
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J.-M. (1997) *A Peptide Antibiotic from Human Skin*. 387 (6636), 861
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J.M. (2001) “Isolation and Characterization of Human Beta -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (8), 5707–5713
- Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.-M., Schwarz, T., and Gläser, R. (2010) “Enhanced Expression and Secretion of Antimicrobial Peptides in Atopic Dermatitis and after Superficial Skin Injury.” *The Journal of Investigative Dermatology* 130 (5), 1355–1364
- Harder, J. and Schröder, J.-M. (2005) “Antimicrobial Peptides in Human Skin.” *Chemical Immunology and Allergy* 86, 22–41
- Harder, J. and Schröder, J.-M. (2002) “RNase 7, a Novel Innate Immune Defense Antimicrobial Protein of Healthy Human Skin.” *Journal of Biological Chemistry Biol Chem* 277 (48), 46779–46784
- Hein, K.Z., Takahashi, H., Tsumori, T., Yasui, Y., Nanjoh, Y., Toga, T., Wu, Z., Grötzinger, J., Jung, S., Wehkamp, J., Schroeder, B.O., Schroeder, J.M., and Morita, E. (2015) “Disulphide-Reduced Psoriasis Is a Human Apoptosis-Inducing Broad-Spectrum Fungicide.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (42), 13039–44
- Higashiyama, S. and Nanba, D. (2005) “ADAM-Mediated Ectodomain Shedding of HB-EGF in

- Receptor Cross-Talk." *Biochimica et Biophysica Acta* 1751 (1), 110–7
- Holcman, M. and Sibilio, M. (2015) "Mechanisms Underlying Skin Disorders Induced by EGFR Inhibitors". *Molecular & Cellular Oncology* 2 (4), e1004969
- Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981) "Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 29 (4), 577–80
- Huang, Y.-C., Lin, Y.-M., Chang, T.-W., Wu, S.-J., Lee, Y.-S., Chang, M.D.-T., Chen, C., Wu, S.-H., and Liao, Y.-D. (2007) "The Flexible and Clustered Lysine Residues of Human Ribonuclease 7 Are Critical for Membrane Permeability and Antimicrobial Activity". *Journal of Biological Chemistry* 282 (7), 4626–4633
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., and Boman, H.G. (2005) "Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*". *European Journal of Biochemistry* 106 (1), 7–16
- Johnston, A., Gudjonsson, J.E., Aphale, A., Guzman, A.M., Stoll, S.W., and Elder, J.T. (2011) "EGFR and IL-1 Signaling Synergistically Promote Keratinocyte Antimicrobial Defenses in a Differentiation-Dependent Manner." *J Invest Dermatol* 131 (2), 329–37
- Koff, J.L., Shao, M.X.G., Ueki, I.F., and Nadel, J. a (2008) "Multiple TLRs Activate EGFR via a Signaling Cascade to Produce Innate Immune Responses in Airway Epithelium." *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 294 (6), L1068-75
- Köten, B., Simanski, M., Gläser, R., Podschun, R., Schröder, J.-M., and Harder, J. (2009) "RNase 7 Contributes to the Cutaneous Defense against *Enterococcus faecium*." *PLoS One* 4 (7), e6424
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A.L., Wu, Z.-R., Hooper, L. V., Schmidt, R.R., von Aulock, S., Radek, K.A., Huang, C.-M., Ryan, A.F., and Gallo, R.L. (2009) "Commensal Bacteria Regulate Toll-like Receptor 3-dependent Inflammation after Skin Injury". *Nature Medicine* 15 (12), 1377–1382
- Lehrer, R.I. (2004) "Primate Defensins". *Nature Reviews Microbiology* 2 (9), 727–738
- Li, S., Sheng, J., Hu, J.K., Yu, W., Kishikawa, H., Hu, M.G., Shima, K., Wu, D., Xu, Z., Xin, W., Sims, K.B., Landers, J.E., Brown, R.H., and Hu, G. (2013) "Ribonuclease 4 Protects Neuron Degeneration by Promoting Angiogenesis, Neurogenesis, and Neuronal Survival under Stress." *Angiogenesis* 16 (2), 387–404
- Lin, J., Schwarz, V., Sharifpanah, F., Jayarathne, S., Hammes, H., Sauer, H., and Preissner, K. (2012) "Die Rolle von Extrazellulärer RNA in Der Angiogenese Im Mausmodell". *Diabetologie Und Stoffwechsel* 7 (S 01), P_24
- Lin, Y.-M., Wu, S.-J., Chang, T.-W., Wang, C.-F., Suen, C.-S., Hwang, M.-J., Chang, M.D.-T., Chen, Y.-T., and Liao, Y.-D. (2010) "Outer Membrane Protein I of *Pseudomonas aeruginosa* Is a Target of Cationic Antimicrobial Peptide/Protein." *Journal of Biological Chemistry* 285 (12), 8985–94
- Lipsky, B.A., Holroyd, K.J., and Zasloff, M. (2008) "Topical versus Systemic Antimicrobial Therapy for Treating Mildly Infected Diabetic Foot Ulcers: A Randomized, Controlled, Double-Blinded, Multicenter Trial of Pexiganan Cream". *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 47 (12), 1537–45

- McLaren, D.J., McKean, J.R., Olsson, I., Venge, P., and Kay, A.B. (1981) "Morphological Studies on the Killing of Schistosomula of *Schistosoma Mansoni* by Human Eosinophil and Neutrophil Cationic Proteins in Vitro". *Parasite Immunology* 3 (4), 359–373
- Melo, M.N., Ferre, R., and Castanho, M.A.R.B. (2009) "Antimicrobial Peptides: Linking Partition, Activity and High Membrane-Bound Concentrations." *Nature Reviews. Microbiology* 7 (3), 245–50
- Mildner, M., Ballaun, C., Stichenwirth, M., Bauer, R., Gmeiner, R., Buchberger, M., Mlitz, V., and Tschachler, E. (2006) "Gene Silencing in a Human Organotypic Skin Model". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348 (1), 76–82
- Minegishi, Y., Saito, M., Nagasawa, M., Takada, H., Hara, T., Tsuchiya, S., Agematsu, K., Yamada, M., Kawamura, N., Ariga, T., Tsuge, I., and Karasuyama, H. (2009) "Molecular Explanation for the Contradiction between Systemic Th17 Defect and Localized Bacterial Infection in Hyper-IgE Syndrome." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (6), 1291–301
- Mohammed, I., Yeung, A., Abedin, A., Hopkinson, A., and Dua, H.S. (2011) "Signalling Pathways Involved in Ribonuclease-7 Expression". *CMLS* 68 (11), 1941–1952
- Ockenga, W., Kühne, S., Bocksberger, S., Banning, A., and Tikkanen, R. (2014) "Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation Is Required for Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Muscarinic Acetylcholine Receptors in HaCaT Keratinocytes". *International Journal of Molecular Sciences* 15 (11), 21433–21454
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., and Kitano, H. (2005) "A Comprehensive Pathway Map of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling." *Molecular Systems Biology* 1, 2005.0010
- Pifferi, M., Ragazzo, V., Caramella, D., and Baldini, G. (2001) "Eosinophil Cationic Protein in Infants with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis: Predictive Value for Subsequent Development of Persistent Wheezing." *Pediatric Pulmonology* 31 (6), 419–24
- Poole, K. (2011) "Pseudomonas Aeruginosa: Resistance to the Max". *Frontiers in Microbiology* 2 (APR), 1–13
- Rademacher, F., Simanski, M., Gläser, R., and Harder, J. (2018) "Skin Microbiota and Human 3D Skin Models". *Experimental Dermatology* 27 (5), 489–494
- Rademacher, F., Simanski, M., and Harder, J. (2016) "RNase 7 in Cutaneous Defense". *International Journal of Molecular Sciences* 17 (4), 560
- Riordan, J.F. and Vallee, B.L. (1988) "Human Angiogenin, an Organogenic Protein." *British Journal of Cancer* 57 (6), 587–90
- Roupé, K.M., Nybo, M., Sjöbring, U., Alberius, P., Schmidtchen, A., and Sørensen, O.E. (2010) "Injury Is a Major Inducer of Epidermal Innate Immune Responses during Wound Healing". *Journal of Investigative Dermatology* 130 (4), 1167–1177
- Scharf, S., Hippenstiel, S., Flieger, A., Suttorp, N., and N'Guessan, P.D. (2010) "Induction of Human α -Defensin-2 in Pulmonary Epithelial Cells by Legionella Pneumophila: Involvement of TLR2 and TLR5, P38 MAPK, JNK, NF- κ B, and AP-1". *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 298 (5), L687–L695
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., and Rose-John, S. (2011) "ADAM17: A Molecular Switch to Control Inflammation and Tissue Regeneration". *Trends in Immunology* 32 (8), 380–387

- Schneider, M.R., Werner, S., Paus, R., and Wolf, E. (2008) "Beyond Wavy Hairs: The Epidermal Growth Factor Receptor and Its Ligands in Skin Biology and Pathology". *American Journal of Pathology* 173 (1), 14–24
- Schonwetter, B.S., Stolzenberg, E.D., and Zasloff, M.A. (1995) "Epithelial Antibiotics Induced at Sites of Inflammation." *Science (New York, N.Y.)* 267 (5204), 1645–8
- Schröder, J.-M. and Harder, J. (1999) "Human Beta-Defensin-2". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (6), 645–651
- Schröder, J. (2010) "Antimikrobielle Peptide. Körper-eigene Antibiotika Schützen Haut Und Schleimhaut". *Pharmazeutische Zeitung* 16 (16), 155
- Schröder, J.M. (1999) "Epithelial Antimicrobial Peptides: Innate Local Host Response Elements". *Cellular and Molecular Life Sciences* 56 (1–2), 32–46
- Schuster, C., Gläser, R., Fiala, C., Eppel, W., Harder, J., Schröder, J.-M., and Elbe-Bürger, A. (2013) "Prenatal Human Skin Expresses the Antimicrobial Peptide RNase 7." *Archives of Dermatological Research* 305 (6), 545–9
- Seals, D.F. and Courtneidge, S.A. (2003) "The ADAMs Family of Metalloproteases: Multidomain Proteins with Multiple Functions." *Genes & Development* 17 (1), 7–30
- Shao, M.X.G. and Nadel, J. a (2005) "Dual Oxidase 1-Dependent MUC5AC Mucin Expression in Cultured Human Airway Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3), 767–72
- Shuyi, Y., Feng, W., Jing, T., Hongzhang, H., Haiyan, W., Pingping, M., Liwu, Z., Zwahlen, R.A., and Hongyu, Y. (2011) "Human Beta-Defensin-3 (HBD-3) Upregulated by LPS via Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Pathways to Enhance Lymphatic Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma". *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 112 (5), 616–625
- Simanski, M., Dressel, S., Gläser, R., and Harder, J. (2010) "RNase 7 Protects Healthy Skin from Staphylococcus Aureus Colonization." *The Journal of Investigative Dermatology* 130 (12), 2836–8
- Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Schumacher, H., Gläser, R., and Harder, J. (2013) "IL-17A and IFN- γ Synergistically Induce RNase 7 Expression via STAT3 in Primary Keratinocytes." *PloS One* 8 (3), e59531
- Singer, A.J. and Clark, R.A.F. (1999) "Cutaneous Wound Healing". *New England Journal of Medicine* 341 (10), 738–746
- Sörensen, O.E., Cowland, J.B., Theilgaard-Monch, K., Liu, L., Ganz, T., and Borregaard, N. (2003) "Wound Healing and Expression of Antimicrobial Peptides/Polypeptides in Human Keratinocytes, a Consequence of Common Growth Factors". *The Journal of Immunology* 170 (11), 5583–5589
- Sorrentino, S. (2010) "The Eight Human 'Canonical' Ribonucleases: Molecular Diversity, Catalytic Properties, and Special Biological Actions of the Enzyme Proteins". *FEBS Letters* 584 (11), 2194–2200
- Spencer, J.D., Schwaderer, A.L., Dirosario, J.D., McHugh, K.M., McGillivray, G., Justice, S.S., Carpenter, A.R., Baker, P.B., Harder, J., and Hains, D.S. (2011) "Ribonuclease 7 Is a Potent Antimicrobial Peptide within the Human Urinary Tract." *Kidney International* 80 (2), 174–

- Spencer, J.D., Schwaderer, A.L., Eichler, T., Wang, H., Kline, J., Justice, S.S., Cohen, D.M., and Hains, D.S. (2014) "An Endogenous Ribonuclease Inhibitor Regulates the Antimicrobial Activity of Ribonuclease 7 in the Human Urinary Tract." *Kidney International* 85 (5), 1179–91
- Spencer, J.D., Schwaderer, A.L., Wang, H., Bartz, J., Kline, J., Eichler, T., DeSouza, K.R., Sims-Lucas, S., Baker, P., and Hains, D.S. (2013) "Ribonuclease 7, an Antimicrobial Peptide Upregulated during Infection, Contributes to Microbial Defense of the Human Urinary Tract". *Kidney International* 83 (4), 615–625
- Steubesand, N., Kiehne, K., Brunke, G., Pahl, R., Reiss, K., Herzig, K.-H., Schubert, S., Schreiber, S., Fölsch, U.R., Rosenstiel, P., and Arlt, A. (2009) "The Expression of the Beta-Defensins HBD-2 and HBD-3 Is Differentially Regulated by NF-KappaB and MAPK/AP-1 Pathways in an in Vitro Model of Candida Esophagitis." *BMC Immunology* 10, 36
- Stolz, H.U., Waller, F., and Wang, K. (2013) *Innate Immunity in Plants: The Role of Antimicrobial Peptides*. 123–139
- Sunnarborg, S.W., Hinkle, C.L., Stevenson, M., Russell, W.E., Raska, C.S., Peschon, J.J., Castner, B.J., Gerhart, M.J., Paxton, R.J., Black, R.A., and Lee, D.C. (2002) "Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme (TACE) Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Availability." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (15), 12838–45
- Takeda, K. and Akira, S. (2004) "Toll-like Receptors in Innate Immunity". *International Immunology* 17 (1), 1–14
- Tallant, T., Deb, A., Kar, N., Lupica, J., de Veer, M.J., and DiDonato, J.A. (2004) "Flagellin Acting via TLR5 Is the Major Activator of Key Signaling Pathways Leading to NF-Kappa B and Proinflammatory Gene Program Activation in Intestinal Epithelial Cells." *BMC Microbiology* 4, 33
- Thiel, G. and Rössler, O. (2005) "Rezeptor-Tyrosinkinase Und Intrazelluläre Signalkaskaden: Signaltransduktion". *Biologie in Unserer Zeit* 35 (5), 312–319
- Torrent, M., Badia, M., Moussaoui, M., Sanchez, D., Nogués, M.V., and Boix, E. (2010) "Comparison of Human RNase 3 and RNase 7 Bactericidal Action at the Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall." *FEBS J* 277 (7), 1713–25
- Torrent, M., Pulido, D., Valle, J., Nogués, M.V., Andreu, D., and Boix, E. (2013) "Ribonucleases as a Host-Defence Family: Evidence of Evolutionarily Conserved Antimicrobial Activity at the N-Terminus." *The Biochemical Journal* 456 (1), 99–108
- Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000) "Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides". *Biopolymers* 55 (1), 4–30
- Wang, G., Li, X., and Wang, Z. (2016) "APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education". *Nucleic Acids Research* 44 (D1), D1087–D1093
- Wanke, I., Steffen, H., Christ, C., Krismer, B., Götz, F., Peschel, A., Schaller, M., and Schitteck, B. (2011) "Skin Commensals Amplify the Innate Immune Response to Pathogens by Activation of Distinct Signaling Pathways." *J Invest Dermatol* 131 (2), 382–90
- Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Schwind, B., Duchrow, M., Wohlschlaeger, C., Feller, A.C., and Stange, E.F. (2002) "Human [Beta]-Defensin 2 but

- Not [Beta]-Defensin 1 Is Expressed Preferentially in Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease." *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 14 (7), 745–752
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J.M., and Stange, E.F. (2004) "NF-KappaB- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by Escherichia Coli Nissle 1917: A Novel Effect of a Probiotic Bacterium." *Infection and Immunity* 72 (10), 5750–8
- Wikramanayake, T.C., Stojadinovic, O., and Tomic-Canic, M. (2014) "Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing." *Advances in Wound Care* 3 (3), 272–280
- Xu, Y., Duan, C., Kuang, Z., Hao, Y., Jeffries, J.L., and Lau, G.W. (2013) "Pseudomonas Aeruginosa Pyocyanin Activates NRF2-ARE-Mediated Transcriptional Response via the ROS-EGFR-PI3K-AKT/MEK-ERK MAP Kinase Signaling in Pulmonary Epithelial Cells". *PLoS ONE* 8 (8), e72528
- Yu, H., Zhou, X., Wen, S., and Xiao, Q. (2012) "Flagellin/TLR5 Responses Induce Mucus Hypersecretion by Activating EGFR via an Epithelial Cell Signaling Cascades." *Experimental Cell Research* 318 (6), 723–31
- Zanger, P., Holzer, J., Schleucher, R., Scherbaum, H., Schittek, B., and Gabrysch, S. (2010) "Severity of Staphylococcus Aureus Infection of the Skin Is Associated with Inducibility of Human -Defensin 3 but Not Human -Defensin 2". *Infection and Immunity* 78 (7), 3112–3117
- Zasloff, M. (2009) "Antimicrobial RNases of Human Skin." *Journal of Investigative Dermatology* 129 (9), 2091–2093
- Zasloff, M. (1987) "Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from Xenopus Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial CDNA Sequence of a Precursor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (15), 5449–53
- Zhang, J., Dyer, K.D., and Rosenberg, H.F. (2003) "Human RNase 7: A New Cationic Ribonuclease of the RNase A Superfamily." *Nucleic Acids Research* 31 (2), 602–7
- Zhang, Z.-T. and Zhu, S.-Y. (2009) "Drosomycin, an Essential Component of Antifungal Defence in Drosophila." *Insect Molecular Biology* 18 (5), 549–56
- Zunke, F. (2017) "The Shedding Protease ADAM17: Physiology and Pathophysiology". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864 (11), 2059–2070

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
3D	dreidimensional
Abb	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AG1478	<i>Thyrphostin AG-1478</i>
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AMP	Antimikrobielle(s) Protein(e)
AMT	Antimikrobieller Test
aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
BPE	Rinderhypophysenextrakt
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAMP	<i>cathelicidin antimicrobial peptide</i>
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
cDNA	komplementäre DNA
CFU	<i>colony forming units</i> (Koloniebildende Einheiten)
cm ²	Quadratcentimeter
Cys	Cystein
D	Asparagin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Duox1	<i>dual oxidase 1</i>
E	Glutamin
EBD	<i>enteric beta-defensin</i>
ECP	<i>eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>eosinophil-derived neurotoxin</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAc	Essigsäure
hBD	humanes Beta Defensin
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIES	Hyper IgE-Syndrom
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
iAK	Irrelevanter Antikörper
IBRAB	<i>indirect bridged avidin-biotin</i>
IFN	Interferon
IFN γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IGF-1	<i>insulin-like-growth-factor-1</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	Interleukin
IRAK	<i>IL-1 receptor associated kinase</i>
I κ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
K	Lysin
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KGM2	Keratinocyte Growth Medium 2
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LAP	Linguales Antimikrobielles Peptid
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
Lys	Lysin
M	Molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
MM	Marimastat
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
Muc5AC	<i>Mucin 5AC</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NaP	NaPP/1%TSB/0,05%BSA Natriumphosphat-Puffer
NaPP	Natriumphosphatpuffer
nat	natürlich
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge gemessen
OprI	<i>outer membrane protein I</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAK	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stamm
PAKΔfliC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Flagellin-defiziente Mutante
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
poly I:C	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qPCR	quantitative Echtzeit(Real-Time)-PCR
R	Arginin
R7	RNase 7
rek	rekombinant
RI	Ribonuklease Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RP38	ribosomale Protein L38
RSV	Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
s	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SKDM	Serum-freies-Keratinocyten-Differenzierungs-Medium
sog.	sogenannt
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T/E	Trypsin/EDTA (
TAK1	<i>transforming growth factor β-activated kinase-1</i>
TAP	Tracheales Antimikrobielles Peptid
TBS	TRIS gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TGFα	<i>transforming growth factor alpha</i>
TIR	<i>Toll/IL-1-receptor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFα	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
TWEEN® 20	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitan-Monolaurat
u.a.	unter anderem
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
upm	Umdrehungen pro Minute
VE-Wasser	vollständig entsalztes Wasser
WP	Waschpuffer
z.B.	zum Beispiel

Abbildungen

Abbildung 1.1: Aufbau der Epidermis.....	2
Abbildung 1.2: Phylogenetische Einteilung der RNasen der humanen RNase A Superfamilie.....	7
Abbildung 1.3: RNase 7 Struktur.....	8
Abbildung 1.4: RNase 7 Konzentration in der humanen Haut.....	8
Abbildung 1.5: Kationische Cluster von RNase 7.....	9
Abbildung 3.1: Biolumineszenzreaktionen katalysiert von <i>firefly</i> und <i>Renilla</i> -Luziferasen.....	26
Abbildung 3.2: Aufbau eines 3D-Hautäquivalents.....	28
Abbildung 3.3: Prozedere eines <i>ex vivo</i> Stimulationsexperiments.....	29
Abbildung 3.4: Modell der IBRAB-Methode nach Hsu <i>et al.</i>	30
Abbildung 4.1: RNase 7 wird konstitutiv im <i>Stratum corneum</i> und <i>Stratum granulosum</i> humaner Haut exprimiert.....	36
Abbildung 4.2: Rekombinante RNase 7 hemmt das Wachstum von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dosisabhängig.....	37
Abbildung 4.3: RNase 7 im <i>Stratum corneum</i> hemmt das Wachstum von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Abbildung 4.4: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bakterienkulturüberstände induzieren RNase 7 Expression in primären Keratinozyten.....	39
Abbildung 4.5: hBD-3 und RNase 7 werden durch EGFR-Liganden in humanen Keratinozyten induziert.....	41
Abbildung 4.6: Die <i>P. aeruginosa</i> -vermittelte RNase 7 Expression in Keratinozyten ist vom EGFR abhängig.....	42
Abbildung 4.7: Die <i>P. aeruginosa</i> -vermittelte RNase 7 Expression in 3D-Hautäquivalenten wird durch EGFR-Blockade inhibiert.....	43
Abbildung 4.8: Die <i>P. aeruginosa</i> -vermittelte RNase 7 Expression in einem <i>ex vivo</i> Hautexplantat wird durch EGFR-Blockade herunterreguliert.....	44
Abbildung 4.9: Die <i>P. aeruginosa</i> -vermittelte hBD-2- und hBD-3-Expressionen in 3D-Hautäquivalenten werden unterschiedlich reguliert.....	45
Abbildung 4.10: Die <i>P. aeruginosa</i> -induzierte RNase 7 Expression wird durch Marimastat gehemmt.....	46
Abbildung 4.11: An der Regulation der <i>P. aeruginosa</i> -induzierten RNase 7 Expression ist die Metalloprotease ADAM17 beteiligt.....	47
Abbildung 4.12: Die <i>P. aeruginosa</i> -induzierte RNase 7 Expression wird durch TLR5-Antikörper und TLR5-spezifische siRNA negativ beeinflusst.....	48
Abbildung 4.13: Die <i>P. aeruginosa</i> -induzierte RNase 7 Expression ist Flagellin-abhängig.....	49

Abbildung 4.14: Die <i>P. aeruginosa</i> -induzierte RNase 7 Expression wird durch MyD88-spezifischer siRNA negativ beeinflusst.....	50
Abbildung 4.15: Die NF- κ B-Luziferaseaktivität wird durch Inhibition des EGFR verstärkt.	51
Abbildung 4.16: RNase 7 degradiert die RNA von NHEK nach Stimulation.	53
Abbildung 4.17: RNase7 hat Einfluss auf die Induktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8.	53
Abbildung 4.18: Poly I:C hat Einfluss auf die Induktion von RNase 7 Expression.	54
Abbildung 4.19: RNase 7 beeinflusst die poly I:C induzierte TNF α Expression.....	54
Abbildung 4.20: Die poly I:C-induzierte TNF α Expression wird durch RNase7-spezifische siRNA positiv beeinflusst.	55
Abbildung 4.21: Die poly I:C-induzierte TNF α Expression wird durch RI-spezifische siRNA negativ beeinflusst.	56
Abbildung 5.1: Regulation der RNase 7 Expression.	58
Abbildung 5.2: Dreidimensionale Darstellung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Abbildung 5.3: Regulation der <i>P. aeruginosa</i> -induzierten RNase 7 Expression über den EGFR. 66	
Abbildung 5.4: Hypothetische Regulation der <i>P. aeruginosa</i> -induzierten RNase 7 Expression über Transaktivierung von TLR5 und EGFR.....	68
Abbildung 5.5: Hypothetische Regulation der <i>P. aeruginosa</i> -induzierten RNase 7 Expression. 70	

Tabellen

Tabelle 1.1: Übersicht einiger humaner AMP der Haut und deren antimikrobielle Aktivität.	6
Tabelle 3.1: Menge der Reagenzien für 6,5 Zellkultureinsätze.....	27
Tabelle 3.2: absteigende Alkoholreihe.....	30
Tabelle 3.3: aufsteigende Alkoholreihe	31

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen. Deshalb gilt mein Dank allen beteiligten Personen, auch denen, die nicht namentlich erwähnt werden.

An erster Stelle danke ich **Prof. Dr. Thomas Roeder**, für die Bereitschaft das Gutachten für diese Arbeit zu übernehmen und das Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer **Prof. Dr. Jürgen Harder**, der mich mit größter Hilfsbereitschaft und fachlicher Kompetenz in dieses umfangreiche, spannende Thema eingeführt und durch die Labor- und Schreibphase meiner Dissertation begleitet hat. Seine stetige Bereitschaft zum inhaltlichen Diskurs trug wesentlich zum Zustandekommen dieser Arbeit bei. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und dass er mir die Möglichkeit gab, auch nach der Geburt meiner Tochter ein Teil des ausgezeichnetem Teams zu bleiben.

Ein großes Dankeschön geht an **Lena Schröder**, **Regine Gläser** und **Maren Simanski** die mir mit konstruktiver Kritik und Ratschlägen bei all den zahlreichen Fragestellungen um das Gelingen dieser Arbeit zur Seite standen.

Ein besonderes Dankeschön geht an **Heilwig Hinrichs** und **Conny Wilgus**, ohne die diese großartige Arbeitsgruppe nicht das wäre was sie ist. Es war mir stets ein großes Vergnügen mit euch zu arbeiten, große und kleine Laborprobleme zu lösen und ab und zu auch mal ein Kännchen zusammen zu trinken. Ihr seid der **Fels der AG Harder**. Danke für alles.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des sechsten Stocks der Dermatologie (ES GIBT IHN WIRKLICH!) für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Von tiefstem Herzen danke ich meinem Mann **Alexander** und meiner Tochter **Malin** für eure bedingungslose Liebe und euer unermüdliches Bestreben für mein Wohlergehen zu sorgen. Danke, dass es euch gibt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, **Franziska Rademacher**, dass ich die vorliegende Dissertation, mit Ausnahme von der wissenschaftlichen Konsultation durch meinen akademischen Betreuer, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Dissertation, die anderen Quellen im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen sowie für Quellen aus dem Internet. Die Dissertation wurde unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Rademacher, F. , Simanski, M. , Schröder, L. , Mildner, M. and Harder, J. (2017) "The role of RNase 7 in innate cutaneous defense against *Pseudomonas aeruginosa*." *Experimental Dermatology*, 26: 227-233.

Kiel, Juni 2018

Franziska Rademacher

Lebenslauf

Anhang

Accepted: 1 August 2016

DOI: 10.1111/exd.13166

ORIGINAL ARTICLE

WILEY Experimental Dermatology

The role of RNase 7 in innate cutaneous defense against *Pseudomonas aeruginosa*

Franziska Rademacher¹ | Maren Simanski¹ | Lena Schröder¹ | Michael Mildner² | Jürgen Harder¹

¹Department of Dermatology, University of Kiel, Kiel, Germany

²Department of Dermatology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Correspondence

Jürgen Harder, Department of Dermatology, University of Kiel, Kiel, Germany.
Email: jharder@dermatology.uni-kiel.de

Abstract

The ribonuclease RNase 7 is a major skin-derived human antimicrobial protein expressed in keratinocytes. Here we show that the gram-negative pathogen *Pseudomonas aeruginosa* secretes factor(s) that induced RNase 7 gene and protein expression in human primary keratinocytes. The metalloprotease inhibitor marimastat, the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor AG1478 and the EGFR blocking antibody cetuximab significantly attenuated this induction, indicating an important role of the EGFR for the *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 induction. In line with this, siRNA-mediated downregulation of ADAM17, a metalloprotease known to proteolytically mediate the release of soluble EGFR ligands, decreased the *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 induction in keratinocytes. The impact of the EGFR was also demonstrated in a human 3D skin equivalent where blockade of the EGFR diminished induction of RNase 7 by *P. aeruginosa*. Blockade of Toll-like receptor 5 (TLR5), a pattern recognition receptor (PRR) known to be activated by *P. aeruginosa*, only moderately reduced the *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 induction in keratinocytes. The functional relevance of RNase 7 to participate in cutaneous defense against *P. aeruginosa* was demonstrated by antibodies that neutralized the antimicrobial activity of RNase 7. These antibodies significantly inhibited the capacity of human *stratum corneum* skin extracts to control growth of *P. aeruginosa*. Taken together, our results indicate that *P. aeruginosa* induces the expression of RNase 7 in keratinocytes in an EGFR-dependent manner. Enhanced release of RNase 7 contributes to control cutaneous growth of *P. aeruginosa*.

KEYWORDS

antimicrobial peptides, cutaneous innate defense, epidermal growth factor receptor, keratinocytes

1 | INTRODUCTION

Human skin harbours diverse defense barriers to protect itself from microbial threats.¹ There is increasing evidence that the production of antimicrobial peptides and proteins (AMP) by keratinocytes provides a rapid and efficient antimicrobial response. AMP participate in innate immunity by their potent antimicrobial activity as well as by

immunomodulatory activities.² Keratinocytes produce a wide variety of AMP among them antimicrobial RNases.³ The dominant RNase in human skin is RNase 7, a member of the human RNase A superfamily.^{4,5} RNase 7 has been shown to exhibit ribonuclease activity as well as a broad spectrum of in vitro antimicrobial activity against bacteria and fungi.⁴⁻⁹ Interestingly, the ribonuclease activity of RNase 7 seems to be dispensable for antimicrobial activity against some bacteria.^{5,10}

Although RNase 7 is abundantly expressed in keratinocytes its expression in keratinocytes can be further induced by bacteria, dermatophytes, viruses and cytokines.^{4,11–14} The importance of RNase 7 in cutaneous defense against gram-positive bacteria was demonstrated by neutralizing antibodies. Blocking the antimicrobial activity of RNase 7 by neutralizing antibodies revealed an important contribution of RNase 7 to control the cutaneous growth of *S. aureus*.¹⁵ Similarly, skin extracts showed decreased antimicrobial activity against *Enterococcus faecium* when RNase 7 was blocked by a neutralizing antibody.⁵ These data highlight an important role of RNase 7 in cutaneous defense.

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacterium responsible for various infections including skin, soft tissue and wound infections.¹⁶ The purpose of this study was to gain more insight into the role of RNase 7 in innate epidermal defense against *P. aeruginosa*. Therefore, we aimed to identify involved signalling pathways of the *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 induction. In addition, we investigated the potential contribution of RNase 7 to the anti-*P. aeruginosa* activity of human stratum corneum.

2 | METHODS

2.1 | Cell culture and stimulation

Primary normal human keratinocytes (NHEK, Promocell, Heidelberg, Germany) were cultured in collagen-coated 12-well plates in "keratinocyte growth medium 2" (KGM2) plus supplements (Promocell) without antibiotics at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For stimulation experiments, NHEK were used at passage 4–5.

Culture supernatant was generated by inoculating *P. aeruginosa* PAK strain from glycerol in 8 mL tryptic soy broth (TSB) and growing overnight at 37°C under agitation. Subsequently, 200 µL of the PAK culture was inoculated in 8 mL TSB and grown for additional 5 hours until the OD₆₀₀ reached ~1.0. The PAK culture was diluted in a ratio of 1:10 in cell culture medium EpiLife plus supplements (Thermo Scientific, Hamburg, Germany) and incubated at 37°C for 24 hours without shaking. Afterwards, bacteria were pelleted by centrifugation at 8500 g and the supernatant was sterile-filtered (0.45 µm) and stored at –20°C until use.

Postconfluent NHEK were stimulated with 500 µL of diluted PAK supernatant in a ratio of 1:10 in cell culture medium KGM2 without supplements. The cells were then incubated for 18–24 hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After incubation, cell supernatant was harvested for ELISA and cells were lysed for RNA isolation.

To evaluate the influence of the EGFR pathway, the specific EGFR antibody cetuximab (20 µg/mL, Merck, Darmstadt, Germany), the specific EGFR inhibitor AG1478 (10 µmol/L, Tyrphostin, ENZO LifeScience, Lörrach, Germany) as well as the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat (10 µmol/L, MM, Tocris, Bristol, UK) were used. To investigate the role of TLR5, cells were also treated with a specific TLR5 antibody (2–10 µg/mL, anti-hTLR5-IgA, Invivogen, Toulouse, France). Incubation with an irrelevant antibody served as control. The antibodies and inhibitors were applied to the medium 1 hour before stimulation and remained during stimulation.

For stimulation with living *P. aeruginosa*, bacteria were grown in a same manner as for supernatant generation until OD₆₀₀ reached ~0.2. Bacteria were harvested by centrifugation at 300 g for 5 minutes, washed with phosphate-buffered saline (PBS, Biowest SAS, Nuaille, France), resuspended in KGM2 without supplements to an OD₆₀₀ of 0.2 and diluted in a ratio of 1:20 in KGM2 cell culture medium without supplements. 20 µL of this suspension was applied onto the 3D skin equivalent.

2.2 | siRNA experiments

Two different ADAM17-specific siRNAs were used: "SilencerSelect" (s13720 and non-silencing control siRNA 4390844) were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) and "ON-TARGETplus SMARTpool" (L-003453-00-0005 and Non-targeting Pool D-001810-10) were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). NHEK (40%–60% cell confluence) were transfected with siRNAs (5–10 nmol/L) using 2 µL of the transfection reagent HiPerFect (Qiagen, Hilden, Germany). After 16–20 hours, medium was changed and the keratinocytes were further cultured for 3 days and used for stimulation with PAK supernatant.

2.3 | Organotypic 3D skin equivalent

To generate an organotypic 3D skin equivalent, cultured primary normal human keratinocytes were seeded onto a collagen/fibroblast matrix and allowed to develop a multilayered stratified epidermis through incubation for 1 week at the air/medium interface. The organotypic 3D skin equivalent was constructed according to a protocol of Mildner and colleagues.¹⁷ Briefly, a 2-mL solution of 0.4% collagen G type I from calfskin (Biochrom, Berlin, Germany) in 15 mmol/L HCl was mixed with 250 µL Hank's balanced salt solution (HBSS 10x; Gibco, Eggenstein, Germany). This solution was further mixed with 250 µL foetal calf serum (FCS, Gibco, Eggenstein, Germany) containing 1 × 10⁵ fibroblasts/mL (cultured from human foreskin dermis) and the total mix was applied to a cell culture insert (3 µm pore size; BD Bioscience, Heidelberg, Germany) integrated in a 6-well deep well cell culture companion plate (BD Bio Coat, Corning, Wiesbaden, Germany). After 2 hours, at 37°C the collagen solution was gelled and KGM2 medium with supplements was added (13 mL to the surrounding external well and 2 mL to the insert containing the gelled collagen matrix). After overnight incubation at 37°C and 5% CO₂, ~1.5 × 10⁶ NHEK in a total volume of 2 mL KGM2 medium were seeded onto the collagen matrix. After overnight incubation, the matrix gel was detached from the insert periphery. After additional 24-h incubation time, KGM2 medium of the insert and surrounding external well was removed. The external well was then filled with 10 mL serum-free keratinocyte differentiation medium (SKDM) consisting of KGM2 full-medium (without bovine pituitary extract and without epinephrine) supplemented with 1.3 mmol/L calcium, 50 µg/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and 0.1% bovine serum albumin (fatty acid free, Roth, Karlsruhe, Germany). Medium was changed every second day. After 6 days, the skin equivalent was stimulated

with living PAK by application of $\sim 1.4 \times 10^4$ CFU/20 μ L in KGM2 for ~ 24 hours. Stimulation was performed in the absence or presence of the specific EGFR antibody cetuximab (20 μ g/mL) which was applied to the culture medium in the external well. After incubation, two biopsies were taken from each 3D skin equivalent using a 6-mm biopsy punch. One biopsy was embedded in paraffin for immunohistochemical analysis and the other biopsy was used for RNA isolation. The treated KGM2 medium in the external wells was harvested for ELISA.

2.4 | RNA isolation and cDNA synthesis

The total RNA of the keratinocytes and the 3D skin equivalent were isolated using 500 μ L of the RNA isolation reagent Crystal RNAmagic according to the manufacturer's protocol (Biolab Products, Göttingen, Germany). The isolated RNA was resuspended in ddH₂O and 1 μ g total RNA was reverse-transcribed to cDNA using an oligo (dT)18 primer and 50 Units Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the supplier's protocol.

2.5 | Real-time PCR analysis

Quantitative real-time PCR was performed with cDNA corresponding to 10 ng total RNA which served as template in a StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) using SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio, Saint-Germain-en-Laye, France) as previously described.¹⁸ The following intron-spanning primers were used: RNase 7: 5'-GGA GTC ACA GCA CGA AGA CCA-3' (forward primer) and 5'-CAT GGC TGA GTT GCA TGC TTG A-3' (reverse primer); TLR5: 5'-GAC CCT CTG CCC CTA GAA TAA-3' (forward primer) and 5'-GAA TTC CAA ACA CAG GAC CG-3' (reverse primer); ADAM17: Hs_ADAM17_1_SG (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Germany). Standard curves were generated for each primer pair with serial dilutions of template cDNA. All target gene cycle threshold (Ct) values were normalized to the housekeeping gene RPL38 (ribosomal protein L38) using the primer pair: 5'-TCA AGG ACT TCC TGC TCA CA-3' (forward primer) and 5'-AAA GGT ATC TGC TGC ATC GAA-3' (reverse primer). Relative gene expression is given as a ratio between expression of the target gene and RPL38 gene expression. Controls are set as 1.

2.6 | ELISA

Secreted protein levels in the cell culture supernatants were measured by a specific ELISA for RNase 7 as previously described.⁵ The detection range of the RNase 7 ELISA was between 0.3 and 40.0 ng/mL.

2.7 | Immunostaining

To perform immunostaining, the organotypic 3D skin equivalent was embedded in paraffin and used for immunohistochemistry as described recently.¹⁹ Staining was performed with the self-generated goat anti-RNase 7 antibody (1:400)⁵ followed by biotinylated rabbit anti-goat IgG antibody (1:500, DakoCytomation, Glostrup, Denmark)

and avidin/biotinylated enzyme complex (Elite ABC complex, Vector laboratories, Peterborough, UK) and a horseradish peroxidase substrate (HRP; NovaRed, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were counterstained with haematoxylin and mounted with Eukitt (polybutyl methacrylate-co-methyl methacrylate); O. Kindler, Freiburg, Germany). Negative control staining was performed using pre-immune serum instead of an antibody.

2.8 | Antimicrobial Assay

Pseudomonas aeruginosa strain K (PAK)²⁰ was cultured at 37 °C in TSB for 3 hours to an OD₆₀₀ of 0.2. Bacteria were diluted to a final concentration of 5×10^3 /mL in 10 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% TSB and 0.05% BSA. The bacteria suspension was incubated with 5 μ g/mL of recombinant RNase 7 or 5 μ L of *stratum corneum* skin extract prepared as previously described.⁵ The *stratum corneum* skin extract (a pool from several individuals) contained approx. 15 μ g/mL RNase 7 as determined by ELISA. Incubation was performed in the presence of a specific RNase 7 blocking antibody (0.5–0.1 mg/mL) or an irrelevant antibody for 3 hours at 37°C.⁵ Afterwards, several dilutions were plated on TSB agar plates and colony-forming units (CFU) were determined after overnight incubation at 37 °C.

2.9 | Statistics

Statistical significance was determined using t-test (for analysis of two groups) or one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey's multiple comparison post hoc test (for analysis of multiple groups). Results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The software GraphPad Prism (version 6) was used for statistical analysis.

3 | RESULTS

3.1 | *Pseudomonas aeruginosa* induces RNase 7 expression in primary human keratinocytes via epidermal growth factor receptor (EGFR) signalling

To investigate whether *P. aeruginosa* is able to induce RNase 7 expression in keratinocytes, we first treated primary normal human epidermal keratinocytes (NHEK) with bacterial culture supernatants of *P. aeruginosa*. This resulted in a significant induction of RNase 7 gene expression (Fig. 1a) and RNase 7 protein secretion (Fig. 1b). As there is evidence that *P. aeruginosa* infection in human corneal epithelial cells is associated with EGFR activation,²¹ we analysed the impact of the EGFR for the *P. aeruginosa*-induced RNase 7 expression in keratinocytes. To this end, we stimulated NHEK with *P. aeruginosa* supernatant in the presence of a specific EGFR antibody (cetuximab) and the EGFR inhibitor (AG1478). It is known that EGFR ligands are released from the cell surface by ectodermal shedding through metalloproteases such as ADAM17 ("A Disintegrin and A Metalloprotease 17"; also known as TACE, "tumor necrosis factor

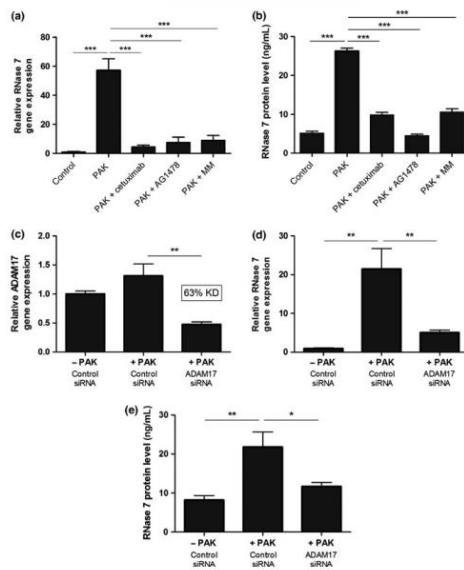


FIGURE 1 *Pseudomonas aeruginosa*-induced RNase 7 expression in keratinocytes is mediated by epidermal growth factor receptor (EGFR) signalling. NHEK were treated with vehicle only (control) or stimulated with supernatants of PAK in the absence or presence of the EGFR antibody cetuximab (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the EGFR inhibitor AG1478 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) or the metalloproteinase inhibitor marimastat (MM, 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$). (a) RNase 7 gene expression was analysed by quantitative real-time PCR and (b) RNase 7 protein secretion was determined by ELISA. Shown are means \pm SEM of three stimulations. To investigate the influence of ADAM17, we treated NHEK with a control siRNA or a specific ADAM17 siRNA (Life Technologies). After 5 d of incubation, the cells were stimulated with vehicle only (-PAK) or stimulated with PAK supernatant (+PAK). Knockdown (KD) of ADAM17 gene expression (c) was analysed by real-time PCR. RNase 7 gene expression and protein secretion were determined by real-time-PCR (d) and ELISA (e), respectively. Shown are means \pm SEM of cumulative data of two independent experiments each consisting of three stimulations. (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$ one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey's multiple comparison test)

alpha-converting enzyme"). Therefore, we used the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat (MM) to investigate the potential involvement of ectodermal shedding activity by metalloproteinases. All three reagents resulted in a significant inhibition of *P. aeruginosa* supernatant-induced RNase 7 gene expression (Fig. 1a) and protein secretion (Fig. 1b).

To specifically assess the influence of ADAM17, we treated NHEK with a specific ADAM17 siRNA. This resulted in a 63% (Fig. 1c) knockdown of ADAM17 gene expression. Stimulation of these cells with *P. aeruginosa* supernatant revealed a significant reduced RNase 7 gene expression (Fig. 1d) and protein secretion (Fig. 1e). Similar

results were obtained using another specific ADAM17 siRNA (Fig. S1).

3.2 | EGFR inhibition leads to diminished *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 induction in an organotypic 3D skin equivalent

To analyse whether the results obtained in the cultured primary keratinocytes are transferable to a stratified epidermis, we used a differentiated organotypic 3D skin equivalent. We stimulated the 3D skin equivalent with living *P. aeruginosa* in the absence or presence of the EGFR antibody cetuximab. In line with the monolayer cell culture experiments, *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 gene expression was reduced by cetuximab (Fig. 2a). RNase 7-specific immunostaining revealed decreased induction of RNase 7 immunoreactivity in the presence of cetuximab (Fig. 2b).

3.3 | TLR5 is involved in the *P. aeruginosa*-induced RNase 7 expression in keratinocytes

It has been reported that Toll-like receptor 5 (TLR5) activation mediated by *P. aeruginosa* leads to EGFR activation in human bronchial epithelial cells (16-HBE or NHBE).^{22,23} To investigate the role of TLR5 on RNase 7 expression, we stimulated NHEK with *P. aeruginosa* supernatant in the absence or presence of a specific antibody against TLR5. This resulted in a decreased RNase 7 gene expression (Fig. 3a) and protein secretion (Fig. 3b).

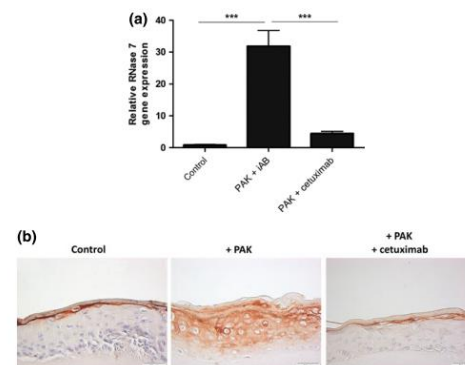


FIGURE 2 *Pseudomonas aeruginosa*-induced RNase 7 expression in an organotypic skin model is decreased by EGFR blocking. An organotypic skin equivalent was treated with vehicle only (control) or stimulated with living PAK (1.4×10^4 CFU/20 μL) and co-treated with an irregular antibody (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or cetuximab (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (a) RNase 7 gene expression was analysed by quantitative real-time PCR. Shown are means \pm SEM of four independent experiments (*** $P < .001$, Student's *t*-test). (b) RNase 7 protein expression was investigated by immunohistochemistry

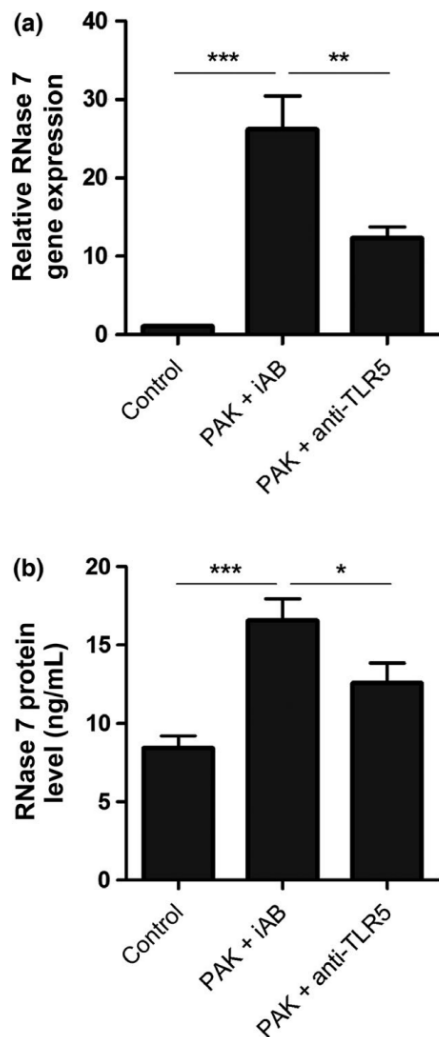


FIGURE 3 *Pseudomonas aeruginosa*-induced RNase 7 expression in keratinocytes is decreased by a TLR5 antibody. NHEK were treated with vehicle only (control) or stimulated with PAK supernatant and co-treated with an irrelevant antibody (iAB, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or the TLR5 antibody (anti-TLR5, 2–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (a) RNase 7 gene expression was analysed by quantitative real-time PCR and (b) RNase 7 protein secretion was determined by ELISA. Shown are means \pm SEM of four independent experiments each consisting of three stimulations (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$ one-way ANOVA using Tukey's multiple comparison test)

3.4 | RNase 7 contributes to the antimicrobial activity of human skin extracts against *P. aeruginosa*

Analysis of the antimicrobial activity of RNase 7 revealed dose-dependent activity against *P. aeruginosa* (Fig. S2). To explore the functional role of RNase 7 to control the growth of *P. aeruginosa*, we used a specific RNase 7 neutralizing antibody. The antibacterial activity of RNase 7 against *P. aeruginosa* was completely inhibited by co-treatment with an RNase 7 antibody. An irrelevant antibody had no

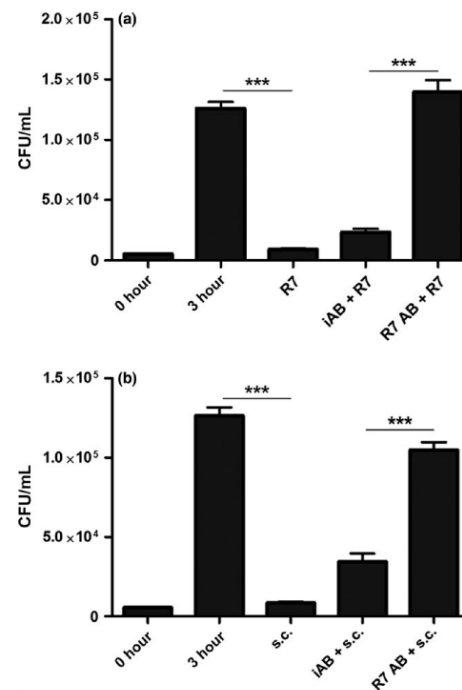


FIGURE 4 RNase 7 contributes to the antimicrobial activity of human skin extracts against *P. aeruginosa*. (a) *P. aeruginosa* was incubated for 3 h at 37°C without RNase 7 (3 h), with RNase 7 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; R7), with RNase 7 together with an irrelevant antibody (iAB + R7) or with RNase 7 together with a specific RNase 7 neutralizing antibody (R7 AB + R7). (b) The same experimental set-up was performed with human stratum corneum extract instead of RNase 7. We incubated *P. aeruginosa* alone (3 h) or together with stratum corneum extract (s.c.). In addition, *P. aeruginosa* was incubated with stratum corneum extract in the presence of an irrelevant antibody (iAB + s.c.) or a specific RNase 7 antibody (R7 AB + s.c.). After incubation, serial dilutions were plated on agar plates and the colony-forming units (CFU) were counted the following day. Shown are means \pm SEM of three independent experiments each performed in triplicates (*** $P < .001$ one-way ANOVA using Tukey's multiple comparison test)

influence on the RNase 7 killing activity (Fig. 4a). This confirmed the capacity of the RNase 7 antibody to neutralize the killing activity of RNase 7. To explore the role of RNase 7 in human *stratum corneum* extracts, we repeated this assay with human *stratum corneum* extract in the absence or presence of the RNase 7 antibody. Antibody-mediated inactivation of RNase 7 in the *stratum corneum* extract resulted in a significantly reduced growth of *P. aeruginosa* (Fig. 4b).

4 | DISCUSSION

Our results indicate that RNase 7 is an important factor released by keratinocytes to control the growth of *P. aeruginosa* on the skin surface. Immunostaining of the 3D skin equivalent revealed highest immunoreactivity in the uppermost epidermal layers, in particular in the *stratum corneum*. This is in line with RNase 7 immunostainings of skin biopsies which revealed highest intensity in the *stratum corneum*.^{5,24} It corresponds also with the high amounts of RNase 7 extractable from *stratum corneum*.⁴ One may speculate that the cationic RNase 7 released by living keratinocytes accumulates and concentrates in the *stratum corneum* probably by interaction with anionic structures. As shown here, RNase 7 contributes to the killing activity of human *stratum corneum* against *P. aeruginosa*. Thus, RNase 7 may contribute to hinder cutaneous colonization and infection by *P. aeruginosa* directly on the skin surface.

Pseudomonas aeruginosa is often associated with chronic wounds and biofilms of *P. aeruginosa* may promote chronicity of wounds.^{25–27} Thus, it remains to be determined whether an insufficient expression and/or induction of RNase 7 is associated with chronic or hard-to-heal wounds, especially such wounds infected with *P. aeruginosa*. The reported lack of induction of RNase 7 in chronic wounds²⁸ would fit with such hypothesis. As RNase 7 is highly effective against *P. aeruginosa* in vitro,^{4,8,10} one may speculate that RNase 7 could be useful as a potential therapeutic for topical treatment of wound infections caused by antibiotic-resistant *P. aeruginosa*. The uncommon antimicrobial mechanism of RNase 7 through targeting the outer membrane protein I (OprI) of *P. aeruginosa* may make it difficult for *P. aeruginosa* to acquire resistance against RNase 7.⁸

It has been reported that blockade of EGFR decreased the constitutive expression of RNase 7²⁹ as well as the *Staphylococcus epidermidis*- and *Trichophyton rubrum*-mediated induction of RNase 7 in keratinocytes.^{12,30} This prompted us to investigate the influence of the EGFR on the *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 induction. Our results indicate that activation of the EGFR is crucial for RNase 7 induction in keratinocytes by *P. aeruginosa*. These data highlight a critical role of the EGFR for RNase 7 expression in keratinocytes. It has also been demonstrated that the EGFR is involved in the induction of other skin-derived AMP. For example, Wanke et al.¹² reported the participation of the EGFR in the induction of hBD-3 by *S. epidermidis*. In addition, it has been shown that EGFR and IL-1 signalling synergistically induced the expression of hBD-2 in keratinocytes.³¹ Taken together, these data suggest that the EGFR has an important function in cutaneous defense by mediating the induction of several AMP.

In line with the importance of the EGFR, we also detected a crucial role of the metalloproteinase ADAM17 for the *P. aeruginosa*-mediated

RNase 7 induction. ADAM17 is known to mediate the shedding and release of EGFR ligands. Thus, we propose that sensing of *P. aeruginosa* by the keratinocytes leads to activation of ADAM17 which in turn activates the EGFR through the shedding of membrane-bound EGFR ligands which activate the EGFR in a paracrine/autocrine way. In concordance with our data, it has been reported that ADAM17 is crucial for *P. aeruginosa*-mediated mucin (MUC5AC) expression in airway epithelial cells.^{23,32}

It remains to be shown which factor(s) secreted by *P. aeruginosa* are responsible for the observed RNase 7 induction in keratinocytes. Flagellin might be a potential candidate as flagellin has been shown to induce the EGFR/ADAM17-mediated mucin production in airway epithelial cells.²³ Flagellin is sensed by TLR5 and our experiments revealed a minor, yet significant influence of TLR5. Thus, other pattern recognition receptors (PRRs) than TLR5 may be involved in the *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 induction in keratinocytes. One candidate could be TLR4, because it has been shown that stimulation of airway epithelial cells with the TLR4 ligand LPS activates the EGFR.^{32,33} Moreover, *P. aeruginosa*-derived LPS has been reported to increase RNase 7 immunoreactivity in the outer root sheath of the hair follicle.¹³ Further experiments have to uncover the identity of additional pattern recognition receptors as well as corresponding *P. aeruginosa*-released ligands involved in the induction of RNase 7 by *P. aeruginosa*.

Together, our data revealed an important role of the ADAM17/EGFR signal pathway in the *P. aeruginosa*-mediated RNase 7 induction in keratinocytes. A dysregulation of this cascade may be associated with an enhanced susceptibility for skin infections and wound complications. A targeted induction of RNase 7 might be an option to strengthen cutaneous defense.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Cornelia Wilgus and Heilwig Hinrichs for excellent technical assistance. This study was supported by a grant from the German Research Foundation (DFG) to J.H. (HA 3386/6-1).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTION

FR designed the study, performed experiments, analysed data and edited the manuscript. MS performed experiments, analysed data and edited the manuscript. LS performed experiments and edited the manuscript. MM provided experimental advice and edited the manuscript. JH designed the study, analysed data and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- [1] Harder J, Schröder J-M, Gläser R. *Exp Dermatol*. 2013;22:1–5.
- [2] Dutta P, Das S. *Curr Top Med Chem*. 2016;16:99–129.

- [3] Simanski M, Köten B, Schröder J-M, et al. *J Innate Immun.* **2012**;4:241–247.
- [4] Harder J, Schröder J-M. *J Biol Chem.* **2002**;277:46779–46784.
- [5] Köten B, Simanski M, Gläser R, et al. *PLoS One.* **2009**;4:e6424.
- [6] Spencer JD, Schwaderer AL, Dirosario JD, et al. *Kidney Int.* **2011**;80:174–180.
- [7] Torrent M, Badia M, Moussaoui M, et al. *FEBS J.* **2010**;277:1713–1725.
- [8] Lin Y-M, Wu S-J, Chang T-W, et al. *J Biol Chem.* **2010**;285:8985–8994.
- [9] Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF. *Nucleic Acids Res.* **2003**;31:602–607.
- [10] Huang Y-C, Lin Y-M, Chang T-W, et al. *J Biol Chem.* **2007**;282:4626–4633.
- [11] Eberhard J, Menzel N, Dommisch H, et al. *Oral Microbiol Immunol.* **2008**;23:21–28.
- [12] Wanke I, Steffen H, Christ C, et al. *J Invest Dermatol.* **2011**;131:382–390.
- [13] Reithmayer K, Meyer KC, Kleiditzsch P, et al. *Br J Dermatol.* **2009**;161:78–89.
- [14] Surasombatpattana P, Hamel R, Patramool S, et al. *Infect Genet Evol.* **2011**;11:1664–1673.
- [15] Simanski M, Dressel S, Gläser R, et al. *J Invest Dermatol.* **2010**;130:2836–2838.
- [16] Wu DC, Chan WW, Metelitsa AI, et al. *Am J Clin Dermatol.* **2011**;12:157–169.
- [17] Mildner M, Ballaun C, Stichenwirth M, et al. *Biochem Biophys Res Com.* **2006**;348:76–82.
- [18] Roth SA, Simanski M, Rademacher F, et al. *J Invest Dermatol.* **2014**;134:374–380.
- [19] Laudien M, Dressel S, Harder J, et al. *Rhinology.* **2011**;49:107–111.
- [20] Bradley DE. *Can J Microbiol.* **1973**;19:623–631.
- [21] Zhang J, Li H, Wang J, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2004**;45:2569–2576.
- [22] Koff JL, Shao MXG, Ueki IF, et al. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* **2008**;294:L1068–L1075.
- [23] Yu H, Zhou X, Wen S, et al. *Exp Cell Res.* **2012**;318:723–731.
- [24] Gläser R, Becker K, von Eiff C, et al. *J Invest Dermatol.* **2014**;134:2347–2350.
- [25] Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, et al. *Wound Repair Regen.* **2008**;16:2–10.
- [26] Zhao G, Hochwalt PC, Usui ML, et al. *Wound Repair Regen.* **2010**;18:467–477.
- [27] James GA, Zhao AG, Usui M, et al. *Wound Repair Regen.* **2016**;24:373–383.
- [28] Dressel S, Harder J, Cordes J, et al. *Exp Dermatol.* **2010**;19:628–632.
- [29] Lichtenberger BM, Gerber PA, Holcman M, et al. *Sci Transl Med.* **2013**;5:199ra111.
- [30] Firat YH, Simanski M, Rademacher F, et al. *PLoS One.* **2014**;9:e93941.
- [31] Johnston A, Gudjonsson JE, Aphale A, et al. *J Invest Dermatol.* **2011**;131:329–337.
- [32] Shao MXG, Ueki IF, Nadel JA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2003**;100:11618–11623.
- [33] Koff JL, Shao MXG, Kim S, et al. *J Immunol.* **2006**;177:8693–8700.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

Figure S1 ADAM17 is involved in the RNase 7 induction by supernatants of *P. aeruginosa*. NHEK were treated with a control siRNA or a specific ADAM17 siRNAs (Dharmacon). After 5 days of incubation the cells were stimulated with vehicle only (–PAK) or stimulated with PAK supernatant (+PAK). Knockdown (KD) of ADAM17 gene expression (A) was analyzed by real-time PCR. RNase 7 gene expression and protein secretion was determined by real-time-PCR (B) and ELISA (C), respectively. Shown are means±SEM. of cumulative data of two experiments each consisting of three stimulations. (**p*<.05; ***p*<.01; ****p*<.001 one-way ANOVA using Tukey's multiple comparison test).

Figure S2 RNase 7 exhibits antimicrobial activity against *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* was incubated for 3 h at 37°C without RNase 7 (3 h) or with the indicated concentrations of RNase 7. After incubation serial dilutions were plated on agar-plates and the colony forming units (CFU) were counted the following day. Shown are means±SEM (n=3).