

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

**Die Bedeutung von Rhamnolipiden in der Pathogenese epithelialer
Pseudomonas aeruginosa Infektionen**

Inauguraldissertation
zur
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JOMTJE FAALEG PETERS GEB. DÖSSEL

aus Henstedt-Ulzburg

Kiel (2013)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Schröder
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Podschun
Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2014
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.03.2014

gez.: Prof. Dr. Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Danksagungen:

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Schröder für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Ulrich Gerstel für die außergewöhnlich gute Betreuung, die spannenden, aufschlussreichen Gespräche und die interessanten Gedankenexperimente.

Für den Spaß und die vielen Tipps bei der Laborarbeit bedanke ich mich bei Britta, Ulf, Jan, Ties, Julia, Elvira und den vielen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik.

Vielen Dank Jutta und Claudia für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der HPLC und der ELISAs.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Chemikalien.....	8
2.1.1 Lösungen und Puffer:.....	9
2.1.2 Medien und Zusätze	10
2.1.3 Primer	10
2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	10
2.2.1 HaCat-Zelllinie	10
2.2.2 A549-Zelllinie	11
2.2.3 Primäre Keratinozyten	11
2.2.4 Subkultivierung der Zellen	12
2.2.5 Einfrieren von Zellen	12
2.2.6 Kollagenisieren von Kulturflaschen und Kulturplatten	12
2.3 Stimulation der Zellen.....	13
2.4 Bakterienstämme.....	15
2.4.1 Nährmedien für Bakterien:	15
2.4.2 Kultivierung von <i>P. aeruginosa</i>	15
2.4.3 Biochemische Untersuchungen des hBD2-reprimierenden Faktors.....	16
2.5 Molekularbiologische Methoden	17
2.5.1 RNA-Isolierung.....	17
2.5.2 hBD2-ELISA.....	17
2.5.3 Interleukin-8- ELISA.....	18
2.5.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	19
2.5.5 RT (reverse Transkription) – PCR.....	19
2.5.6 DNA-Aufreinigung	20
2.5.7 Real-time-RT-PCR (Light Cycler).....	20
2.5.8 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	21
2.5.9 SDS-PAGE	22
2.5.10 Silberfärbung (Heukeshoven und Dernick, 1988)	22
2.5.11 Immuno-Dot Analyse	24
2.5.12 Western Blot	24

2.5.13	Trypanblaufärbung	24
2.5.14	LDH-Zytotoxizitätstest	25
2.5.15	Immunfluoreszenz	26
2.5.16	Rhamnolipid-Quantifizierung mittels Methyleneblaukomplexierung.....	27
2.5.17	HPLC G75	27
2.6	Darstellung der Ergebnisse	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Wirkung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Kulturfiltraten auf Epithelzellen....	28
3.1.1	Einfluss von Kulturmedium, Wachstumsphase und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Stamm auf die hBD2- und IL8-induzierende Aktivität in Keratinozyten 28	
3.1.2	Identifizierung des PAMPs	30
3.1.3	Chromatographische Auftrennung des PG generierten bakteriellen Überstandes	32
3.1.4	Kostimulation primärer Keratinozyten mit den Fraktionen und Flagellin	33
3.2	Identifizierung des Faktors, der die Flagellin-induzierte hBD2-Antwort unterdrückt	34
3.2.1	Biochemische Eigenschaften des Faktors	34
3.2.2	Rhamnolipid-Quantifizierung.....	37
3.3	Wirkung von Rhamnolipiden auf epitheliale Zellen	37
3.3.1	Nachweis der Zytotoxizität von Rhamnolipiden	37
3.3.2	Dosis-Wirkungsverhalten von Rhamnolipiden auf die Flagellin-induzierte Immunantwort in Keratinozyten	40
3.4	Rhamnolipide inhibieren die durch Flagellin stimulierte Immunantwort in Keratinozyten auf mRNA- und Protein-Ebene.....	41
3.4.1	Nachweis des immunmodulatorischen Effekts von Rhamnolipiden auf Keratinozyten	41
3.5	Zeitkinetik der inhibierenden Wirkung von Rhamnolipiden auf die Flagellin-induzierte Sekretion von hBD2 in Keratinozyten	45
3.5.1	„Effekt“ von Rhamnolipiden auf die PMA-induzierte hBD2-Sekretion ...	47
3.5.2	Molekulare Mechanismen der inhibitorische Wirkung von Rhamnolipiden auf die hBD2-Expression in Keratinozyten	48
4	Diskussion	50
5	Zusammenfassung der Ergebnisse	53

6	Quellenverzeichnis	54
7	Anhang.....	59
7.1	Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit.....	59
7.2	Lebenslauf.....	60

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AMP	antimikrobielles Peptid
BAPTA/AM	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
BSA	bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDGS	EpiLife® defined Growth Supplements
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
hBD2	humanes- β -Defensin 2
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IL8	Interleukin 8
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
LB-Medium	lysogeny broth Medium
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
OD	optische Dichte
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG-Medium	Propylenglycol
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	pattern recognition receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RL	Rhamnolipid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TSB-Medium	Tryptic Soy Broth- Medium

1 Einleitung

Die Haut ist als Grenzfläche zur Umwelt permanent einer Besiedlung durch Mikroorganismen ausgesetzt. Auf ihr leben je nach Lokalisation $10^2 - 10^6$ Mikroorganismen/cm² (Fritsch, 2009). Dabei entwickelt jeder Mensch innerhalb kurzer Zeit seine individuelle Hautflora aus residenten Keimen, deren Wachstum es zu kontrollieren gilt. Zusätzlich muss die Haut die Besiedlung und das Eindringen von pathogenen Keimen verhindern. Für diese Aufgaben verfügt die Haut über verschiedene Barriere-Eigenschaften. Ein relativ saurer pH-Wert von etwa 5,5 verhindert die Kolonisierung und Ausbreitung vieler schädlicher Mikroorganismen (Fritsch, 2009). Über die von der Haut gebildete Lipidschicht wird nicht nur das Verdunsten von Flüssigkeit aus dem Körper verhindert, sie stellt außerdem eine mechanische Barriere für viele Keime dar und verhindert das Eindringen von hydrophilen Stoffen (Valacchi *et al.*, 2012). Durch die fortlaufende Ausdifferenzierung neuer Keratinozyten und die Desquamation alter Keratinozyten kommt es zu einer ständigen Hauterneuerung. Dies erschwert die Besiedlung durch adhärente Keime. Neben diesen eher physikalischen Barriere-Eigenschaften verfügt die Haut über zusätzliche biochemische Schutzfunktionen der angeborenen, unspezifischen Immunität. Neben neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen und verschiedenen Effektormolekülen des Komplement-Systems sind hier insbesondere antimikrobielle Peptide (AMPs) zu finden (Gläser *et al.*, 2005; Harder *et al.*, 1997; Harder und Schröder, 2002; Zasloff, 2002). Unterteilt werden die AMPs in vier Gruppen (Harder *et al.*, 2007): die Defensine, die Cathelicidine, die S100-Proteine und die Ribonukleasen. Die Defensine zeichnen sich durch ein großes Wirkungsspektrum aus. Sie sind bakterizid gegen gramnegative und grampositive Bakterien und Mykobakterien, inhibieren einige Viren wie zum Beispiel das Herpes simplex- Virus und sind fungizid (Martin *et al.*, 1995). Angriffspunkte können die Zellwand-, die Protein- und/oder die Nukleinsäuresynthese sowie enzymatische Aktivitäten der Mikroorganismen sein (Brogden, 2005; Hale und Hancock, 2007). AMPs werden zum Teil konstitutiv exprimiert und können so das Wachstum und die Zusammensetzung der Normalflora kontrollieren (Salzman *et al.*, 2010), sie können aber auch durch Zytokine oder mehr oder weniger spezifisch durch pathogen-

assoziierte molekulare Muster („pathogen associated molecular pattern“ (PAMPs)) induziert werden. PAMPs wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren, mikrobielle DNA und doppelsträngige RNA (Aderem und Ulevitch, 2000; Medzhitov und Janeway, Jr., 2002) werden durch wirtseigene Rezeptoren der angeborenen Immunität, sogenannten mustererkennenden Rezeptoren („pattern-recognition receptors“, PRRs) wahrgenommen (Medzhitov und Janeway, Jr., 2002) und in eine schnelle Immunantwort umgesetzt.

Die Effizienz der epithelialen Abwehrmechanismen wird deutlich, wenn die Schutzbarrieren beeinflusst bzw. zerstört werden. Hier verursachen dann insbesondere opportunistische Krankheitserreger wie z.B. *P. aeruginosa* schwerwiegende Infektionen (de Bentzmann S. und Plesiat, 2011).

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) ist ein ubiquitär vorkommendes, gramnegatives, monotrich begeißeltes, aerob lebendes Stäbchenbakterium, das immunkompetenten Menschen meist keine Probleme bereitet.

P. aeruginosa ernährt sich sowohl von organischen als auch anorganischen Stoffen und ist somit chemoorganotroph. Der Keim kommt ubiquitär vor und lebt als Boden- und Wasserkeim in feuchtem Milieu. Somit und aufgrund der niedrigen Nährstoffanforderungen ist *P. aeruginosa* in der Lage auf feuchten Böden, im Sanitärbereich und auch in Medikamenten und Desinfektionsmitteln zu überleben. Das Bakterium vermag sogar SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Teil zu verstoffwechseln (Hagelueken *et al.*, 2006). Je nach Kulturmedium setzt der Keim Farbstoffe frei (hauptsächlich Fluorescein/ Pyoverdin (gelbgrün) und Pyocyanin (blaugrün)). Kennzeichnend für *P. aeruginosa* ist auch der süßliche Geruch nach Lindenblüten, der durch die Bildung von 2-Aminoacetophenon entsteht (Scott-Thomas *et al.*, 2010). Für ein ideales Wachstum sind Temperaturen von $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ nötig (Brandis *et al.*, 1998).

Das opportunistische Pathogen *P. aeruginosa* befällt Menschen, Tiere, Insekten, Nematoden und Pflanzen (D'Argenio *et al.*, 2001) und ist u.a. aufgrund seiner Toleranz gegenüber einer Vielzahl von Desinfektionsmitteln und Antibiotika einer der wichtigsten Verursacher von nosokomialen Infektionen. Laut KISS (Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System, 2011) ist *P. aeruginosa* für 17,7% der beatmungsassoziierten Infektionen und für 14,2% der Harnwegskatheter-assoziierten Infektionen auf Intensivstationen verantwortlich (Geffers und Gastmeier, 2011).

Unter den bakteriell verursachten Sepsen ist die *Pseudomonas*- Sepsis mit 39% diejenige mit der höchsten Letalität (Scheetz *et al.*, 2009). Ein erhöhtes Infektionsrisiko durch *P. aeruginosa* besteht auch bei Patienten mit Verbrennungswunden (Kerr und Snelling, 2009), bei beatmeten Patienten und beim Einsatz von Harnwegskathetern oder als Folge von Obstruktionen oder instrumentellen Manipulationen im Urogenitaltrakt (Hahn *et al.*, 2009). Chronische Infektionen der Lunge mit *P. aeruginosa* stellen zurzeit auch das größte Problem bei der Mukoviszidose dar und sind eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität (Cobb *et al.*, 2004). Isoliert man die Bakterienstämme aus der Lunge bei chronischem Befall mit *P. aeruginosa*, so findet man häufig unbewegliche, schleimbildende Morphotypen (Mahenthiralingam *et al.*, 1994).

P. aeruginosa besitzt die Fähigkeit Biofilme zu bilden. Als Biofilm bezeichnet man eine vom Bakterium selbst produzierte polymere extrazelluläre Matrix, bestehend aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, in der die Mikroorganismen eingebettet vorliegen (Donlan und Costerton, 2002; Lopez *et al.*, 2010). Über Kanäle werden zum einen die Nährstoffversorgung und zum anderen die Kommunikation untereinander ermöglicht (Costerton *et al.*, 1999).

Biofilme werden vor allem an abiotischen oder biotischen Grenz- bzw. Oberflächen wie zum Beispiel auf Wasseroberflächen (flüssig – gasförmig) oder Böden (fest – gasförmig) gebildet. Auch die Haut, Katheter oder Prothesen stellen solche Grenzflächen dar und sind somit ein potentielles Habitat für die Besiedlung durch Mikroorganismen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass *P. aeruginosa* zur transienten Hautflora gehört (Cogen *et al.*, 2008).

Die Ausbildung von Biofilmen wird bei Pseudomonaden durch das Quorum Sensing-System reguliert (Häussler, 2010). Beim Quorum Sensing ermittelt das Bakterium über die Konzentration kleiner sekretierter Signalmoleküle, sogenannten Autoinducern, ihre eigene Zelldichte (Venturi, 2006). Die Autoinducer sind spezifisch, sie können also nur durch Mitglieder einer Spezies oder einer Familie erkannt werden (Federle und Bassler, 2003).

Für *Pseudomonas* sind bisher zwei regulative Quorum Sensing-Systeme beschrieben, das Las -System und das Rhl-System (Smith und Iglewski, 2003). Beide Systeme sind für die Produktion einer Vielzahl von Virulenzfaktoren verantwortlich (Tabelle 1). Das hierarchisch untergeordnet Rhl-System (Latifi *et al.*,

1996) reguliert u.a. auch die Synthese von Rhamnolipiden über eine Rhamnosyltransferase. Rhamnolipide sind Glykolipide (Fujita *et al.*, 1988). Sie bestehen aus Dimeren von 3-Hydroxyfettsäuren, welche über eine β -glycosidische Bindung an eine Mono- oder Di-Rhamnose-Einheit gebunden sind. Bis jetzt sind bis zu 60 verschiedene Rhamnolipide unterschiedlicher chemischen Struktur bekannt (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Am häufigsten findet man das Mono-Rhamnolipid Rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoat (Rha-C₁₀-C₁₀) und das Di-Rhamnolipid Rhamnosyl-Rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoat (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) (Abb. 1) (Soberon-Chavez *et al.*, 2005).

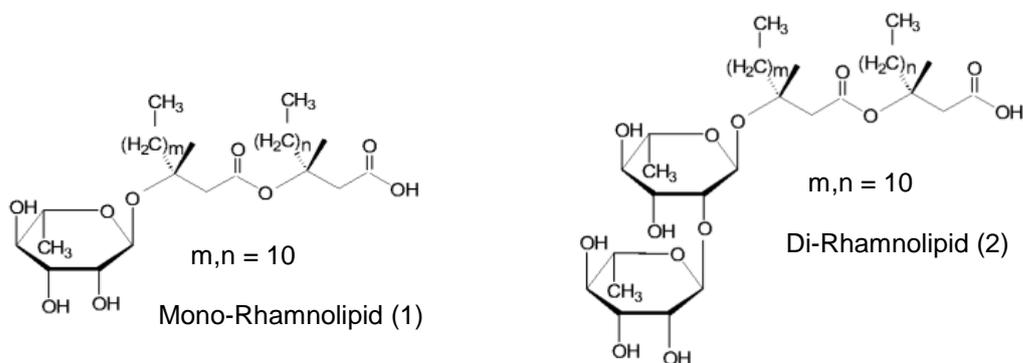


Abbildung 1

Aufgrund ihrer Struktur – den hydrophilen OH- und Säuregruppen und den hydrophoben Alkylresten – haben Rhamnolipide einen amphiphilen Charakter. Sie sind oberflächenaktiv und auch bekannt als Biosurfactants/ Biodetergenzien. Dadurch sind sie in der Lage hydrophobe Nährstoffe zu solubilisieren und erleichtern damit die Aufnahme durch das Bakterium (Beal und Betts, 2000; Koch *et al.*, 1991). Im Konkurrenzkampf mit anderen Bakterien zeigen Rhamnolipide gegen viele gram-negative und gram-positive Bakterien antibakterielle Aktivität, daneben wurden fungizide und viruzide Eigenschaften nachgewiesen (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Auf eukaryotische Zellen haben Rhamnolipide verschiedenste Effekte. Historisch wurden Rhamnolipide als hitzestabile Zytotoxine (Hämolyse) beschrieben (Sierra, 1960). Im Vergleich zu anderen Virulenzfaktoren (wie *Salmonella* oder *Pasteurella*) sind sie aber gering toxisch (Liu, 1974). Rhamnolipide können sich auch in die Zellmembran der Wirtszelle einlagern. Dies führt über einen noch unbekanntem Mechanismus zu einer Veränderung in den „tight

junctions“, was ein Eindringen des Pathogens erleichtert. Im Zusammenhang mit Mukoviszidose nutzt *P. aeruginosa* diesen Weg, um die Barrierefunktion des Lungenepithels zu zerstören und auf parazellulärem Weg ins Interstitium zu gelangen (Zulianello *et al.*, 2006).

Rhamnolipide haben einen ziliostatischen Effekt in explantierten Trachealzellen (Hingley *et al.*, 1986). Auf Makrophagen wirken Rhamnolipide zytolytisch, in geringen Konzentrationen verhindern sie die Phagozytose durch Makrophagen (McClure und Schiller, 1992).

Neben diesen Effekten verändern Rhamnolipide das Bakterium auch selbst. So induzieren Rhamnolipide das „Shedden“ von LPS, um die Oberflächeneigenschaften des Bakteriums anzupassen (Al Tahhan *et al.*, 2000). Auch Flagellin, ein weiterer Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* wird durch Rhamnolipide freigesetzt (Gerstel *et al.*, 2009). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Hauptstrukturprotein des Flagellums von Keratinozyten erkannt wird und die Induktion und die Sekretion von humanem- β -Defensin-2 (hBD2) sowie Interleukin-8 (IL8) zur Folge hat (Abtin *et al.*, 2008; Schlee *et al.*, 2007). Insbesondere hBD2 zeigt eine hohe antibakterielle Aktivität gegen gramnegative Bakterien, unter anderem auch gegen *P. aeruginosa* (Harder *et al.*, 1997).

Interessanterweise verliert eine Flagellin- defiziente Mutante ihre hBD2- und IL8-induzierenden Eigenschaften (Gerstel *et al.*, 2009) und unterstreicht die Bedeutung von Flagellin in der kutanen Pathogenerkennung und -abwehr.

Tabelle 1: Potenzielle Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa* (Reinhardt et al., 2012)

Virulenzfaktor	Wirkungsmechanismus
Adhäsine, z.B. Pili	Bindebrücken zur Wirtszelle, initiale Kolonisierungsschritte, Adhärenz an Muzin
Flagellum	Beweglichkeit, Adhärenz
Siderophore	Hohe Bindungsaffinität zu Eisen, dadurch Überleben im eisenlimitierten Wirtsmilieu
Proteasen	Gewebsinvasion und –zerstörung, Zerstörung von unspezifischen Abwehrmechanismen (z.B. Opsonin, Komplement)
LasA	Proteolyse der Elastin vernetzenden Peptide
LasB	Proteolytischer Abbau durch LasA vorgeschädigten Elastins
Alkalische Protease	Proteolytischer Abbau durch LasA vorgeschädigten Elastins
Rhamnolipid	Detergens-ähnliche Eigenschaften, Abtöten von Leukozyten, ziliostatisch
Phospholipase C (hämolytisch und nicht-hämolytisch)	Abbau von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, Bildung von Diacylglycerol oder Ceramid und Phosphorylcholin (Abbau von z.B. Lungensurfactant)
Zytotoxin	Porenbildung in Zellmembranen, dadurch Gewebsentzündung und –zerstörung
Exoenzym S	ADP-Ribosylierung von Vimentin
Exoenzym A	ADP-Ribolysierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2, Behinderung der Proteinsynthese, Abtötung von Makrophagen, Superantigen
Alginate, Mukoexopolysaccharid	Physikalische Abgrenzung, antiphagozytär

Zielsetzung der Arbeit

Als ubiquitär vorkommender Umweltkeim ist *P. aeruginosa* in der Lage biotische und abiotische Oberflächen zu kolonisieren und in Form von Biofilmen dauerhaft zu persistieren. Während des Überganges von einer planktonischen in eine sessile Lebensform wird unter anderem die bakterielle Zellhülle durch das *P. aeruginosa* eigene Biodetergenz Rhamnolipid modifiziert und damit einhergehend der Virulenzfaktor Flagellin freigesetzt. Insbesondere bei der Besiedlung von humanen Epithelien birgt die Freisetzung dieses PAMPs ein hohes Risiko für das Pathogen, erkannt und durch antimikrobielle Peptide des angeborenen Immunsystems bekämpft zu werden.

Da *P. aeruginosa* dennoch schwerwiegende Infektionen bei Menschen verursacht, ist Ziel dieser Arbeit zu untersuchen ob *P. aeruginosa* in der Lage ist, die durch Flagellin induzierte Immunantwort in Keratinozyten zu manipulieren.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

5 x EvaGreen QPCR Mix	Capillary, biolabproducts
5 x Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
ABTS	Roche, Mannheim
Aqua Spüllösung	Deltaselect GmbH, Pfullingen
BAPTA/AM	Tocris
Bovines Kollagen	BD Biosciences, Bedford, USA
Borax	ICN Biomedicals Inc., USA
Chloroform	Watertown, MA USA
Cryo-SFM	Promocell
DMSO	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	USB, Cleveland
Methylenblau	Sigma, Deisenhofen
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
PMA	Sigma, Deisenhofen
Rhamnolipide	JBR515, 15%ige Lösung aus Ra-C10-C10 und Ra-Ra-C10-C10; Jeneil Biosurfactant Co. Saukville, USA
Streptavidin-POD-Konjugat	Roche, Mannheim
Superscript	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Sigma, Deisenhofen
Flagellin	Laborstock
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen

Verbrauchsmaterialien:

12-Loch und 24-Loch Kultur-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (200 ml, 75 cm ³)	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch Platten für ELISA MaxiSorp TM	Nunc, Roskilde, Dänemark
Sterilfilter (0,45 und 0,2 µm Porenweite)	Schleicher und Schuell, Dassen

Zellen:

HaCats	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Fusenig (Krebsforschungszentrum Heidelberg)
A549	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rosenstiel (CAU Kiel)

2.1.1 Lösungen und Puffer:

PBS (pH 7,4)	80,0 g	Natriumchlorid
	2,0 g	Kaliumchlorid
	11,5 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	2,0 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	H ₂ O ad 1000ml	
TAE-Puffer	242 g	TRIS
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0,5M EDTA

2.1.2 Medien und Zusätze

Calciumchlorid-Lösung 60 µM	Gibco®, Invitrogen™
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)	Cell Concepts, Umkirch
EpiLife® (Medium für primäre Keratinozyten)	Gibco®, Invitrogen™
EDGS (defined growth supplements)	Gibco®, Invitrogen™
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz
L-Glutamin	Gibco®, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin

2.1.3 Primer

Gen- mRNA	Primer	Sequenz
GAPDH	GA-1	5`-CCAGCCCGACCATCGCTC-3`
GAPDH	GA-2	5`-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3`
Psoriasisin	vo- r1	5`-TGTCCTTTTTCTCAAAGACGTC-3`
Psoriasisin	vo- f1	5`-AGACGTGATGACAAGATTGAC-3`
hBD2	for-1	5`-GCCTCTTCCAGGTGTTTTTG-3`
hBD2	ra	5`-GAGACCACGGTGCCAATTT-3`

2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

2.2.1 HaCat-Zelllinie

Diese Zelllinie ist eine immortale, humane Keratinozytenzelllinie, die nicht tumorigen ist (Boukamp *et al.* 1988). Kultiviert wurden die Zellen in DMEM-Nährmedium unter Zusatz von L-Glutamin (2mM Endkonzentration), Penicillin (100U/ml), Streptomycin (100µg/ml) sowie 10% FCS. Die Zellen wurden gesplittet, wenn sie eine Konfluenz

von etwa 80-90% erreicht hatten. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 5% CO₂-Atmosphäre .

2.2.2 A549-Zelllinie

Die A549-Zelllinie stammt aus einem humanen Lungenkarzinom. Es sind immortale Epithelzellen der Alveolarzellen Typ II. Die A549 Zellen wurden in DMEM Nährmedium unter Zusatz von L-Glutamin (2mM Endkonzentration), Penicillin (100U/ml), Streptomycin (100µg/ml) sowie 10% FCS bei 37°C und in wasserdampfgesättigter 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.2.3 Primäre Keratinozyten

Die primären Keratinozyten wurden aus einem Präputium gewonnen. Dafür wurde zunächst die Subcutis abpräpariert. Das verbliebene Präputium wurde in Streifen geschnitten und über Nacht in 25ml PBS mit Zusatz von 1ml 2,5% Trypsin hydrolysiert. Am nächsten Tag wurde der Verdau durch Zugabe von 20ml FCS-haltigem DMEM (mit Zusatz von Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin) gestoppt. Nun wurde die Keratinozyten vom verhornten Teil der Epidermis abpräpariert und in der Flüssigkeit resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 800g für 5min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 23ml Epilife-Medium mit 0,06mM Calcium unter Zusatz von 5ml Penicillin/ Streptomycin und EDGS (epilife® Defined Growth Supplements) resuspendiert. Die Zellen wurden in einer kollagenisierten Flasche ausgesät und das Medium nach 3h gewechselt. Die Keratinozyten wurden alle 2 Tage gefüttert und waren nach sieben Tagen nahezu konfluent und konnten gesplittet werden.

Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

2.2.4 Subkultivierung der Zellen

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurden sie zweimal mit 1xPBS gewaschen und dann mit 5ml Trypsin-EDTA Lösung behandelt. Nach 5 - 7min wurde die Trypsinisierung durch Zugabe von FCS-haltigem DMEM gestoppt. Die Zellen wurden nun bei 800g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde entsprechend in DMEM bzw. Epilife Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in neue Kulturflaschen oder auf Platten ausgesät und weiter kultiviert. Die primären Keratinozyten wurden in der 2. bzw. 3. Passage benutzt.

2.2.5 Einfrieren von Zellen

HaCat/A549: Die Zellen wurden wie erwähnt gesplittet, nach dem Zentrifugieren wurden sie in kaltem (-20°C) DMSO-FCS-Medium (100µl DMSO (Dimethylsulfoxid)) in 900µl FCS) resuspendiert und in Cryo-caps überführt. Diese wurden bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Primäre Keratinozyten: Die Zellen wurden nach dem gleichen Verfahren wie die HaCats behandelt aber in kaltem (-20°C) Cryo-SFM-DMSO-Medium (100µl DMSO in 900µl Cryo-SFM (Promocell) resuspendiert.

2.2.6 Kollagenisieren von Kulturflaschen und Kulturplatten

Keratinozyten zeigen ein adhärentes Wachstumsverhalten. Sie heften sich über Adhäsionsproteine an die Extrazellulärmatrix, an die Basalmembran und an andere Keratinozyten. Um die Adhärenz der primären Keratinozyten zu verbessern wurden kollagenisierte Zellkulturflaschen und Kulturplatten verwendet, als Beschichtung diente bovines Kollagen (2,9mg/ml; BD Biosciences, Bedford, USA) 1%ig in HCl gelöst. Die Zellkulturflaschen wurden mit je 5ml, die 12-Lochplatten mit je 0,5ml pro Vertiefung, die 24-Lochplatten mit je 0,3ml pro Vertiefung für 3h bei 37°C inkubiert, anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen.

2.3 Stimulation der Zellen

Die primären Keratinozyten und HaCat-Zellen wurden wie unter 2.2.4 beschrieben in 12 bzw. 24 Lochplatten kultiviert. Vor der Stimulation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Die Stimulation der HaCat-Zellen erfolgte in FCS freiem DMEM Vollmedium. Sofern nicht näher spezifiziert, wurden Stimuli entsprechend der Tabelle 2 eingesetzt. Nach 24h Inkubation wurden die Überstände für die weitere Analyse abgenommen, zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Für Zeitreihen-Experimente wurden die Überstände nach 2, 4, 8, 20 und 24h Inkubationszeit entsprechend abgenommen. Für mRNA- und Protein-Analysen wurden die adhärennten Zellen nach Ende der Stimulation mit PBS gewaschen und ebenfalls bei -20°C gelagert. Bei Stimulation der Zellen mit BAPTA/AM und Rhamnolipiden erfolgte die Vorinkubation gleichzeitig.

Tabelle 1: Protokoll zur Stimulation der Zellen

Stimulans	Zugesetzte Menge (je Kavität)	Endkonzentration in der Kavität	Vorgehensweise
Bakterielle Kulturfiltrate	10µl/ml		24h stimulieren
BAPTA/AM	0,5µl einer 20mM Vorratslösung in DMSO	20µM	30min inkubieren, danach mit PBS waschen und neues Medium auftragen
PMA	1µl einer Vorratslösung mit 0,05mg/ml PMA in Epilife	100ng/ml	24h stimulieren
Flagellin	2µl einer Vorratslösung mit 37,5µg/ml Flagellin in Epilife	150ng/ml	24h stimulieren
Rhamnolipid	500µl einer Rhamnolipid-Lösung mit 0,1mg/ml in Epilife	0,1mg/ml	2h inkubieren, danach einmal mit PBS waschen und neues Medium auftragen
DMSO	0,5µl	0,1%	30min inkubieren, danach einmal mit PBS waschen und frisches Medium auftragen

2.4 Bakterienstämme

PAO 1 leo	Wildtyp
CF 391	Cystische Fibrose
Rhl A Mutante PAO1 Δ rhlA	rhlA-Gen-Deletion

Die *rhlA* Mutante wurde freundlicher Weise von Prof. Bjarnshold, Universität Kopenhagen zur Verfügung gestellt.

2.4.1 Nährmedien für Bakterien:

TSB-Medium (Caso Broth von Fluka)	30g/l
Pepton/Glucose-Medium (PG-Medium)	1% Pepton (aus Casein) 1% Glucose
LB-Medium (lysogeny broth Medium)	NaCl 10g/l Bacto Trypton 10g/l Hefeextrakt 5g/l

2.4.2 Kultivierung von *P. aeruginosa*

Für die Vorkultur wurden 3ml TSB-Medium mit Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200rpm kultiviert. Die Vorkultur wurde 5min bei 6000rpm zentrifugiert und das Pellet in 4ml sterilem H₂O resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 600nm gemessen. Nun wurden 10ml PG-Medium bzw. 10ml LB-Medium in 100ml Erlenmeyerkolben mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Diese wurden bei 200rpm, 37°C kultiviert. In der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0,4) wurde aus jedem Kolben jeweils 1ml abgenommen, zentrifugiert und sterilfiltriert. Eine zweite Probe wurde bei 60°C für 15min hitzeinaktiviert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach 24h wurden in der stationären Phase (OD₆₀₀ von 4) entsprechende Proben genommen.

2.4.3 Biochemische Untersuchungen des hBD2-reprimierenden Faktors

Wie unter 2.2 angegeben wurde CF391 in PG-Medium kultiviert. Zur Identifizierung des Faktors wurden Überstände aus der stationären Phase generiert, sterilfiltriert und biochemisch wie folgt analysiert.

Prüfen der Hitzebeständigkeit: Je 2ml Kulturfiltrat wurden für 20min auf 65°C bzw. 95°C erhitzt.

Säurefällung: 2ml Kulturfiltrat wurden mit 1M Salzsäure auf pH 2 gebracht und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einem neuen Eppendorfreaktionsgefäß mit 1M NaOH wieder neutralisiert. Das Pellet wurde in 2ml Wasser suspendiert und mit 1M NaOH neutralisiert.

Proteinverdau: Proteinase K ist ein Enzym, welches bei ausreichender Inkubationszeit viele Proteine verdaut. 2ml Kulturfiltrat wurden 3h bei 37°C mit 150µg/ml Proteinase K inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 90°C für 20min inaktiviert.

Anschließend wurden die verschiedenen Proben auf ihre hBD2-reprimierenden Eigenschaften untersucht. Dazu wurden primäre Keratinozyten mit 10µl der entsprechenden Proben in Anwesenheit von Flagellin stimuliert und die hBD2-Sekretion nach 24h untersucht.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte über das RNA-Isolations-Kit NucleoSpin® RNA II von Macherey-Nagel nach dem vorgegebenen Protokoll.

Die Zellen wurden hierbei zunächst lysiert, anschließend homogenisiert und auf einen Filter aufgetragen, der RNA und DNA bindet. Kontaminierende DNA wurde durch rekombinante DNase verdaut. Salze, Metabolite und zelluläre Makromoleküle wurden durch Waschen mit verschiedenen Pufferlösungen entfernt. Die RNA wurde am Ende in RNA-freies Wasser aufgenommen.

2.5.2 hBD2-ELISA

Der hBD2-Nachweis in Zellkulturüberständen erfolgte mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs.

Lösungen:

Carbonatpuffer:	1,59g/l	Na ₂ CO ₃
	2,93g/l	NaHCO ₃
		pH 9,6
Waschpuffer/ Verdünnungspuffer:	0,5% Tween 20 in PBS	
Blockierlösung:	1% BSA in PBS	
Substratlösung:	ABTS Tablette in ABTS Puffer gelöst (Roche)	

Über Nacht wurde eine MaxiSorp 96-Loch-Platte (NUNC) mit dem ersten Antikörper (goat anti-hBD2, Pepro-Tech) in der Verdünnung 1:500 in 0,05M Carbonatpuffer (50µl je Loch) beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Lochinhalte verworfen und die Lochoberflächen mit 200µl Blockierlösung pro Loch für 20min (300rpm, 37°C) abgesättigt. Nach dem Waschschrift (3x waschen mit 200µl Waschpuffer je Loch)

wurden je Loch 50µl der Probe aufgetragen. Zur Ermittlung der Standardkurve wurde 10ng/µl hBD2 im gleichen Medium wie die zu untersuchenden Proben in 6 Schritten 1:10 verdünnt und in Doppelwerten aufgetragen. Die Platte wurde für 60min (300rpm, 37°C) inkubiert und anschließend, wie beschrieben gewaschen. Das gebundene hBD2 wurde über einen zweiten, biotinylierten hBD2-Antikörper (goat anti-hBD2, 0,5µg/µl, Pepro-Tech) nachgewiesen. Dieser wurde auf 0,2µg/ml in Waschpuffer verdünnt, je Loch wurden 50µl aufgetragen und 30min (300rpm, 37°C) inkubiert. Nach Waschen der Löcher wurde die Festphase mit je 50µl eines Streptavidin-POD-Konjugates (Roche, 1:10000 in Waschpuffer verdünnt) für 30min, 300rpm bei 37°C inkubiert.

Die Platte wurde nun 6x mit dem Waschpuffer (200µl je Loch) gewaschen und mit 50µl/Loch Substratlösung (ABTS) für etwa 15min bei Raumtemperatur entwickelt. Die Extinktion wurde bei 497nm gemessen.

2.5.3 Interleukin-8- ELISA

Lösungen:

Blockierlösung:	1% BSA in PBS 5% Sucrose
Reagenzpuffer:	0,05g BSA 50ml 1xPBS 25µl Tween20
Zitratpuffer (pH 5):	3,65g Zitronensäure-Monohydrat 5,9g Na ₂ HPO ₄ Dihydrat (ad 1 l Aqua dest.)
Substratlösung:	1 Tablette o-Phenylendiamindihydrochlorid (Sigma) auf 25ml Zitratpuffer 10µl H ₂ O ₂
1M H ₂ SO ₄ :	97% Schwefelsäure 1:19 verdünnt

Für den IL8-ELISA wurde das human CXCL8 / IL8 DuoSet ELISA Entwicklungssystem von R&D Systems verwendet.

Über Nacht wurde eine MaxiSorp96-Loch-Platte (NUNC) mit dem 1. Antikörper (1:180 in 1x PBS verdünnt) beschichtet. Dann wurde die Platte dreimal mit PBS 0,05% Tween20 (PBS-T) gewaschen und mit 250µl Blockierlösung pro Loch 1h bei Raumtemperatur blockiert. Der Waschschrift wurde nach jedem Inkubationsschritt dreimal wiederholt. Pro Loch wurden 50µl der Probe aufgetragen und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50µl des Detektionsantikörpers (1:180 in Reagenzpuffer verdünnt) pro Loch aufgetragen und 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschschrift wurden 50µl Streptavidin (1:200 verdünnt in Reagenzpuffer) pro Loch aufgetragen und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden nach dem Waschen 50µl Substratlösung in die Löcher gegeben. Nach 10min Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50µl 1M H₂SO₄ abgestoppt.

2.5.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der RNA aus den Zellen wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bestimmt. Die Messung erfolgte mittels eines UV-Detektors mit automatischer Quantifizierung bei 260nm (A₂₆₀), dabei entspricht eine A₂₆₀ Extinktion von 1 einer RNA- Konzentration von 41,2µg/ml (Sambrook J. und Russel D.W., 2001).

2.5.5 RT (reverse Transkription) – PCR

Die reverse Transkription dient dem Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase. Die reverse Transkriptase benötigt eine DNA-Polymerase und einen Primer zur Initiation. Verwendet wurden hierfür oligoDT-Primer, diese sind Thymin-Basen, die komplementär zum Poly-A-Ende der RNA sind. Im zweiten Schritt bindet die reverse Transkriptase und die cDNA kann synthetisiert werden.

Zunächst wurde 1µg RNA mit H₂O auf ein Volumen von 11,25µl gebracht. Dann wurden 1,5µl oligoDT (20µM, Invitrogen) hinzugefügt. Der Ansatz wurde bei 70°C für

10min inkubiert und danach auf 42°C heruntergekühlt. Anschließend wurde der folgende Mastermix hinzugefügt:

Mastermix:

4µl 5xPuffer von Invitrogen

1µl dNTP's (10mM)

2µl DTT

0,25µl Superscript von Invitrogen

Für 1h wurde bei 42°C die reverse Transkription durchgeführt, anschließend wurde der Ansatz 5min auf 90°C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren.

Nach Zugabe von 80µl H₂O betrug die cDNA- Konzentration 10ng/µl. Es lag ein Endvolumen von 100µl vor.

2.5.6 DNA-Aufreinigung

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem GeneJET™ PCR Purification Kit von Fermentas nach gegebenem Protokoll.

Hierbei wird DNA selektiv und reversibel an eine spezielle Glasfilter-Membran gebunden. Verunreinigungen werden anschließend mit verschiedenen Pufferlösungen entfernt und die reine, hochwertige DNA mit einem Nidrigsalzpuffer eluiert.

2.5.7 Real-time-RT-PCR (Light Cycler)

Bei der Real-time-RT-PCR handelt es sich um ein schnelles, vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung von mRNA-Expressionsleveln. In einem Schritt werden Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und PCR-Produkt-Quantifizierung kombiniert. Während der linearen Wachstumsphase können über Fluoreszenzfarbstoffe oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden, die während des PCR-Zyklus an die cDNA binden, direkt PCR-Produkte detektiert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe

werden mit Licht angeregt. Die gemessene Fluoreszenz korreliert dabei mit der quantitativen Menge des PCR-Produkts und wird in Echtzeit (real-time) über eine Software dargestellt. Es lassen sich so relative, aber auch absolute Quantifizierungen einer Ziel-mRNA durchführen. Für letzteres ist die Generierung einer externen Standardkurve nötig. Sie kann aus jeder cDNA mit bekannter Konzentration über eine Verdünnungsreihe und Mitführen der Probe erstellt werden. Jede quantitative RT-PCR wird durch Störgrößen, wie zum Beispiel unterschiedliche Ausgangsmengen von mRNA, beeinflusst. Eine Korrektur ist über eine Normalisierung der Expression des Ziel-Gens zur Expression eines Referenz-Gens möglich. Als Referenz-Gene eignen sich Housekeeping-Gene. Die mRNA-Expressionslevel des Ziel-Gens wurden deshalb in Relation zum Housekeeping-Gen GAPDH gesetzt. Es wurde der LightCycler (Roche Diagnostics) und als DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® (BIOTIUM) verwendet. Für eine Probe wurden 9µl Mastermix und 1µl cDNA-Probe (10ng/µl) verwendet.

Mastermix für 13 Proben:

97,5µl Aqua dest.

30µl EvaGreen®

3,75µl Primer 1

3,75µl Primer 2

2.5.8 Agarose-Gel-Elektrophorese

Für die Auftrennung von DNA wurde ein 1%iges Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 1x TAE Puffer (40mM Tris, 20mM Acetat, 1mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht und gelöst. Zur Detektion der DNA wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml dazugegeben. Nach Polymerisation wurden in die Taschen 5µl der Ladder (smart ladder, Eurogentec) bzw. eine Mischung von 5µl der Probe und 1µl eines 6fach-Lade-Puffers (0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin, 10mM Tris/HCl, pH 8,0) gegeben. Die Elektrophorese wurde für 45min bei 90V in einer Elektrophoresekammer durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1xTAE-Puffer. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA und der resultierenden Fluoreszenz auf dem UV-Tisch konnte die Auftrennung der DNA detektiert werden.

2.5.9 SDS-PAGE

Die Proteinauftrennung zur Flagellin-Detektion erfolgte mittels SDS-PAGE nach der Masse der Proteine. SDS lagert sich an Proteine an und bildet so eine negative Hülle. Eine Auftrennung nach Ladung wird so verhindert, weil die Eigenladung der Proteine maskiert wird. Es wurden folgende Polyacrylamidgele verwendet:

	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
Acrylamid 30%	1,67ml	0,63ml
Puffer (3M Tricin, pH 8,45, 0,3% SDS)	1,67ml	1,55ml
Glycerin (87%)	0,77ml	-
Aqua dest.	0,87ml	2,04ml
APS (10%)	25 μ l	75 μ l
TEMED	2,5 μ l	7,5 μ l
Gesamtvolumen	5ml	5ml

Die Proben wurden zur Auftrennung mit einem Probenpuffer (4% (w/v) SDS, 60% (w/v) Glycerol, 0,3M Tris, 0,01% Coomassie-Brillant Blue G250) versetzt und für 5min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und in die entsprechenden Taschen des SDS-Gels pipettiert. Die Trennung erfolgte im Mini-Protean III-System (BioRad) unter Verwendung eines Kathoden- (0,1M Tris, 0,1M Tricine, 0,1% SDS) und Anodenpuffers (1M Tris, pH 8,9). Als Größenstandard wurde die „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet.

2.5.10 Silberfärbung (Heukeshoven und Dernick, 1988)

Bei der Silberfärbung werden DNA, RNA und Proteine nach der Elektrophorese im Polyacrylamidgel angefärbt. Das Verfahren ähnelt der Entwicklung von Fotografien. Die Silberionen lagern sich an die negativen Seitenketten der Moleküle an und färben das Gel nach ihrer Reduktion durch Formaldehyd zu elementarem Silber an den entsprechenden Stellen schwarz.

Lösungen:

Fixierlösung:	H ₂ O	30ml
	Ethanol (96%, vergällt)	15ml
	Eisessig	5ml
Farmers Reducer:	4M NaOAc	5ml
	Ethanol (96%, vergällt)	15ml
	H ₂ O	24ml
	Eisessig	187,5µl
	pH 6.0 (eventuell einstellen)	
	wässrige Natriumthiosulfat-Lösung (1%)	5ml
	Glutaraldehyd (25%)	1ml
Imprägnierlösung:	H ₂ O	45ml
	AgNO ₃ (1%) in H ₂ O	5ml
	Formaldehyd-Lösung	12,5µl
Entwicklerlösung:	Na ₂ CO ₃ (12,5%)	14ml
	H ₂ O	56ml
	Formaldehyd-Lösung	28µl

Zur Fixierung wurde das Gel in einem Gefäß mit 35ml Fixierlösung für 30min geschüttelt. Danach wird die Fixierlösung abgegossen und das Gel im Farmers Reducer im oben angegebenen Volumen für 30min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Reducer-Lösung abgegossen. Es folgten 3 Waschschrte mit je 25ml H₂O für 10min. Dann wurde das Gel angefärbt. Hierfür wurde das Gel für 30min in der Imprägnierlösung geschüttelt. In diesem Schritt lagern sich die Silberionen an die Proteine an. Die Lösung wird abgegossen und das Gel mit der Entwicklerlösung versetzt. Formaldehyd reduziert Silberionen zu elementarem Silber. Abgestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 25ml Essigsäure (5%) für 30min auf dem Schüttler.

2.5.11 Immuno-Dot Analyse

Die Immuno-Dot-Analyse („Dot Blot“) ist wie der Western Blot ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine. Die Proben wurden punktförmig (5µl je Probe) auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2µm, GE Healthcare) aufgetragen. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und anschließend 1h mit einer Milchpulver-PBS-Tween20 Lösung (2,5g Magermilchpulver gelöst in 50 ml PBS-0,05% Tween20) behandelt. Danach wurde die Lösung verworfen und die Membran mit dem ersten Antikörper (αFliC, 0,25µg/ml) über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die Membran wurde sechsmal für je 10min mit 25ml PBS-Tween20 gewaschen. Nun wurde der zweite Antikörper (goat-α-rabbit) in 10ml einer 3%igen Milchpulverlösung 1:10000 verdünnt und mit der Membran für 1h auf dem Schüttler belassen. Nach dem Waschen der Membran mit PBS-Tween20 (3x je 10min) wurden die beiden LumiLight-Komponenten (Roche) 1:1 gemischt und auf der Membran verteilt. Nach 7min Inkubationszeit unter Lichtausschluss auf einer Folie wurde die Lumineszenz mit dem „Diana III Digital CCD Imaging System“ (Raytest) gemessen.

2.5.12 Western Blot

Der Western Blot ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine. Zunächst erfolgte eine Auftrennung mittels SDS-PAGE (2.5.9), anschließend wurden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Hierfür wurde eine Protean III Western Blot Apparatur verwendet. Die Übertragung erfolgte bei 120mA für 1h in einem Transferpuffer (48mM Tris, 39mM Glycin, 0,0375% SDS, 22,2% Ethanol (pH9,2)) auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2µm, GE Healthcare). Die Membran wurde nun für 1h mit Milchpulver-PBS-Tween20 geblockt. Die Detektion des Antigens erfolgte wie unter 2.5.10 beschrieben.

2.5.13 Trypanblaufärbung

Die Trypanblaufärbung ist ein Vitalitätstest für Zellen. Der saure Diazofarbstoff kann die Zellmembran von lebenden Zellen nicht passieren, durchdringt aber die defekte

Zellmembrane toter Zellen und kann dort als Anion an Proteine binden. Diese Zellen weisen dann eine dunkelblaue Farbe auf. Es wurde eine 0,07%ige Trypanblaulösung in PBS hergestellt und davon 400µl je Well (12-Well Platte) bzw. 200µl je Well (24-Well Platte) auf die Platten gegeben. Sofort danach wurden die Zellen fotografiert. Trypanblau ist zytotoxisch, aus diesem Grund müssen Trypanblaufärbungen immer sofort begutachtet werden.

2.5.14 LDH-Zytotoxizitätstest

Für den Zytotoxizitätstest wurde das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche nach Anleitung verwendet.

Bei der Nekrose/Zelllyse wird die Zellmembran geschädigt und in der Zelle befindliche zytoplasmatische Enzyme werden frei. Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist ein solches zytoplasmatisches Enzym. LDH oxidiert mit Hilfe von NADH/H⁺ Laktat zu Pyruvat. Der in dem Kit enthaltene Katalysator kann nun NADH/H⁺ zu NAD⁺ oxidieren, die dabei frei werdenden Wasserstoffatome reduzieren das gelbe Tetrazolium-Salz zu rotem Formazan-Salz (Abb. 2). Diese Farbreaktion korreliert direkt mit der Anzahl der abgestorbenen Zellen. Das Formazan-Salz ist wasserlöslich, seine Konzentration lässt sich photometrisch bei 540nm bestimmen.

Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurden die Zellen auf kollagenisierten 12-Well Platten kultiviert und über 24h mit unterschiedlichen Rhamnolipid-Konzentrationen inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, für 15s bei 13000g zentrifugiert und bei -4°C gelagert. Als Positivkontrolle wurde den entsprechenden Wells 10min vor Versuchsende 5µl des Lysispuffers hinzugefügt.

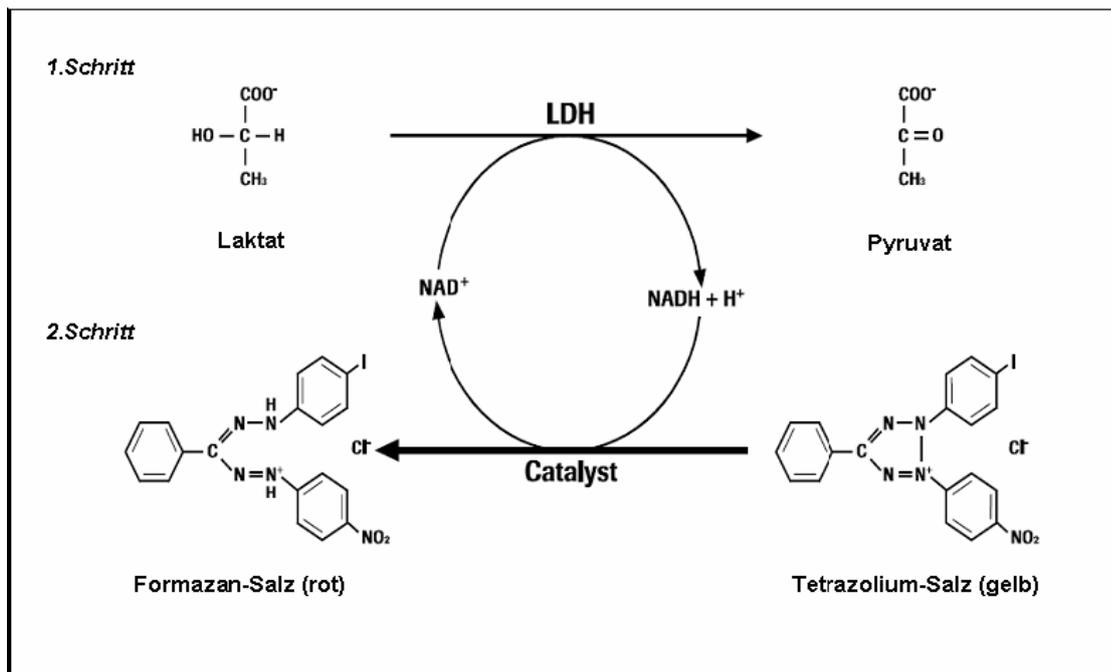


Abbildung 2: Farbreaktion beim LDH-Zytotoxizitätstest (Quelle: Anleitung Cytotoxicity Detection Kit, Roche)

2.5.15 Immunfluoreszenz

Primäre Keratinozyten wurden auf kollagenisierten Deckgläsern in 6-Well oder 12-Well-Platten kultiviert und stimuliert. Die Überstände wurden nach 24h abgenommen, die Deckgläser einmal mit 1xPBS gewaschen und die Zellen für 5min in -20°C kaltem Methanol fixiert und für 5min an der Luft getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Für immunologische Untersuchungen wurden die Zellen zunächst mit 10% Rota®ImmunoBlock Roth, in PBS/ 0,1%Tween20) für 1h blockiert. 20µl des 1. Antikörpers (GeneTex Inc., Psoriasis-Antikörper [47C1068], Mausmonoklonal, 1:100 in PBS/Tween20) wurden aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert (Endkonzentration: 50µg/ml). Die Zellen wurden nun 5x mit PBS/ 0,1% Tween20 für je 10min gewaschen. Danach folgte eine Inkubation (25µl je Deckglas) mit dem IgG Ziege α Maus-Antikörper (Molecular Probes, 1:200 verdünnt in PBS/Tween20, Endkonzentration: 10µg/ml) zusammen mit Hoechst-Reagenz (Dapi-Reagenz, Hoechst, 1:100 verdünnt in PBS/Tween20, Endkonzentration: 0,1 mg/ml). Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut gewaschen und in Kaisers Glyceringelatine (Merck, 1Tropfen) eingebettet.

2.5.16 Rhamnolipid-Quantifizierung mittels Methylenblaukomplexierung

Die Quantifizierung erfolgte nach der von Pinzon beschriebenen Methode (Pinzon und Ju, 2009). Hierzu wurde der pH-Wert von 150µl zu untersuchender Probe mit 1M HCl auf pH 2-3 eingestellt. Die Extraktion der Rhamnolipide aus der Probe erfolgte dann mit 750µl Chloroform. Die Probe wurde gevortext und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. 600µl der Chloroformphase wurden in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 765µl einer Methylenblaulösung (735µl Aqua dest., 30µl 0,1% Methylenblau in 10mM Borax-Lösung (pH 8,2), versetzt. Die Probe wurde homogenisiert und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Chloroformphase in eine Quarzküvette überführt und die Extinktion bei 600nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte bei einem pH unter 9,5, da sonst Methylenblau zu Dimethyltinolin oxidiert wird und es so zu Verfälschungen der Ergebnisse kommen kann.

2.5.17 HPLC G75

Bei der Gelfiltration werden Moleküle abhängig von der Größe getrennt. Das Säulenfüllmaterial besitzt Poren definierten Durchmessers. Bei der Größenausschlusschromatographie können große Moleküle im Gegensatz zu kleinen Molekülen nicht in diese Poren hinein diffundieren und werden so schneller in einem Flüssigkeitsstrom durch die Säule transportiert. Die kleinsten Moleküle werden so als letztes eluiert.

2.6 Darstellung der Ergebnisse

Die im Ergebnisteil aufgeführten Diagramme stellen, sofern nicht anders erwähnt, repräsentative Werte für mehrfach durchgeführte Experimente dar. Die angegebenen Messwerte sind jeweils die Mittelwerte aus Dreifachmessungen, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von *Pseudomonas aeruginosa*- Kulturfiltraten auf Epithelzellen

Der Kontakt zwischen Pathogen und Haut ist der notwendige erste Schritt um die Haut zu besiedeln und möglicherweise Infektionen zu verursachen. Als transienter Hautkeim (Fritsch, 2009) kann *Pseudomonas aeruginosa* gerade bei gestörten Barrierefunktionen der Haut auf lebende Epithelzellen treffen. Im Fall von *P. aeruginosa* induziert das PAMP Flagellin über den wirtseigenen TLR5 das AMP hBD2 sowie das Chemokin IL8.

Um zu untersuchen, inwieweit *Pseudomonas aeruginosa* in der Lage ist diese erste Immunantwort zu umgehen, wurden zunächst Epithelzellen mit bakteriellen Kulturfiltraten stimuliert und die resultierende hBD2- und IL8-induzierende Aktivität bestimmt.

3.1.1 Einfluss von Kulturmedium, Wachstumsphase und *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm auf die hBD2- und IL8-induzierende Aktivität in Keratinozyten

Je nach Wachstumsphase produziert *P. aeruginosa* unterschiedliche immunstimulatorische Faktoren. Um diese Einflüsse zu berücksichtigen wurden *P. aeruginosa* Stämme in PG-Medium kultiviert und sterilfiltrierte Überstände aus der logarithmischen sowie stationären Wachstumsphase für die Stimulation der Keratinozyten verwendet.

Im Anschluss wurde die Proteinsekretion von hBD2 und IL8 in den Überständen der stimulierten Zellen quantifiziert.

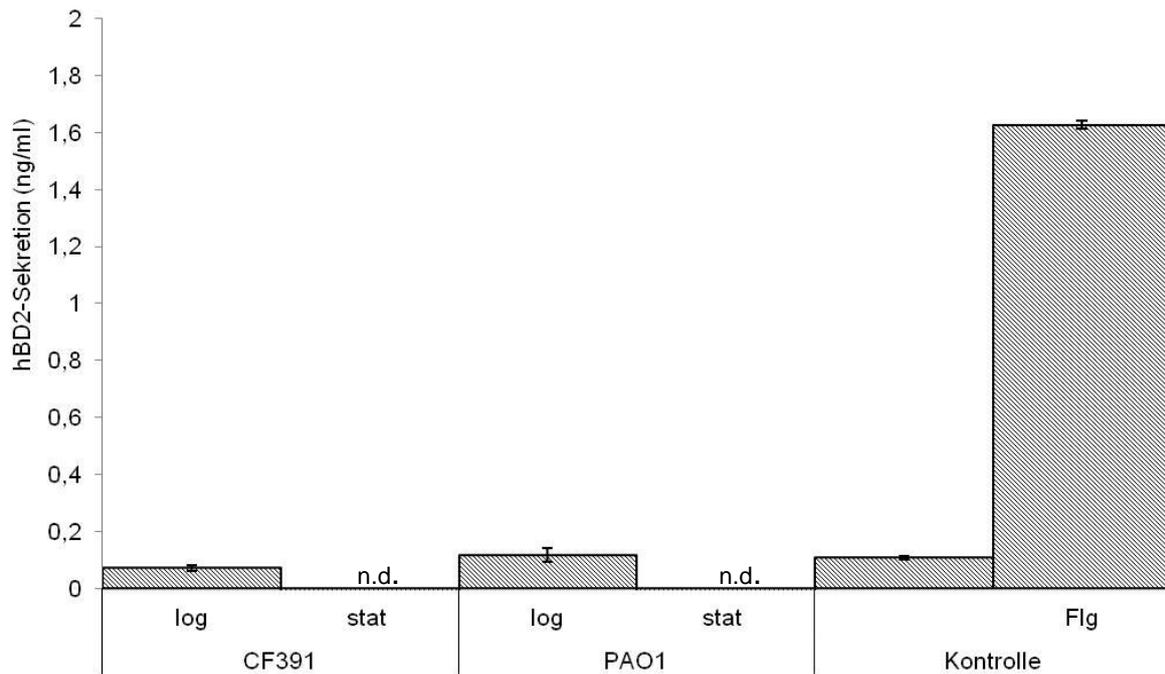


Abbildung 3: hBD2-ELISA der mit sterilfiltrierten bakteriellen Kulturüberständen von CF391, PAO1 stimulierten primären Keratinozyten Überständen. Die Stimulation erfolgte über 24h mit 10µl/ml Kulturüberstand. Als Kontrolle dienten Überstände nicht stimulierter Keratinozyten in EpiLife und mit Flagellin (Flg; 200ng/ml) stimulierte Keratinozyten.

log: Sekretion durch logarithmisch generierte Bakterienüberstände;

stat: Sekretion durch Kulturüberstände der stationären Phase;

n.d.: nicht detektierbar.

Sowohl Stimulationsexperimente mit *P. aeruginosa* Kulturfiltraten der logarithmischen als auch stationären Phase zeigten keine erhöhten hBD2-Expressionen in primären Keratinozyten (Abb. 3). Betrachtet man die IL8-Expression (Abb. 4) zeigte sich, dass alle *P. aeruginosa* Überstände im Vergleich zur Kontrolle erhöhte IL8-Expressionen induzierten. Dabei wurde die maximal detektierte IL8-Sekretion durch *P. aeruginosa* Kulturfiltrate der stationären Phase verursacht.

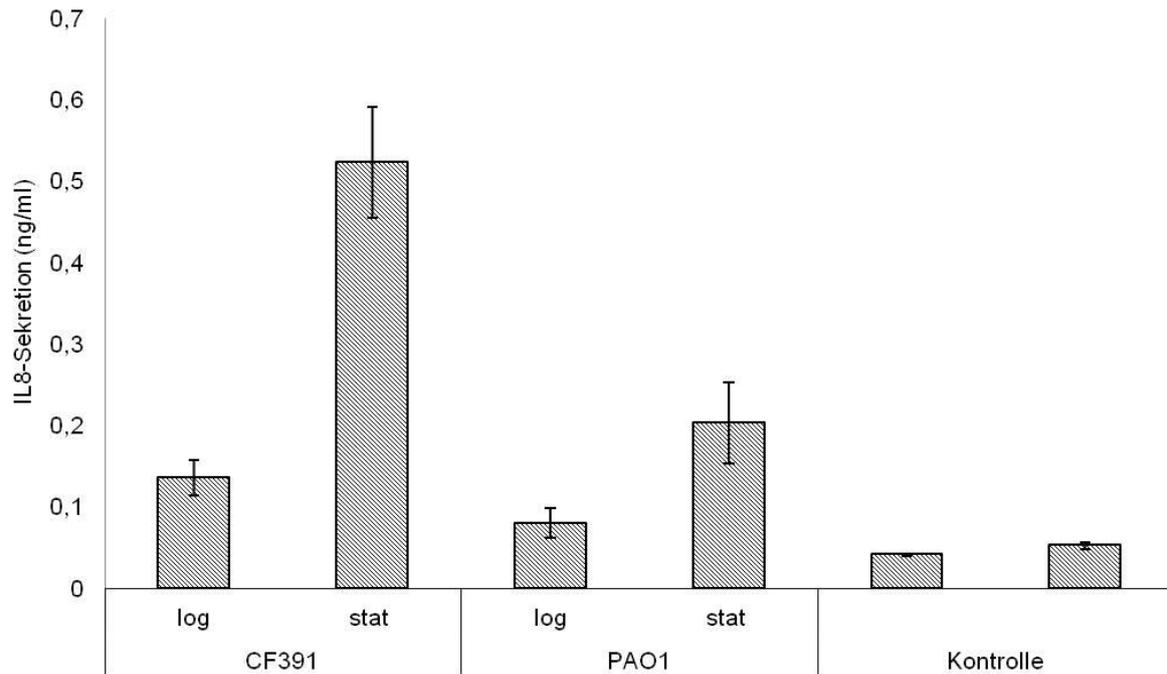


Abbildung 4: IL8-ELISA der mit bakteriellen Kulturfiltraten von CF391 und PAO1 stimulierten primären Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über 24h mit sterilfiltriertem bakteriellen Kulturüberstand (10µl/ml). Als Kontrolle dienten Überstände nicht stimulierter Keratinozyten in EpiLife.
 log: Sekretion durch logarithmisch generierte Bakterienüberstände;
 stat: Sekretion durch Überstände der stationären Phase.

3.1.2 Identifizierung des PAMPs

Ein bekanntes PAMP von *P. aeruginosa*, das sowohl die hBD2-Antwort als auch die IL8-Antwort auslöst, ist das Flagellin (Abtin *et al.*, 2008; Schlee *et al.*, 2007). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Flagellin-defiziente *Pseudomonas*-Mutante ($\Delta fliC$) auch keine hBD2-Antwort in Keratinozyten hervorruft (Gerstel *et al.*, 2009). Dot Blot-Analysen der verschiedenen PG-Überstände zeigten Immunreaktivität gegen Flagellin nur in Überständen der stationären Wachstumsphase (Abb. 5).

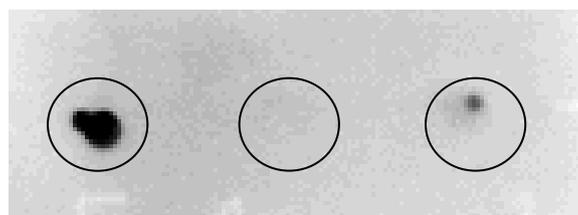


Abbildung 5: Anti Flagellin Dot Blot der in PG Medium kultivierten, sterilfiltrierten CF391 Kulturüberstände. Links wurden als Kontrolle 500ng Flagellin, in der Mitte 10µl PG Kulturüberstand der logarithmischen Phase und rechts 10µl PG Kulturüberstand der stationären Phase aufgetragen.

Flagellin ist als Induktor für hBD2 bekannt, dennoch war bei Stimulation der Zellen mit den Kulturfiltraten keine gesteigerte Expression zu detektieren (Abb. 3).

Aus diesem Grund wurden primäre Keratinozyten mit Kulturfiltraten der in PG-Medium kultivierten Bakterien und isoliertem Flagellin kostimuliert. Im Anschluss wurde die Sekretion sowohl von hBD2 als auch IL8 der Keratinozyten analysiert.

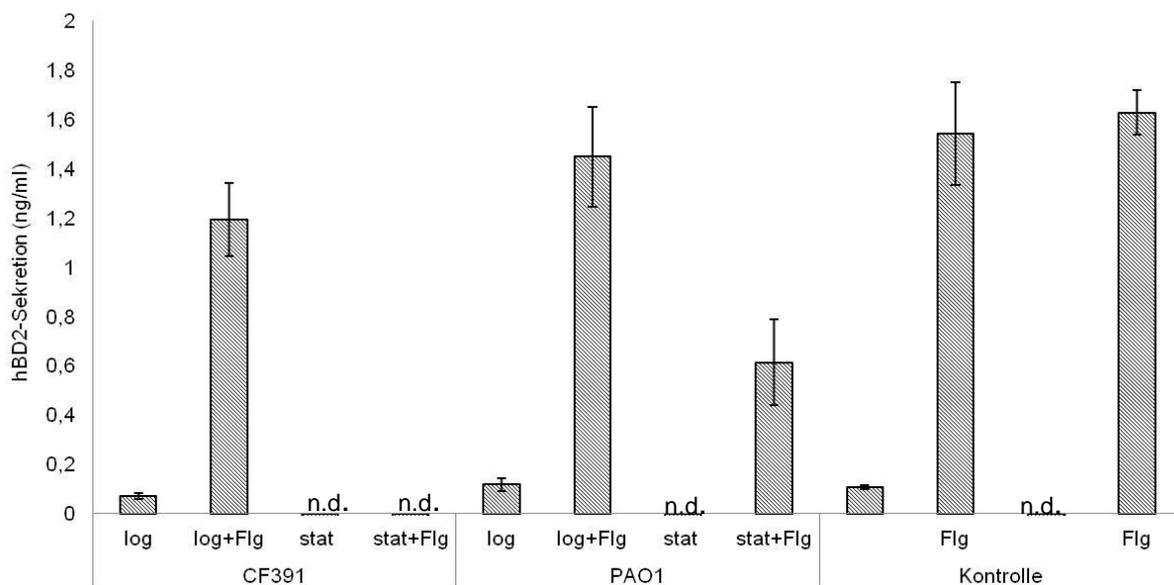


Abbildung 6: hBD2-Sekretion der mit bakteriellen Kulturfiltraten stimulierten primären Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über 24h mit Kulturfiltraten von PAO1 und CF391 (10µl/ml). Als Kontrolle dienten Überstände nicht stimulierter Keratinozyten in EpiLife.

log: Sekretion induziert durch logarithmisch generierte Bakterienüberstände;

stat: Sekretion induziert durch Überstände der stationären Phase;

Flg: mit Flagellin (200ng/ml) kostimulierte Kulturfiltrate;

n.d.: nicht detektierbar.

In der Kontrolle induzierte das isolierte Flagellin die Expression von etwa 1,5ng/ml hBD2. Auch bei Kostimulation der Zellen mit Kulturfiltraten der logarithmischen Phase zeigte sich eine erhöhte hBD2-Expression. Im Gegensatz dazu konnte bei Kostimulation von isoliertem Flagellin und Kulturfiltraten der stationären Phase keine bzw. eine deutliche Reduktion der hBD2-Sekretion detektiert werden (Abb. 6). Hinsichtlich der IL8-Expression konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abb. 7). Die Zellen, die mit Kulturfiltraten der logarithmischen Wachstumsphase stimuliert wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle nur eine gering erhöhte IL8-Sekretion. Die IL8-Sekretion bei Stimulation mit Kulturfiltraten der stationären Phase war dagegen

deutlich erhöht. Kostimulation von Flagellin und bakterieller Kulturfiltrate induzierte in Keratinozyten eine maximale IL8- Sekretion.

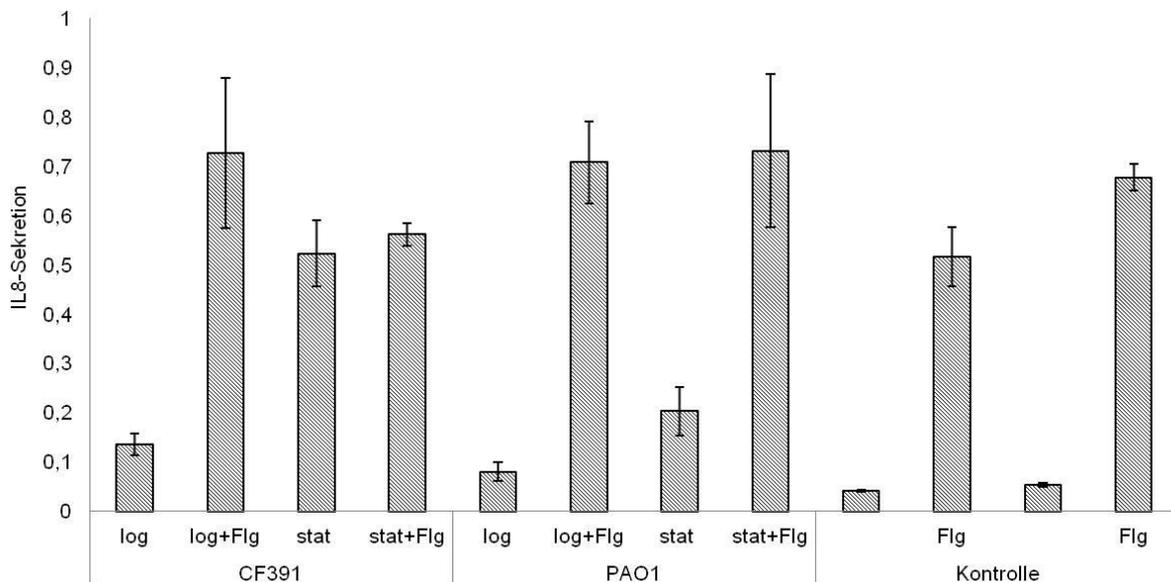


Abbildung 7: IL8-Sekretion der mit bakteriellen Kulturfiltraten stimulierten primären Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über 24h mit Kulturfiltraten von PAO1 bzw. CF391 (10µl/ml). Als Kontrolle dienten Überstände nicht stimulierter Keratinozyten in EpiLife-Medium.

log: Sekretion induziert durch logarithmisch generierte Bakterienüberstände;

stat: Sekretion induziert durch Überstände der stationären Phase;

Flg: mit Flagellin (200ng/ml) kostimierte Kulturfiltrate

3.1.3 Chromatographische Auftrennung des PG generierten bakteriellen Überstandes

Flagellin ist als Hauptauslöser der hBD2-Expression in Keratinozyten bekannt und konnte in den untersuchten PG generierten bakteriellen Überständen der stationären Phase im Dot Blot nachgewiesen werden (Abb. 5). Dennoch induzierten diese Überstände nicht die Expression von hBD2. Um zu untersuchen, inwieweit mögliche bakterielle Faktoren diese Flagellin-induzierte Antwort inhibieren können, wurde der Überstand chromatographisch an einer Superdex G75-Säule aufgetrennt (Abb. 8).

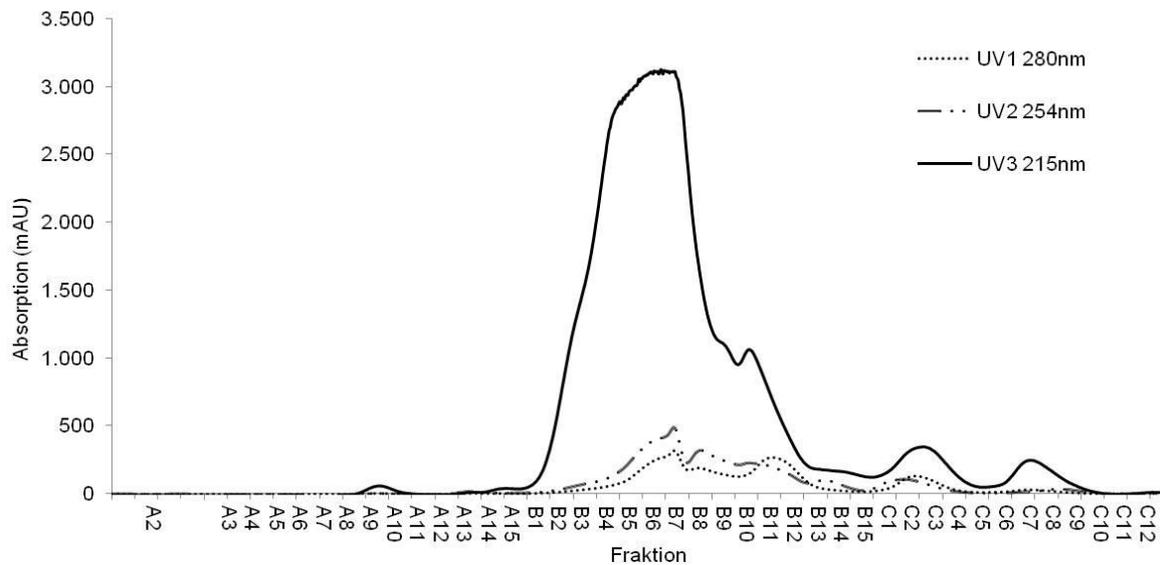


Abbildung 8: Größenaufschlußchromatografie eines PG generierten Kulturüberstands an einer Superdex G75 Säule, Laufmittel: 0,15mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,8

3.1.4 Kostimulation primärer Keratinozyten mit den Fraktionen und Flagellin

Einige Fraktionen bewirkten eine hBD2-Sekretion, während andere keine Aktivität zeigten (Abb. 9). Lediglich die Fraktionen A8 - A10 induzierten bei Stimulation der Keratinozyten eine hBD2-Antwort. Um die Fraktionen zu identifizieren, die hBD2-Sekretion unterbinden, erfolgte eine Kostimulation mit Flagellin. Die Suppression der Flagellin induzierten hBD2-Sekretion war besonders in den Fraktionen A13, A15 und B1 zu sehen (Abb. 9).

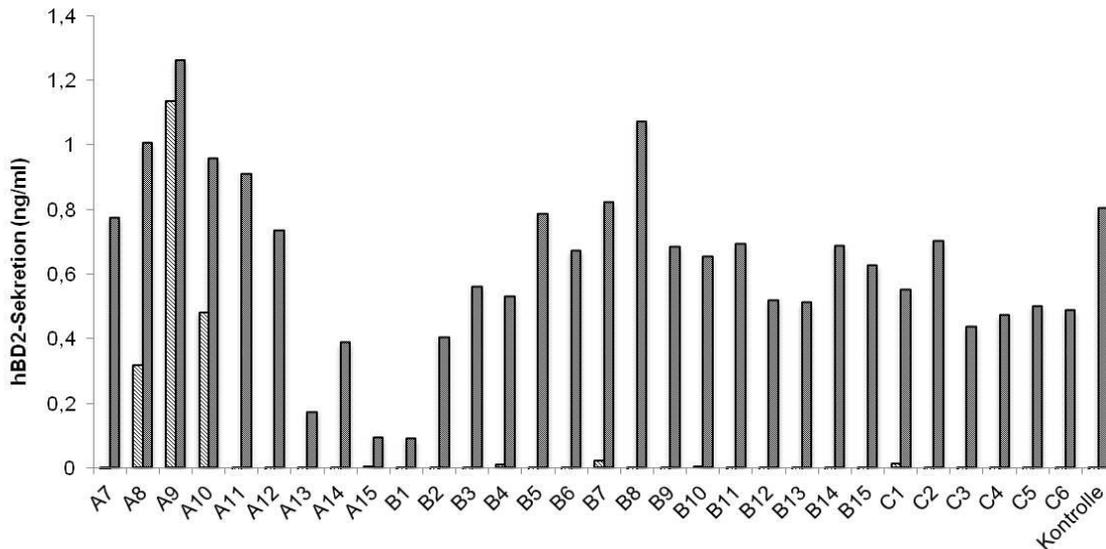


Abbildung 9: Induktion der hBD2-Sekretion durch größenauflösungschromatographisch aufgetrennte Fraktionen eines PG generierten Kulturüberstand (10µl/ml). Schraffierte Balken ■ entsprechen der durch die Fraktionen induzierten hBD2-Sekretion nach 24h. Graue Balken ■ stellen die Kostimulation der Fraktionen mit Flagellin (200ng/ml) dar.

3.2 Identifizierung des Faktors, der die Flagellin-induzierte hBD2-Antwort unterdrückt

3.2.1 Biochemische Eigenschaften des Faktors

Untersuchungen zur Hitzestabilität des gesuchten Faktors zeigten, dass die Hitzebehandlung des Kulturfiltrats bei 65°C bzw. 95°C keinen Einfluss auf die hBD2-supprimierende Wirkung des Faktors hatte (Abb. 10).

Auch die Behandlung des Kulturfiltrats mit Proteinase K zeigte keine Veränderung der supprimierenden Eigenschaften des Faktors auf die hBD2-induzierenden Eigenschaften von Flagellin (Abb.11).

Lediglich eine Behandlung des Kulturfiltrats mit Säure führte dazu, dass die Induktion der hBD2-Sekretion nicht supprimiert wurde (Abb.10). Eine Kostimulation mit Flagellin konnte diese hBD2-Sekretion nicht weiter steigern. Durch die Säurebehandlung des bakteriellen Kulturfiltrats entstand ein Pellet. Dieses resuspendierte Pellet induzierte nur eine geringe hBD2-Antwort in Keratinozyten und

war wiederum in der Lage eine durch Flagellin induzierte hBD2-Sekretion zu supprimieren (Abb. 10).

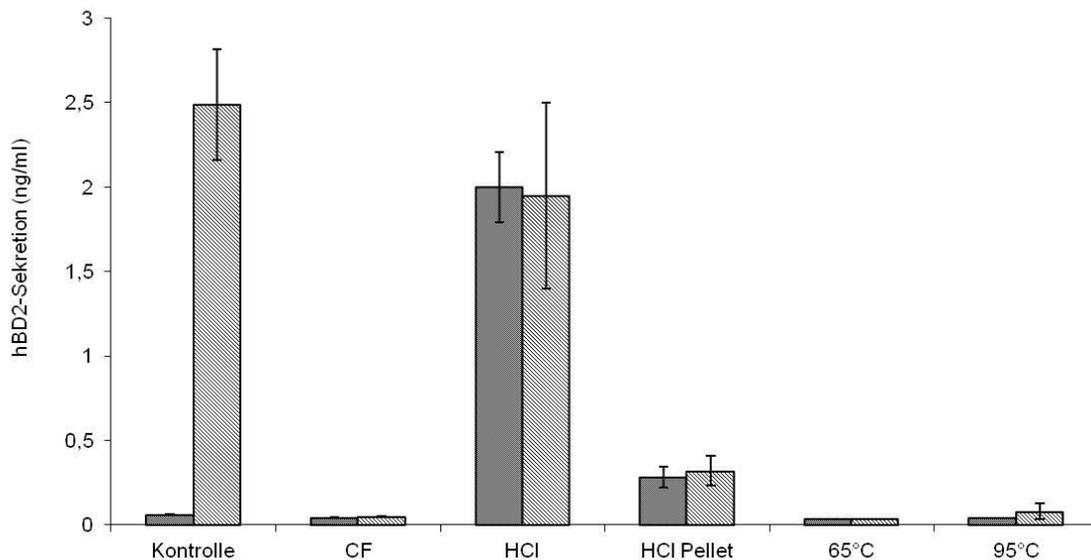


Abbildung 10: hBD2-Sekretion der mit bakteriellen Kulturfiltraten stimulierten primären Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über 24h. Schraffierte Balken ■ entsprechen den zusätzlich mit Flagellin versetzten Kulturfiltraten. In der ersten Spalte (Kontrolle) fand keine weitere Stimulation statt. Die zweite Spalte (CF) entspricht der Sekretion durch Stimulation mit in der stationären Phase generiertem Bakterienüberstand von CF391 (10µl/ml). Die Balken der dritten Spalte (HCl) entsprechen der Sekretion durch Stimulation mit dem Überstand von HCl-behandeltem Bakterienüberstand von CF391, der in der stationären Phase generiert wurde (20µl/ml). In der vierten Spalte (HCl Pellet) entsprechen die Balken der Sekretion durch Stimulation mit dem Pellet von HCl behandeltem Bakterienüberstand von CF391 der in der stationären Phase generiert wurde (20µl/ml). Die Balken der fünften Spalte (65°C) entsprechen der Sekretion durch Stimulation mit für 20min auf 65°C erhitztem, in der stationären Phase generiertem Bakterienüberstand von CF391 (20µl/ml). In der letzten Spalte entsprechen die Balken der Sekretion durch Stimulation mit für 20min auf 95°C erhitztem, in der stationären Phase generiertem Bakterienüberstand von CF391 (20µl/ml).

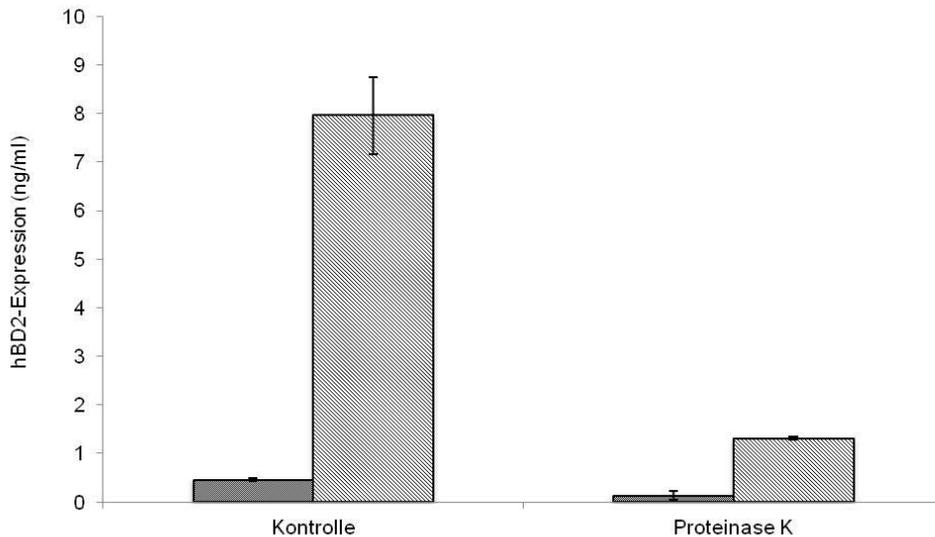


Abbildung 11: hBD2-Sekretion primärer Keratinozyten, stimuliert mit Proteinase K behandelten bakteriellen Kulturfiltraten stimulierter primärer Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über 24h. Schraffierte Balken  entsprechen den zusätzlich mit Flagellin versetzten Kulturfiltraten. In der ersten Spalte (Kontrolle) fand keine weitere Stimulation statt. Die zweiten Spalte (Proteinase K) entspricht der Sekretion durch Stimulation mit Proteinase K-behandeltem, in der stationären Phase generierten Bakterienüberstand von CF391 (10µl/ml).

Der supprimierende Faktor ist also hitzestabil, lässt sich durch Säure ausfällen und ist kein Protein. Massenspektrometrische Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zeigten Peaks bei m/z 503 und 649 und damit, dass es sich bei dem Faktor um ein Rhamnolipid handelt (Abb. 12).

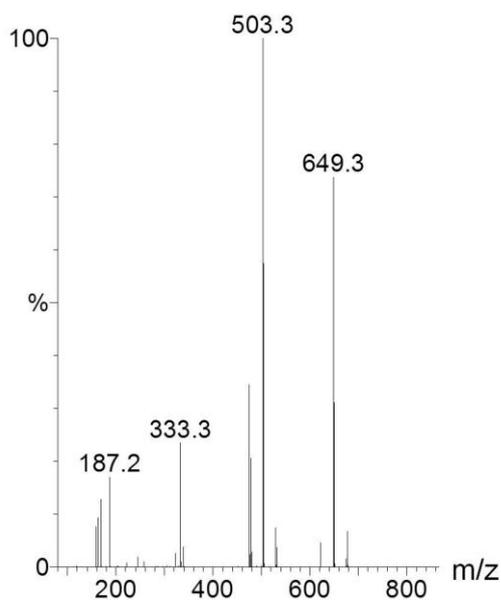


Abbildung 12: Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie des mit Chloroform extrahierten hBD2-supprimierenden Faktors. Die Ionen bei m/z 503 entsprechen Mono-Rhamnolipiden und die Ionen bei m/z 649 entsprechen Di-Rhamnolipiden. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. U. Gerstel zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Rhamnolipid-Quantifizierung

Da die Rhamnolipid-Produktion vom *P. aeruginosa*-Stamm abhängt, wurde der Rhamnolipid-Gehalt der beiden untersuchten Stämme mittels Methylenblau-Komplexierung quantifiziert.

Die höchsten Rhamnolipid-Konzentrationen wurden in PG-Überständen von CF391 nachgewiesen, gefolgt von PAO1. Als Kontrolle wurden PG-Überstände der Rhamnolipid-defizienten rhIA- Mutante bestimmt (Abb. 13).

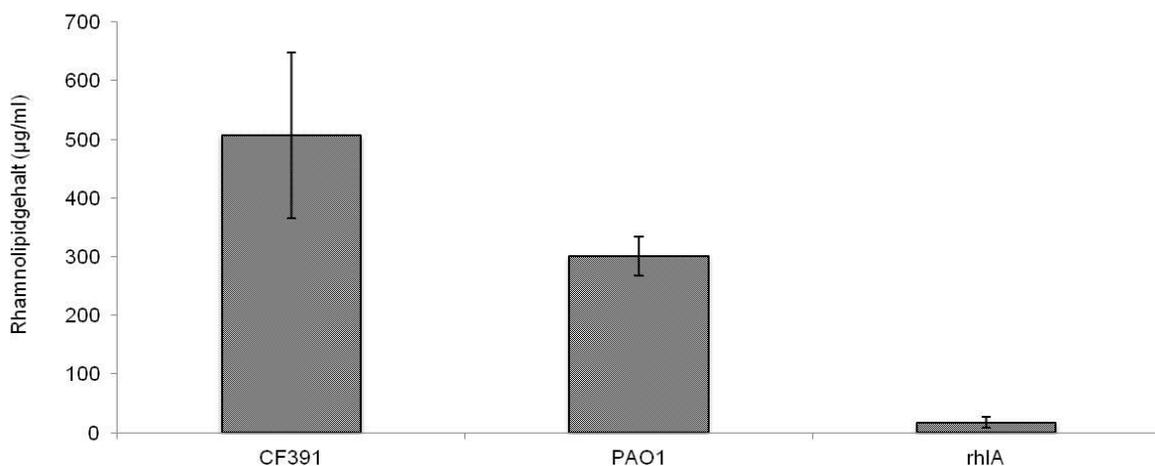


Abbildung 13: Rhamnolipid-Quantifikation bakterieller Kulturfiltrate von CF391, PAO1 und der PAO1 Δ rhIA-Mutante (rhIA). Rhamnolipid Konzentrationen der in PG-Medium generierten Kulturfiltrate der stationären Phase wurden mittels Methylenblau- Komplexierung bestimmt.

3.3 Wirkung von Rhamnolipiden auf epitheliale Zellen

3.3.1 Nachweis der Zytotoxizität von Rhamnolipiden

Rhamnolipide besitzen zytotoxische Eigenschaften. Um die Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität zu ermitteln, wurden A549 Zellen mit unterschiedlichen Mengen von Rhamnolipiden inkubiert und danach durch Anfärbung mit Trypanblau die Anzahl der abgestorbenen Zellen bestimmt. Bei der

unbehandelten Kontrolle konnte der Farbstoff nicht in die Zellen eindringen. Mit steigender Rhamnolipid-Konzentration nahm die Anzahl blau gefärbter Zellen zu. Ab einer Konzentration von 15µg/ml Rhamnolipid waren nahezu alle Zellen abgestorben (Abb. 14).

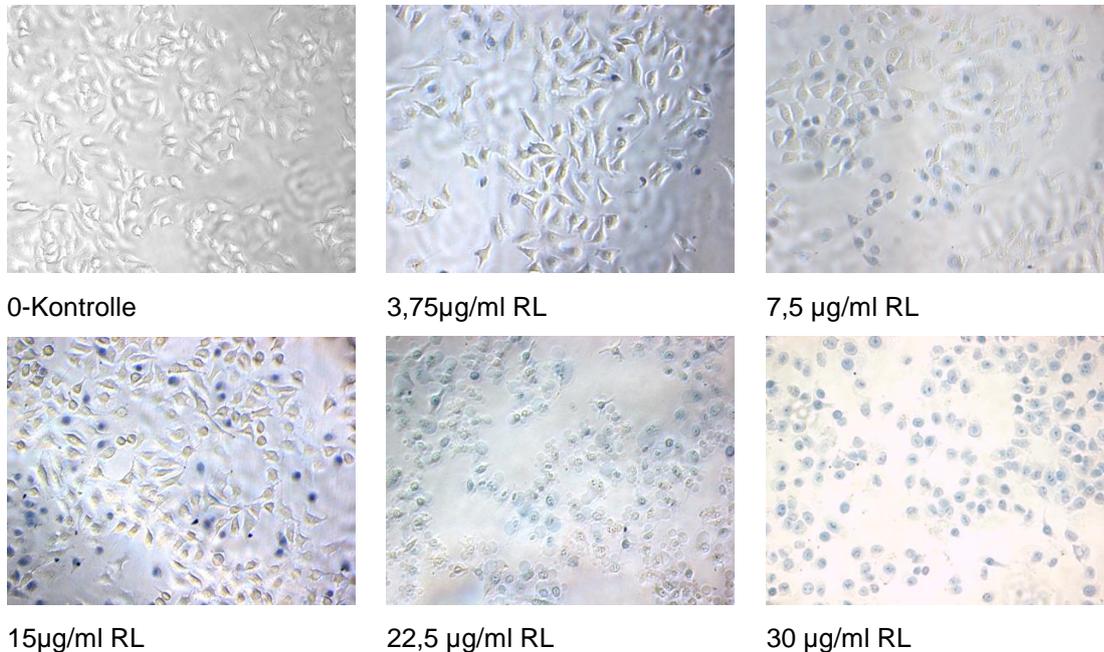


Abbildung 14: Zytotoxizität von Rhamnolipiden. A549-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen Rhamnolipid (RL; 0-30 µg/ml) für 24h inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und bei 40facher Vergrößerung fotografiert.

Zur Bestätigung wurde ein Zytotoxizitätstest auf primären Keratinozyten durchgeführt (Abb. 15). Der Test basiert auf dem Nachweis von aus Zellen freigesetzter LDH (Laktatdehydrogenase). LDH ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in allen Zellen vorliegt. Wird die Plasmamembran aufgrund einer Schädigung durchlässig, gelangt das LDH in den Kulturüberstand und kann hier mittels einer Farbreaktion nachgewiesen werden.

Bei einer Konzentration von 22,5µg/ml Rhamnolipid starben bereits 20% der Zellen ab, erhöhte man die Konzentration auf 30µg/ml Rhamnolipid, stieg die Absterberate auf über 40%. Untersuchungen mit den Kulturfiltraten der Stämme CF391 und Δ rhIA zeigten, dass die Überstände im untersuchten Konzentrationsbereich wenig bzw. nicht zytotoxisch waren.

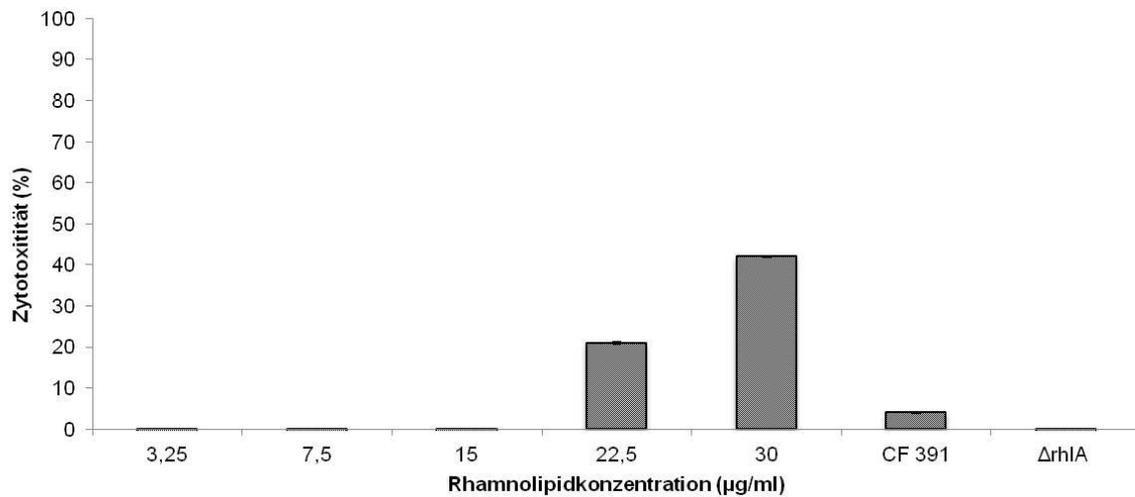


Abbildung 15: Zytotoxizität von Rhamnolipid auf primäre Keratinozyten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zellen wurden mit Rhamnolipid in den Konzentrationen 3,25; 7,5; 15; 22,5 und 30μg/ml stimuliert. Die Stimulation mit den in der stationären Phase generierten bakteriellen Überständen von CF391 und Δ rhIA erfolgte in der Konzentration 10μl/ml. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die Zytotoxizität mit dem Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche bestimmt.

3.3.2 Dosis-Wirkungsverhalten von Rhamnolipiden auf die Flagellin-induzierte Immunantwort in Keratinozyten

Die Zellen, die in einem Medium mit einer Rhamnolipid-Konzentration unter 30µg/ml behandelt wurden, waren noch vital. In einem Dosis-Wirkungs-Versuch wurde das Verhalten der Zellen auf verschiedene Rhamnolipid-Konzentrationen alleine und bei gleichzeitiger Stimulation mit Flagellin untersucht.

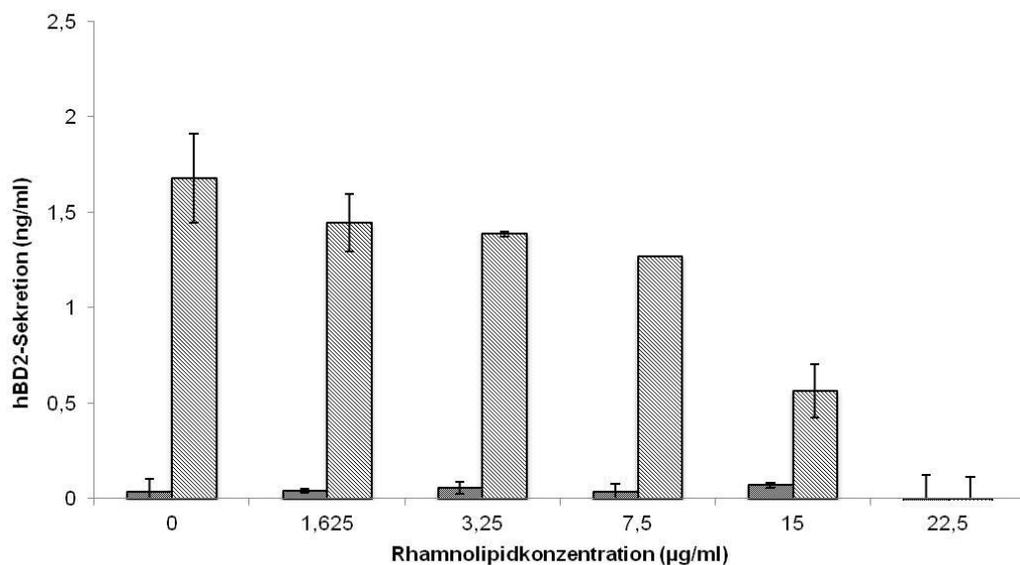


Abbildung 16: Einfluss von Rhamnolipid auf die Flagellin-induzierte hBD2-Sekretion. Primäre Keratinozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Rhamnolipiden (schraffierte Balken) bzw. Rhamnolipiden und Flagellin (200ng/ml, gestreifte Balken) über 24h behandelt und die resultierende hBD2-Sekretion wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert.

Abb. 16 zeigt, dass schon bei einer Rhamnolipid-Konzentration von 1,625µg/ml die Flagellin-induzierte hBD2-Antwort beeinträchtigt wurde. Mit Zunahme der Rhamnolipid-Konzentration verstärkte sich dieser Effekt. Die hBD2-Antwort wurde bei einer Rhamnolipid-Konzentration von 22,5µg/ml vollständig unterdrückt (Abb. 16). Im Vergleich dazu hatten die eingesetzten Rhamnolipid-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Flagellin-induzierte IL8-Antwort (Abb. 17).

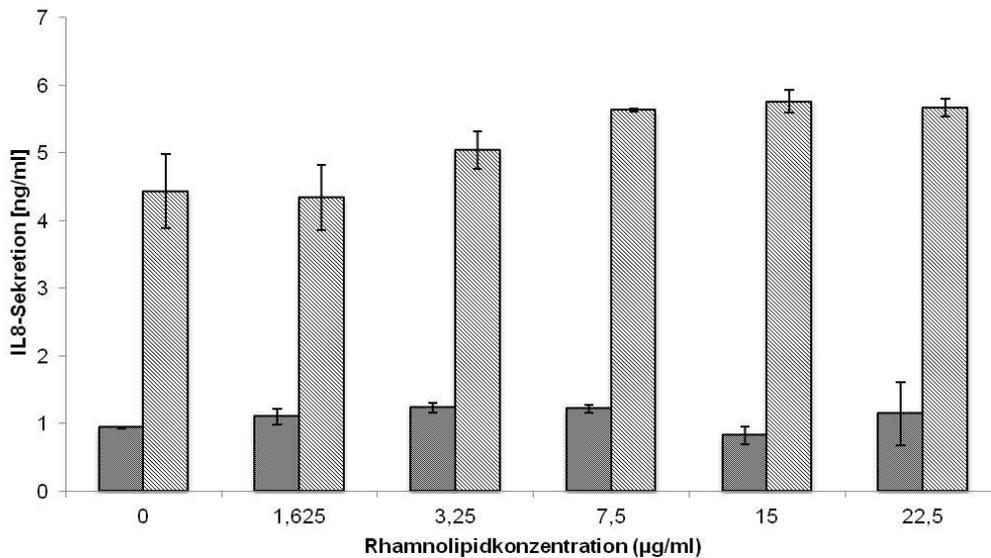


Abbildung 17: Einfluss von Rhamnolipid auf die Flagellin-induzierte IL8-Sekretion. Primäre Keratinozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Rhamnolipiden (schraffierte Balken) bzw. Rhamnolipiden und Flagellin (200ng/ml, gestreifte Balken) über 24h behandelt und die resultierende IL8-Sekretion wurde mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert.

3.4 Rhamnolipide inhibieren die durch Flagellin stimulierte Immunantwort in Keratinozyten auf mRNA- und Protein-Ebene

3.4.1 Nachweis des immunmodulatorischen Effekts von Rhamnolipiden auf Keratinozyten

Primäre Keratinozyten wurden über 24h mit Rhamnolipiden und Flagellin behandelt. In den Kulturüberständen zeigte sich, dass auf Protein-Ebene die durch Flagellin induzierte hBD2-Antwort von 2,2ng/ml auf 0,2ng/ml reduziert wurde, wenn eine Ko-Stimulation mit 15µg/ml Rhamnolipid durchgeführt wurde (Abb. 18). Auf mRNA-Ebene ließen sich mittels Real-Time-PCR vergleichbare Ergebnisse erzielen. Hier zeigte sich eine Reduktion der relativen hBD2-mRNA-Expression gegen GAPDH um etwa 75% (Abb. 19).

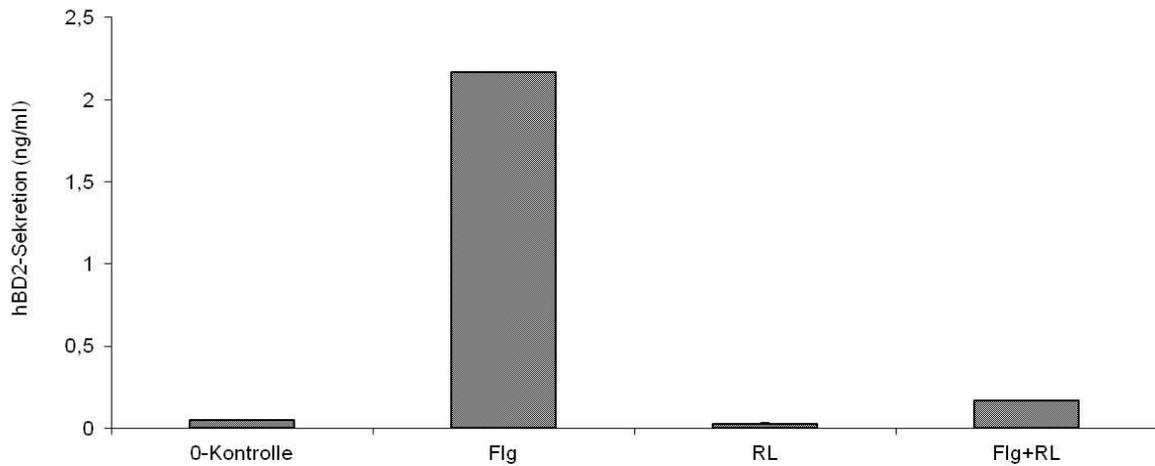


Abbildung 18: Rhamnolipide reduzieren die Flagellin-induzierte hBD2-Sekretion primärer Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit Flagellin (Flg; 200ng/ml) oder Flagellin in Anwesenheit von Rhamnolipiden (RL; 15µg/ml) für 24h stimuliert und die resultierende hBD2-Sekretion quantifiziert.

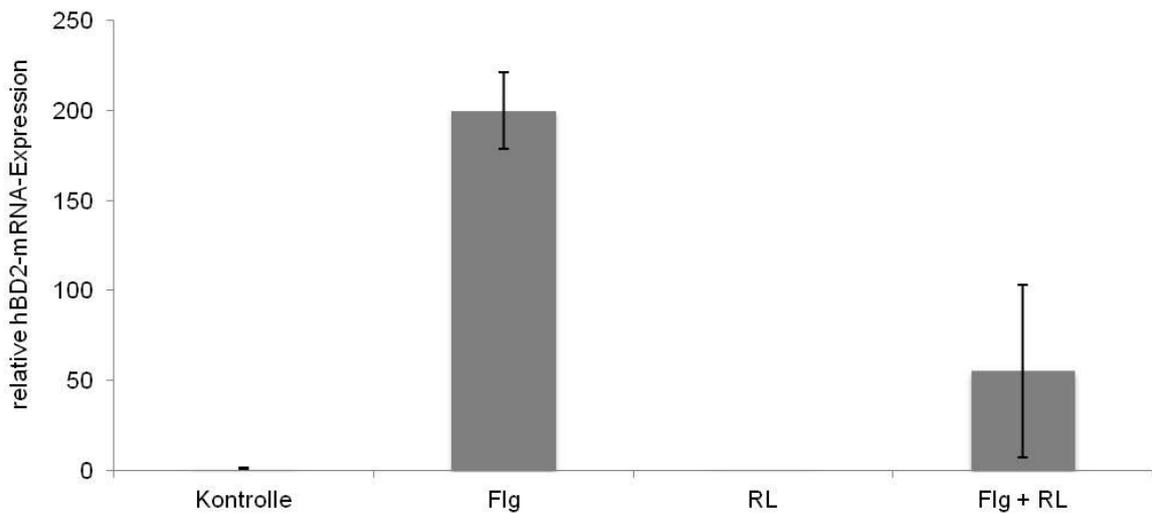


Abbildung 19: Rhamnolipide reduzieren die Flagellin-induzierte hBD2-mRNA. Primäre Keratinozyten wurden mit Flagellin (Flg; 200ng/ml) oder Flagellin in Anwesenheit von Rhamnolipiden (RL; 15µg/ml) für 24h stimuliert und die resultierende hBD2-mRNA Expression gegen GAPDH als „Housekeeping Gene“ quantifiziert.

Auch bei HaCat-Keratinocyten reduzierte eine Kostimulation von Rhamnolipiden mit dem hBD2-Induktor Flagellin die relativen hBD2-mRNA-Expression um 93,4% (Abb. 20).

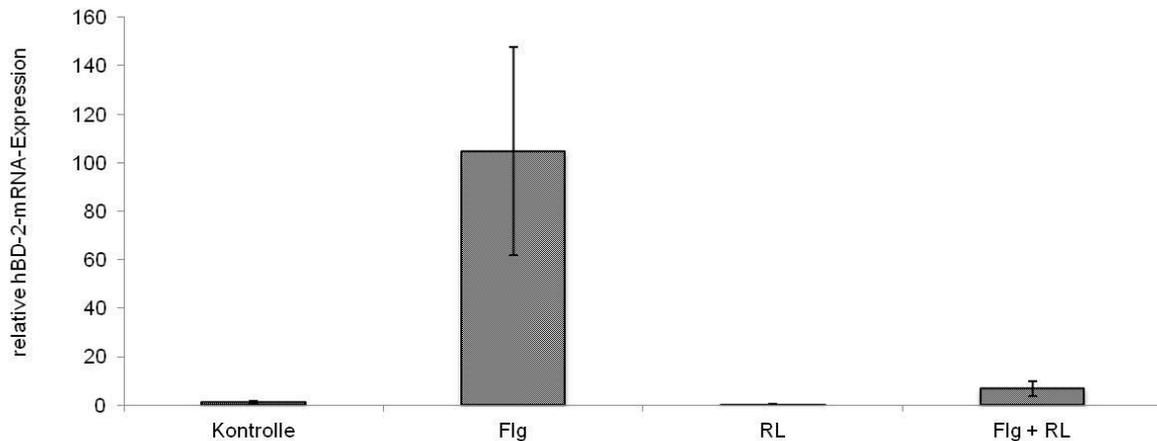
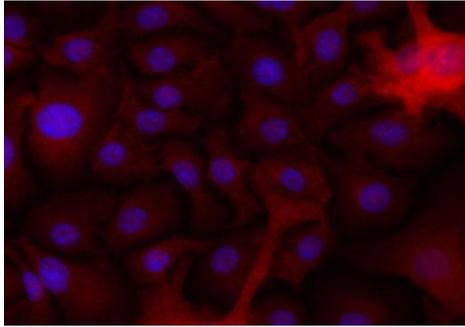


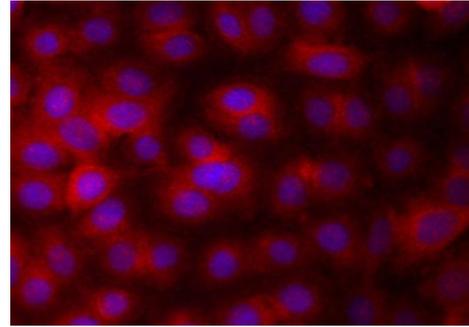
Abbildung 20: Rhamnolipide reduzieren die Flagellin-induzierte hBD2-mRNA Expression von HaCat Zellen. HaCat Zellen wurden mit Flagellin (Flg; 200ng/ml) oder Flagellin in Anwesenheit von Rhamnolipiden (RL; 15µg/ml) für 24h stimuliert und die resultierende hBD2-mRNA Expression gegen GAPDH als "Housekeeping Gene" quantifiziert.

Ein weiteres AMP, welches durch Flagellin induziert wird, ist Psoriasin. Bei Psoriasin handelt es sich um ein kleines Protein der S100-Familie, das bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielt. Unter anderem wirkt es so chemotaktisch auf CD4+ - T-Lymphozyten und Neutrophile (Jinquan *et al.*, 1996).

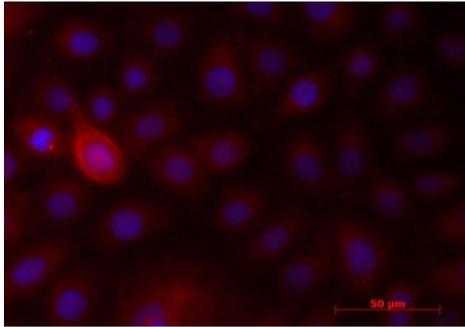
Auch für Psoriasin ließ sich zeigen, dass die Expression auf Proteinebene blockiert wurde. Hierfür wurden die stimulierten Zellen mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Es zeigte sich, dass bei der Immunfluoreszenzfärbung gegen Psoriasin die Fluoreszenzintensität bei den mit Flagellin stimulierten Zellen sehr viel stärker ist als bei nur mit Rhamnolipiden und Flagellin behandelten Zellen bzw. der Kontrolle (Abb. 21).



Kontrolle



Flagellin (200ng/ml)



Rhamnolipid (15 µg/ml) und Flagellin (200ng/ml)

Abbildung 21: Immunfluoreszenzbilder stimulierter primärer Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über 24h mit 200ng/ml Flagellin und/oder 15 µg/ml Rhamnolipid in DMEM, Länge des Balkens: 50µm.

Auch auf mRNA-Ebene ließ sich mittels Real-Time-PCR eine Reduktion der Flagellin-induzierten Psoriasin-Antwort nachweisen. Im Vergleich zur Flagellin-Kontrolle war die mRNA-Expression um etwa 88% geringer bei Ko-Stimulation mit Rhamnolipid (Abb. 22).

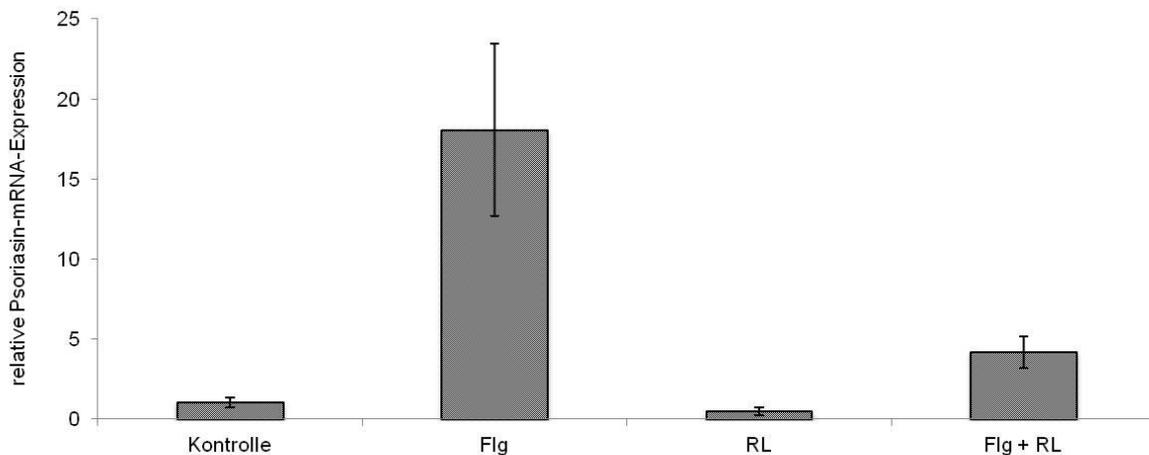


Abbildung 22: Rhamnolipide reduzieren die Flagellin-induzierte Psoriasisin-mRNA Expression. HaCat Zellen wurden mit Flagellin (Flg; 200ng/ml) oder Flagellin in Anwesenheit von Rhamnolipiden (RL; 15µg/ml) für 24h stimuliert und die resultierende Psoriasisin-mRNA Expression gegen GAPDH als Housekeeping Gene quantifiziert.

3.5 Zeitkinetik der inhibierenden Wirkung von Rhamnolipiden auf die Flagellin-induzierte Sekretion von hBD2 in Keratinozyten

Als amphiphile Substanzen haben Rhamnolipide verschiedene Möglichkeiten die Flagellin-induzierte hBD2-Expression zu inhibieren. Zunächst wurde der Zeitverlauf der Inhibition der Flagellin-induzierten hBD2-Expression durch Rhamnolipide näher charakterisiert. Dazu wurden primäre Keratinozyten mit Rhamnolipiden und Flagellin koinkubiert und die hBD2-Sekretion nach 2, 4, 8, 20 und 24h Inkubationszeit bestimmt. Wie in Abbildung 23 gezeigt, konnten ab 8h Inkubation kontinuierlich steigende hBD2-Mengen bei Stimulation der Keratinozyten mit Flagellin detektiert werden, die nach 24h das Maximum erreichten. Wurden die Flagellin-stimulierten Keratinozyten mit Rhamnolipiden koinkubiert, konnten erst nach 24h hBD2-Mengen detektiert werden, die etwa 1/10 der maximalen durch Flagellin induzierten hBD2-Sekretion betrug. Rhamnolipide allein hatten keinen Einfluss auf die hBD2-Sekretion (Abb. 23). Im Gegensatz zu der hBD2-Antwort konnte bereits 2h nach Flagellin-Stimulation IL8 detektiert werden (Abb. 24). Nach 8h war die durch Flagellin induzierte IL8-Antwort der Zellen auf 1,2ng/ml angestiegen, nach 24h konnte das

Maximum von 2,2ng/ml detektiert werden. Ko-Stimulation der Flagellin-stimulierten Keratinozyten mit Rhamnolipiden erhöhte die IL8-Sekretion auf maximal 6,8ng/ml nach 24h. Bei Stimulation der Keratinozyten nur mit Rhamnolipiden wurden nach 24h lediglich 0,9ng/ml IL8 quantifiziert Sowohl bei der hBD2- als auch bei der IL8-Sekretion war nach 20h ein leichter Rückgang zu beobachten.

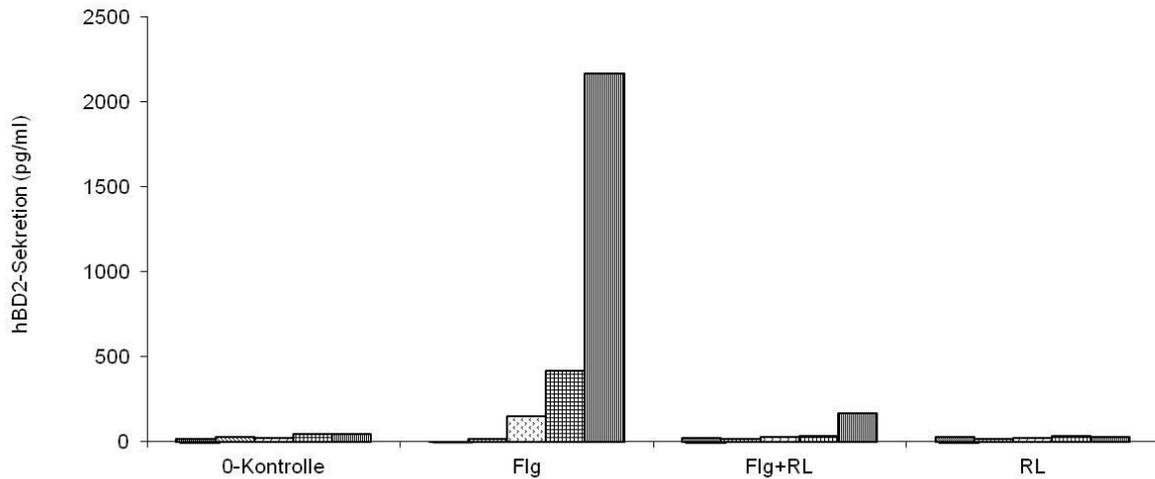


Abbildung 23: Rhamnolipide reduzieren die Flagellin-induzierte hBD2-Sekretion von primären Keratinozyten über einen Zeitraum von 24h. Die Zellen wurden mit Flagellin (Flg) und/oder Rhamnolipiden (RL, 15 µg/ml) stimuliert und die Überstände nach 2, 4, 8, 20 und 24h Inkubationszeit abgenommen. Die hBD2-Sekretion wurde mittels eines ELISAs bestimmt.

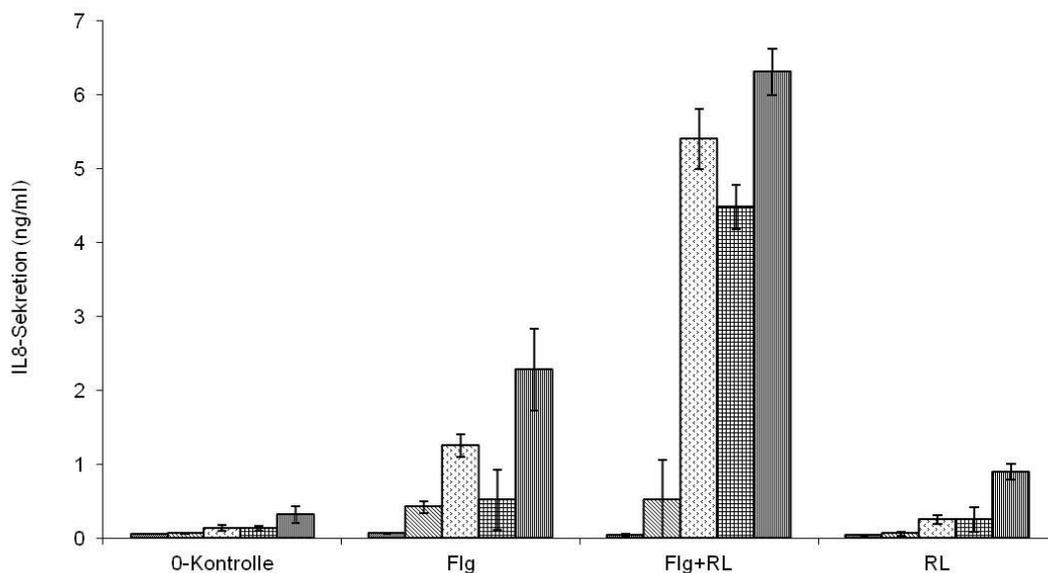


Abbildung 24: Rhamnolipide reduzieren nicht die Flagellin-induzierte IL8-Sekretion von primären Keratinozyten. Die Zellen wurden mit Flagellin (Flg) und/oder Rhamnolipiden (RL, 15 µg/ml) stimuliert und die Überstände nach 2, 4, 8, 20 und 24h Inkubationszeit abgenommen. Die IL8-Sekretion wurde mittels eines ELISAs bestimmt.

Da in den vorangegangenen Versuchen eine Modifikation von Flagellin durch Rhamnolipide nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden Keratinozyten 2h mit Rhamnolipiden vorinkubiert, anschließend gewaschen und nach Auftragen von neuem Medium mit Flagellin stimuliert. Nach 2, 4, 6 und 16h wurde die hBD2-Sekretion bestimmt (Abb. 25). Die Flagellin-induzierte hBD2-Antwort stieg im Verlauf von 8h auf maximal 6,5ng/ml an. Bei Ko-Inkubation der Zellen mit Flagellin und Rhamnolipiden wurde die hBD2-Sekretion unterdrückt, erst nach 16h konnte ein Anstieg auf 2,5ng/ml detektiert werden. Wurden die Zellen nur mit Rhamnolipiden stimuliert, wurde im Vergleich zur Kontrolle keine gesteigerte Expression beobachtet.

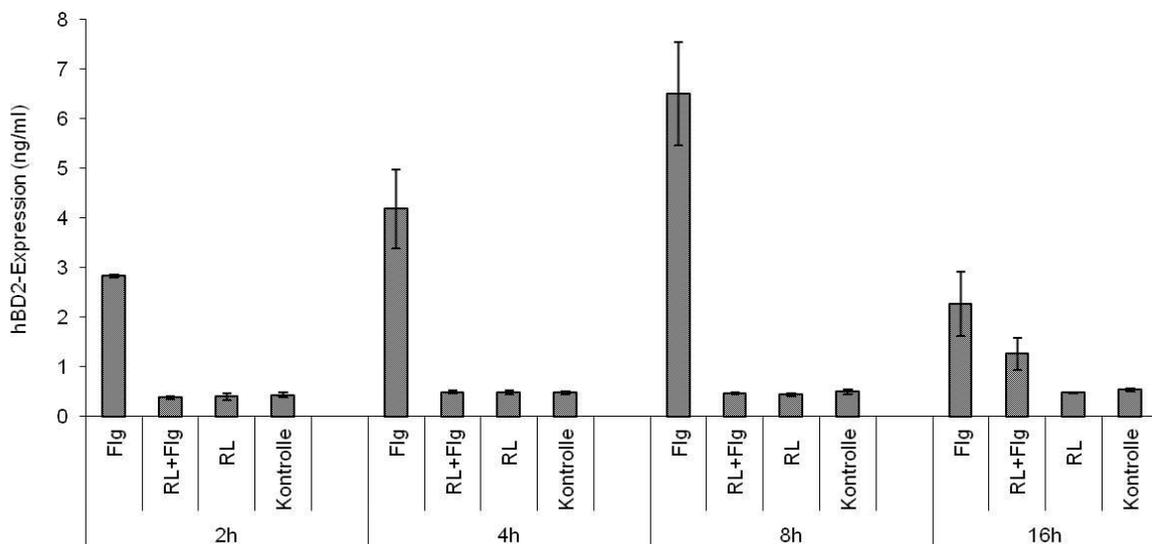


Abbildung 25: Zeitkinetik der hBD2-Sekretion von stimulierten primären Keratinozyten. Die Zellen wurden mit/ohne Rhamnolipid (RL; 15µg/ml) für 2h vorinkubiert und anschließend nach 2,4,6 und 16h mit Flagellin (Flg; 200ng/ml) stimuliert. Nach 24h Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und ein hBD2-ELISA durchgeführt.

3.5.1 „Effekt“ von Rhamnolipiden auf die PMA-induzierte hBD2-Sekretion

Neben Flagellin ist auch der Phorbolster PMA für die Induktion der hBD2-Expression in Keratinozyten bekannt. Um den Einfluss von Rhamnolipiden auf die PMA stimulierte hBD2-Expression zu untersuchen, wurden primäre Keratinozyten für 2h mit Rhamnolipiden vorbehandelt, gewaschen und mit PMA stimuliert. Wie in Abb. 26 zu sehen, induziert PMA die hBD2-Sekretion der Keratinozyten. Eine

Vorbehandlung der Zellen mit Rhamnolipiden blockiert die PMA induzierte Sekretion nahezu vollständig.

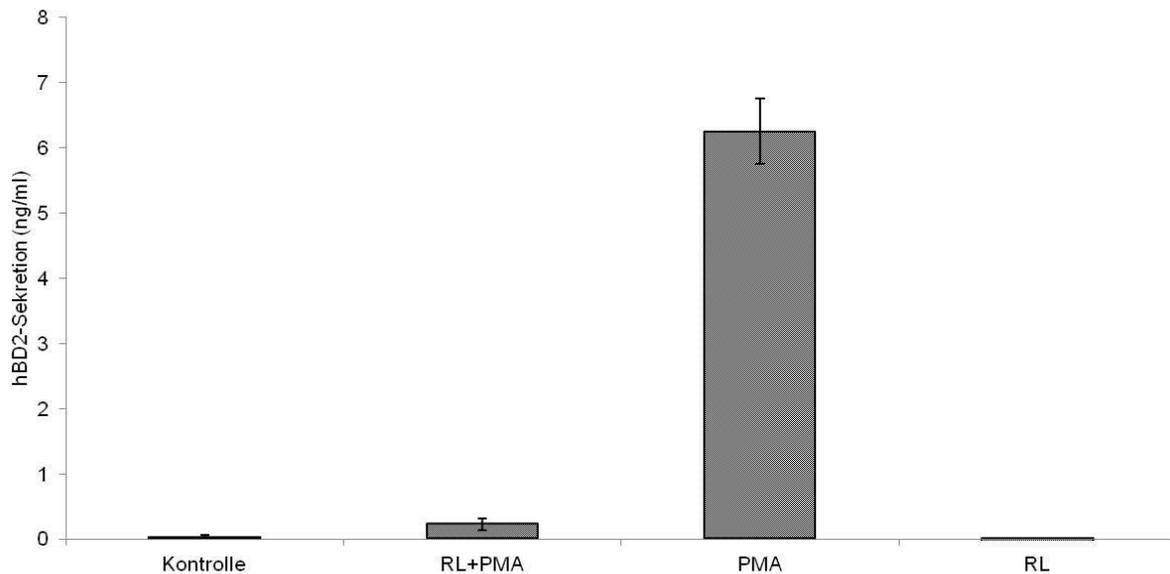


Abbildung 26: Rhamnolipide reduzieren die PMA-induzierte hBD2-Sekretion von primären Keratinozyten. Die Zellen wurden für 2h mit Rhamnolipid (15µg/ml) vorinkubiert und anschließend mit PMA (100ng/ml) stimuliert. Nach 24h Inkubationszeit wurde die hBD2-Sekretion mittels eines ELISAs bestimmt.

3.5.2 Molekulare Mechanismen der inhibitorische Wirkung von Rhamnolipiden auf die hBD2-Expression in Keratinozyten

Rhamnolipide sind Komplexbildner. Sie werden aus diesem Grund häufig als Mittel eingesetzt, um mit Schwermetallionen verseuchte Gewässer zu klären (Mulligan *et al.*, 2001). Unter anderem werden auch Calciumionen von Rhamnolipiden gebunden (Ochoa-Loza *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, inwieweit eine Komplexierung von Calciumionen in den Keratinozyten eine induzierte hBD2-Expression unterbinden kann, wurden primäre Keratinozyten mit dem intrazellulären Calcium-Chelator BAPTA/AM behandelt und stimuliert. Es zeigte sich, dass das BAPTA/AM den gleichen Effekt auf die Zellen bezüglich der hBD2-Sekretion hat wie Rhamnolipide (Abb. 27). Die Flagellin-induzierte hBD2-Antwort betrug 9,2ng/ml, bei Kostimulation mit Rhamnolipiden sank die hBD2-Antwort auf 5,2ng/ml. Kostimulation mit BAPTA/AM ließ die hBD2-Expression auf einen Wert von 5,9ng/ml sinken. Behandelt man Keratinozyten mit Flagellin, Rhamnolipiden und BAPTA/AM konnte keine hBD2-

Sekretion mehr detektiert werden. Ähnliche Effekte wurden auch bei der Stimulation der Zellen mit PMA anstelle von Flagellin beobachtet (Abb. 28).

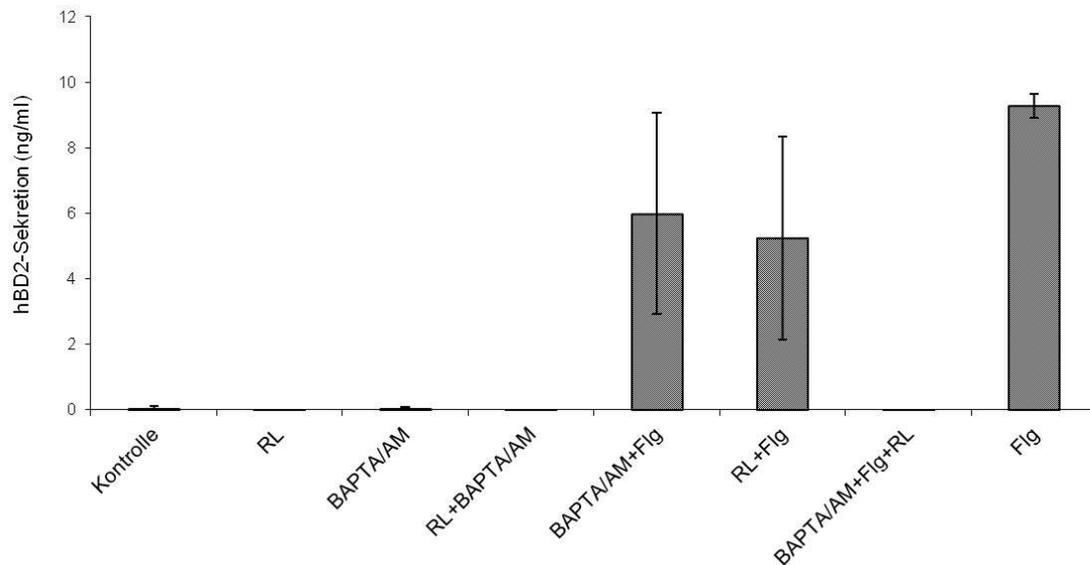


Abbildung 27: Der Calcium-Chelator BAPTA/AM supprimiert eine Flagellin-induzierte hBD2-Sekretion Die primären Keratinozyten wurden mit/ohne Rhamnolipid (RL; 15µg/ml) und/oder BAPTA/AM (20µM) 2h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Flagellin (Flg; 200ng/ml) stimuliert. Nach 24h Inkubationszeit wurde die hBD2-Sekretion bestimmt.

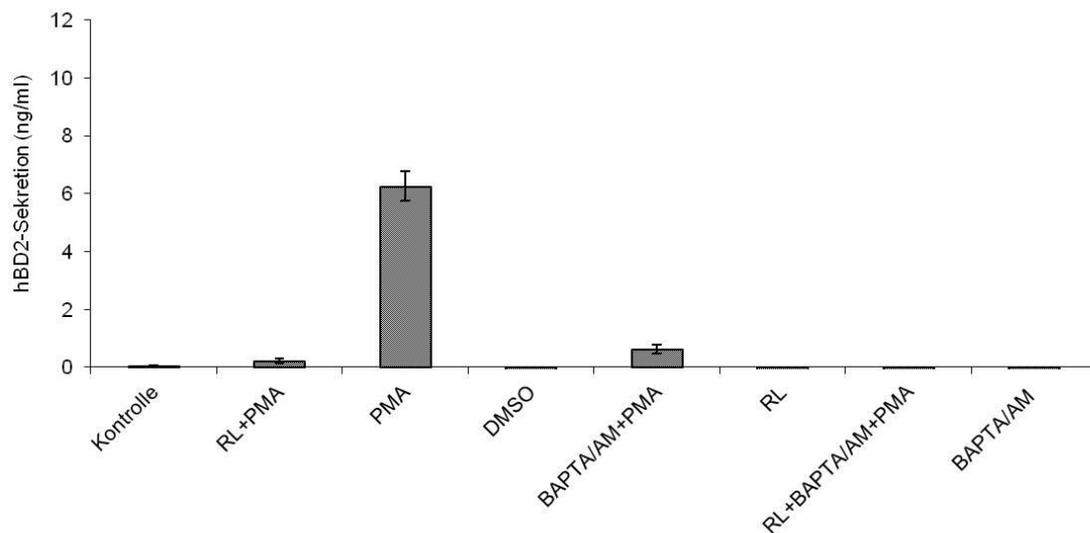


Abbildung 28: Der Calcium-Chelator BAPTA/AM supprimiert die PMA-induzierte hBD2-Sekretion primärer Keratinozyten wie. Die Zellen wurden mit/ohne Rhamnolipid (RL; 15µg/ml) und/oder BAPTA/AM (20µM) 2h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PMA (100ng/ml) stimuliert. Nach 24h Inkubationszeit wurde die hBD2-Sekretion bestimmt.

4 Diskussion

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Beobachtung, dass Kulturfiltrate von *Pseudomonas aeruginosa* trotz der Präsenz von Flagellin, nicht zu einer hBD2-Antwort in Keratinozyten führten. In dieser Arbeit konnte diese Beobachtung verifiziert und der supprimierende Faktor als Rhamnolipid identifiziert werden. Weiterführende Untersuchungen lassen vermuten, dass Rhamnolipide Calcium abhängige PK (Proteinkinase) C-Formen beeinflussen und so die Induktion der hBD2-Expression in Keratinozyten inhibieren (Dössel *et al.*, 2012). Bei hBD2 handelt es sich um ein antimikrobielles Peptid, das besonders gegen *P. aeruginosa* eine hohe Effektivität zeigt (Harder *et al.*, 1997). Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, die die natürliche Hautflora in Balance halten (Salzman *et al.*, 2010) und das Eindringen von Mikroorganismen kontrollieren (Chromek *et al.*, 2006; Moser *et al.*, 2002; Nizet *et al.*, 2001). Im Falle von *P. aeruginosa* ist es das Flagellin, welches bei Kontakt mit Keratinozyten die hBD2-Expression steigert (Abtin *et al.*, 2008; Schlee *et al.*, 2007).

Flagellin ist ein immunreaktives Monomer, welches als Multimer im Flagellum polymerisiert vorliegt. Das Flagellum selbst ist nicht immunreaktiv (Smith *et al.*, 2003), kann aber unter bestimmten Bedingungen oder durch Hitzeeinwirkung in monomeres Flagellin zerfallen. Diese monomere Form kann dann eine Immunreaktion in eukaryotischen Zellen auslösen (Hayashi *et al.*, 2001). Verma und Kollegen (Verma *et al.*, 2005) zufolge spielt die Glykosylierung des *P. aeruginosa*-Flagellins dabei eine entscheidende Rolle, da deglycosyliertes Flagellin eine signifikant reduzierte Immunantwort in Epithelzellen auslöst. Anhand der hier präsentierten Daten ist das Flagellin aus den hier generierten Überständen immunreaktiv (Abb. 10). Eine Modifikation des Flagellins durch das Pathogen konnte daher ausgeschlossen werden.

Basierend auf der Gelchromatographie sowie den biochemischen Eigenschaften ist der von *P. aeruginosa* gebildete Faktor hitze- und säurestabil sowie nicht proteinogen und konnte als Rhamnolipid identifiziert werden.

Es ist bekannt, dass Rhamnolipide ihrerseits die vermehrte Freisetzung von Flagellin aus dem Flagellum bewirken (Gerstel *et al.*, 2009). Offensichtlich maskieren Rhamnolipide dabei das immunreaktive Flagellin nicht, da es weiterhin von der Zelle

als PAMP erkannt wird. Dies unterstreichen die erhöhten IL-8-Expressionswerte (Abb. 4 und Abb. 7). Rhamnolipide interferieren offensichtlich selektiv mit der Signalkaskade, die die Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 veranlassen.

Rhamnolipide wurden früher als Hämolyse und in diesem Zusammenhang als zytotoxisch beschrieben (Liu und Mercer, 1963). Eine weitere Erklärung für die hier beobachteten Phänomene wäre, dass die Rhamnolipide eine so stark toxische Wirkung auf die Zellen hatten, dass diese nicht mehr zu einer normalen Zellfunktion in der Lage waren. Die durchgeführten Zytotoxizitätstests haben gezeigt, dass Rhamnolipide in der Tat zytotoxisch sind, die in diesen Untersuchungen eingesetzten Konzentrationen aber außerhalb dieses toxischen Bereichs lagen.

Die Reduktion der hBD2-Antwort ließ sich nicht nur bei Stimulation mit dem PAMP Flagellin nachweisen, sondern trat auch bei der Verwendung von IL1 β (persönliche Mitteilung durch Dr. Gerstel), einem weiteren hBD2-induzierendem Zytokin (Harder *et al.*, 2000), sowie PMA auf. Phorbolster können die PKC (Proteinkinase C) aktivieren, da sie als Diacylglycerin-Mimetika wirken (Püschel *et al.*, 2011). Die PKC liegt in nicht stimulierten Zellen inaktiv in der Zellmembran vor. Bei der Aktivierung der PLC (Phospholipase C) wird Triacylglycerin in Diacylglycerin und Inositol-triphosphat gespalten. Inositol-triphosphat bewirkt in der Zelle die Freisetzung von Calcium aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums. Calcium überführt zusammen mit Diacylglycerin die PKC in einen aktiven Zustand. Die PKC ist für eine Vielzahl von Reaktionen im Zellinneren verantwortlich. Über verschiedene Wege werden durch sie Signale weitergeleitet und die Transkription von vielen Proteinen reguliert, wie zum Beispiel die Expression von proinflammatorischen Mediatoren (Dolmetsch *et al.*, 1997) oder von AMPs wie hBD2 (Jang *et al.*, 2004).

Über den asialoGM1 Rezeptor in der Zellmembran ist über noch nicht geklärte Wege auch die Aktivierung der PLC durch Flagellin und damit ebenfalls der PKC möglich (Adamo *et al.*, 2004; McNamara *et al.*, 2006). Da die Reduktion der hBD2-Sekretion durch Rhamnolipide auch bei Stimulation der Zellen mit PMA zu bemerken war, wird ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang zwischen Rhamnolipiden und der PKC angenommen.

Eine Reduktion der hBD2-Antwort war gleichfalls bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit Flagellin oder PMA und dem intrazellulären Calciumchelator BAPTA/AM zu beobachten. Calcium wird benötigt, um die PKC und damit unter anderem die

hBD2-Expression zu aktivieren. Rhamnolipide haben amphiphile Eigenschaften und können so Metallionen wie zum Beispiel Calciumionen komplexieren (Ochoa-Loza *et al.*, 2001).

Es ist denkbar, dass Rhamnolipide die Zellmembran passieren und dann intrazelluläres Calcium komplexieren. Als Folge kann dann die PKC nicht in die aktive Form überführt werden. Weitere Experimente in der Arbeitsgruppe zeigten, dass Monorhamnolipide in den Intrazellularraum eindringen. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Monorhamnolipide Komplexe mit intrazellulärem Calcium bilden. Eventuell lassen sich die entstandenen Calciumaddukte massenspektrometrisch im Zytoplasma nachweisen. Als Glykolipide können Rhamnolipide in die Zellmembran integrieren. Dort könnten sie dann direkt die PKC hemmen oder deren Interaktion mit DAG behindern. Ein Nachweis hierfür könnte durch die Detektion von Rhamnolipiden in Membranfraktionen nach Zellaufschluss erbracht werden.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass *P. aeruginosa* das angeborene Immunsystem mit Hilfe von Rhamnolipid, einem vom Bakterium selbst produzierten Surfactant, umgeht.

In humanen Keratinozyten konnte die Flagellin-induzierte hBD2-Expression durch in der stationären Phase generierten bakteriellen Überständen von *P. aeruginosa* supprimiert werden. Der supprimierende Faktor konnte in nachfolgenden Versuchen als hitzestabil und durch Säure ausfällbar identifiziert werden. Außerdem blieb er bei Behandlung mit Proteinase K unbeeinflusst, es handelt sich deshalb nicht um ein Protein. Mit weiteren Untersuchungen konnten der Faktor als Rhamnolipid identifiziert werden.

Eine Kostimulation von Keratinozyten mit aufgereinigtem Rhamnolipid in Mengen unterhalb der zytotoxischen Konzentration zusammen mit Flagellin zeigten ebenfalls eine Supprimierung der induzierten hBD2-Expression. Ähnliche Effekte konnten bei Kostimulation der Keratinozyten mit Flagellin und BAPTA-AM, einem intrazellulären Calciumchelator, erreicht werden. Neben Flagellin als Induktor ließ sich auch die PMA-induzierte hBD2-Expression supprimieren. Dies lässt vermuten, dass Rhamnolipide mit Calcium-abhängigen Signalkaskaden, wie der PKC-Signalkaskade, interferiert.

Über diesen Weg ist es *P. aeruginosa* also möglich sich auf der Haut zu etablieren, ohne seinen Hauptpathogenitätsfaktor, das Flagellin, verstecken zu müssen.

6 Quellenverzeichnis

Abdel-Mawgoud, A., Lepine, F., und Deziel, E. (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**: 1323-1336.

Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Gruber, F., Schröder, J. M., und Tschachler, E. (2008) Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to *Escherichia coli*. *FASEB J* **22**: 2168-2176.

Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I., und Prince, A. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* Flagella Activate Airway Epithelial Cells through asialoGM1 and Toll-Like Receptor 2 as well as Toll-Like Receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**: 627-634.

Aderem, A. und Ulevitch, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787.

Al Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., und Maier, R. M. (2000) Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3262-3268.

Beal, R. und Betts, W. B. (2000) Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* **89**: 158-168.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., und Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**: 761-771.

Brandis, Eggers, Köhler, und Pulverer. Medizinische Mikrobiologie. 7, 467ff. 1998. München, Urban & Fischer.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**: 238-250.

Chromek, M., Slamova, Z., Bergman, P., Kovacs, L., Podracka, L., Ehren, I. *et al.* (2006) The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* **12**: 636-641.

Cobb, L. M., Mychaleckyj, J. C., Wozniak, D. J., und Lopez-Boado, Y. S. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin and Alginate Elicit Very Distinct Gene Expression Patterns in Airway Epithelial Cells: Implications for Cystic Fibrosis Disease. *J Immunol* **173**: 5659-5670.

Cogen, A. L., Nizet, V., und Gallo, R. L. (2008) Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* **158**: 442-455.

- Costerton, J. W., Stewart, P. S., und Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- D'Argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C. A., und Manoil, C. (2001) Drosophila as a model host for Pseudomonas aeruginosa infection. *J Bacteriol* **183**: 1466-1471.
- de Bentzmann S. und Plesiat, P. (2011) The Pseudomonas aeruginosa opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol* **13**: 1655-1665.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., und Healy, J. I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386**: 855-858.
- Donlan, R. M. und Costerton, J. W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
- Dössel, J., Meyer-Hoffert, U., Schröder, J. M., und Gerstel, U. (2012) Pseudomonas aeruginosa-derived rhamnolipids subvert the host innate immune response through manipulation of the human beta-defensin-2 expression. *Cell Microbiol* **14**: 1364-1375.
- Federle, M. J. und Bassler, B. L. (2003) Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* **112**: 1291-1299.
- Fritsch, P. Dermatologie und Venerologie für das Studium. 140, 152-140. 2009. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
Ref Type: Generic
- Fujita, K., Akino, T., und Yoshioka, H. (1988) Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun* **56**: 1385-1387.
- Geffers, C. und Gastmeier, P. (2011) Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int* **108**: 87-93.
- Gerstel, U., Czapp, M., Bartels, J., und Schröder, J. M. (2009) Rhamnolipid-induced shedding of flagellin from Pseudomonas aeruginosa provokes hBD-2 and IL-8 response in human keratinocytes. *Cell Microbiol* **11**: 842-853.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., und Schröder, J. M. (2005) Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* **6**: 57-64.
- Hagelueken, G., Adams, T. M., Wiehlmann, L., Widow, U., Kolmar, H., Tummeler, B. *et al.* (2006) The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa, defines a third class of sulfatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7631-7636.
- Hahn, H., Kaufmann, S., Schulz, T., und Suerbaum, S. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6, 276. 2009.
Ref Type: Generic

Hale, J. D. und Hancock, R. E. (2007) Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* **5**: 951-959.

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

Harder, J., Gläser, R., und Schröder, J. M. (2007) The role and potential therapeutical applications of antimicrobial proteins in infectious and inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **7**: 75-82.

Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S. *et al.* (2000) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**: 714-721.

Harder, J. und Schröder, J. M. (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* **277**: 46779-46784.

Häussler, S. (2010) Multicellular signalling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* **300**: 544-548.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R. *et al.* (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.

Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988) Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in Phastsystem Development Unit .1. Staining of Sodium Dodecyl-Sulfate Gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32.

Hingley, S. T., Hastie, A. T., Kueppers, F., Higgins, M. L., Weinbaum, G., und Shryock, T. (1986) Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. *Infect Immun* **51**: 254-262.

Jang, B. C., Lim, K. J., Paik, J. H., Kwon, Y. K., Shin, S. W., Kim, S. C. *et al.* (2004) Up-regulation of human [beta]-defensin 2 by interleukin-1[beta] in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-[kappa]B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**: 1026-1033.

Jinquan, T., Vorum, H., Larsen, C. G., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Gesser, B. *et al.* (1996) Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J Invest Dermatol* **107**: 5-10.

Kerr, K. G. und Snelling, A. M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection* **73**: 338-344.

Koch, A. K., Kappeli, O., Fiechter, A., und Reiser, J. (1991) Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol* **173**: 4212-4219.

Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., und Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**: 1137-1146.

- Liu, P. V. (1974) Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **130 Suppl**: S94-S99.
- Liu, P. V. und Mercer, C. B. (1963) growth, toxigenicity and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hyg (Lond)* **61**: 485-491.
- Lopez, D., Vlamakis, H., und Kolter, R. (2010) Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000398.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., und Speert, D. P. (1994) Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **62**: 596-605.
- Martin, E., Ganz, T., und Lehrer, R. I. (1995) Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol* **58**: 128-136.
- McClure, C. D. und Schiller, N. L. (1992) Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **51**: 97-102.
- McNamara, N., Gallup, M., Sucher, A., Maltseva, I., McKemy, D., und Basbaum, C. (2006) AsialoGM1 and TLR5 Cooperate in Flagellin-Induced Nucleotide Signaling to Activate Erk1/2. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**: 653-660.
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**: 298-300.
- Moser, C., Weiner, D. J., Lysenko, E., Bals, R., Weiser, J. N., und Wilson, J. M. (2002) beta-Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect Immun* **70**: 3068-3072.
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., und Gibbs, B. F. (2001) Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J Hazard Mater* **85**: 111-125.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R. A. *et al.* (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**: 454-457.
- Ochoa-Loza, F. J., Artiola, J. F., und Maier, R. M. (2001) Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *J Environ Qual* **30**: 479-485.
- Pinzon, N. M. und Ju, L. K. (2009) Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**: 975-981.
- Püschel, G., Kietzmann, T., Doenecke, D., Kühn, H., Höhne, W., Christ, B. *et al.* Taschenlehrbuch Biochemie. 1. 2011. Stuttgart, Thieme.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Reinhardt, D., Götz, M., Kraemer, R., und Schöni, M. Cystische Fibrose. 2012. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin.
Ref Type: Generic

- Salzman, N. H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjoberg, J., Amir, E. *et al.* (2010) Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* **11**: 76-82.
- Sambrook J. und Russel D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheetz, M. H., Hoffman, M., Bolon, M. K., Schulert, G., Estrellado, W., Baraboutis, I. G. *et al.* (2009) Morbidity associated with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* **64**: 311-319.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F., und Fellermann, K. (2007) Induction of Human β -Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infect Immun* **75**: 2399-2407.
- Scott-Thomas, A. J., Syhre, M., Pattermore, P. K., Epton, M., Laing, R., Pearson, J. *et al.* (2010) 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulm Med* **10**: 56.
- Sierra, G. (1960) Hemolytic effect of a glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* **26**: 189-192.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L. R. *et al.* (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **4**: 1247-1253.
- Smith, R. S. und Iglewski, B. H. (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**: 56-60.
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F., und Deziel, E. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 718-725.
- Valacchi, G., Sticozzi, C., Pecorelli, A., Cervellati, F., Cervellati, C., und Maioli, E. (2012) Cutaneous responses to environmental stressors. *Ann N Y Acad Sci* **1271**: 75-81.
- Venturi, V. (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* **30**: 274-291.
- Verma, A., Arora, S. K., Kuravi, S. K., und Ramphal, R. (2005) Roles of Specific Amino Acids in the N Terminus of *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin and of Flagellin Glycosylation in the Innate Immune Response. *Infect Immun* **73**: 8237-8246.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389-395.
- Zulianello, L., Canard, C., Kohler, T., Caille, D., Lacroix, J. S., und Meda, P. (2006) Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**: 3134-3147.

7 Anhang

7.1 Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

Dössel, J., Meyer-Hoffert, U., Schröder, J. M., und Gerstel, U. (2012) Pseudomonas aeruginosa-derived rhamnolipids subvert the host innate immune response through manipulation of the human beta-defensin-2 expression. *Cell Microbiol* **14**: 1364-1375.

Abstract:

Pseudomonas aeruginosa is a well-known cause of infections especially in compromised patients. To neutralize this pathogen, the expression of antimicrobial factors in epithelial cells is crucial. In particular the human beta-defensin hBD-2 is especially active against *P. aeruginosa*. In this study, we identified rhamnolipids in *P. aeruginosa* culture supernatants that are able to prevent the pathogen-induced hBD-2 response in keratinocytes. The presence of rhamnolipids within the host cells and inhibition assays suggest that calcium-regulated pathways and protein kinase C activation are impaired by rhamnolipids. In consequence, the induction of hBD-2 in keratinocytes by *P. aeruginosa*-derived flagellin as well as the host's own hBD-2 mediator interleukin IL-1 β is inhibited. Strikingly, rhamnolipids did not affect the release of the proinflammatory mediator interleukin IL-8 by flagellin. Thus, in addition to their function in establishment and persistence of *P. aeruginosa* infections, rhamnolipids can be engaged by *P. aeruginosa* for a targeted attenuation of the innate immunity to manage its survival and colonization on compromised epithelia.

Posterpräsentation auf der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) 2010 in Lübeck:

Gerstel U., **Dössel J.**, Zimmermann A., Meyer-Hoffert U., Schröder J.M.; (2010) *Pseudomonas aeruginosa* manipulates the cutaneous defense by repressing hBD-2 and psoriasin. *Exp. Dermatol.* 19(2), Abstract P187.

7.2 Lebenslauf

Jomtje Faaleg Peters geb. Dössel

Hebbelstr. 9 24116 Kiel

Geburtsdatum: 5.2.1986

Geburtsort: Henstedt-Ulzburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

1992 - 1996	Grundschule Tangstedt
1996 - 1997	Johannes-Brahms-Gymnasium Pinneberg
1997 - 2005	Justus-Knecht-Gymnasium Bruchsal
2005	allgemeine Hochschulreife (Abitur)
2005 - 2011	Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2011	Staatsexamen im Fach Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Seit Oktober 2011	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dezember 2011	Approbation als Zahnärztin
September 2012	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)