

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

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON
IFAPSORIASIN- / FILAGGRIN-2-PEPTIDEN IN DER ANTIMIKROBIELLEN
HAUTABWEHR**



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

vorgelegt von
Anne-Kathrin Junge
aus Rostock
Kiel 2011

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Schröder

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Grötzing

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.04.2012

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	IV
--	-----------

Abkürzungsverzeichnis	V
------------------------------------	----------

1 Einleitung.....	1
--------------------------	----------

1.1 Die Haut.....	1
--------------------------	----------

1.1.1 Aufbau der menschlichen Haut.....	1
---	---

1.1.2 Differenzierung der menschlichen Haut.....	2
--	---

1.1.3 Der "Epidermale Differenzierungskomplex"	4
--	---

1.1.4 Die "S100 Fused Type"-Proteinfamilie	5
--	---

1.1.5 Ifapsoriasis	6
--------------------------	---

1.2 Die Immunabwehr der menschlichen Haut	8
--	----------

1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	9
--	----------

2 Material und Methoden	10
--------------------------------------	-----------

2.1 Chemikalien	10
------------------------------	-----------

2.2 Geräte.....	10
------------------------	-----------

2.3 Oligonukleotide (Primer).....	11
--	-----------

2.4 Vektor	12
-------------------------	-----------

2.5 Mikroorganismen	12
----------------------------------	-----------

2.6 Molekularbiologische Methoden.....	12
---	-----------

2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	12
--	----

2.6.1.1 Standard-PCR.....	12
---------------------------	----

2.6.1.2 Kolonie-PCR	13
---------------------------	----

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	14
---------------------------------------	----

2.6.3 DNA-Aufreinigung	14
------------------------------	----

2.6.4 DNA-Restriktionshydrolyse	15
---------------------------------------	----

2.6.5 Ligation	15
----------------------	----

2.6.6 Transformation.....	15
---------------------------	----

2.6.6.1 Transformation mit chemisch-kompetenten Zellen.....	15
---	----

2.6.6.2 Transformation mit elektrokompetenten Zellen	16
--	----

2.6.7	Plasmidisolierung.....	16
2.6.8	DNA-Sequenzierung.....	16
2.7	Rekombinante Expression der Fusionsproteine in <i>Escherichia coli</i>.....	17
2.7.1	Struktur des Expressionsvektors.....	17
2.7.2	Durchführung der Expression der Fusionsproteine.....	17
2.8	Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine	18
2.8.1	Lyse der <i>Escherichia coli</i> -Bakterien.....	18
2.8.2	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie.....	18
2.8.3	C8-Umkehrphasen-HPLC	18
2.8.4	Hydrolyse der Fusionsproteine	19
2.8.5	C4-Umkehrphasen-HPLC	19
2.8.6	C2/C18-Umkehrphasen-HPLC.....	20
2.9	Proteinanalytik.....	20
2.9.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	20
2.9.2	Massenspektrometrie.....	21
2.10	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität mittels Radialdiffusionstest	21
3	Ergebnisse	23
3.1	Amplifikation der IFPS-1- und IFPS-2-Gensequenzen mittels PCR	23
3.2	Klonierung im pSUMO3-Vektorsystem.....	25
3.2.1	Restriktionshydrolyse der PCR-Produkte.....	25
3.2.2	Restriktionshydrolyse des Vektors für IFPS-2.....	27
3.2.3	Überprüfung der Effizienz der Gel-Extraktion des pSUMO3-Vektors.....	28
3.2.4	Ligation und Transformation in <i>Escherichia coli</i> TOP10-Zellen	29
3.2.5	Plasmidisolierung.....	31
3.2.6	Transformation in <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS-Zellen.....	31
3.2.7	Transformation in <i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen	32
3.3	Expression und Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine pSUMO3-IFPS-1 und pSUMO3-IFPS-2	33
3.4	Aufreinigung von rekombinant exprimiertem IFPS-1 und IFPS-2	35

3.5	Antimikrobielle Aktivität von Ifapsoriasin	38
3.5.1	Radialdiffusionstest.....	38
3.5.2	Antimikrobielle Aktivität von IFPS-1 im Radialdiffusionstest	39
3.5.3	Antimikrobielle Aktivität von IFPS-2 im Radialdiffusionstest	39
4	Diskussion	41
4.1	Schwierigkeiten bei der Proteinherstellung.....	42
4.2	Antimikrobielle Wirksamkeit der Fragmente.....	44
4.3	Mögliche Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide.....	46
4.4	Antivirale Aktivität und RGD-Motiv	47
4.5	Weiterführende Untersuchungen zur Wirkweise.....	48
4.6	Therapeutischer Nutzen von Antimikrobiellen Peptiden	51
5	Zusammenfassung	55
6	Anhang.....	56
6.1	Vektorkarte des pSUMO3-Expressionsvektors	56
6.2	Proteinsequenzen und -daten	56
6.2.1	IFPS-1.....	56
6.2.2	IFPS-2.....	57
7	Literaturverzeichnis	58
8	Danksagung.....	63
9	Lebenslauf	64
10	Erklärung	65

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

1.1:	Aufbau der menschlichen Epidermis.....	2
1.2:	Übersicht der konservierten Struktur der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie	5
1.3:	Schematische Darstellung des Ifapsoriasin-Proteins.....	7
3.1:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit Produkten der Standard-PCR.....	24
3.2:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit DNA der Extraktion aus dem Agarosegel.....	25
3.3:	Schematische Darstellung der Restriktionshydrolyse von IFPS-1.....	26
3.4:	Schematische Darstellung der Restriktionshydrolyse von IFPS-2.....	26
3.5:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Restriktionshydrolyse.....	27
3.6:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Restriktionshydrolyse des Vektors für IFPS-2.....	28
3.7:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Effizienz der Gel-Extraktion	29
3.8:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit IFPS-1 in <i>Escherichia coli</i> TOP10-Zellen	30
3.9:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit IFPS-2 in <i>Escherichia coli</i> TOP10-Zellen	30
3.10:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Plasmidextraktion.....	31
3.11:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit IFPS-1 in <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS-Zellen.....	32
3.12:	Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit IFPS-2 in <i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen.....	33
3.13:	Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins mittels C8-Umkehrphasen-HPLC	34
3.14:	Massenbestimmung des pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins mittels Massenspektrometrie	35
3.15:	Chromatogramm der Auftrennung einer SUMO-Protease 2 behandelten Probe eines pSUMO3-IFPS-2-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC.....	36
3.16:	Massenbestimmung des IFPS-2-Proteins mittels Massenspektrometrie	37
3.17:	Chromatogramm der Aufreinigung eines IFPS-1-Proteins mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC	38
3.18:	Auswertung des Radialdiffusionstests nach Steinberg und Lehrer	40
4.1:	Möglicher antiviraler Wirkmechanismus des Ifapsoriasins	48
6.1:	Schematische Darstellung des pSUMO3-Expressionsvektors.	56

Tabellen

2.1:	Kultivierung der unterschiedlichen Mikroorganismen-Gattungen im Radialdiffusionstest.....	22
3.1:	Messdaten des Radialdiffusionstests	40

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AU	"absorption unit"
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	"complementary DNA"
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	"expanded-spectrum-betalactamases"
ESI-MS	Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie
FDA	"federal drug administration"
h	Stunde
HPLC	"high performance liquid chromatography"
IFPS	Ifapsoriasis
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	"Lysogenic Broth"
LEW	"Lysis Equilibration Wash"-Puffer
M	molar
Mb	Megabasen
MEK	minimale effektive Konzentration
min	Minute
mM	millimolar
mRNA	"messenger RNA"
MW	Mittelwert
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
OD _{600nm}	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	"Phosphate-Buffered Saline solution"
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris-(2-chlorethyl)-Phosphat
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSB	"Tryptic soy broth"
U	Unit(s)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z	Ladung

Symbole des Einbuchstabencodes für Aminosäuren:

A	Alanin	G	Glycin	M	Methionin	S	Serin
C	Cystein	H	Histidin	N	Asparagin	T	Threonin
D	Asparaginsäure	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin
E	Glutaminsäure	K	Lysin	Q	Glutamin	W	Tryptophan
F	Phenylalanin	L	Leucin	R	Arginin	Y	Tyrosin

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenin	C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin	T	Desoxythymidin

1 EINLEITUNG

1.1 Die Haut

Die Haut bedeckt beim durchschnittlichen Erwachsenen eine Fläche von etwa 2 m² und ist damit eines der größten Organe des menschlichen Körpers (Alonso und Fuchs, 2003). Die Haut erfüllt lebenswichtige Aufgaben: Die Epidermis dient der Abgrenzung des Organismus von der Umgebung, schützt den Körper vor Wasserverlust und zahlreichen schädigenden Umwelteinflüssen wie mechanischem Stress, Mikroorganismen und Strahleneinwirkungen. Kleine Sinnesorgane (Druck-, Schmerz- und Thermorezeptoren) haben ihren Sitz auf der Haut und ermöglichen so die Wahrnehmung verschiedener Reize aus der Umwelt. Die Architektur ihrer Gefäße und Schweißdrüsen macht die Haut zudem zu einem wichtigen Glied der Thermoregulation.

1.1.1 Aufbau der menschlichen Haut

Die Haut setzt sich aus mehreren Schichten zusammen: Ihre äußerste Schicht wird von der Epidermis gebildet, die aus verhornendem mehrschichtigem Plattenepithel besteht. Darunter liegt die bindegewebige Dermis. Diese bildet mit der Epidermis die Kutis, die Haut im engeren Sinne. Gemeinsam mit der darunter liegenden Subkutis, einer Schicht aus Binde- und Fettgewebe, bildet die Kutis die Hautdecke (Lüllmann-Rauch, 2003).

Das verhornende mehrschichtige Plattenepithel der Epidermis besteht aus Keratinozyten. Es lassen sich vier Schichten der Epidermis unterscheiden (siehe Abb. 1.1): Das *Stratum basale* besteht aus einer Lage prismatischer Zellen, die an der Basallamina verankert sind. Diese Zellen dienen der Proliferation. Das *Stratum spinosum* enthält polygonale Zellen mit mikroskopisch deutlich sichtbaren Desmosomen. Im *Stratum granulosum* enthalten die Keratinozyten Keratohyalin granula und lamellierte Granula ("lamellar bodies"). Das *Stratum corneum* enthält Korneozyten, Überreste toter Zellen, die weder Kern noch Organellen besitzen. Die Zellwanderung findet in der Epidermis permanent von basal nach superfizial statt, wobei die Zeitspanne von der Bildung eines Keratinozyten bis zur Abschilferung vom *Stratum corneum* durch nachrückende Zellen etwa vier Wochen beträgt (Houben et al., 2007).

Die bindegewebige Dermis enthält Talg- und Schweißdrüsen und ist für die Ernährung und Verankerung der Epidermis verantwortlich. Die Subkutis verbindet die Kutis mit tiefer liegenden Strukturen und dient als Verschiebeschicht und Druckpolster (Lüllmann-Rauch, 2003).

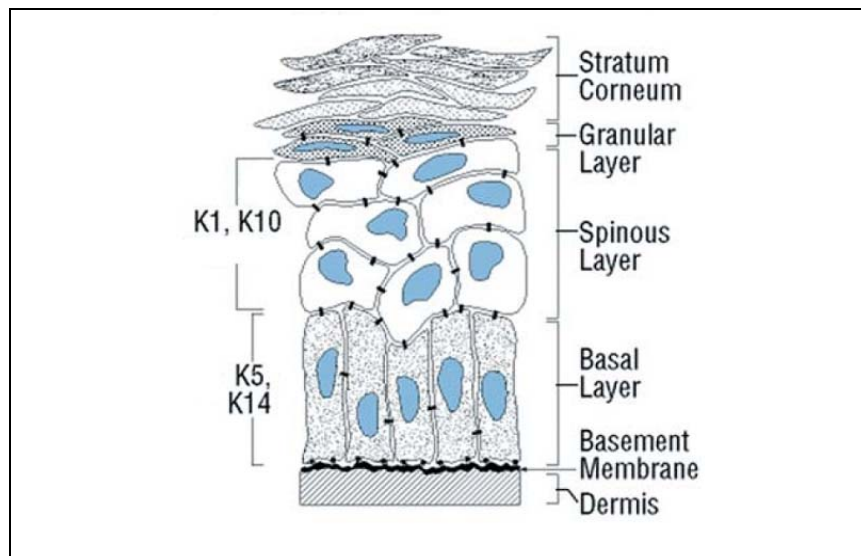


Abb. 1.1: Aufbau der menschlichen Epidermis. Die Proliferation der Keratinozyten findet im *Stratum basale* ("basal layer") statt. Nach der Ablösung von der Basallamina durchwandern die Keratinozyten die Zellschichten der Epidermis. Während der terminalen Differenzierung werden in den verschiedenen Zellschichten typische Keratine (K1, K10, K5, K14) exprimiert (aus Presland und Dale, 2000).

1.1.2 Differenzierung der menschlichen Haut

Die epidermale Differenzierung stellt einen komplexen Mechanismus dar. Keratinozyten entwickeln sich von proliferierenden Zellen im *Stratum basale* zu abgeflachten toten Zellen im *Stratum corneum*. Unipotente epidermale Stammzellen liegen in Nestern zwischen den Keratinozyten des *Stratum basale* und sind für den Zellnachschub verantwortlich. Diese Zellen sind durch einen langsamen Zellzyklus, eine lange Lebenszeit und eine hohe Proliferationsfähigkeit gekennzeichnet (Alonso und Fuchs, 2003). Zum größten Teil sind die multipotenten epidermalen Stammzellen jedoch im Wulst des Haarfollikels lokalisiert (Houben et al., 2007). Während der epidermalen Differenzierung werden verschiedene Proteine exprimiert. Proliferierende Keratinozyten im *Stratum basale* stellen unter anderem die Keratine 5 und 14 her (siehe Abb. 1.1.). Über komplexe Signalwege in der Transkriptionskontrolle verlieren die meisten Keratinozyten ihre Fähigkeit zur Proliferation. Durch den Verlust ihrer Verankerung an der Basalmembran treten die Keratinozyten in den Vorgang der epidermalen Differenzierung ein (Hoffjan und

Stemmler, 2007). Im *Stratum spinosum* beginnt die Expression differenzierungsspezifischer Proteine, wie zum Beispiel die Expression der Keratine vom Typ 1 und Typ 10 (siehe Abb. 1.1) (Lippens et al., 2005). In diesem Stadium entstehen Keratohyalingranula, die vor allem die Strukturproteine Profilaggrin, das 400 kDa-Vorläufer-Protein der Filaggrine (Steven et al., 1990), sowie Loricrin enthalten (Elias, 2005). Es werden auch andere Strukturproteine wie Involucrin, Trichohyalin und die "Small-Proline-Rich Region"-Proteine exprimiert (Hoffjan und Stemmler, 2007). Im *Stratum granulosum* wird Profilaggrin durch Dephosphorylierung und Proteolyse in etwa 37 kDa große Filaggrin-Monomere und ein N-terminales S100-Protein gespalten (Candi et al., 2005). Filaggrin geht Ionenbindungen mit den Keratinen vom Typ 1 und 10 ein. So wird die Bildung von unlöslichen Makrofibrillen im Zytosol der Keratinozyten induziert, was zu einem Kollaps des Keratin-Netzwerks führt und eine Änderung der Zellform bedingt (Dale et al., 1997). Es wird angenommen, dass das N-terminale Filaggrin-Fragment in den Zellkern gelangt und dort für weitere Schritte der Differenzierung verantwortlich ist (Pearson et al., 2002, Houben et al., 2007). Bereits im oberen *Stratum spinosum* kommt es an der Innenseite der Plasmamembran zur Vernetzung epidermaler Proteine durch Transglutaminasen (Lorand und Graham, 2003). Die so gebildete starre Schicht, die die Keratinozyten umgibt, wird als "Cornified Envelope" bezeichnet (Hoffjan und Stemmler, 2007). Neben Filaggrin ist auch Loricrin an der Verfestigung des "Cornified Envelope" beteiligt (Houben et al., 2007). Die terminale Differenzierung der Keratinozyten ist mit einer zunehmenden Vernetzung der Keratine über Disulfidbrücken verbunden (Sun und Green, 1977).

Die Lipide der Epidermis-Barriere stammen von lamellierten Granula, sogenannten "Lamellar Granules", ab. Die lamellierten Granula sind kleine membranbegrenzte Organellen. Sie enthalten Stapel von Lipidlamellen, die aus Cholesterin (50%), ω -Ceramiden (25%), Phospholipiden (10%) und anderen Lipiden wie z. B. Cholesterolsulfat bestehen. Beim Übergang von Zellen des *Stratum granulosum* zu verhornten Zellen des *Stratum corneum* fusionieren die lamellierten Granula mit der Plasmamembran und setzen ihre Lipidmembranen in den Extrazellularraum frei und tragen so zur Ausbildung einer äußeren Lipidhülle bei. Gemeinsam mit den Lipiden werden Enzyme für die weitere Prozessierung der Lipide freigesetzt. ω -Ceramide werden kovalent an die äußere Oberfläche des "Cornified envelope" gebunden und auch als "Lipid Envelope" bezeichnet, der die epidermale Barriere weiter verfestigt (Madison, 2003). Im *Stratum corneum* schließlich ist die Plasmamembran der Zelle

vollständig durch vernetzte Proteine auf der zytosolischen Seite und durch die Lipidmatrix auf der extrazellulären Seite ersetzt (Houben et al., 2007). Das Ergebnis der terminalen Differenzierung eines Keratinozyten ist der Zelltod. Die gebündelten Intermediärfilamente sind mit Strukturproteinen vernetzt und füllen das zytoplasmatische Kompartiment der Zelle aus. In diesem Stadium sind die Zellorganellen weitgehend zerstört und der Zellkern ist degradiert. Der Zelltod der Keratinozyten unterscheidet sich von der Apoptose und wird als epidermaler programmierter Zelltod beschrieben (Lippens et al., 2005; Polakowska et al., 1994). Es wird angenommen, dass Caspase 14, die hauptsächlich in der Epidermis exprimiert wird, an diesem Vorgang beteiligt ist (Houben et al., 2007). Die Abschilferung der Korneozyten von der Oberfläche wird als Desquamation bezeichnet. Sie erfordert eine kontrollierte Zerstörung adhäsiver Strukturen wie Desmosomen, Hemidesmosomen und Adhärens-Kontakte durch verschiedene Enzyme wie z. B. Kallikrein 5 und Kallikrein 7 (Houben et al., 2007).

1.1.3 Der "Epidermale Differenzierungskomplex"

Das menschliche Chromosom 1 enthält in seiner Region 1q21 ungefähr 50 verschiedene Gene, die an der epidermalen Differenzierung beteiligt sind (Toulza et al., 2007; Volz et al., 1993; Mischke et al., 1996; Hoffjan und Stemmler, 2007). Die Gene des "Epidermalen Differenzierungskomplexes" liegen auf einem 1,62 Mb großen Locus auf dem langen Arm von Chromosom 1 (Toulza et al., 2007). Die Proteine, deren kodierende DNA-Sequenzen in diesem Abschnitt liegen, sind hauptsächlich in vier Familien organisiert: Es werden die S100-Proteine, die "Cornified Envelope Precursor"-Proteine, die "Late Cornified Envelope"-Proteine und die "S100 Fused-Type"-Proteine unterschieden (de Guzman et al., 2010; Jackson et al., 2005; Mischke et al., 1996). Die Familie der S100-Proteine, der u.a. das Protein Psoriasin (S100A7) angehört, ist charakterisiert durch ihre N-terminalen potenziellen Ca^{2+} -Bindungsdomänen, die S100- und die EF-Hand-Domäne. Die S100-Proteine erfüllen Funktionen in der Zellzykluskontrolle, Transkription, Differenzierung und Zellmotilität (Marenholz et al., 2004). Für die "Cornified Envelope Precursor"-Proteine, zu denen Loricrin und Involucrin sowie die "Small-Proline-Rich Region"-Proteine gehören, sind eine unterschiedliche Anzahl von Tandem-Wiederholungen typisch. Die Aufgabe der "Cornified Envelope Precursor"-Proteine ist u.a. die Vernetzung der Proteine des "Cornified Envelope" (Steinert et al., 1998; Cabral et al.,

2001). Die "S100 Fused-Type"-Proteinfamilie zeichnet sich ebenfalls durch zwei N-terminal gelegene potenzielle Ca^{2+} -Bindungsdomänen sowie eine unterschiedliche Zahl Tandem-Wiederholungen aus, die für die Gene der "Cornified Envelope Precursor"-Proteine charakteristisch sind (Segre, 2006).

1.1.4 Die "S100 Fused Type"-Proteinfamilie

Der Name "S100 Fused Type"-Protein entstand aufgrund der strukturellen Eigenschaften, die die Gene der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie mit den Genen der S100-Familie und den "Cornified Envelope Precursor"-Proteinen teilen. So weisen die Mitglieder der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie zum einen die für die S100-Proteine typischen potenziellen Ca^{2+} -Bindungsdomänen und zum anderen die für die "Cornified Envelope Precursor"-Proteine charakteristischen Tandemsequenzwiederholungen auf (Segre, 2006).

Die genomische Sequenz der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie beinhaltet drei Exons, die durch zwei Introns getrennt werden. Das erste Exon besitzt eine Größe von etwa 50 bp und beinhaltet den nicht kodierenden Bereich der 5'-UTR (siehe Abb. 1.2). Das mit etwa 150 bp größere zweite Exon enthält das Startkodon und kodiert für die S100-Domäne. Das große dritte Exon enthält die kodierende Sequenz für die EF-Hand-Domäne, für die Tandemsequenzwiederholungen und die 3'-UTR (siehe Abb. 1.2).

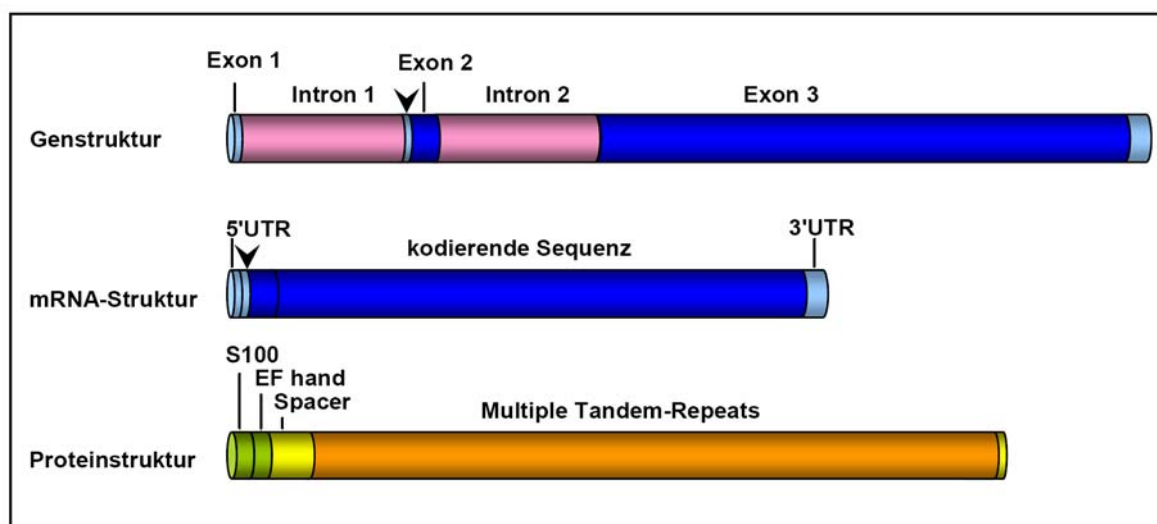


Abb. 1.2: Übersicht der konservierten Struktur der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie. Die Struktur auf genomischer, mRNA- und Proteinebene der "S100 Fused Type"-Proteinfamilienmitglieder ist hochkonserviert. Hellblau: nicht-kodierende Sequenzen; dunkelblau: kodierende Sequenzen; grün: S100- und EF-Hand-Domäne; gelb: Spacer-Sequenzen; orange: Multiple Tandemwiederholungen; UTR: untranslatierte Region. Der Pfeil markiert das Translationsstartkodon ATG (aus Hansmann, 2008).

Zur Familie der "S100 Fused Type"-Proteine gehören Trichohyalin-like 1 (Wu et al., 2011), Trichohyalin (Lee et al., 1993), Repetin (Krieg et al., 1997), Hornerin (Makino et al., 2001), Profilaggrin (Presland et al., 1992), Ifapsoriasin (Wu et al., 2009) und Cornulin (Contzler et al., 2005).

1.1.5 Ifapsoriasin

Ifapsoriasin, das zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unbekannt war, wird heute bevorzugt als Filaggrin-2 bezeichnet. Die Bezeichnung Ifapsoriasin wird in dieser Arbeit allerdings aus Gründen der Einfachheit beibehalten. Ifapsoriasin wurde in unserer Abteilung als Mitglied der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie identifiziert (Wu, 2005) und mithilfe von Expressions- und Funktionsanalysen weiter charakterisiert (Hansmann, 2008). Strukturelle Analysen zeigten für Ifapsoriasin den für diese Familie typischen Aufbau: Ein sehr kleines erstes Exon mit einer Größe von 51 bp, welches die 5'-UTR enthält, ein größeres zweites Exon (160 bp), welches das Translationsstartkodon und die S100-Domäne enthält sowie ein drittes Exon mit einer Größe von 8907 bp, welches die restliche kodierende Sequenz und die 3'-UTR beinhaltet (Wu et al., 2009).

Das Ifapsoriasin-Gen kodiert ein Protein mit 2391 Aminosäuren und einer theoretischen Masse von etwa 248 kDa. Der pI-Wert des Proteins beträgt 8,45. Die abgeleitete Proteinsequenz zeigte einen für die Proteinfamilie konservierten Aufbau mit zwei N-terminalen potenziellen Ca^{2+} -Bindungsdomänen (S100- und EF-Hand-Domäne), zwei Arten Tandemsequenzwiederholungen, die jeweils Repeats mit einer Größe zwischen 75-77 Aminosäuren umfassen, und zwei Spacer-Sequenzen, die sich jeweils vor den Tandemsequenzwiederholungen befinden. Aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung ließen sich die Tandemsequenzwiederholungen in zwei Gruppen einteilen und wurden deshalb als "A-Repeats" und "B-Repeats" bezeichnet. Es konnten neun A-Repeats und 14 B-Repeats identifiziert werden, wobei das letzte B-Repeat direkt vor dem C-Terminus lokalisiert ist (Wu et al., 2009) (siehe Abb. 1.3).

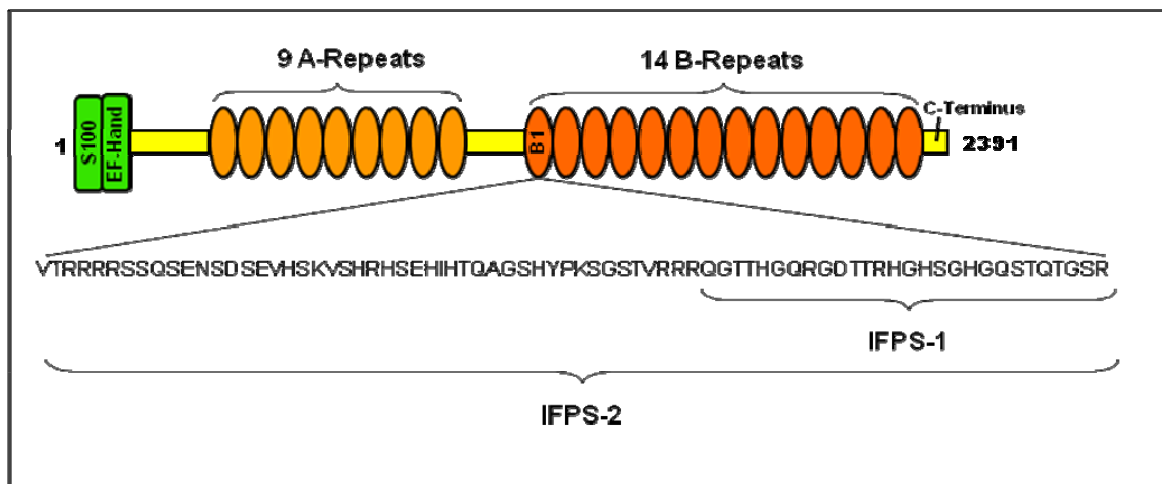


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Ifapsoriasin-Proteins. Ifapsoriasin enthält zwei potentielle Ca^{2+} -Bindungsdomänen (S100-Domäne und EF-Hand) und zwei Arten Tandemrepeats (A- und B-Repeats), welche durch eine kurze Spacersequenz voneinander getrennt sind. Die A- und B-Repeats sind jeweils zwischen 75 und 77 Aminosäuren lang, variieren aber in ihrer Aminosäuresequenz. Gelb: Spacer-Sequenzen; orange: multiple Tandem-Repeats; IFPS-2: rekombinant exprimiertes Proteinfragment (gesamtes B1-Repeat); IFPS-1: in der Sequenz des IFPS-2 als verkürztes Fragment enthalten (modifiziert aus Hansmann, 2008).

Auf Proteinebene wurde Ifapsoriasin im oberen *Stratum granulosum* und im *Stratum corneum* der Epidermis sowie in ekkrinen Schweißdrüsen und deren Ausführungsgängen nachgewiesen (Hansmann, 2008). Eine Expression im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* ist auch für die meisten der bisher analysierten Mitglieder der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie bekannt (Huber et al., 2005, Makino et al., 2001, Makino et al., 2003). Untersuchungen mit der Ca^{2+} -abhängigen Protease Calpain 1 deuten darauf hin, dass dieses Enzym an der Prozessierung des Ifapsoriasins beteiligt ist (Hsu et al., 2011). Ifapsoriasin ist wahrscheinlich ein in Wasser unlösliches Protein, das über Disulfid-Brücken und vermutlich auch über andere kovalente Bindungen wie Transglutaminase-katalysierte Vernetzungen verknüpft ist (Hansmann, 2008). Ifapsoriasin könnte daher ein struktureller Bestandteil des "Cornified Envelope" sein, einer Struktur, die für die Funktion der epidermalen Barriere verantwortlich ist.

Verschiedene rekombinant hergestellte Fragmente des Ifapsoriasins wurden bereits auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit getestet. Ein Ifapsoriasin-Fragment, welches das letzte B-Repeat und den gesamten C-Terminus umfasste, zeigte hauptsächlich gegen *Pseudomonas aeruginosa* gerichtete Aktivität (Hansmann, 2008). In immunhistochemischen Untersuchungen wurden für dieses C-terminale Fragment deutliche Signale in den ekkrinen Schweißdrüsen, in deren Ausführungsgängen

sowie im Schweiß detektiert (Hansmann, 2008). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass Ifapsoriasis aktiv an der kutanen Abwehr beteiligt ist.

1.2 Die Immunabwehr der menschlichen Haut

Die menschliche Haut ist ständig einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen ausgesetzt. Für die erfolgreiche Abwehr dieser Umwelteinflüsse ist ein außerordentlich effektives Abwehrsystem notwendig. Eine wichtige Komponente der kutanen Immunabwehr stellt die sogenannte "physikalische Barriere" dar, die vom *Stratum corneum* gebildet wird. Im *Stratum corneum* sind die in eine Lipidmatrix eingelagerten Korneozyten durch Korneodesmosomen miteinander verbunden und stellen so ein erstes Hindernis für Mikroorganismen dar. Die fortlaufende Abschilferung der obersten Korneozyten verhindert zusätzlich eine übermäßige Besiedlung mit Keimen (Schröder und Harder, 2006). Zur "chemischen Barriere" gehören die antimikrobiellen Lipide (Drake et al., 2008) sowie die antimikrobiellen und antiviralen Peptide und Proteine. Die antimikrobiellen Peptide können in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: Defensine, Cathelicidine, Ribonukleasen und S100-Proteine (Harder et al., 2007). In der menschlichen Haut werden einige konstitutive und induzierbare antimikrobielle Peptide exprimiert, wie zum Beispiel die β -Defensine 1-4, das Cathelicidin LL-37, die Ribonuklease 7 sowie das S100-Protein Psoriasis (Harder et al., 2007). Einige noch nicht klassifizierte Peptide mit antimikrobieller Wirksamkeit wie Dermcidin und Lysozym kommen ebenfalls in der menschlichen Haut vor (Schröder und Harder, 2006).

Die immunologische Abwehr dient dazu, eingedrungene Fremdstoffe unschädlich zu machen. Das menschliche Immunsystem lässt sich in zwei Anteile unterteilen: das angeborene Immunsystem und das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist mithilfe von präformierten Rezeptormolekülen in der Lage eingedrungene Mikroorganismen anhand sogenannter pathogenassoziierter molekularer Mustern ("pathogen-associated molecular pattern", PAMP) zu erkennen. Beispiele für solche Moleküle sind Lipopolysaccharide bei gramnegativen und Peptidoglykane bei grampositiven Bakterien. Virale DNA und RNA können durch Toll-like-Rezeptoren erkannt werden. Das angeborene Immunsystem erkennt potenzielle Pathogene antigen-unabhängig und bildet kein Gedächtnis aus. Die Besonderheit des angeborenen Immunsystems liegt unter anderem darin, dass es sehr schnell auf das Eindringen von Mikroorganismen reagieren kann. Die

wichtigsten zellulären Vertreter des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen, Mastzellen, Dendritische Zellen und Epithelzellen. Wichtige molekulare Bestandteile sind die Toll-like-Rezeptoren und das Komplementsystem. Die sogenannte erworbene Immunabwehr wird erst nach der Geburt erlernt und kann in zwei Abteilungen eingeteilt werden: die humorale Abwehr und die zellvermittelte Abwehr. Die Effektorzellen der humoralen Abwehr sind die Plasmazellen, aktivierte B-Lymphozyten, deren sezernierte Antikörper Antigene spezifisch binden und damit unschädlich machen können. Die zellvermittelte Abwehr wird durch die T-Lymphozyten vermittelt. Diese können als T-Helferzellen zum einen durch Zytokinsekretion in Vorgänge der angeborenen und erworbenen Immunität eingreifen und zum anderen als zytotoxische T-Zellen andere Zellen abtöten, wenn sie an ihrer Oberfläche Antigene erkannt haben, die diese Zellen z. B. als virusinfiziert ausweisen. Die erworbene Abwehr ist gekennzeichnet durch Spezifität in der Erkennung eines Antigens durch Antikörper und die Konservierung der erlernten Fähigkeiten (Lüllmann-Rauch, 2003).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurde Ifapsoriasin als neues Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie identifiziert. Die genomische Organisation, die cDNA-Sequenz, mRNA-Expressionsprofile sowie mögliche biologische Funktion von Ifapsoriasin wurden z. T. bereits untersucht (Wu, 2005; Hansmann, 2008). Alle bisher bekannten Mitglieder der Proteinfamilie werden in Epithelien exprimiert. Diese Gewebe sind vermehrt Einflüssen aus der Umwelt ausgesetzt. Daher ist fraglich, ob die Mitglieder der Proteinfamilie eventuell einen Beitrag zur antimikrobiellen Abwehr der Haut leisten könnten. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits antimikrobielle Aktivität von Hornerin- und Profilaggrin-Fragmenten nachgewiesen (Wu, 2005, Karsch, 2010, Schulz, 2010). Verschiedene Fragmente des Ifapsoriasins haben ebenfalls antimikrobielle Aktivität gezeigt (Hansmann, 2008). Ziel dieser Arbeit war es, weitere mithilfe rekombinanter Expression hergestellte Peptide des Ifapsoriasins (siehe 6.2) auf eine mögliche antimikrobielle Aktivität zu untersuchen. Es wurden Peptide aus der Region der B-Repeats ausgewählt, da in ihrer Aminosäuresequenz eine sogenannte RGD-Sequenz enthalten ist, die diesem Proteinbereich vermutlich zusätzlich antivirale Aktivität verleihen könnte.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Roth oder Sigma-Chemie bezogen.

100 bp plus DNA ladder	Fermentas
100 bp DNA ladder	New England Biolabs
100 bp TriDye DNA ladder	New England Biolabs
1 kb DNA Quick ladder	New England Biolabs
Acetonitril	Promochem GmbH
Agarose	Biozym
dNTPs	Amersham Biosciences
EDTA	Gibco
Glycerin	USB
Hefe-Extrakt	Oxoid
H ₂ O (für HPLC)	Promochem GmbH
Trifluoressigsäure	Promochem GmbH

2.2 Geräte

Photometer

150-20 Spectrophotometer, Hitachi
Biophotometer, Eppendorf

Thermoblock

Thermomixer comfort, Eppendorf

Thermocycler

T3 Thermocycler, Biometra

Ultraschall

Sonopuls GM 70, Bandelin Elektronik

Konzentratoren

Lyophilisator Alpha 2-4 LSC, Christ
Vakuumpumpe KAS 16, Pfeiffer Vacuum
Concentrator 5301, Eppendorf
Gel Pump GP 100, Savant

Zentrifugen

Centrifuge 5417 R, Eppendorf

Centrifuge 5804 R, Eppendorf

Gelkammern

Horizon 1114, Invitrogen

HPLC

Gradientenpumpen

Liquid Chromatograph LC-10AT VP, Shimadzu

FCV-10 AL VP, Shimadzu

SpectraSystem P4000, Spectra Physics

Detektor

UV-VIS Detector SPD-10A VP, Shimadzu

Entgaser

Degasser DG-4, Henggeler

Integratoren

SP 4270 integrator, Spectra Physics

SP 4290 integrator, Spectra Physics

Massenspektrometer

QTOF II, Waters Micromass

2.3 Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Sigma-Genosys synthetisiert.

pSUMO3-System

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz
IFPS-2-F	GCAGGATGACGTACGTCAGGTGTAAGTAGAAGACGAAGATCTA
IFPS-2-R	GCAGGATCCTTATCTGGAACCTGTCTGTGTAG
IFPS-1-F	GCAGGTCTCAAGGTCAAGGAAGTACTCATGGACAG
IFPS-1-R	GCAGGATCCTTATCTGGAACCTGTCTGTGTAG

Vektorprimer für Kolonie-PCR und Sequenzierungen

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz
T7-Reverse	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG
pSumo3-forward	TCAATGAGGCAGATCAGATT

2.4 Vektor

pSUMO3 Life Sensors

2.5 Mikroorganismen

<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
<i>Escherichia coli</i>	TOP10F (Invitrogen) BL21(DE3) pLysS (Novagen) Rosetta-gami2 (DE3) pLysS (Novagen) ATCC 11775
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine effektive Technik zur Amplifikation von genau definierten DNA-Fragmenten *In-Vitro* dar. Neben der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz werden Oligonukleotide (Primer), eine DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine Pufferlösung benötigt. Die PCR läuft in unterschiedlichen Phasen ab, die sich in Zyklen wiederholen. Innerhalb eines Reaktionszyklus lassen sich drei Phasen unterscheiden: Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 94-95°C, Oligonukleotid-Anlagerung bei primerspezifischer Temperatur und Elongation, in der die DNA-Polymerase neue DNA-Doppelstränge synthetisiert. Die Temperatur für die Elongation ist vom Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase abhängig. Unter 2.3 sind die jeweils verwendeten Primer-Sequenzen aufgeführt.

2.6.1.1 Standard-PCR

Zur Herstellung der beiden Fragmente des humanen Ifapsoriasins wurde Keratinozyten-cDNA als Vorlage verwendet. Dazu war zunächst mRNA aus kultivierten Keratinozyten isoliert worden, die nach Abbau von genomischer DNA durch DNase-Behandlung mithilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde. Zur Amplifikation der cDNA-Fragmente für die Klonierung in die Expressionsvektoren wurde eine *Pfu*-Polymerase verwendet. Diese Polymerase

wurde ursprünglich aus dem hitzestabilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* isoliert, dessen Anfangsbuchstaben jeweils in der Vorsilbe "Pfu" verwendet werden. Die Pfu-Polymerase besitzt im Gegensatz zur Taq-Polymerase, die aus *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde, neben der 5'-3-Polymerase-Aktivität auch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Diese ermöglicht, dass falsch eingebaute Nukleotide von der Polymerase erkannt und entfernt werden ("proof reading"). Dadurch kann die Fehlerrate gegenüber der Taq-Polymerase auf ein Sechstel minimiert werden.

Für die Standard-PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 1x Pfu Cloned PCR-Puffer mit MgSO₄ (Stratagene)
- 200 µM dNTP mix
- 200 nM 5'- und 3'-Primer
- cDNA
- 2,5 U Pfu Turbo Hotstart Polymerase (Stratagene)
- H₂O ad 50 µl.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C	60 s	} 33 Zyklen
95°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	10 min	
4°C	∞	

2.6.1.2 Kolonie-PCR

Mithilfe der Kolonie-PCR wurden die Kolonien aus der Transformation auf das Vorhandensein des korrekten Inserts überprüft. Dabei wurden Einzelkolonien von der Agarplatte in den PCR-Ansatz aufgenommen. Durch Hitzeeinwirkung wurden die Bakterien lysiert und ihre DNA zugänglich, so dass die Primer daran binden konnten. Die Primer waren so gewählt, dass einer im Bereich des Inserts und der andere im Bereich des Vektors binden konnte.

Es wurde folgender Ansatz verwendet:

- 1x Taq-Puffer (Invitrogen)
- 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 200 µM dNTP mix
- 200 nM 5'-und 3'-Primer
- 1 U Taq-DNA-Polymerase
- H₂O ad 20 µl

Die Bedingungen wurden folgendermaßen gewählt:

95°C	5 min	
83°C	∞	Zugabe der Polymerase
94°C	60 s	} 38 Zyklen
58°C	20 s	
72°C	2 min 30 s	
72°C	3 min	
4°C	∞	

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von PCR-Produkten und Plasmiden. Zur Überprüfung von DNA-Fragmenten wurden 1,5%ige Gele, zur Überprüfung von Plasmiden 0,8%ige Gele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) durch Aufkochen vollständig gelöst und anschließend abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) wurde die Lösung in einen horizontalen Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden anschließend mit 6x-Beladungspuffer (0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin, 10mM Tris/HCl, pH 0,8) versetzt und nach Aushärten des Gels in die Geltaschen gefüllt. Abhängig von der Größe der Fragmente und Plasmide wurden verschiedene Größenstandards verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei kontinuierlich 100 V in TAE-Puffer, wobei die Dauer der angelegten Spannung abhängig von Fragmentgröße und Agarose-Konzentration variierte. Die elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren wurden durch Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei 302 nm auf einem UV-Tisch (Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator TM-20, UVP) detektiert und mithilfe einer BioDocII-Fotodokumentationsanlage (Biometra) digital dokumentiert.

2.6.3 DNA-Aufreinigung

Nach erfolgreicher Agarose-Gelelektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung mit dem QIAEXII-Gel-Extraction Kit nach der Anleitung des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5. Zur Überprüfung der Extraktion und zur Bestimmung der DNA-Masse der Gelextrakte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.6.4 DNA-Restriktionshydrolyse

Die durch die PCR erzeugten Ifapsoriasin-Fragmente wurden in der Restriktionshydrolyse so geschnitten, dass passende Überhänge für die Ligation mit dem pSUMO3-Vektor geschaffen wurden. Der pSUMO3-Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen bzw. mit Restriktionsenzymen, die passende Überhänge generieren, hydrolysiert, um eine gerichtete Ligation der Fragmente sicherzustellen. Die Restriktionshydrolyse erfolgte mit Endonukleasen der Firma New England Biolabs nach Anleitung für 3 h bei vorgegebener Temperatur und anschließender Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65°C.

2.6.5 Ligation

Für die Ligation wurde das zu ligierende DNA-Fragment im dreifachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Es wurden 25 ng des jeweiligen Vektors, ein entsprechendes Volumen des DNA-Fragmentes und 2 U einer T4-Ligase (Invitrogen) in Ligationspuffer (Invitrogen) auf ein Gesamtvolumen von 5 µl gebracht. Die Inkubation erfolgte bei 16°C für 8 h. Zur Kontrolle der Ligation wurde der geschnittene Vektor ohne Insert verwendet, um zu ermitteln, ob dieser re-ligiert wurde.

2.6.6 Transformation

2.6.6.1 Transformation mit chemisch-kompetenten Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Zellen wurden 2,5 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid-DNA mit 100 µl *Escherichia coli* TOP10-Zellen bzw. *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 30 s folgte eine dreiminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 600 µl 37°C warmes SOC-Medium (2% Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) zugegeben und der Transformationsansatz für eine Stunde bei 37°C und 250 Upm inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde anschließend auf vorgewärmten LB-Agarplatten ausplattiert, die mit dem für das jeweilige Plasmid selektiven Antibiotikum versetzt waren (50 µg/ml Kanamycin, 34 µg/ml Chloramphenicol), und über Nacht bei 37°C

inkubiert. Die Klone wurden über eine Kolonie-PCR auf das korrekte Plasmid überprüft (siehe 2.6.1.2).

2.6.6.2 Transformation mit elektrokompetenten Zellen

Bei der Elektroporation werden Bakterien einige Millisekunden lang mit einem elektrischen Impuls behandelt. Dazu wurden *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl Plasmid-DNA eine Minute auf Eis inkubiert. Die Zell-DNA-Mischung wurde in einer speziellen Küvette auf einem Schlitten zwischen zwei Kontakte in die Kammer des Elektroporators (MicroPulser, Bio-Rad) eingebracht. Die für 2,7-5,4 ms angelegte Spannung betrug 2,5 kV. Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen. Die Zeit zwischen dem elektrischen Impuls und der Applikation des Nährmediums ist entscheidend für das spätere Wachstum der Zellen (Miller et al., 1988). Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C und 225 Upm. Die Zellen wurden auf selektiven (50 µg/ml Kanamycin, 34 µg/ml Chloramphenicol, 12,5 µg/ml Tetracyclin) LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Brutschrank gehalten.

2.6.7 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte mit einem Plasmid-Extraktionskit (NucleoSpin Plasmid Quick[®]Pure Kit, Macherey-Nagel). Dafür wurden Bakterien in einer 3 ml-Übernachtskultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Lyse der Zellen sowie die Plasmidaufreinigung erfolgten nach Anleitung des Herstellers. Im Anschluss wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese in einem 0,8%igen Gel zur Qualitätskontrolle und Konzentrationsabschätzung durchgeführt.

2.6.8 DNA-Sequenzierung

Die Plasmide für die Expression wurden nach erfolgreicher Kolonie-PCR aufgereinigt und von der Firma SeqLab (Göttingen) nach der Strangabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Es kam ein Fluoreszenz-Kapillar-Sequenzierer zum Einsatz.

2.7 Rekombinante Expression der Fusionsproteine in *Escherichia coli*

2.7.1 Struktur des Expressionsvektors

Zur Herstellung der rekombinanten Fusionsproteine in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen bzw. in *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen wurde der pSUMO3-Vektor verwendet. Dieser Vektor besitzt in seiner "Multiple Cloning Site" verschiedene Schnittstellen für Restriktionsenzyme, um das Einfügen des Inserts in seinen Leserahmen zu ermöglichen. Am N-Terminus des jeweils exprimierten Fusionsproteins befindet sich ein "Fusionstag" bestehend aus einem sogenannten Histidin-"Tag", der der späteren Proteinaufreinigung über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie dient, und einem SUMO-"Fusionstag". SUMO ("Small Ubiquitin-Like Modifier") bezeichnet einen Abschnitt des Fusionsproteins, welcher aufgrund seiner Tertiärstruktur von der SUMO-Protease erkannt und abgespalten wird, so dass das jeweilige Zielprotein freigesetzt wird. Die Gensequenzen für die Fusionsproteine stehen unter der Kontrolle des T7-Promotors. Dieser DNA-Abschnitt reguliert die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase, deren Expression durch IPTG induzierbar ist. Eine schematische Darstellung der Vektorstruktur ist in Abb. 6.1 gezeigt. Die vom Hersteller genannten Vorteile gegenüber anderen Expressionssystemen sind zum einen eine erhöhte Proteinausbeute in der Expression dadurch, dass die SUMO-Protease nie im gewünschten Protein schneidet, und zum anderen eine erheblich verbesserte Löslichkeit des Proteins. Zur Selektion bei der Kultivierung der Bakterien trägt der pSUMO3-Vektor ein Kanamycin-Resistenz-Gen.

2.7.2 Durchführung der Expression der Fusionsproteine

Der Expressionsvektor pSUMO3 inklusive Insert wurde wie unter 2.6.6 beschrieben in den Expressionsstamm (*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen bzw. *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen) transformiert. Die positiven Klone wurden durch Plasmid-vermittelte und zellspezifische Antibiotika-Resistenz selektiert. 20 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit positiven Klonen angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler (200 Upm) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die OD_{600nm} bestimmt. Für die Expression wurden 250 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit den Bakterien aus der Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 0,02 *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen bzw. auf eine

OD_{600nm} von 0,1 für *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen angeimpft und schüttelnd bei 37°C inkubiert. Um das Wachstum der Bakterien zu bestimmen, wurde stündlich die OD_{600nm} des Ansatzes bestimmt. Bei einer OD_{600nm} von 0,4-0,6 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert und der Ansatz für weitere 3 h inkubiert. Bei 5000 x g und 4°C wurden die Expressionskulturen 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml LEW-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0; 1 ml Puffer pro 100 ml Kultur) resuspendiert, anschließend bei -80°C eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.8 Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine

2.8.1 Lyse der *Escherichia coli*-Bakterien

Die Lyse der in LEW-Puffer gelagerten *Escherichia coli*-Bakterien wurde durch eine Ultraschallbehandlung für 5 min mit je 12 s Ultraschall (davon pro Sekunde 60% Puls und 40% Pause) bei 50% Leistung und mit jeweils 30 s Pause auf Eis erreicht. Die lysierten Zellen wurden für 30 min bei 4°C und 11500 x g abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,45 µm, Sarstedt). Bis zur chromatographischen Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins erfolgte die Lagerung bei -20°C.

2.8.2 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Der Überstand der lysierten *Escherichia coli*-Bakterien wurde über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Jeweils 2 ml einer Probe wurden auf spezielle Trennsäulen, "Protino® Ni-TED packed columns" (Macherey-Nagel), aufgetragen. Aufgrund seiner Hexahistidin-Sequenz interagiert das Fusionsprotein mit den Nickelionen, die an die Säulenmatrix gebunden waren. Während das Fusionsprotein an der Säule gebunden war, befanden sich die übrigen *Escherichia coli*-Proteine im Durchlauf. Zur Elution wurden 4 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.8.3 C8-Umkehrphasen-HPLC

Für die weitere Aufreinigung des eluierten Materials der Nickel-Affinitätssäule erfolgte eine C8-Umkehrphasen-HPLC. Es wurde eine SP 250/10 Nucleosil 300-7 C8-Säule

(Macherey-Nagel) verwendet. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von Puffer A (0,1% Trifluoressigsäure (v/v) in H₂O) zu Puffer B (0,1% Trifluoressigsäure (v/v) in Acetonitril). Eluiert wurde mit einer Durchflussrate von 3 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 215 nm. Das Eluat der Nickel-Affinitätssäule wurde mit 5%iger Trifluoressigsäure auf pH 3 eingestellt, für 5 min bei 6000 x g zentrifugiert und sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Die Äquilibration der Säule erfolgte mit 10% Puffer B. Es folgte ein linearer Gradient auf 40% Puffer B in 10 min, in den weiteren 15 min erfolgte eine Steigerung auf 65% Puffer B, gefolgt von einem linearen Gradienten auf 100% Puffer B in 6 min. Abschließend wurde die Säule mit 100% Puffer B gespült. Die Fraktionierung erfolgte manuell. Die aus der C8-Umkehrphasen-HPLC resultierenden Fraktionen wurden über eine massenspektrometrische Analyse (siehe 2.9.2) auf das Vorhandensein der rekombinanten Proteine überprüft. Die Fraktionen, die die vorhergesagte Masse enthielten, wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Im Anschluss wurden die Proteine in Wasser gelöst, um ihre Konzentration zu bestimmen (siehe 2.9.1). Die Lagerung bis zur Hydrolyse der Fusionsproteine erfolgte bei -20°C.

2.8.4 Hydrolyse der Fusionsproteine

Das im SUMO-System exprimierte Protein lag als Fusionsprotein mit angehängtem Histidin-SUMO-"Tag" vor. Die SUMO-Protease 2 ist in der Lage diesen Teil anhand seiner Tertiärstruktur zu erkennen und abzuspalten. Für die Hydrolyse mit SUMO-Protease 2 wurde lyophilisiertes Protein aus der Aufreinigung über C8-Umkehrphasen-HPLC verwendet. Ein Hydrolyseansatz bestand aus einem Volumen gelösten Proteins entsprechend 200 µg, 2 mM DTT, 1x PBS und aus einem Gesamtvolumen von 1 ml und wurde über Nacht bei 30°C in einem Schüttler bei 300 Upm inkubiert. Es wurden 3 U der SUMO-Protease 2 eingesetzt.

2.8.5 C4-Umkehrphasen-HPLC

Im Anschluss an die Hydrolyse des Fusionsproteins in Zielprotein und Fusionsteil (siehe 2.8.4) wurde eine C4-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Es wurde eine Jupiter 5U C4 300Å-Säule (Phenomenex) verwendet. Die Auftrennung erfolgte über einen H₂O/Acetonitril- Gradienten, wobei als Puffer B 100% Acetonitril mit 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure verwendet wurde. Die aufzutragende Lösung bestehend aus Zielprotein, Fusionsteil und Protease sowie nicht verdautem Fusionsprotein wurde

mit 5%iger Trifluoressigsäure auf pH 3 eingestellt, zentrifugiert und filtriert. Die Durchflussrate betrug 0,5 ml/min. Zunächst wurde die Säule mit 10% Puffer B äquilibriert. Es folgte ein linearer Gradient bis 40% Puffer B innerhalb von 10 min, gefolgt von einem linearen Gradienten in 20 min auf 70% Puffer B. Der Gradient verlief anschließend weiterhin linear auf 100% B in einer Minute. Abschließend wurde eine Spülung mit 100% Puffer B durchgeführt. Die Elution wurde durch UV-Absorption bei 215 nm verfolgt, wobei die Fraktionierung des eluierten Materials manuell erfolgte. Um zu überprüfen, ob es im Hydrolyseansatz zur Abspaltung des gewünschten rekombinanten Produkts gekommen ist, wurden die resultierenden Fraktionen massenspektrometrisch analysiert (siehe 2.9.2). Bei korrekter Masse wurden die Proteine lyophilisiert und nach einer Konzentrationsbestimmung in Wasser zu 100 µg aliquotiert. Zur weiteren Verwendung wurden die Proteine erneut lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

2.8.6 C2/C18-Umkehrphasen-HPLC

Die C2/C18-Umkehrphasen-HPLC wurde zur weiteren Aufreinigung von IFPS-1 nach der Trennung vom Fusionsteil sowie zur Bestimmung seiner Masse durchgeführt. Es wurde eine "SMART™-System"-Anlage (Pharmacia) unter Verwendung einer µRPC C2/C18 SC 2.1/10-Säule (GE Healthcare) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls über einen H₂O/Acetonitril-Gradienten, wobei als Puffer B 80% Acetonitril mit 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure verwendet wurde. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte in 100%-Puffer A. In den ersten 10 min wurde der Gradient linear auf 25% Puffer B, in den folgenden 30 min auf 70% Puffer B und in den abschließenden 10 min auf 100% Puffer B gesteigert. Die Flussrate betrug 100 µl/min. Die Detektion erfolgte bei 215, 254 und 280 nm und fraktioniert wurde manuell.

2.9 Proteinanalytik

2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen in Lösungen, die nur ein definiertes Protein enthielten (z. B. Fusionsproteine nach Aufreinigung mittels C8-Umkehrphasen-HPLC), wurden mithilfe des molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt. Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt den proportionalen Zusammenhang zwischen der Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge und der Konzentration eines Stoffes in Lösung bei

gleichbleibender Schichtdicke der Lösung: $E_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} \cdot c \cdot d$ ($E_{280\text{ nm}}$: Extinktion bei 280 nm; $\epsilon_{280\text{ nm}}$: molarer Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; c : Konzentration der Lösung in M; d : Schichtdicke der Küvette in cm). Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz konnte die Konzentration der Lösung durch Messung der Absorption bei 280 nm errechnet werden. Für die photometrische Absorptionsmessung wurden UVetten® (Eppendorf) verwendet.

2.9.2 Massenspektrometrie

Zur Überprüfung der Proteinaufreinigung nach C4-, C8- bzw. C2/C18-Umkehrphasen-HPLC und zur Ermittlung der Masse unbekannter Proteine wurde diese mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) in einem Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid-Massenspektrometer bestimmt. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mit einer Natrium- und Cäsiumiodid-Lösung (40 $\mu\text{g/ml}$ in 50% 2-Propanol) in einem Bereich von 80-2000 m/z (Masse/Ladungsverhältnis). Die Proben wurden mit einer Lösung aus 50% (v/v) Acetonitril mit 0,2% (v/v) Ameisensäure versetzt und bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l/min}$ im positiven Ionen-Modus gemessen. Die Kapillarspannung betrug $\sim 3\text{ kV}$, die Konus-Spannung 40 kV; gemessen wurde bei einer Konus-Temperatur von 100°C und einer Desolvationstemperatur von 150°C . Die Messungen erfolgten mit Stickstoff als Träger-Gas. Spektren wurden in einem m/z -Bereich von 80-2000 aufgenommen und unter Verwendung der MassLynx 4-Software (Micromass) ausgewertet. Hierzu wurden die Spektren der einzelnen Scans gemittelt, Hintergrund-korrigiert und die monoisotopischen Massen in Dalton über die "Maximum Entropy 1" (MaxEnt1) Dekonvolution berechnet.

2.10 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität mittels Radialdiffusionstest

In diesem antimikrobiellen Testverfahren wurden die jeweiligen Mikroorganismen zunächst in einer Übernachtskultur in 8 ml TSB-Medium bei 37°C bei 120 Upm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden stammabhängig unterschiedliche Volumina 2-3,5 h bei 37°C in 8 ml TSB-Medium gegeben und die Kulturen verschieden kultiviert; eine Übersicht ist in Tab. 2.1 dargestellt. Nach Verflüssigung wurde die Underlay-Agarose (1% (w/v) Agarose (Invitrogen), 0,02% (v/v) Tween20, 1% (v/v) TSB-Medium, 10 mM Natriumphosphatpuffer) auf 46°C abgekühlt, zu 10 ml mit entsprechenden Volumina der Bakterien versetzt (siehe Tab. 2.1) und in

Petrischalen (Sarstedt) gegossen. Die Aushärtung erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur und für 30 min bei 7°C. Mit Hilfe einer Hautstanze mit 3 mm Durchmesser wurden Löcher in die Underlay-Agarose gestanzt. Die Proben wurden in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen (unverdünnt 1000 µg/ml; verdünnt: 1:3, 1:10, 1:30 und 1:100) in 0,01% (v/v) Essigsäure gelöst und zu je 5 µl in die gestanzten Löcher gegeben. Als Positivkontrolle wurde humanes Lysozym (100 ng/µl in 0,01% Essigsäure), das bekanntermaßen antimikrobielle Aktivität gegen die verwendeten Mikroorganismen besitzt, verwendet. Als Negativkontrolle diente 0,01% Essigsäure. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Nach der Verflüssigung und Abkühlung der Overlay-Agarose (1% (w/v) Agarose, 3,4% (w/v) Caseinpepton, 0,6% (w/v), Sojamehlpepton, 0,5% (w/v) D+-Glucose-Monohydrat, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v), Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,2-7,4), wurde diese zu 10 ml auf die Underlay-Agarose gegossen. Die Petrischalen wurden nach Aushärtung für 3 h bei 37°C inkubiert.

Tab. 2.1: Kultivierung der unterschiedlichen Mikroorganismen-Gattungen im Radialdiffusionstest.

Gattung	Überimpftes Volumen aus Übernachtskultur	Inkubation der Kultur bei 37°C	Volumen in 10 ml Underlay
<i>Escherichia coli</i>	50 µl	Standkultur	50 µl
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 µl	Standkultur	50 µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	100µl	Standkultur	100µl
<i>Candida albicans</i>	200 µl	Schüttelkultur	200 µl

Anschließend erfolgte die Vermessung der Hemmhöfe. Aus den Durchmessern der Hemmhöfe wurde die "Minimale effektive Konzentration" (MEK) als Maß für die antimikrobielle Aktivität berechnet (Steinberg und Lehrer, 1997).

3 ERGEBNISSE

Ifapsoriasin wurde in unserer Arbeitsgruppe als neues Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie auf genomischer Ebene in der Region des "Epidermalen Differenzierungskomplexes" im Abschnitt 1q21 des humanen Chromosoms 1 identifiziert. Die genomische Organisation, die cDNA-Sequenz, die mRNA-Expression sowie die Expression und die Funktion des Proteins wurden z. T. bereits untersucht (Wu, 2005; Hansmann, 2008). Ziel dieser Arbeit war es, weitere Fragmente des Ifapsoriasins rekombinant herzustellen, aufzureinigen und auf mögliche antimikrobielle Aktivität zu untersuchen.

Zwei Fragmente aus den B-Repeats des Ifapsoriasins wurden für die Untersuchung ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit ausgewählt: IFPS-1, welches ein N-terminal verkürztes B1-Repeat darstellt (Aminosäuren 1311-1338) und IFPS-2, welches das B1-Repeat in seiner ganzen Länge repräsentiert (Aminosäuren 1264-1338) (siehe Abb. 1.3). Bei der Einteilung des Ifapsoriasins in Repeats muss berücksichtigt werden, dass die Repeats aufgrund bioinformatischer Analysen festgelegt wurden. Es gibt bisher keine experimentellen Beweise, dass das Protein tatsächlich in die festgelegten Repeats prozessiert wird.

3.1 Amplifikation der IFPS-1- und IFPS-2-Gensequenzen mittels PCR

Zur Generierung der Ifapsoriasin-Proteine wurden zunächst zwei DNA-Fragmente der entsprechenden cDNA-Sequenz mittels Standard-PCR amplifiziert (siehe 2.6.1.1). Die Größe der amplifizierten DNA entsprach dabei der DNA zweier Ifapsoriasin-Fragmente von Aminosäure 1311 bis 1338 und von Aminosäure 1264 bis 1338 (siehe 6.2). Eine cDNA (Aminosäuren 1078-1481), die aus ausdifferenzierten Keratinozyten neonataler Vorhautepidermis stammte, diente als Vorlage für die Amplifikation und wurde freundlicherweise von Dr. Zhihong Wu zur Verfügung gestellt. Es wurden Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an der Nukleotidsequenz dieser cDNA spezifisch binden (IFPS-1: 1311-1338 F, 1311-1338 R; IFPS 2: 1264-1338 F, 1264-1338 R) (siehe 2.3). Unter Verwendung der IFPS-1- und IFPS-2-Primer wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel PCR-Produkte mit einer Größe von etwa 260 und 110 Basenpaaren detektiert (siehe 2.6.2), die der Größe der zu erwartenden Fragmente aus der PCR (IFPS-1: 110 bp; IFPS-2: 258 bp) entsprachen

(siehe Abb. 3.1). Das zusätzliche Produkt in Spur zwei könnte aus anderen Regionen der cDNA-Vorlage amplifiziert worden sein, da sich die cDNA aus repetitiven Sequenzen zusammensetzt. Es besteht dadurch die Möglichkeit, dass Primer an identischen Sequenzen von anderen Repeat-Einheiten gebunden haben.

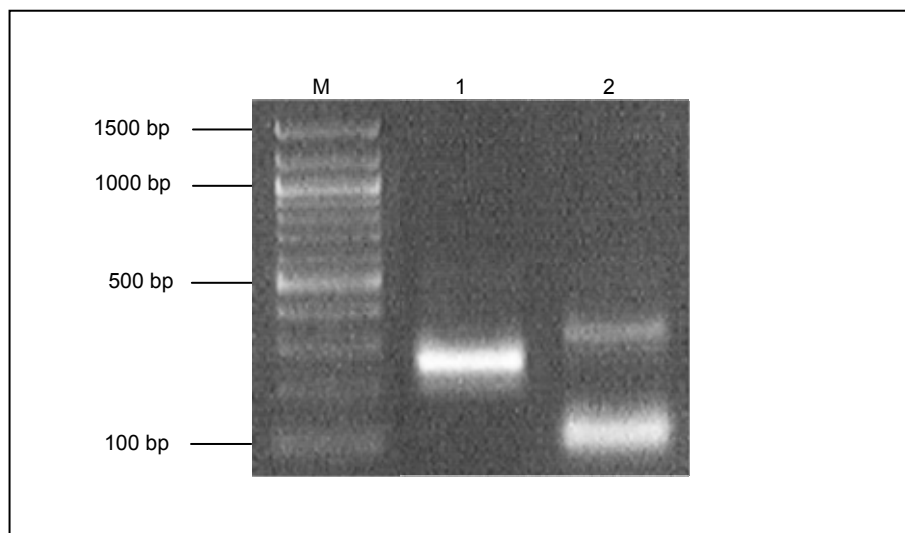


Abb. 3.1: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit Produkten der Standard-PCR. M = 100 Basenpaare–DNA–Leiter (New England Biolabs); 1 = IFPS-2 (258 bp), 2 = IFPS-1 (110 bp).

Im Anschluss wurden die beiden Banden für IFPS-1 und IFPS-2 aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mithilfe eines Extraktionskits extrahiert. Zur Kontrolle der Agarosegel-Extraktion und zur Konzentrationsbestimmung wurde eine weitere Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA-Extraktion von IFPS-1 und IFPS-2 wurde in zwei Elutionsschritten durchgeführt. Aus diesem Grund wurde die DNA jeweils eines Fragments je nach Elutionsschritt in zwei verschiedene Geltaschen pipettiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel waren für IFPS-1 und IFPS-2 Banden mit einer Größe von etwa 110 bzw. etwa 260 Basenpaaren sichtbar (siehe Abb. 3.2), was mit der Größe der erwarteten Fragmente aus der PCR (IFPS-1: 110 bp; IFPS-2: 258 bp) übereinstimmte.

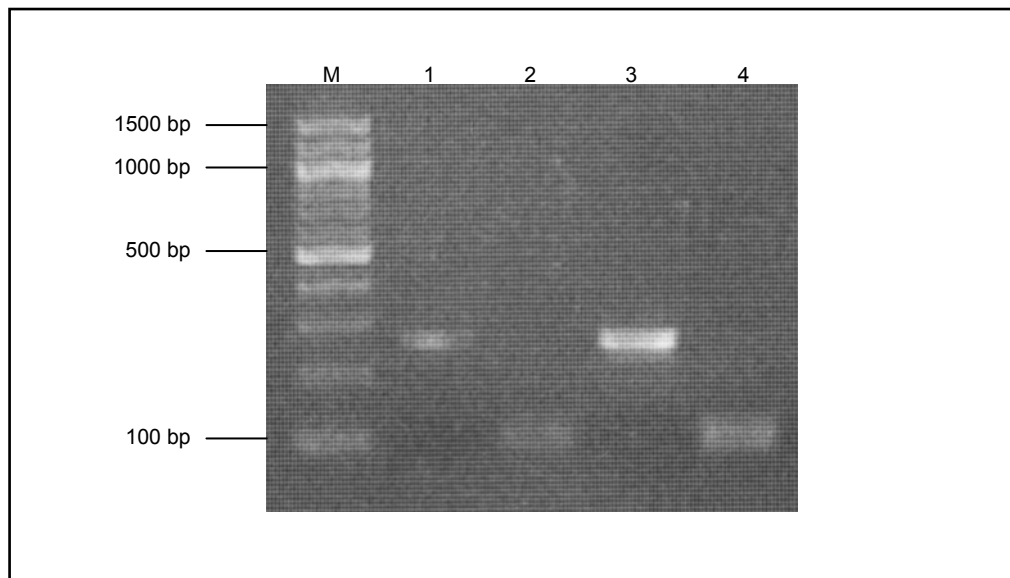


Abb. 3.2: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit DNA der Extraktion aus dem Agarosegel. M: 100 Basenpaare–DNA–Leiter (New England Biolabs); 1 = IFPS-2 (nach zweitem Elutionsschritt, 258 bp); 2 = IFPS-1 (nach zweitem Elutionsschritt, 110 bp); 3 = intensive Bande für IFPS-2 (nach erstem Elutionsschritt, 258 bp); 4 = IFPS-1 (nach erstem Elutionsschritt, 110 bp).

3.2 Klonierung im pSUMO3-Vektorsystem

3.2.1 Restriktionshydrolyse der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte für die Ligation in den pSUMO3-Vektor vorzubereiten, wurde eine Restriktionshydrolyse mithilfe der Restriktionsenzyme *BsaI* und *BamHI* für IFPS-1 bzw. *FokI* und *XhoI* für IFPS-2 durchgeführt (siehe 2.6.4). Für IFPS-1 wurde nach der Restriktionshydrolyse ein Fragment mit 96 Basenpaaren und für IFPS-2 ein Fragment mit 237 Basenpaaren erwartet (siehe Abb. 3.3 und 3.4). Im Ergebnis der im Anschluss durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese war die Verkürzung der Ifapsoriasin-Fragmente nach der Restriktionshydrolyse gegenüber der Kontroll-DNA sichtbar (siehe Abb. 3.5). Als Kontrolle diente jeweils eine DNA-Probe des zuvor erstellten PCR-Produkts (IFPS-1 = 110 Basenpaare, IFPS-2 = 258 Basenpaare).

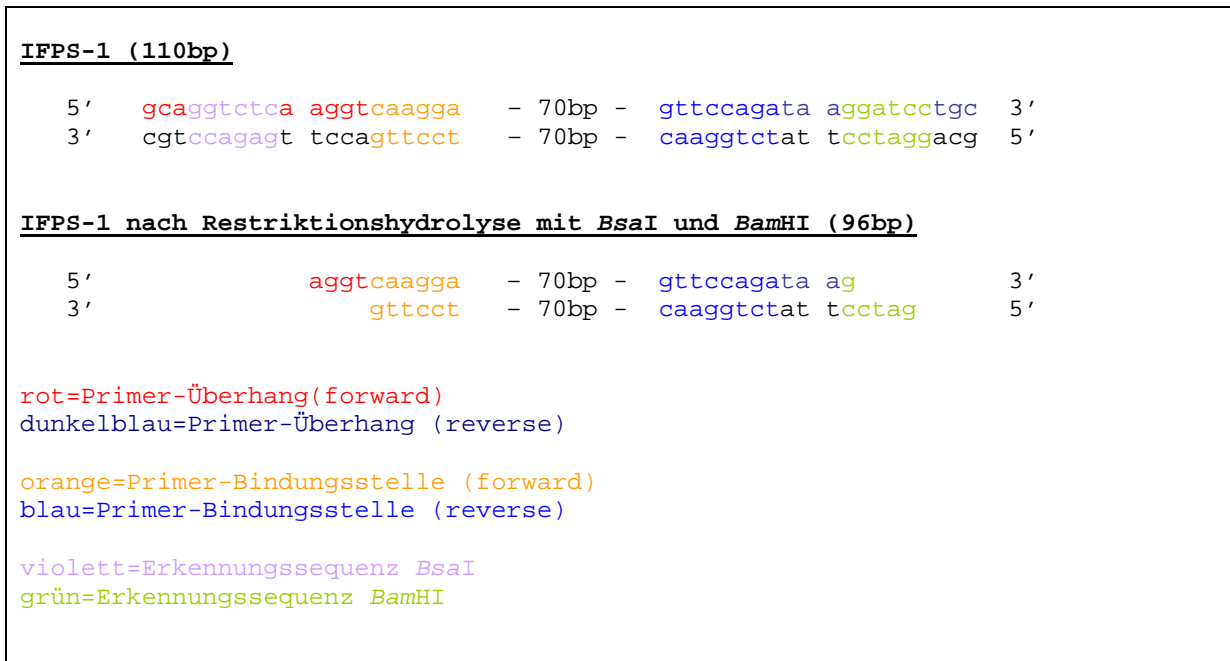


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Restriktionshydrolyse von IFPS-1.

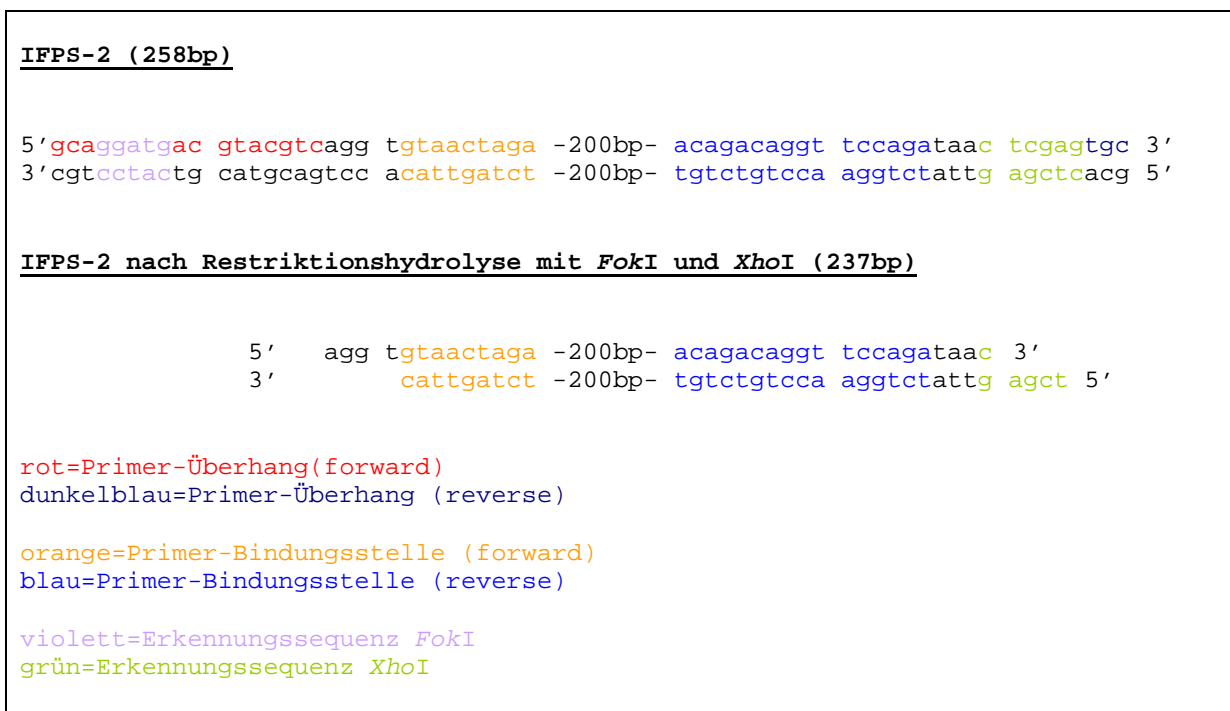


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Restriktionshydrolyse von IFPS-2.

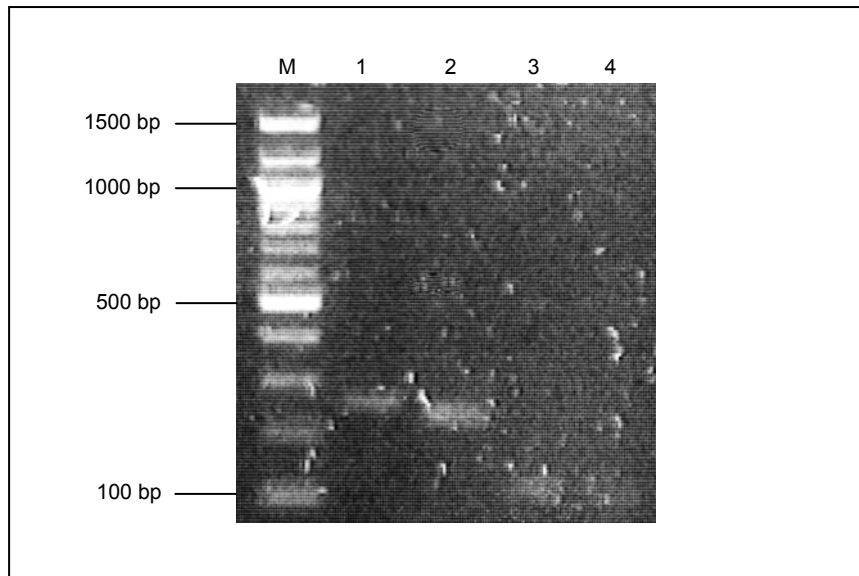


Abb. 3.5: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Restriktionshydrolyse. M = 100-Basenpaar-DNA-Leiter (New England Biolabs); 1 = IFPS-2, unbehandelte Kontrolle (258 bp); 2 = verkürztes IFPS-2 nach Restriktionshydrolyse (237 bp); 3 = IFPS-1, unbehandelte Kontrolle (110 bp); 4 = verkürztes IFPS-1 nach Restriktionshydrolyse (96 bp, sehr schwache Bande).

3.2.2 Restriktionshydrolyse des Vektors für IFPS-2

Um zu dem in der Restriktionshydrolyse erzeugten verkürzten IFPS-2-Fragment komplementär zu sein, musste der pSUMO3-Vektor einer Restriktionshydrolyse mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *BsaI* unterzogen werden. Zur Kontrolle wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abb. 3.6). Um die Funktion der beiden Restriktionsenzyme *XhoI* und *BsaI* beurteilen zu können, wurden neben der Restriktionshydrolyse mit beiden Enzymen auch solche Ansätze in der Agarose-Gel-Elektrophorese verwendet, in denen jeweils nur ein Restriktionsenzym eingesetzt wurde. Hier lag der zuvor zirkuläre Vektor nach der Restriktionshydrolyse in linearer Form vor, was zu einer Veränderung im Laufverhalten führte: Die Bande zeigte eine Größe von etwa 5,6 kb anstatt von etwa 3,3 kb. Die Banden mit den Produkten der Restriktionshydrolysen, in denen jeweils nur ein Enzym verwendet wurde, zeigten die gleiche Größe von etwa 5,6 kb an (siehe Abb. 3.6, Bande 3 und 4). Das Produkt der Restriktionshydrolyse unter Verwendung beider Restriktionsenzyme zeigte eine Bande mit der korrekten Größe an, die etwas weniger als etwa 5,6 kb betrug (siehe Abb. 3.6, Bande 5). Zur weiteren Kontrolle wurde der Vektor mit denselben Reagenzien versetzt und den gleichen Temperaturschritten unterzogen, ohne dass dabei Restriktionsenzyme zugegeben wurden. Die Banden dieses Ansatzes zeigten in der Agarose-Gelelektrophorese ebenso wie die Banden eines Ansatzes des Vektors ohne Zugabe von Reagenzien eine Größe von etwa 3,3 kb und eine Größe

über 10 kb (siehe Abb. 3.6, Banden 2 und 1). Die verschiedenen Banden repräsentieren unterschiedliche Konformationen der Vektoren.

Der mit den Restriktionsenzymen *Bsa*I und *Bam*HI verdaute Vektor für IFPS-1 wurde freundlicherweise von Dr. Zhihong Wu zur Verfügung gestellt.

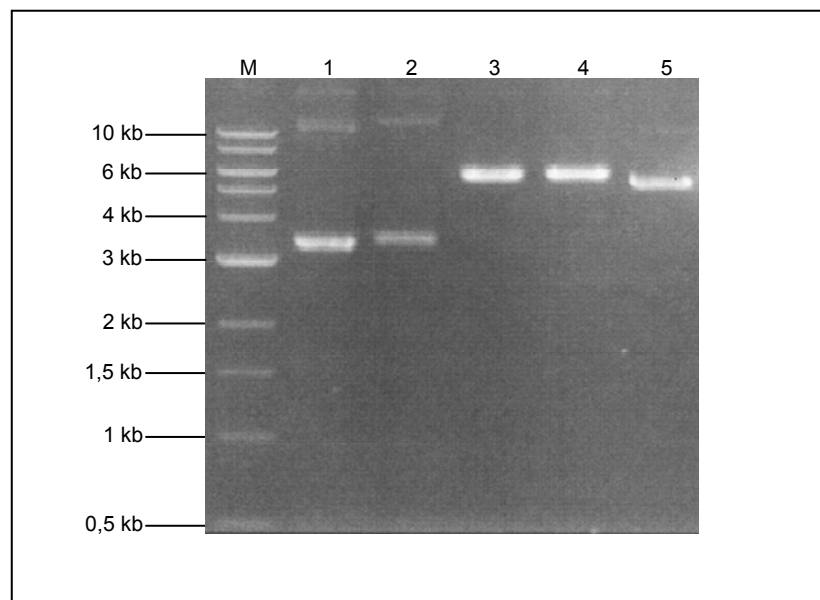


Abb. 3.6: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Restriktionshydrolyse des Vektors für IFPS-2. M = 1000-Basenpaar-Leiter (New England Biolabs); 1 = pSUMO3-Vektor (Kontrolle); 2 = pSUMO3-Vektor-Non-Verdau; 3 = pSUMO3-Vektor-Einzelverdau mit *Xho*I; 4 = pSUMO3-Vektor-Einzelverdau mit *Bsa*I; 5 = pSUMO3-Vektor-Doppelverdau mit *Xho*I und *Bsa*I.

3.2.3 Überprüfung der Effizienz der Gel-Extraktion des pSUMO3-Vektors

Um festzustellen, ob bei der Agarose-Gelextraktion die korrekte Vektor-DNA extrahiert wurde und zur Bestimmung der Konzentration, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abb. 3.7). Die Bande zeigte die erwartete Größe der Vektor-DNA von etwa 5,6 kb.

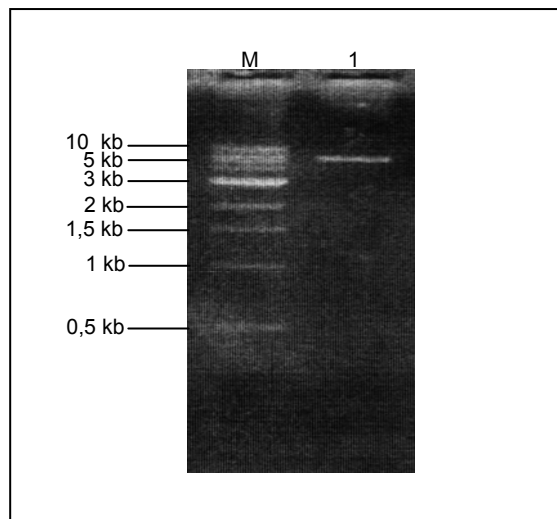


Abb. 3.7: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Effizienz der Gel-Extraktion. M = 1000-Basenpaar-Leiter (New England Biolabs); 1 = pSUMO3-Vektor nach Agarose-Gelextraktion: die Bande des aus dem Agarose-Gel extrahierten Vektors zeigte eine Bande mit einer Größe von etwa 5,6 kb.

3.2.4 Ligation und Transformation in *Escherichia coli* TOP10-Zellen

Die in der Restriktionshydrolyse geschnittenen DNA-Fragmente IFPS-1 und IFPS-2 wurden in der Ligation (siehe 2.6.5) mit dem jeweiligen pSUMO3-Vektor verbunden. Der Vektor lag nach der Ligation in geschlossener Form vor und wurde daraufhin in die chemisch-kompetenten *Escherichia coli* TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.6.6.1). Im Anschluss erfolgte eine Übernachtkultivierung bei 37°C auf mit Kanamycin versetzten Agarplatten, da der pSUMO3-Vektor eine Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin zur Selektion positiver Klone besitzt. So sollte verhindert werden, dass Bakterien wachsen, die den Kanamycin-Resistenzgen tragenden pSUMO3-Vektor nicht enthielten. Für IFPS-1 wurden zehn Kolonien und für IFPS-2 sechs Kolonien in der der Kolonie-PCR auf korrekte Vektoren und Inserts hin überprüft (siehe 2.6.1.2). Da die Primer für die Kolonie-PCR so gewählt worden waren, dass der IFPS-1-F- bzw. der IFPS-2-F-Primer im Bereich des Inserts und der T7-Reverse-Primer im Bereich des Vektors bindet, addieren sich jeweils zur ursprünglichen Länge der Fragmente (IFPS-1: 84 bp, IFPS-2: 225 bp) noch der Überhang der Primer (IFPS-1: 14 bp, IFPS-2: 21 bp) sowie der Überhang des Vektors (IFPS-1: 136 bp, IFPS-2: 96 bp). So ließen sich für IFPS-1 und IFPS-2 Fragmentlängen von 234 bp bzw. 342 bp errechnen. In der im Anschluss an die Kolonie-PCR durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die Bakterien Vektoren aufgenommen hatten, die das korrekte Insert enthielten (siehe Abb. 3.8 und Abb. 3.9). Als Negativkontrolle diente der Ansatz der Kolonie-PCR mit

dem Unterschied, dass keine bakterielle DNA hinzugegeben wurde. Als Positivkontrolle wurde der Ligationsansatz verwendet.

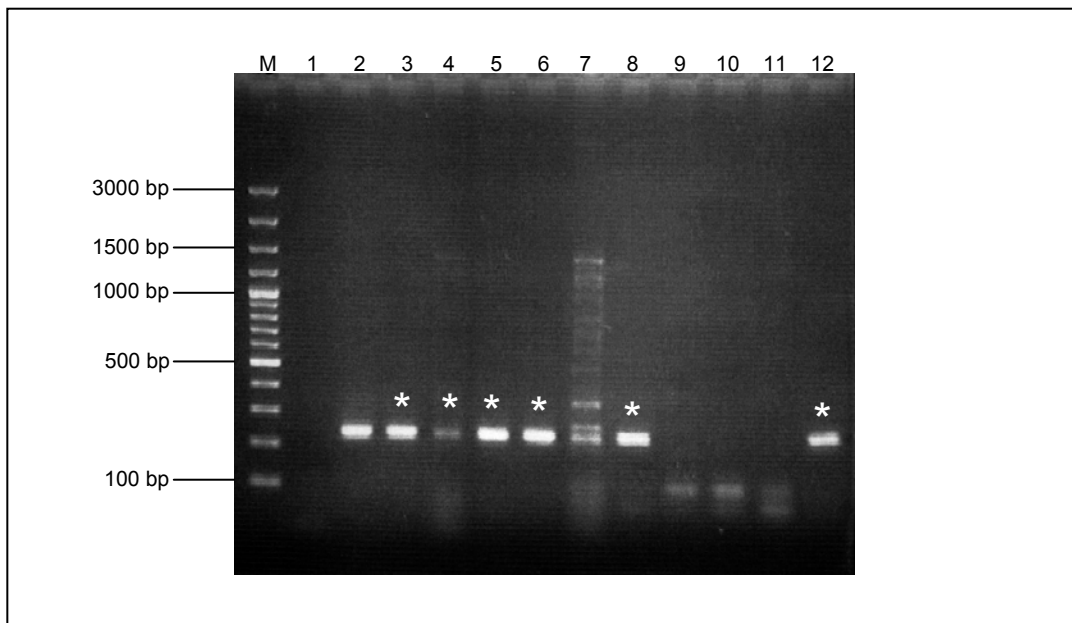


Abb. 3.8: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit IFPS-1 in *Escherichia coli* TOP10-Zellen. M = 100-Basenpaar-Leiter (Fermentas); 1 = Negativkontrolle; 2 = Positivkontrolle (Ligationsprodukt, 234 bp); 3-12 = analysierte Klone. Sechs von zehn analysierten Klonen zeigten Banden mit der korrekten Größe von 234 bp (diese sind mit einem Stern markiert).

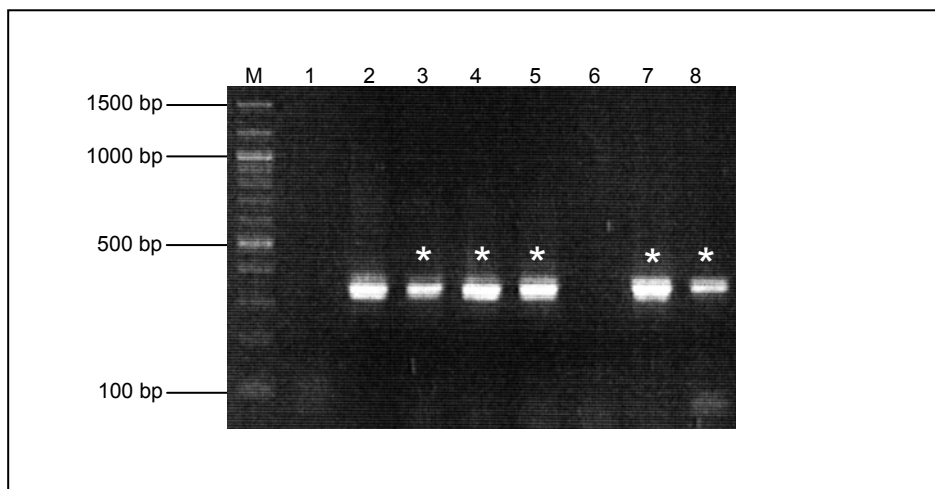


Abb. 3.9: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit IFPS-2 in *Escherichia coli* TOP10-Zellen. M = 100-Basenpaar-DNA-Leiter (New England Biolabs); 1 = Negativkontrolle; 2 = Positivkontrolle (Ligationsprodukt, 342 bp); 3-8 = entsprechende Klone. Fünf von sechs analysierten Klonen zeigten Banden mit der korrekten Größe von 342 bp (diese sind mit einem Stern markiert).

3.2.5 Plasmidisolierung

Mit jeweils zwei positiven Kolonien wurden Kanamycin-haltige LB-Flüssigkulturen hergestellt und diese bei 37°C über Nacht kultiviert. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung (siehe 2.6.7). Um festzustellen, ob die gewünschten Plasmide extrahiert wurden, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abb. 3.10). Die Plasmide mit den Inserts für IFPS-1 und IFPS-2 zeigten jeweils zwei Banden mit der korrekten Größe von 3 kb sowie zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von etwa 8 kb.

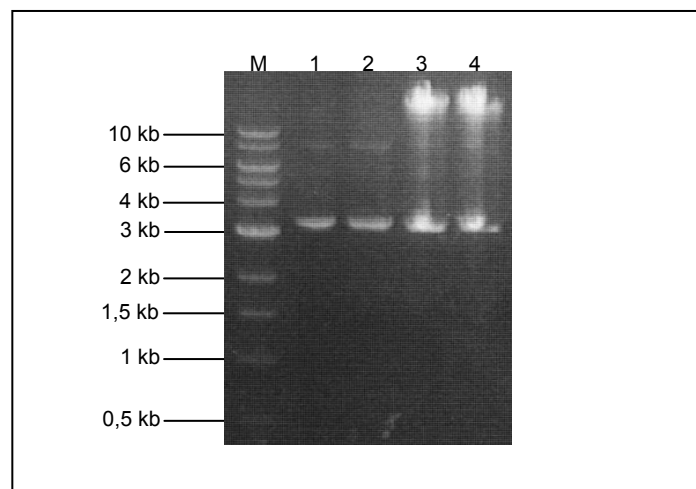


Abb. 3.10: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Plasmidextraktion. M = 1000-Basenpaar-Leiter (New England Biolabs); 1 und 2 = Extrahierte Plasmide der IFPS-2-Klone; 3 und 4 = Extrahierte Plasmide der IFPS-1-Klone. Die verschiedenen Banden repräsentieren unterschiedliche Konformationen der Plasmide.

3.2.6 Transformation in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen

Das Plasmid, welches das mittels Sequenzierung auf seine korrekte Basensequenz getestete Insert des IFPS-1 enthielt, wurde in den *Escherichia coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS transformiert (siehe 2.6.6.1). Da dieser Bakterienstamm eine Chloramphenicol-Resistenz besitzt, erfolgte die Inkubation über Nacht auf LB-Agarplatten, die die Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol entsprechend den Resistenzen des pSUMO3-Vektors sowie der Bakterien enthielten. Die Kolonie-PCR zur Überprüfung, ob der Vektor tatsächlich aufgenommen wurde, bestätigte bei allen vier ausgewählten Kolonien die erfolgreiche Transformation (siehe Abb. 3.11). Von einer der positiven Kolonien wurde eine Kanamycin- und Chloramphenicol-haltige LB-Flüssigkultur hergestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

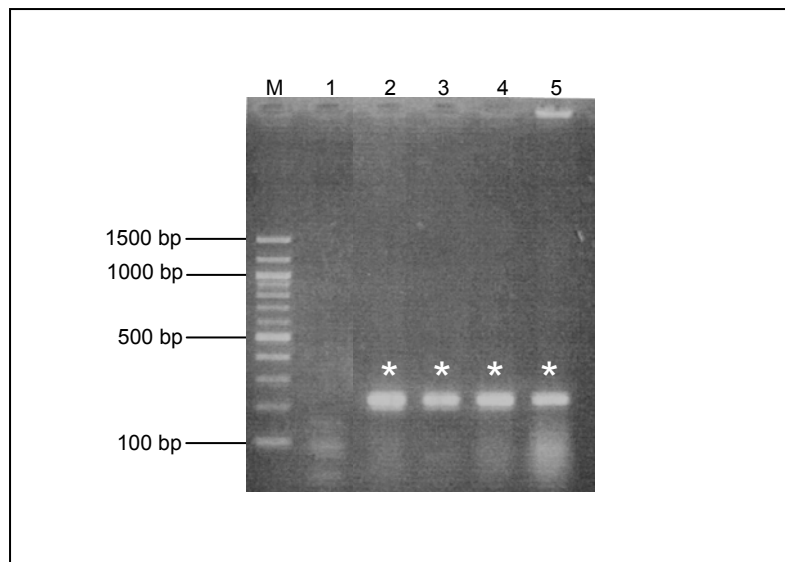


Abb. 3.11: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit IFPS-1 in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen. M = 100-Basenpaar-DNA-Leiter (New England Biolabs); 1 = Negativkontrolle; 2-5 = analysierte Klone. Alle analysierten Klone zeigten Banden mit der korrekten Größe von 234 bp. Die Banden mit positiven Klonen sind mit einem Stern markiert.

3.2.7 Transformation in *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen

Die rekombinante Expression des IFPS-2-Proteins durch *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen war vermutlich aufgrund von sogenannten "rare codons" nicht erfolgreich. Aus diesem Grund wurde das Plasmid in den *Escherichia coli*-Stamm Rosetta-gami2 (DE3) pLysS transformiert (siehe 2.6.6.2), der ein Chloramphenicol- und ein Tetracyclin-Resistenzgen besitzt. Die Inkubation erfolgte auf LB-Agarplatten, die die Antibiotika Kanamycin, Chloramphenicol und Tetracyclin enthielten, über Nacht und bei 37°C. Die Kolonie-PCR bestätigte bei fünf von sechs Kolonien die erfolgreiche Transformation (siehe Abb. 3.12). Mit zwei positiven Kolonien wurden LB-Flüssigkulturen mit den entsprechenden Antibiotika hergestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

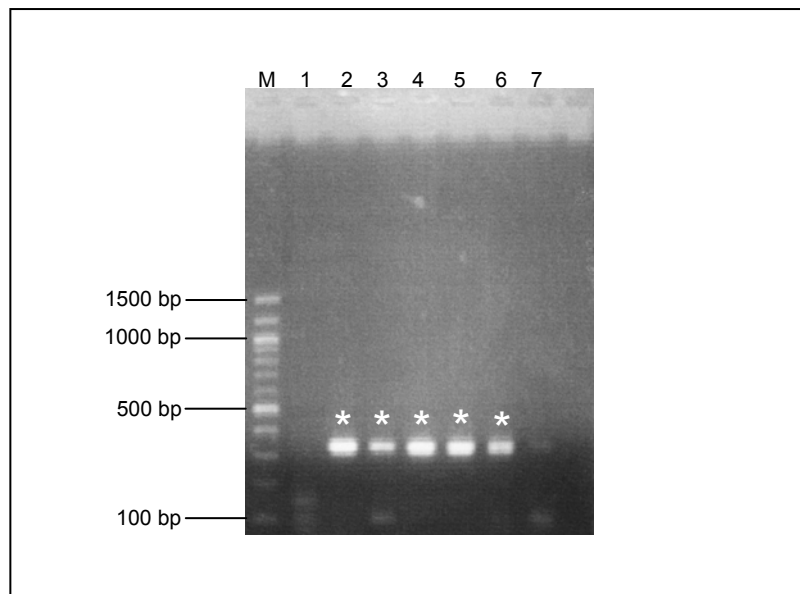


Abb. 3.12: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation des pSUMO3-Vektors mit IFPS-2 in *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen. M = 100-Basenpaar-DNA-Leiter (New England Biolabs); 1 = Negativkontrolle; 2-7 = analysierte Klone. Fünf von sechs analysierten Klonen zeigten Banden mit der erwarteten Größe von 342 bp (diese sind mit einem Stern markiert).

3.3 Expression und Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine pSUMO3-IFPS-1 und pSUMO3-IFPS-2

Für die Expressionskultur wurde LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit den *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLys-Zellen bzw. den Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen auf eine OD_{600nm} von 0,02 bzw. 0,1 angeimpft. Bei einer OD_{600nm} von 0,4-0,6 erfolgte die Induktion der Proteinexpression der rekombinanten Fusionsproteine mit 1 mM IPTG in den *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLys-Zellen bzw. in den Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen. Anschließend wurde für 3 h bei 37°C und bei 200 Upm inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die abzentrifugierten Bakterienzellen in LEW-Puffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Im Anschluss wurden die Bakterienzellen mit Ultraschall lysiert (siehe 2.8.1). In einer weiteren Zentrifugation wurden größere Bakterienbestandteile von den zytosolischen Proteinen getrennt.

Zunächst wurden die aus der Expression gewonnenen Fusionsproteinproben einer immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (siehe 2.8.2) unterzogen, um das jeweilige Fusionsprotein aus dem Proteingemisch zu isolieren. Im Eluat wurde anschließend photometrisch die Konzentration des jeweiligen Fusionsproteins bestimmt. Diese musste bekannt sein, um die Bindungskapazität der für die nachfolgende C8-Umkehrphasen-HPLC verwendeten Säule von etwa 1 mg pro HPLC-Lauf nicht zu überschreiten (siehe 2.8.3). Mittels der C8-Umkehrphasen-HPLC

erfolgte eine weitere Aufreinigung, um möglichst sauberes Fusionsprotein zu gewinnen. Ein typisches Chromatogramm einer C8-Umkehrphasen-HPLC des Fusionsproteins pSUMO3-IFPS-1 ist in Abb. 3.13 gezeigt. Nach etwa 6-8 min wurde ein Einspritzpeak detektiert, der dadurch zustande kam, dass das in der Probe enthaltene Imidazol nicht an die Säule bindet und deshalb zuerst detektiert wurde. Das Fusionsprotein pSUMO3-IFPS-1 wurde nach einer Retentionszeit von etwa 25 min eluiert.

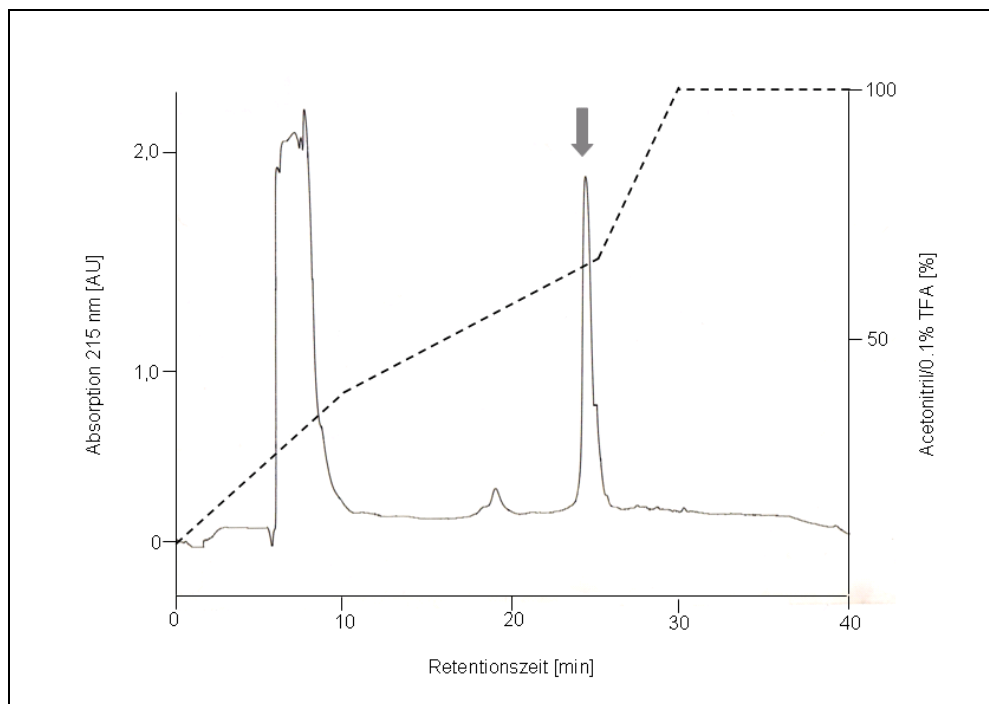


Abb. 3.13: Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins mittels C8-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption bei 215 nm (durchgezogene Linie) im Gradientenverlauf (unterbrochene Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die zuvor über eine Nickel-Affinitätssäule aufgereinigte Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min auf die C8-Säule aufgetragen und mit einem H₂O/0,1%TFA-100%Acetonitril/0,1%TFA-Gradienten eluiert. Der Peak des pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins ist mit einem grauen Pfeil markiert.

Die nachfolgende massenspektrometrische Untersuchung ergab für das pSUMO3-IFPS-1-Fusionsprotein eine Masse von 14431,1 Da. Diese Masse entspricht der Masse des einfach protonierten Proteins. Um die Masse des ungeladenen Proteins zu erhalten, muss von der Masse des protonierten Proteins ein Dalton abgezogen werden, was eine Masse von 14430,1 Da ergibt. Die Differenz dieser Masse zur theoretisch berechneten Masse (14430,8 Da) von 0,7 Da könnte auf die Kalibrierung des Massenspektrometers zurückzuführen sein. Ein repräsentatives Spektrum für eine dekonvolutierte massenspektrometrische Analyse

am Beispiel des C8-Umkehrphasen-HPLC-aufgereinigten pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins ist in Abb. 3.14 gezeigt. Die massenspektrometrisch ermittelte Masse des ungeladenen pSUMO3-IFPS-2-Fusionsproteins betrug 19847,3 Da und zeigte eine Differenz zur errechneten Masse von 19848,6 Da von etwa 1,3 Da.

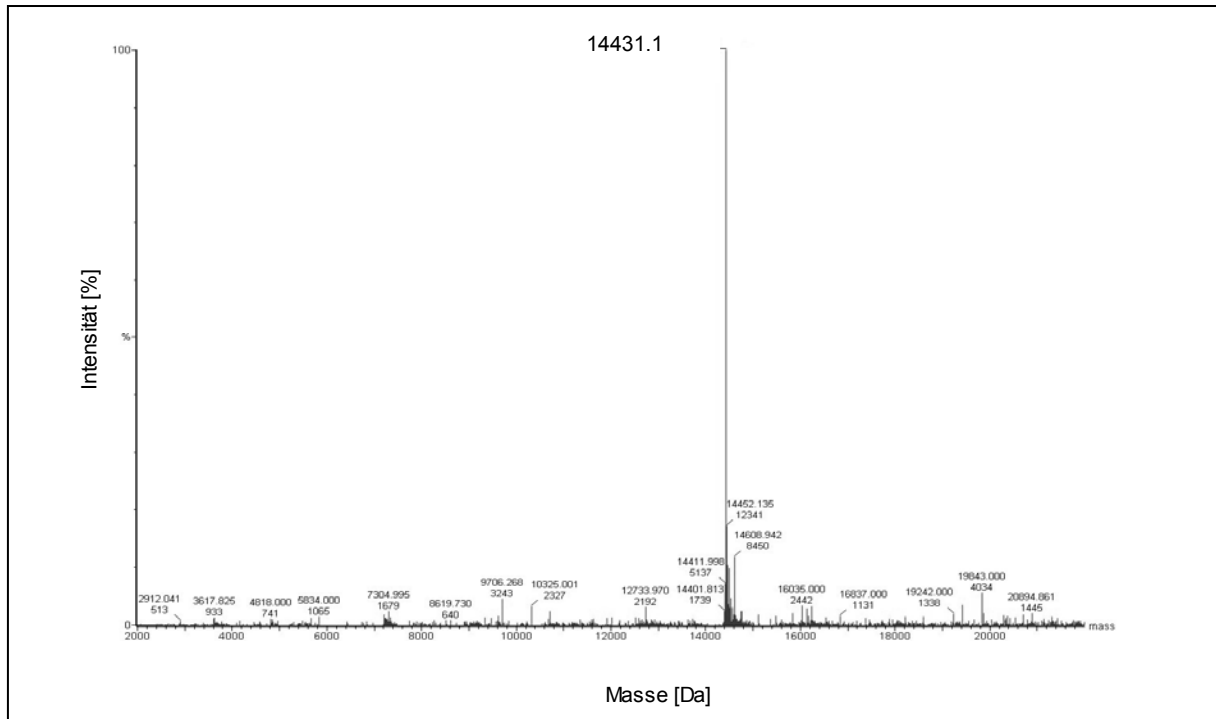


Abb. 3.14: Massenbestimmung des pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins mittels Massenspektrometrie. Gezeigt ist die MaxEnt1-Auswertung einer Messung von pSUMO3-IFPS1-Fusionsprotein, welches mittels C8-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt wurde. Die Masse in Dalton ist gegen die Intensität in Prozent des höchsten Peaks aufgetragen. Es wurde eine Masse von 14431,1 Da ermittelt.

3.4 Aufreinigung von rekombinant exprimiertem IFPS-1 und IFPS-2

Um die IFPS-1- und IFPS-2-Proteine in isolierter Form zu erhalten, mussten die mittels C8-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.8.3) aufgereinigten Fusionsproteine mit Hilfe der SUMO-Protease 2 in das jeweilige Proteinfragment und den pSUMO3-„Fusionstag“ gespalten werden (siehe 2.8.4). Im Anschluss an die Hydrolyse wurde eine C4-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt (siehe 2.8.5), um IFPS-2 aus der Probe zu isolieren. Dabei wurde der pSUMO3-„Fusionstag“ sowie unverdautes Fusionsprotein aus dem Gemisch entfernt. Ein typisches Chromatogramm einer C4-Umkehrphasen-HPLC ist am Beispiel des IFPS-2 in Abb. 3.15 gezeigt. Nach etwa 15 min bzw. nach 18 min ist jeweils ein Peak von in der Probe enthaltenem DTT in

reduzierter bzw. in oxidierter Form sichtbar. Das IFPS-2-Protein und der pSUMO3-
"Fusionstag" wurden nach einer Retentionszeit etwa 21 min bzw. etwa 25 min eluiert.

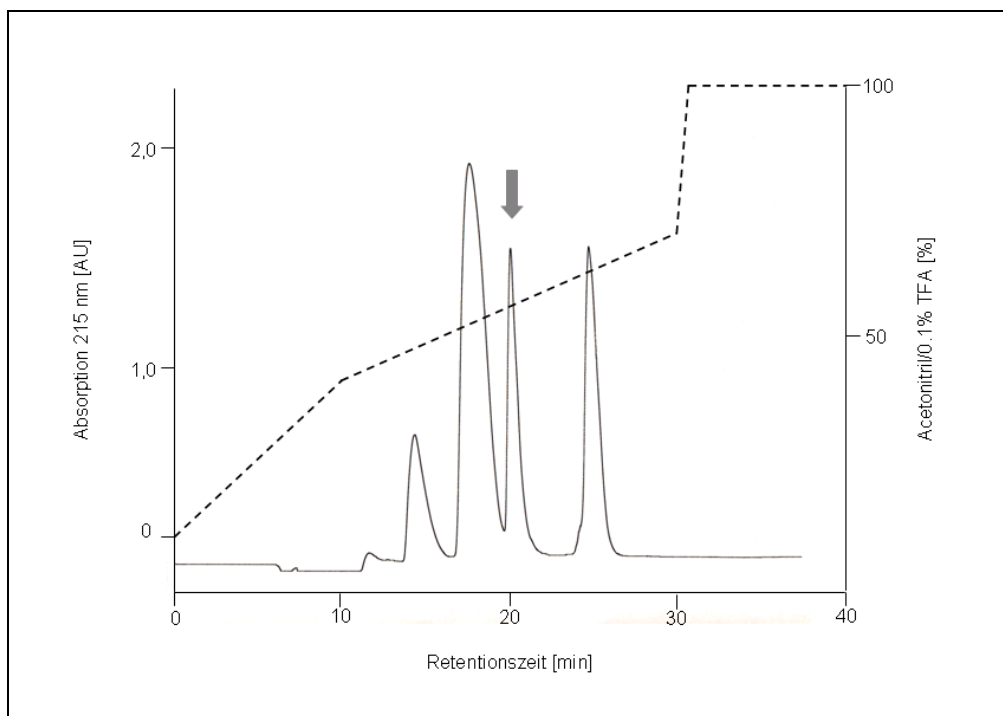


Abb. 3.15: Chromatogramm der Auftrennung einer SUMO-Protease 2 behandelten Probe eines pSUMO3-IFPS-2-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption bei 215 nm (durchgezogene Linie) im Gradientenverlauf (unterbrochene Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem H₂O/0,1% TFA-100% Acetonitril/0,1%TFA-Gradienten. Der Peak des IFPS-2 ist mit einem grauen Pfeil markiert.

Die anschließende massenspektrometrische Analyse der aufgefangenen Proteinfraktionen der C4-Umkehrphasen-HPLC zeigte für IFPS-2 eine Masse von 8348,3 Da (siehe Abb. 3.16). Die Differenz zwischen der Masse des ungeladenen Proteins (8347,3 Da) und der theoretisch errechneten Proteinmasse (8347,8 Da) beträgt 0,5 Da.

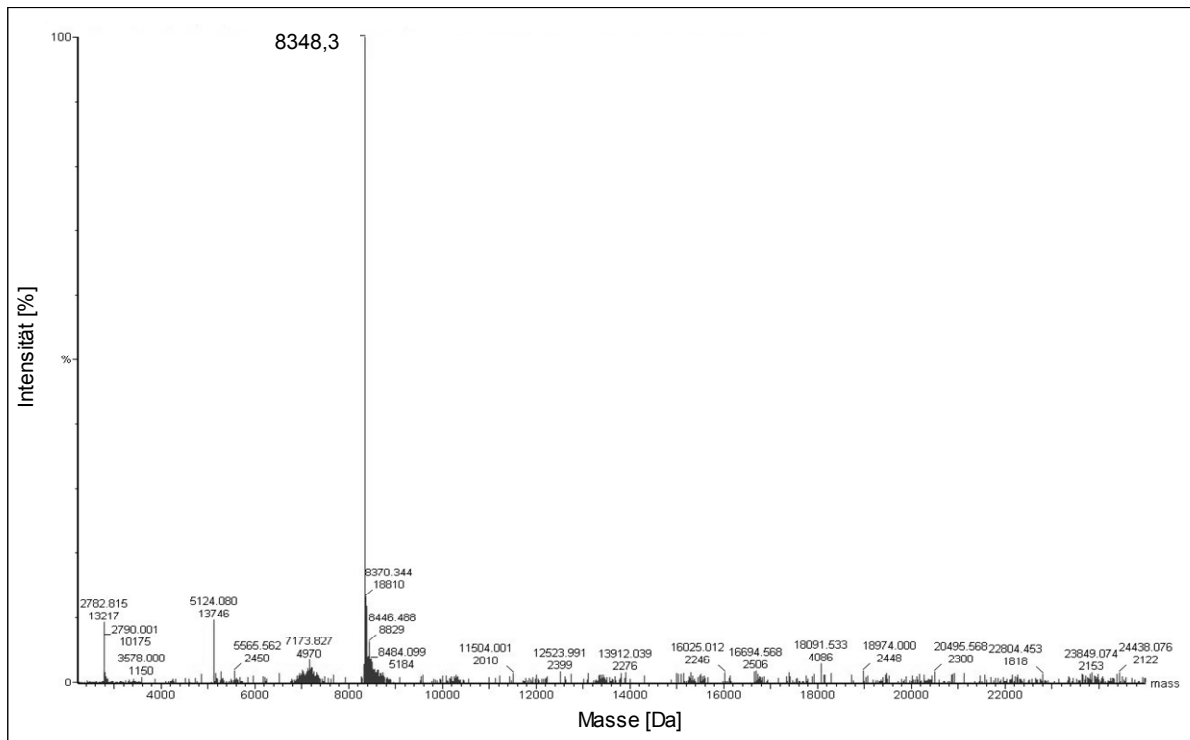


Abb. 3.16: Massenbestimmung des IFPS-2-Proteins mittels Massenspektrometrie. Gezeigt ist die MaxEnt1-Auswertung einer Messung von IFPS-2, welches mittels C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt wurde. Die Masse in Dalton ist gegen die Intensität in Prozent des höchsten Peaks aufgetragen. Es wurde eine Masse von 8348,3 Da ermittelt.

Die massenspektrometrische Analyse der Fraktionen einer C4-Umkehrphasen-HPLC eines SUMO-Protease 2-behandelten pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins zeigte zunächst nicht die erwartete Proteinmasse für IFPS-1. Als wahrscheinlichste Ursache kommt hierfür eine Überlagerung des IFPS-1-Peaks durch DTT in Betracht, welches in hohen Konzentrationen in der Probe enthalten war. Zur besseren Trennung von DTT und IFPS-1 wurde aus diesem Grund eine C2/C18-Umkehrphasen HPLC (siehe 2.8.6) verwendet (siehe 4.1). Anschließend konnte mithilfe der Massenspektrometrie eine Masse von 2930,3 Da detektiert werden. Die Differenz zwischen der Masse des ungeladenen Proteins (2929,3 Da) und der theoretisch berechneten Proteinmasse (2929,9 Da) beträgt 0,6 Da. Ein Chromatogramm der Aufreinigung des IFPS-1 mit Hilfe der C2/C18-Umkehrphasen HPLC ist in Abb. 3.17 dargestellt. Das IFPS-1 und der pSUMO3-„Fusionstag“ wurden nach einer Retentionszeit von etwa 11 min bzw. etwa 25 min eluiert. Der kleinere der beiden Peaks bei etwa 11 min Retentionszeit entspricht einem modifizierten IFPS-1, dessen N-terminales Glutamat zu Pyroglutamat zyklisiert wurde.

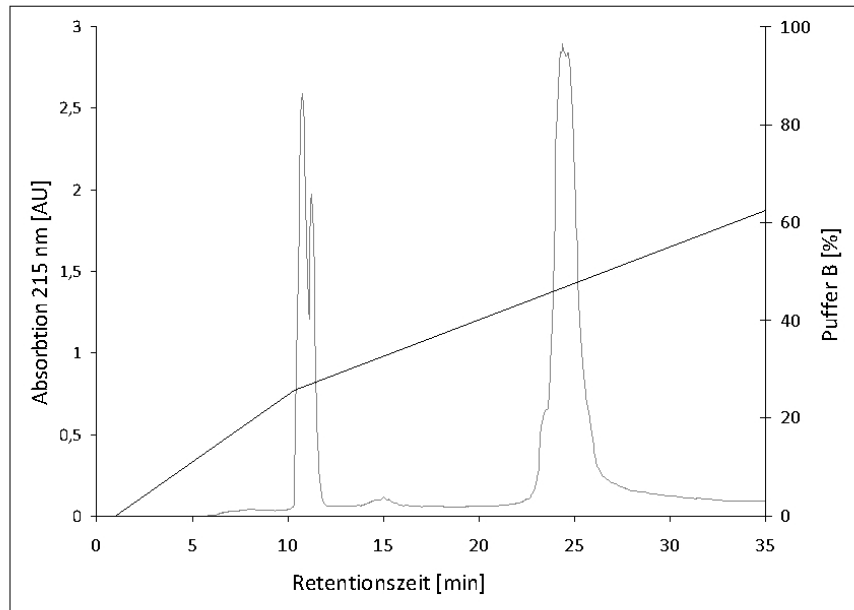


Abb. 3.17: Chromatogramm der Aufreinigung eines IFPS-1-Proteins mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (graue Linie) im Gradientenverlauf (dunkelgraue Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min auf die C2/C18-Säule aufgetragen. Der Peak des IFPS-1 liegt bei einer Retentionszeit von etwa 11 min. Nach etwa 25 min wurde der pSUMO3-„Fusionstag“ eluiert. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten wie in 2.8.6 beschrieben. Der Elutionspuffer B enthielt 80% Acetonitril und 0,1% TFA.

3.5 Antimikrobielle Aktivität von Ifapsoriasin

Nach erfolgreicher Aufreinigung der rekombinant exprimierten IFPS-1- und IFPS-2-Proteine wurden die Proteine auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht. Um die Proteine auf ein möglichst breites Wirkspektrum hin zu untersuchen, wurden IFPS-1 und IFPS-2 jeweils gegen den grampositiven Keim *Staphylococcus aureus*, gegen *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* als typische Vertreter der gramnegativen Bakterien sowie gegen die Hefe *Candida albicans* getestet.

3.5.1 Radialdiffusionstest

Im Radialdiffusionstest werden Agaroseplatten verwendet, die den jeweiligen für die Testung ausgewählten Mikroorganismus bereits enthalten. In die Agarose wurden Löcher gestanzt, welche mit Proteinlösungen in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000) gefüllt wurden (siehe 2.10). Die Konzentration der unverdünnten Probe entsprach dabei einer Konzentration von 1000 µg/ml. Über die "Minimale Effektive Konzentration" (MEK; berechnet aus den

Hemmhöfen bei verschiedenen Verdünnungen) konnte eine Aussage über die individuelle Wirkschwelle der jeweiligen Proteinlösung getroffen werden. Als Positivkontrolle wurde humanes Lysozym (100 ng/µl in 0,01% Essigsäure) verwendet. Als Negativkontrolle diente 0,01% Essigsäure. Die Versuche wurden jeweils dreimalig durchgeführt.

3.5.2 Antimikrobielle Aktivität von IFPS-1 im Radialdiffusionstest

Das Fragment IFPS-1 wies im Radialdiffusionstest selbst in der höchsten verwendeten Konzentration von 1000 µg/ml gegen keinen der ausgewählten Keime *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* antimikrobielle Aktivität auf. Lediglich die Positivkontrolle, bei der das antimikrobiell wirksame Lysozym verwendet wurde, zeigte bei allen zu testenden Mikroorganismen deutliche Hemmhöfe.

3.5.3 Antimikrobielle Aktivität von IFPS-2 im Radialdiffusionstest

IFPS-2 zeigte im Radialdiffusionstest gegen *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* und *Escherichia coli* antimikrobielle Aktivität. Gegen *Staphylococcus aureus* war keine antimikrobielle Aktivität nachweisbar. Für *Escherichia coli* betrug der Durchmesser des Hemmhofes in der höchsten Konzentration von 1000 µg/ml 6 mm (Positivkontrolle 7 mm). Für *Pseudomonas aeruginosa* wurde ein Durchmesser des Hemmhofes von 7 mm gemessen (Positivkontrolle 6 mm). Bei der Testung gegen *Candida albicans* ergab sich ein Durchmesser des Hemmhofes von 6 mm (Positivkontrolle 5 mm). Alle gemessenen Hemmhöfe waren deutlich abgegrenzt und zeigten kein Bakterienwachstum innerhalb des sichtbaren Hemmhofes. Aus den Hemmhofdurchmessern bei verschiedenen Verdünnungen wurden im Anschluss die MEKs für IFPS-2 gegen die drei sensiblen Keime berechnet (Steinberg und Lehrer, 1997). Die der Berechnung zugrunde liegenden Daten sind in Tab. 3.1 dargestellt. Von den Werten der Hemmhofdurchmesser in mm wurden jeweils 3 mm des gestanzten Probenloches abgezogen. Die Hemmhofdurchmesser wurden mit dem Faktor 10 multipliziert um Einheiten (Units) zu erhalten. Aus drei Proben einer Verdünnungsstufe wurde für jeden Keim der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der in Units umgerechneten Hemmhofdurchmesser sind in Abb. 3.18 gegen die halblogarithmisch aufgetragene Konzentration durch Punkte dargestellt. Diese bilden die Grundlage zur Berechnung der dargestellten Regressionsgeraden. IFPS-2 zeigte

gegen *Pseudomonas aeruginosa* mit einer MEK von 2,9 μM eine im Vergleich zum stark wirksamen Lysozym eine moderate Aktivität. Die Aktivität gegen *Candida albicans* und *Escherichia coli* war mit MEKs von 8,2 und 9,1 μM im Vergleich zu Lysozym sehr gering.

Tab. 3.1: Messdaten des Radialdiffusionstests. Angegeben sind die Hemmhofdurchmesser in mm bei verschiedenen Konzentrationen (unverdünnt: 1000 $\mu\text{g/ml}$, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000) des IFPS-2 für jeweils drei wiederholte Tests für die Keime *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*. Der Mittelwert der jeweiligen Verdünnungsstufe stellt die Grundlage zur Berechnung der Regressionsgeraden dar.

Keim	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145				<i>Candida albicans</i> ATCC 24433			
	1	2	3	MW	1	2	3	MW	1	2	3	MW
Hemmhofdurchmesser [mm] Konzentration 1:1	3,00	3,50	3,50	3,33	4,00	4,00	4,00	4,00	3,00	2,50	2,50	2,67
Hemmhofdurchmesser [mm] Konzentration 1:3	1,50	2,00	2,00	1,83	3,00	3,00	2,50	2,83	2,00	1,50	1,50	1,67
Hemmhofdurchmesser [mm] Konzentration 1:10	0,00	0,50	0,50	0,33	1,50	1,50	1,50	1,50	1,00	0,00	0,00	0,33
Hemmhofdurchmesser [mm] Konzentration 1:30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

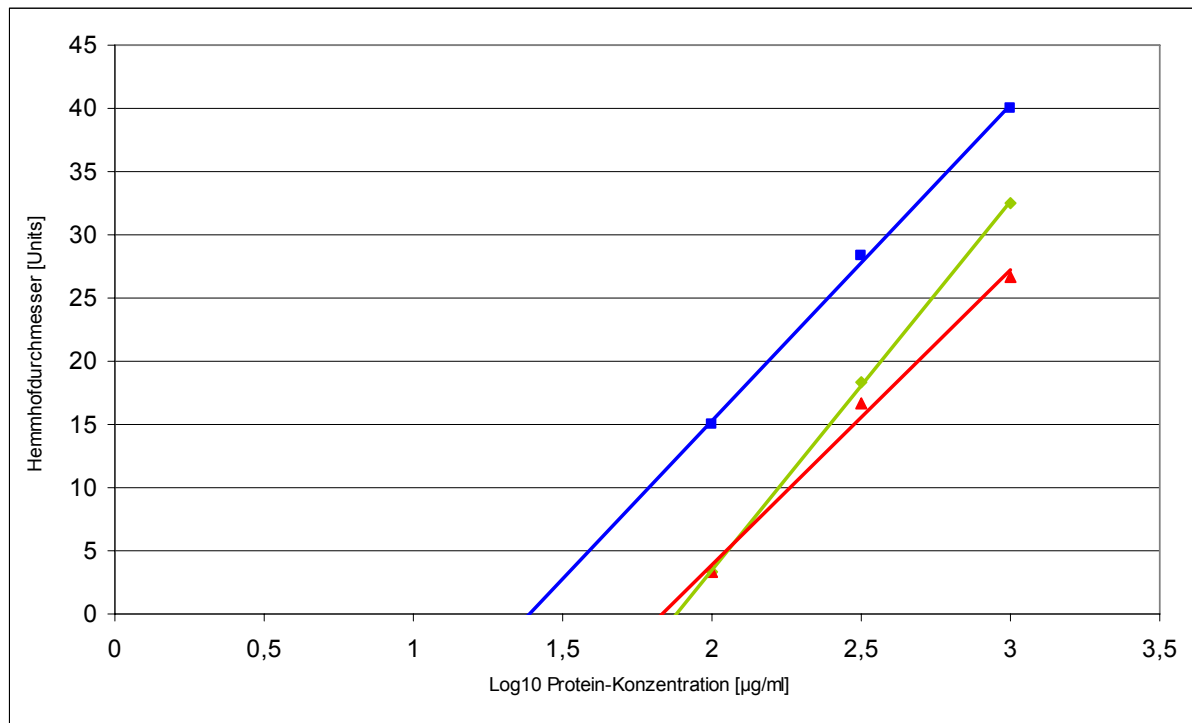


Abb. 3.18: Auswertung des Radialdiffusionstests nach Steinberg und Lehrer. grün: *Escherichia coli* ATCC 11775; blau: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; rot: *Candida albicans* ATCC 24433. Die durchgezogenen Linien stellen die Regressionsgeraden dar. Die Symbole (Quadrat, Dreieck, Raute) markieren die Lage der Datenpunkte. Mithilfe des Schnittpunktes der Geraden mit der Abszisse wurde die MEK des IFPS-2 für den jeweiligen getesteten Keim errechnet.

4 DISKUSSION

Als Barriereorgan ist die menschliche Haut ständig den Einflüssen der Umwelt ausgesetzt, zu denen auch eine Vielzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen und Viren gehört. Abhängig von der Lokalisation ist die menschliche Haut von 10^2 - 10^7 Mikroorganismen pro cm^2 besiedelt (Fredricks, 2001). Zu den typischen Vertretern der permanenten menschliche Hautflora gehören u.a. Staphylokokken, Streptokokken, Propionibakterien, Lactobazillen und Corynebakterien (Fierer et al., 2008; Grice et al., 2009). Abhängig von den angewandten Analysemethoden, den Versuchsbedingungen und den interindividuellen Unterschieden variieren die Studienergebnisse über die Hautflora jedoch sowohl in den Angaben über die Bakterienarten als auch über ihr zahlenmäßiges Verhältnis stark. Neben den Vertretern der permanenten Hautflora gibt es auch Mikroorganismen, die die Haut nur zeitweise und unter besonderen Bedingungen besiedeln. So gilt die Atopische Dermatitis als prädisponierend für die Kolonisierung der Haut mit dem grampositiven Keim *Staphylococcus aureus*, der bei den meisten Menschen nicht zur permanenten Hautflora gehört (Cogen et al., 2008). Neben Bakterien stellt die menschliche Haut auch für Viren und Pilze einen Lebensraum dar (Fredricks, 2001; Cogen et al., 2008). In Anbetracht der Fülle von Mikroorganismen und der Tatsache, dass sich einige Bakterien unter optimalen Bedingungen in 20 min teilen können, ist es erstaunlich, dass es nur sehr selten zu exzessivem Bakterienwachstum und Infektionen der Haut kommt (Schröder und Harder, 2006). Obwohl bis vor einigen Jahren noch angenommen wurde, dass die physikalische Barriere allein für den Schutz vor Infektionen durch Mikroorganismen verantwortlich ist (Schröder und Harder, 2006), zeigten zahlreiche Studien der letzten Jahre, dass dies nicht der Fall ist: Neben der physikalischen Barriere existiert auch eine chemische Barriere, die die antimikrobiellen Lipide (Drake et al., 2008) sowie die antimikrobiellen und antiviralen Peptide und Proteine umfasst (Izadpanah und Gallo, 2005). Die heute bekannten antimikrobiellen Peptide sind kleine, kationische Moleküle, die in der Haut hauptsächlich von Keratinozyten hergestellt werden und der angeborenen Abwehr angehören. Sie sind an der Regulation des Bakterienwachstums auf der Haut beteiligt und können in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: Defensine, Cathelicidine, Ribonukleasen und S100-Proteine (Harder et al., 2007; Schröder und Harder, 2006).

In dieser Arbeit wurde ein Sequenzabschnitt des Ifapsoriasins auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Ifapsoriasin (auch Filaggrin-2 genannt) wurde in unserer Abteilung als Mitglied der "S100 Fused Type Protein"-Familie identifiziert (Wu, 2005). Nachdem ein Hornerin-Fragment als erstes antimikrobiell wirksames Mitglied der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie identifiziert worden war (Wu, 2005), wurde auch für rekombinant hergestellte Ifapsoriasin-Fragmente antimikrobielle Aktivität nachgewiesen (Hansmann, 2008). Ebenso wurde für N-terminale Fragmente des Profilaggrins, welches ebenso ein Mitglied der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie ist, in unserer Arbeitsgruppe eine antimikrobielle Wirksamkeit festgestellt (Schulz, 2010; Karsch, 2010). Für Ifapsoriasin wurde eine Expression im oberen *Stratum granulosum* und im *Stratum corneum* der Haut nachgewiesen (Hansmann, 2008). Diese Schichten bilden die Grenze zwischen dem Körperinneren und der Außenwelt, die ständig mit potenziellen Pathogenen in Kontakt tritt. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob weitere Ifapsoriasin-Fragmente aus dem Bereich der B-Repeats antimikrobielle Aktivität zeigen, die die Barriere- und Abwehrfunktion der Haut unterstützen könnte. In der Aminosäuresequenz der ausgewählten Peptide ist eine RGD-Sequenz enthalten, die der Region dieses B-Repeats vermutlich auch antivirale Aktivität verleihen könnte. Der Frage nach einer möglichen antiviralen Aktivität konnte in dieser Arbeit allerdings nicht nachgegangen werden. Antivirale Testungen sind sehr aufwändig und erfordern spezielle Labore sowie entsprechend geschultes Personal. Aus diesem Grund wird die Testung der Ifapsoriasin-Fragmente auf eine mögliche antivirale Aktivität in Kooperation mit anderen Instituten erfolgen.

4.1 Schwierigkeiten bei der Proteinherstellung

Mithilfe der rekombinanten Expression wurden die Fragmente IFPS-1, welches ein N-terminal verkürztes B1-Repeat darstellt (Aminosäuren 1311-1338) und IFPS-2, welches das B1-Repeat in seiner ganzen Länge repräsentiert (Aminosäuren 1264-1338), hergestellt (siehe Abb. 1.3). Während die Expression des pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins erfolgreich war, zeigte die massenspektrometrische Untersuchung des C8-Umkehrphasen-HPLC-aufgereinigten pSUMO3-IFPS-2-Fusionsproteins zunächst nicht die erwartete Masse. Eine Sequenzanalyse zeigte, dass IFPS-2 sogenannte "rare codons" enthält. "Rare codons" sind Basentriplets, die in vielen *Escherichia coli*-Stämmen selten verwendet werden. Bei dem Versuch ein Protein zu exprimieren, dessen Basensequenz "rare codons" enthält, kommt es im Bakterium

während der Translation zu einem Mangel an diesen seltenen tRNAs, so dass die Translation an dieser Stelle abbricht und die Expression zu verkürzten Fusionsproteinen führt. Der *Escherichia coli*-Stamm Rosetta-gami2 (DE3) pLysS ist in der Lage, auch Proteine zu exprimieren, deren mRNAs "rare codons" enthalten. Der Vorteil des *Escherichia coli*-Stammes Rosetta-gami2 (DE3) pLysS liegt darin, dass die Bakterien ein zusätzliches Plasmid enthalten, das für diese seltenen tRNAs kodiert. Aus diesem Grund wurde der Vektor mit dem entsprechenden Insert für IFPS-2 mithilfe der Elektroporation in Rosetta-gami2 (DE3) pLysS-Zellen transformiert. Die anschließende Expression von IFPS-2 war erfolgreich. Die massenspektrometrische Untersuchung des Proteins im Anschluss an die Aufreinigung über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (siehe 2.8.2) und eine C8-Umkehrphasen-Chromatographie (siehe 2.8.3) ergab die korrekte Masse. Die Spaltung der Fusionsproteine in "Tag" und Zielprotein erfolgte mithilfe der SUMO-Protease 2.

Im Anschluss an die weitere Aufreinigung des IFPS-1 mittels C4-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.8.5) konnte in wiederholten massenspektrometrischen Analysen die Masse des Zielproteins nicht detektiert werden. Jedoch wurden sowohl für den "Tag" als auch für das unverdaute Fusionsprotein korrekte Massen ermittelt. Dies zeigt, dass der vorherige Verdau mithilfe der SUMO-Protease 2 erfolgreich war. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das hydrolysierte Zielprotein aufgrund geringer Interaktion mit der HPLC-Säulenmatrix innerhalb des Laufes schon früh wieder von der HPLC-Säulenmatrix abgelöst wurde. Das Zielprotein konnte so vermutlich nicht von dem in der Probe in sehr hoher Konzentration enthaltenen Dithiothreitol (DTT) getrennt werden, so dass das Signal des Zielproteins nicht messbar war. Versuche, das IFPS-1 mithilfe von Proteingelen mit Coomassie- bzw. Silberfärbungen sowie mithilfe eines Dot blots unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers, der gegen das B14-Repeat und den C-Terminus gerichtet war, nachzuweisen, scheiterten. Das Scheitern des Dot blots weist darauf hin, dass der verwendete Antikörper keine Kreuzreaktivität besitzt, die gegen das B1-Repeat gerichtet ist. Der Versuch das kationische Zielprotein ($pI=11,70$) über eine Heparin-Säule zu isolieren führte ebenfalls nicht zum Erfolg. Erst nach Auftrennung der Hydrolyseprodukte über eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.8.6) konnte die Masse des Zielproteins in einer Fraktion detektiert werden. Zur besseren Trennung von DTT und Zielprotein wurde der Gradient der C2/C18- Umkehrphasen-HPLC erst nach dem Durchlauf des Einspritzpeaks bei Erreichen der Nulllinie gestartet. Dies

ermöglichte, dass das DTT bereits von der Säulenmatrix eluiert wurde bevor die gradientenabhängige Elution des Zielproteins erfolgte. Bei der Aufreinigung einiger anderer Proteine mittels C4-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.8.5) war in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls das Problem einer Überlagerung des Peaks des Zielproteins durch den DTT-Peak aufgetreten. Inzwischen wird als reduzierendes Agens anstelle des DTTs Tris-(2-chlorethyl)-Phosphine (TCEP) eingesetzt. TCEP hat bei 215 nm keine Absorption und führt aus diesem Grund nicht zu einer Überlagerung von Protein-Peaks.

4.2 Antimikrobielle Wirksamkeit der Fragmente

Als erstes antimikrobiell wirksames Mitglied der "S100 Fused Type"-Proteinfamilie wurde Hornerin identifiziert. So wurden in unserer Arbeitsgruppe Hornerin-Fragmente in antimikrobiell aktiven HPLC-Fractionen aus *Stratum corneum*-Extrakten nachgewiesen. Für rekombinant hergestellte Ifapsoriasin-Fragmente, die eine Teilsequenz des N-terminalen Spacers und den C-Terminus mit dem letzten B-Repeat repräsentierten, wurde ebenfalls antimikrobielle Aktivität gezeigt. Die Teilsequenz des N-terminalen Spacers zeigte im Radialdiffusionstest mit einer Minimalen Effektiven Konzentration (MEK) von 14,8 μM sehr geringe antimikrobielle Wirksamkeit gegen *Escherichia coli* (ATCC 11303), während der C-Terminus mit dem letzten B-Repeat eine moderate bis hohe Aktivität (MEKs zwischen 0,4-3,5 μM) gegen verschiedene Pseudomonaden-Stämme aufwies (Hansmann, 2008).

Als Testorganismen wurden in dieser Arbeit *Staphylococcus aureus* als grampositiver Keim, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* als typische Vertreter der gramnegativen Bakterien sowie die Hefe *Candida albicans* ausgewählt. Für IFPS-1 (Aminosäuren 1311-1338), welches das verkürzte B1-Repeat repräsentierte, konnte keine antimikrobielle Aktivität festgestellt werden. IFPS-2 (Aminosäuren 1264-1338), welches das gesamte B1-Repeat umfasste, zeigte gegen *Pseudomonas aeruginosa* mit einer MEK von 2,9 μM eine moderate Aktivität, während die Aktivität gegen *Candida albicans* und *Escherichia coli* mit MEKs von 8,2 und 9,1 μM sehr gering war. Beide Ifapsoriasin-Fragmente weisen mit ihrer geringen Größe (IFPS-1: 2930 Da, IFPS-2: 8348 Da) und einem kationischen Ladungszustand (pI-Werte: IFPS-1: 11,70, IFPS-2: 11,77) typische Merkmale antimikrobieller Peptide auf (Izadpanah und Gallo, 2005; Bals, 2000; Zhang und Falla, 2006, Jenssen et al., 2006). Es ist interessant, dass das vollständige B1-Repeat (Aminosäuren 1264-1338) antimikrobielle Aktivität

zeigte, während das verkürzte B1-Repeat (Aminosäuren 1311-1338) gegen keinen der Keime wirksam war. Offensichtlich enthält nur der Abschnitt, der außerhalb des verkürzten B1-Repeats liegt, eine antimikrobiell wirksame Funktionseinheit. Es ist denkbar, dass in der Aminosäuresequenz des verkürzten B1-Repeats wichtige Aminosäuren fehlen, um eine Tertiärstruktur auszubilden, die in der Lage ist, dem verkürzten B1-Repeat antimikrobielle Aktivität zu verleihen. In ähnlicher Weise verlor auch ein vom Dermcidin abstammendes Peptid seine antimikrobielle Wirksamkeit, nachdem es N-terminal um drei Aminosäuren verkürzt worden war (Steffen et al., 2006). Das vollständige B1-Repeat enthält im Gegensatz zum verkürzten B1-Repeat fünf Aminosäuren mit starker Hydrophobizität (viermal Valin, einmal Isoleucin). Es ist denkbar, dass durch das Fehlen dieser stark hydrophoben Aminosäuren im verkürzten B1-Repeat eine Einlagerung dieses Proteins in bakterielle Membranen aufgrund fehlender hydrophober Wechselwirkungen unmöglich ist. Im Vergleich zum vollständigen B1-Repeat fehlt der verkürzten Variante auch insgesamt achtmal die stark basische Aminosäure Arginin, die häufig in antimikrobiellen Peptiden vorkommt (Chan et al., 2006; Nguyen et al., 2010). Insgesamt fällt auf, dass die Aminosäurezusammensetzung des verkürzten B1-Repeat eher der Verteilung in den A-Repeats des Ifapsoriasins entspricht: Das verkürzte B1-Repeat weist wie die A-Repeats einen hohen Gehalt an Glutamin auf (A-Repeats: 15%, verkürztes B1-Repeat: 14%), während die B-Repeats insgesamt nur etwa halb so viel Glutamin enthalten (8%); der Glycin-Gehalt des verkürzten B1-Repeats entspricht eher dem Glycin-Gehalt der A-Repeats (A-Repeats: 28%, verkürztes B1-Repeat: 25%). Ein zuvor auf antimikrobielle Aktivität getestetes Fragment, welches eines der A-Repeats (A9) repräsentierte, hatte wie das verkürzte B1-Repeat keine Wirksamkeit gezeigt. In der Ähnlichkeit der Aminosäurezusammensetzung des getesteten A-Repeats und des verkürzten B1-Repeats könnte die Begründung dafür liegen, dass das verkürzte B1-Repeat ebenfalls unwirksam ist. Einschränkend muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass auch weder das gesamte B13- noch das gesamte B14-Repeat Wirksamkeit gezeigt haben.

Sowohl das antimikrobiell unwirksame IFPS-1 als auch das aktive IFPS-2 weisen einen ähnlich hohen pI-Wert auf (IFPS-1: 11,70, IFPS-2: 11,77). Dies zeigt, dass der kationische Ladungszustand eines Proteinfragments nicht allein für seine antimikrobielle Wirksamkeit verantwortlich ist. Untersuchungen des antimikrobiellen Peptids Dermcidin haben bereits gezeigt, dass die Nettoladung eines Peptids nicht entscheidend für seine antimikrobiellen Eigenschaften sein muss. Sowohl

kationische als auch anionische Prozessierungsprodukte des Dermcidin wiesen eine ähnlich hohe antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien auf (Steffen et al., 2006).

4.3 Mögliche Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide

Für einige antimikrobielle Peptide wurden bereits mögliche Wirkmechanismen untersucht. So wird für kationische antimikrobielle Peptide, wie das Cathelicidin LL-37 und die β -Defensine hBD1-4, angenommen, dass sie durch ihre positive Ladung in der Lage sind, an negativ geladene Komponenten an der Oberfläche von Bakterien, Pilzen und Viren binden zu können. Sowohl LL-37 als auch hBD1-4 besitzen einen amphipatischen Aufbau (Izadpanah und Gallo, 2005). Dies ermöglicht, dass antimikrobielle Peptide in bakterielle Zellmembranen eindringen oder sie sogar penetrieren können (Lohner und Blondelle, 2005). Je nach spezifischen Bindungseigenschaften der antimikrobiellen Peptide an der Zellmembran kommt es vermutlich durch Porenbildung (Kagan et al., 1990, Brogden, 2005) oder durch Auflösung der Zellmembran zum Zusammenbrechen der Ionengradienten über der Zellmembran (Izadpanah und Gallo, 2005). Die Folge ist der Zelltod. Für das unter aeroben Bedingungen nur schwach wirksame β -Defensin hBD1 ist kürzlich gezeigt worden, dass durch Reduktion von Disulfidbrücken eine antimikrobielle Aktivität erreicht wurde, die mit der Aktivität des hBD3 vergleichbar ist (Schröder et al., 2011).

Das S100-Protein Psoriasin ist antimikrobiell gegen *Escherichia coli* auf der menschlichen Haut wirksam. Transmissions-Elektronen-Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Psoriasin die bakterielle Zellmembran nicht beschädigt (Gläser et al., 2005). Es wird angenommen, dass Psoriasin durch den Entzug von essentiellen Zn^{2+} -Ionen, die für die Aktivität detoxifizierender Enzyme wie beispielsweise die Cu/Zn-Superoxiddismutase essentiell sind, antimikrobiell wirksam ist. So unterscheidet sich der Wirkmechanismus des Psoriasins von dem angenommenen Wirkmechanismus vieler kationischer antimikrobieller Peptide (Gläser et al., 2005). Für einige andere kationische antimikrobielle Peptide wird angenommen, dass sie an negativ geladene RNA bzw. DNA binden und so den RNA- bzw. DNA-Metabolismus stören (Yeaman und Yount, 2003; Brogden, 2005). Zusätzlich zu ihren antimikrobiellen Eigenschaften sind die antimikrobiellen Peptide an einer Vielzahl von Immunfunktionen beteiligt. So wirken die humanen

β -Defensine 1-3 chemotaktisch auf CD4-positive T-Zellen, unreife dendritische Zellen (Schauber und Gallo, 2007) und auf Monozyten (Ganz und Lehrer, 1994). α -Defensine und das Cathelicidin LL-37 zeigen ebenfalls chemotaktische Effekte auf eine Vielzahl von Zellen des Immunsystems (Yang et al., 2001). Neben der chemotaktischen Wirkung können Defensine auch eine vermehrte Zytokinproduktion bewirken (Oppenheim et al., 2003). So sind die antimikrobiellen Peptide nicht nur für die direkte Abwehr von Mikroorganismen zuständig, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in Prozessen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr.

4.4 Antivirale Aktivität und RGD-Motiv

Beide rekombinant hergestellten Ifapsoriasin-Fragmente enthalten ein sogenanntes RGD-Motiv, welches die Aminosäurekombination Arginin-Glycin-Aspartat in der Proteinsequenz bezeichnet. Das RGD-Motiv ist als Integrin-bindende Sequenz identifiziert worden. Die Integrin-Familie wird von insgesamt 24 verschiedenen Zell-Adhäsionsrezeptoren gebildet. Zu den Liganden dieser Rezeptoren zählen Moleküle der Extrazellulärmatrix wie Fibronectin, Zelloberflächenmoleküle sowie verschiedene lösliche Liganden (Takada et al., 2007). Durch die Interaktion zwischen den Integrinen und ihren Liganden werden u.a. die Zellmotilität und die Zellzykluskontrolle reguliert (Legate et al., 2009)

Das Glykoprotein H aus der Hülle der Herpes-Simplex-Viren-Typ 1 enthält ebenfalls ein RGD-Motiv. Untersuchungen mit intaktem und mit einem im RGD-Motiv mutierten Glykoprotein H zeigten, dass nur das intakte Glykoprotein H in der Lage ist eine Bindung an Integrin herzustellen (Parry et al., 2005). Es kann somit vermutet werden, dass Glykoprotein H und damit auch das RGD-Motiv an der Bindung des Herpes-Simplex-Virus an die extrazelluläre Integrin-Domäne der Wirtszelle beteiligt sind. Das RGD-Motiv der Ifapsoriasin-Fragmente könnte auf ähnliche Weise mit Integrin-Molekülen der Epithelzellen interagieren. Durch Bindung des RGD-Motivs an extrazelluläre Integrin-Domänen der potenziellen Wirtszellen könnte die Virusadsorption behindert werden (siehe Abb. 4.1). So kann vermutet werden, dass Ifapsoriasin neben antimikrobiellen Eigenschaften auch antivirale Aktivität besitzt.

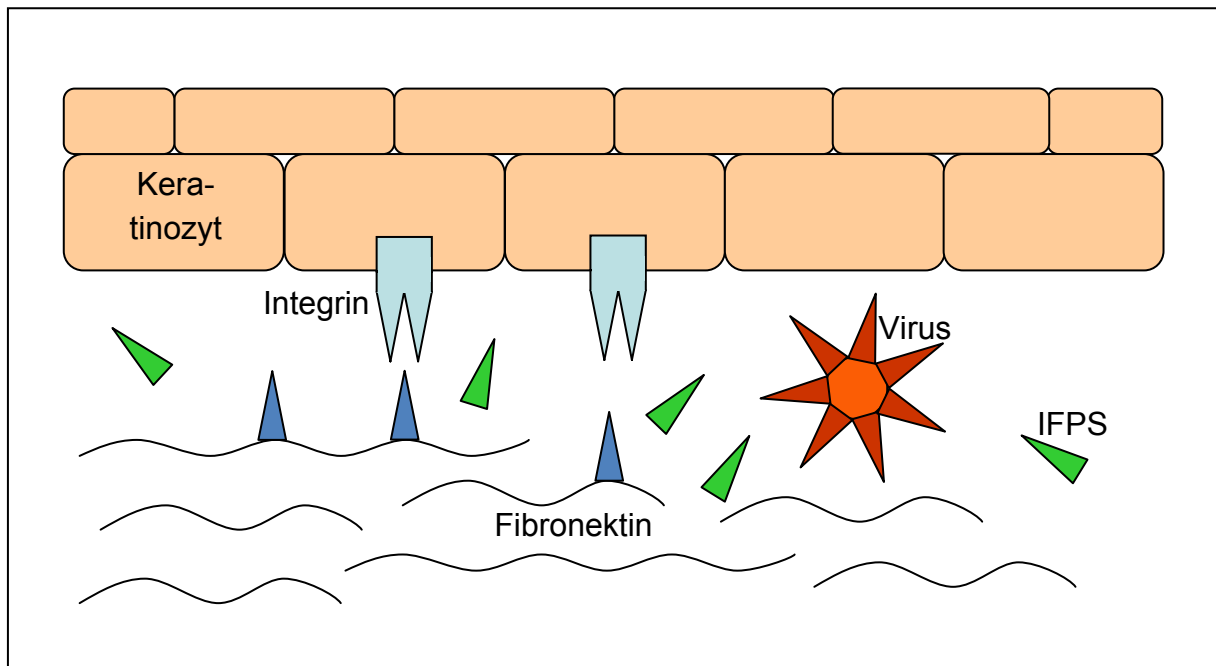


Abb. 4.1: Möglicher antiviraler Wirkmechanismus des Ifapsoriasins. Schematisch dargestellt sind verschiedene Liganden der extrazellulären Domänen der Integrine (hellblau): Moleküle der Extrazellulärmatrix, z. B. Fibronektin (blau); RGD-Motive viraler Glykoproteine (dunkelrot); Eventuell auch das RGD-Motiv des Ifapsoriasins (grün): durch Bindung von Ifapsoriasin-Fragmenten an die extrazellulären Domänen der Integrine käme es zu einer Hemmung der Virusadsorption an den extrazellulären Domänen. Eine Virusinfektion könnte somit verhindert werden.

Für mehrere bisher als antimikrobielle Peptide bekannte Moleküle konnte bereits antivirale Aktivität nachgewiesen werden. Einige synthetisch hergestellte θ -Defensine (Yasin et al., 2004) und die drei α -Defensine HNP-1-3 (humane Neutrophilen-Peptide 1-3) (Hazrati et al., 2006) sind in der Lage an Glykoproteine von Virushüllen zu binden und so die Anheftung an potenzielle Wirtszellen zu behindern. Für das α -Defensin HNP-1 (humanes Neutrophilen-Peptid 1) konnte in *In-Vitro*-Versuchen eine Inaktivierung von Herpes Simplex-Viren Typ 1 und 2, Zytomagalieviren und Influenza-A-Viren gezeigt werden (Daher et al., 1986). Ähnlich dem für die Ifapsoriasin-Fragmente angenommenen antiviralen Wirkmechanismus wirkt HNP-4 (humanes Neutrophilen-Peptid 4): Durch Bindung von HNP-4 an zelluläres Heparansulfat, welches als Rezeptor für das virale Glykoprotein B der Hülle des Herpes Simplex-Viren Typ 1 dient, wird die Virusadsorption des Herpes Simplex-Viren Typ 1 an die Wirtszelle behindert (Hazrati et al., 2006).

4.5 Weiterführende Untersuchungen zur Wirkweise

Das Fragment IFPS-2 (Aminosäuren 1264-1338, gesamtes B1-Repeat) wies gegen *Pseudomonas aeruginosa* moderate Aktivität und gegen *Candida albicans* sowie

Escherichia coli eine sehr geringe Aktivität auf. Um Informationen zur Wirkweise des IFPS-2 zu erhalten, müssten weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

Hinweise auf den Wirkort des IFPS-2 an oder in der Bakterienzelle könnten mithilfe der Immuno-Elektronenmikroskopie gewonnen werden. Unter Verwendung dieser Methode können mit Goldpartikeln markierte sekundäre Antikörper, die gegen den primären anti-IFPS-Antikörper gerichtet sind, der seinerseits gegen den entsprechenden Teil des Ifapsoriasins gerichtet ist, sichtbar gemacht werden. Eine mögliche Lokalisation des Ifapsoriasins an der Zellmembran oder an intrazellulären Strukturen wie Ribosomen oder bakterieller DNA könnte auf diese Weise dargestellt werden. So könnten Rückschlüsse auf den Wirkort und indirekt auf die Wirkweise des Ifapsoriasins gezogen werden.

Für viele antimikrobielle Peptide wird angenommen, dass sie sich durch ladungsabhängige Interaktionen an negativ geladene Bakterienmembranen anlagern, durch ihre amphipatischen Molekülstruktur in die bakterielle Zellmembran eindringen und durch Bildung einer Pore in der Membran schließlich den Zusammenbruch des bakteriellen Ionengradienten und damit den Zelltod verursachen (Izadpanah und Gallo, 2005). IFPS-2 weist mit seiner geringen Größe (8348 Da) und seinem kationischen Ladungszustand (pI: 11,77) typische Merkmale auf, die einen solchen Wirkmechanismus wahrscheinlich machen. IFPS-1 besitzt mit 2930 Da eine noch geringere Größe und eine ähnlich kationische Nettoladung (pI: 11,70). Eine Erklärung für die fehlende antimikrobielle Wirksamkeit könnte sein, dass die Moleküllänge des IFPS-1 von 28 Aminosäuren nicht ausreicht, um eine bakterielle Membran überhaupt durchdringen zu können.

In einem Membranpermeabilitätstest (z. B. "Sytox green assay") könnte der Einfluss von Ifapsoriasin-Fragmenten auf bakterielle Zellmembranen näher untersucht werden. Der dreifach positiv geladene DNA-Farbstoff "Sytox green" färbt nur die DNA von Zellen mit geschädigten Zellmembranen, während der Farbstoff intakte Membranen nicht durchdringen kann (Roth et al., 1997). Fluoreszenzphotometrisch kann über die Intensität des Signals indirekt auf den Anteil an Zellen mit defekten Membranen geschlossen werden. Anhand des Prozentsatzes der Bakterien mit geschädigten Membranen könnte gezeigt werden, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß IFPS-2 Einfluss auf bakterielle Membranen hat. Die Fragen, nach welcher Zeit und in welchen Konzentrationen IFPS-2 Zellmembranen permeabilisiert, könnten mit dieser Methode ebenfalls geklärt werden.

Mit Hilfe eines Pull down assays könnte man bei verfügbarem Antikörper gegen das entsprechende Ifapsoriasisin-Fragment versuchen bakterielle Interaktionspartner zu identifizieren. Das Prinzip des Pull down assays beruht auf der Bindung zwischen anti-IFPS-Antikörpern, die an größere Partikel gebunden sind, und entsprechenden Ifapsoriasisin-Fragmenten. Durch Zugabe eines bakteriellen Zelllysates kommt es zur Bindung zwischen dem oben beschriebenen Komplex mit möglichen bakteriellen Interaktionspartnern. Die Partikel, an welche die anti-IFPS-Antikörper gekoppelt sind, dienen dazu den entstandenen Komplex durch Zentrifugation von anderen zellulären Bestandteilen des Zelllysates zu trennen. Über eine Gelchromatographie und massenspektrometrische Analysen können die bakteriellen Interaktionspartner charakterisiert und identifiziert werden.

Eine weitere Methode zur Identifizierung bakterieller Bindungspartner des Ifapsoriasisins ist die Affinitätschromatographie. In diesem Verfahren werden spezielle Säulen verwendet, an deren Matrix Ifapsoriasisin-Fragmente gekoppelt werden. Diejenigen Bestandteile eines bakteriellen Zelllysates, welche beim Durchfließen der Säule an die Ifapsoriasisin-Fragmente binden, könnten im Anschluss an ihre Elution über eine Flüssigchromatographie und massenspektrometrische Analysen charakterisiert werden.

Zur Klärung der Frage, ob Punktmutationen die antimikrobielle Wirksamkeit des B1-Repeats verändern können, müssten weitere Fragmente des B1-Repeats rekombinant exprimiert und ebenfalls in antimikrobiellen Testverfahren getestet werden. Sollte sich hierbei herausstellen, dass z. B. die Aminosäureabfolge HYPK (Histidin-Tyrosin-Prolin-Lysin) im B1-Repeat aufgrund seiner Einzigartigkeit in den B-Repeats für die antimikrobielle Aktivität des B1-Repeats mitverantwortlich ist, könnte eine Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin bei einer erneuten Expression des B1-Repeats Aufschluss über die Bedeutung dieser Aminosäuren für die antimikrobielle Wirksamkeit des B1-Repeats geben.

Es sollte allerdings immer bedacht werden, dass alle aufgeführten experimentellen *In-Vitro*-Methoden in ihrer Übertragung auf die *In-Vivo*-Situation beschränkt sind. Die Experimente werden immer unter gleichen labortechnischen Bedingungen durchgeführt, die die Komplexität der Vorgänge in der menschlichen Haut kaum wiedergeben können. So werden z. B. der pH-Wert der Haut, die Salzkonzentration oder die Ko-Kolonisation der Haut mit anderen Bakterienarten nur eingeschränkt berücksichtigt.

4.6 Therapeutischer Nutzen von Antimikrobiellen Peptiden

Die Entwicklung von Antibiotika ist eine der Errungenschaften des 20. Jahrhunderts, die bis heute zu einem deutlichen Anstieg der Lebenserwartung führte (Todar, 2009). Doch die Anzahl von Erregern, die Resistenzen gegen die verwendeten Antibiotika aufweist, nimmt weltweit zu (Boucher et al., 2009; Todar, 2009; Eggleston et al., 2010; Spellberg et al., 2008). Die enormen Zuwachsraten von Keimen wie MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*), VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken) und Fluorchinolon-resistenten Pseudomonaden geben Anlass zur Sorge (Boucher et al., 2009). Besonders Antibiotikaresistenzen unter gramnegativen Erregern nehmen weltweit stark zu. So zeigte zum Beispiel der Anteil von gramnegativen Erregern, die in der Lage sind ESBLs (expanded-spectrum-beta-lactamases) zu bilden, in Südostasien einen Anstieg von 2003 bis 2007 von 15% auf 40% (Hawser et al., 2009). Beta-laktamasen ermöglichen Bakterien den Beta-laktam-Ring von Beta-laktamantibiotika zu spalten und den Wirkstoff auf diese Weise unwirksam zu machen. Die Besonderheit der ESBLs ist das Vorliegen von Punktmutationen, die die Resistenzen der Bakterien gegen sonst wirksame Beta-laktamantibiotika wie Monopeneme und Cephalosporine der dritten und vierten Generation erweitern. Diskutierte Gründe, die zur Resistenzentwicklung beitragen, sind der unkritische und übermäßige Gebrauch von Antibiotika sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin sowie die wachsende Zahl an immunsupprimierten Patienten (Boucher et al., 2009; Zaiou, 2007). Die kurze Generationszeit der Bakterien und ihre genetische Variabilität erlauben ihnen in kurzer Zeit gegen Antibiotika resistent zu werden (Bals, 2000). Trotz der Zunahme von resistenten und multiresistenten Erregern, die ein weltweites Gesundheitsproblem darstellt, zeigen Pharmakonzerne kein vermehrtes Interesse an der Entwicklung neuer Antibiotika (Boucher et al., 2009). Die Anzahl der von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde geprüften antibiotischen Substanzen hat von 1983 bis 2007 um 75% abgenommen (Boucher et al., 2009). Ein Grund für diese Entwicklung könnte sein, dass die Entwicklung neuer Antibiotika weniger gewinnbringend ist, als die Entwicklung anderer Wirkstoffklassen (Marr et al., 2006; Spellberg et al., 2008; Oyston et al., 2009). Es gibt jedoch Bestrebungen amerikanischer Forschungsgesellschaften und der Arzneimittelzulassungsbehörde für mehr finanzielle Anreize in der Antibiotika-Entwicklung zu sorgen (Boucher et al., 2009). Es befinden sich bereits einige Substanzen in fortgeschrittenen klinischen Studien auf

dem Weg zur Zulassung. So wurde kürzlich Doripenem, ein Carbapenem mit hoher Aktivität gegen Betalaktamase-produzierende Keime, für die Behandlung von komplizierten intraabdominellen Infektionen zugelassen (Boucher et al., 2009). Dennoch werden neben der Weiterentwicklung von Antibiotika auch neue Wirkstoffklassen für die Bekämpfung der zunehmenden Infektionen durch resistente und multiresistente Erreger erforderlich sein.

Auf der Suche nach neuen Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuer Antibiotika-Klassen sind daher die antimikrobiellen Peptide in den Fokus des Interesses gelangt. Antimikrobielle Peptide sind kleine kationische Moleküle, die in der Lage sind Bakterien, Pilze, Protozoen und sogar Viren abzutöten (Schröder und Harder, 2006; Wang et al., 2009). Sogar an wichtigen Immunfunktionen wie der Rekrutierung und Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen sind antimikrobielle Peptide beteiligt (Oppenheim und Yang, 2005). Sie kommen in allen Lebensformen vom Bakterium bis zum Menschen vor und stellen so einen der konserviertesten Mechanismen der Evolution dar, den eigenen Organismus gegen Pathogene zu schützen (Ganz und Lehrer, 1994). Antimikrobielle Peptide bieten einige Vorteile, die sie zu geeigneten Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuer Antibiotika machen. Sie weisen ein außerordentlich breites Wirkspektrum auf, das auch multiresistente Erreger umfasst und die Resistenzentwicklung gegen diese ist zudem äußerst gering (Marr et al., 2006; Zhang und Falla, 2006; Hamill et al., 2008; Oyston et al., 2009). Eine mögliche Begründung für die geringe Neigung zur Resistenzentwicklung könnte sein, dass antimikrobielle Peptide an verschiedenen konservierten Zielstrukturen angreifen. So sind die Möglichkeiten von Bakterien geringer sich durch Veränderung von Molekülstrukturen der Wirkung einer antimikrobiellen Substanz zu entziehen, da die Veränderung einer einzelnen Zielstruktur nicht zur völligen Unwirksamkeit des Wirkstoffes führt (Oyston et al., 2009; Marr et al., 2006). Allerdings gibt es Mikroorganismen die eine natürliche Resistenz gegen antimikrobielle Peptide aufweisen (Marr et al., 2006; Oyston et al., 2009). Einige antimikrobielle Peptide besonders für die topische Anwendung wurden bereits in klinischen Studien untersucht. Pexiganan, ein Analogon des aus afrikanischen Fröschen isolierten Magainin II (Gottler und Ramamoorthy, 2009) war das erste antimikrobielle Peptid, welches in einer klinischen Studie als antibiotische Creme gegen infizierte diabetische Fußulzera getestet wurde. Es wurde aber von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA nicht zugelassen, nachdem die postulierte Effektivität nicht nachgewiesen werden konnte (Oyston et al., 2009).

Locilex, ebenfalls ein Magainin-Abkömmling mit einer Wirksamkeit gegen grampositive und gramnegative Anaerobier sowie gegen Pilze *In-Vivo*, sollte gegen Infektionen von diabetischen Fußulzera helfen, wurde 1999 aber trotz Wirksamkeit in der Phase III-Studie von der FDA nicht zugelassen (Zhang und Falla, 2006). Isegranin ist ein synthetisches Analogon des im Schwein vorkommenden Cathelicidins Protegrin I (Wiesner und Vilcinskas, 2010). Es wurde in einer Phase III-Studie gegen ulzerierende orale Mukositis, die vermehrt nach der Bestrahlung von Kopf- und Halstumoren auftritt, getestet. Es konnte aber kein signifikanter Vorteil gegenüber dem Placebo festgestellt werden (Trotti et al., 2004). Indolicidin ist ein aus bovinen neutrophilen Granulozyten isoliertes Cathelicidin mit einem breiten Wirkspektrum (Wiesner und Vilcinskas, 2010). Omiganan, ein bakterizides und fungizides Indolicidin-Analogon, ist das bisher vielversprechendste unter den in klinischen Studien getesteten antimikrobiellen Peptiden. Es soll als topisch angewandtes antimikrobielles Agens gegen Katheter-assoziierte Infektion eingesetzt werden und befindet sich zur Zeit in einer Phase III-Studie (Fritsche et al., 2008). Trotz der Bestrebungen Peptide aus der Gruppe der antimikrobiellen Peptide als Therapeutikum einsetzen zu können, ist bis heute keine dieser Substanzen auf dem Arzneimittelmarkt verfügbar.

IFPS-2 hat im Radialdiffusionstest moderate antimikrobielle Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt. Die Aktivität gegen *Candida albicans* und *Escherichia coli* war sehr gering. Um dieses *In-Vitro* antimikrobiell wirksame Proteinfragment des Ifapsoriasins als Therapeutikum gegen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* einsetzen zu können, wären noch sehr viele weitere Untersuchungen notwendig. Es muss bedacht werden, dass es sich bei den Testorganismen um Bakterienstämme handelt, die schon seit langer Zeit nur unter Laborbedingungen gehalten werden. Daher müssten Testungen mit klinischen Isolaten der entsprechenden Keime erfolgen. Es müssten des Weiteren standardisierte Techniken zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden. Hierbei müssten physiologische Salzkonzentrationen und pH-Werte berücksichtigt werden. Für einige antimikrobielle Peptide ist ein Wirkungsverlust unter physiologischen Bedingungen beschrieben (Marr et al., 2006). Weiterhin müssten Untersuchungen zur Stabilität des IFPS-2 durchgeführt werden, da Peptide und Proteine dem ständigen Abbau von Proteasen unterliegen, die überall im Körper vorkommen. Es wurden für dieses Problem bereits erfolgreiche Lösungsstrategien entworfen: eine Modifikation des N- oder des C-Terminus durch Acetylierung und das Ersetzen von

Aminosäuren an voraussichtlichen Protease-Schnittstellen z. B. durch D-Aminosäuren haben die Stabilität von Medikamenten auf Peptidbasis deutlich verbessert (Oyston et al., 2009). Die Zyklisierung und Kopplung an Polyethylenglycol, die besonders die Bioverfügbarkeit verbessert, schützen Peptide ebenfalls vor dem Abbau durch Proteasen (Oyston et al., 2009). Des Weiteren müssten die toxischen Eigenschaften des IFPS-2 untersucht werden, denn besonders ihre kationische Ladung macht antimikrobielle Peptide anfällig für die Interaktion mit anionischen Komponenten der Wirtszellen (Zaiou, 2007). Da antimikrobielle Peptide vielfältige immunmodulatorische Funktionen besitzen, ist ihr Nebenwirkungsspektrum bei einer systemischen Anwendung nur schwer abzuschätzen. Auf pharmazeutischer Ebene müssten Lösungen für die Anwendbarkeit und für mögliche Applikationsformen gefunden werden (Bals, 2000). Dennoch sind antimikrobielle Peptide mit ihrem außerordentlich breiten Wirkspektrum und der bislang geringen Neigung zu Resistenzentwicklungen aussichtsreiche Substanzen für die Entwicklung neuer Antibiotikaklassen, die angesichts der erschreckend hohen Resistenzraten und der Zunahme immunsupprimierter Patienten dringend benötigt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Als Barriereorgan ist die Haut des Menschen zahlreichen Umwelteinflüssen ausgesetzt, zu denen neben physikalischen Einflüssen auch eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze gehört. Die erfolgreiche Abwehr dieser Umwelteinflüsse setzt ein außerordentlich effektives Abwehrsystem voraus. Wichtige Bestandteile der Immunabwehr der menschlichen Haut sind die konstitutiven und induzierbaren antimikrobiellen und antiviralen Moleküle, darunter die Ribonuklease 7, Psoriasin, Dermcidin und Lysozym. Für Fragmente der epidermalen "S100 Fused-Type"-Proteine Profilaggrin und Hornerin konnte ebenfalls antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden.

Ifapsoriasin wurde in unserer Arbeitsgruppe als neues Mitglied der "S100 Fused-Type"-Proteinfamilie auf genomischer Ebene in der Region des "Epidermalen Differenzierungskomplexes" im Abschnitt 1q21 des humanen Chromosoms 1 identifiziert. Für rekombinant hergestellte Ifapsoriasin-Fragmente wurde bereits antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden zwei weitere Peptide aus der Region der B-Repeats des Ifapsoriasins mittels rekombinanter Expression hergestellt und mithilfe des Radialdiffusionstest auf mögliche antimikrobielle Aktivität untersucht. Das innerhalb des B1-Repeats lokalisierte RGD-Motiv könnte Peptiden aus dieser Region eventuell antivirale Aktivität, z. B. gegen Herpes-Simplex-Viren-Typ 1 verleihen. Untersuchungen zur antiviralen Aktivität konnten in dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt werden. In der antimikrobiellen Testung konnte für das Ifapsoriasin-Fragment IFPS-1 keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Das Ifapsoriasin-Fragment IFPS-2 zeigte gegen *Escherichia coli* und *Candida albicans* eine sehr geringe Aktivität, während die Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* moderat war. Die Tatsache, dass nur eines der beiden getesteten Fragmente mit ähnlich hohen pI-Werten wirksam ist, zeigt, dass für die antimikrobielle Wirkweise eines Moleküls seine Nettoladung nicht allein entscheidend ist. Zusätzlich enthält das wirksame IFPS-2 im Gegensatz zum unwirksamen IFPS-1 fünf stark hydrophobe Aminosäuren, die dem Molekül vermutlich die Einlagerung in bakterielle Membranen ermöglichen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein weiteres Ifapsoriasin-Fragment antimikrobiell wirksam ist und somit möglicherweise einen Beitrag zur kutanen Abwehr von Mikroorganismen leisten könnte.

6 ANHANG

6.1 Vektorkarte des pSUMO3-Expressionsvektors

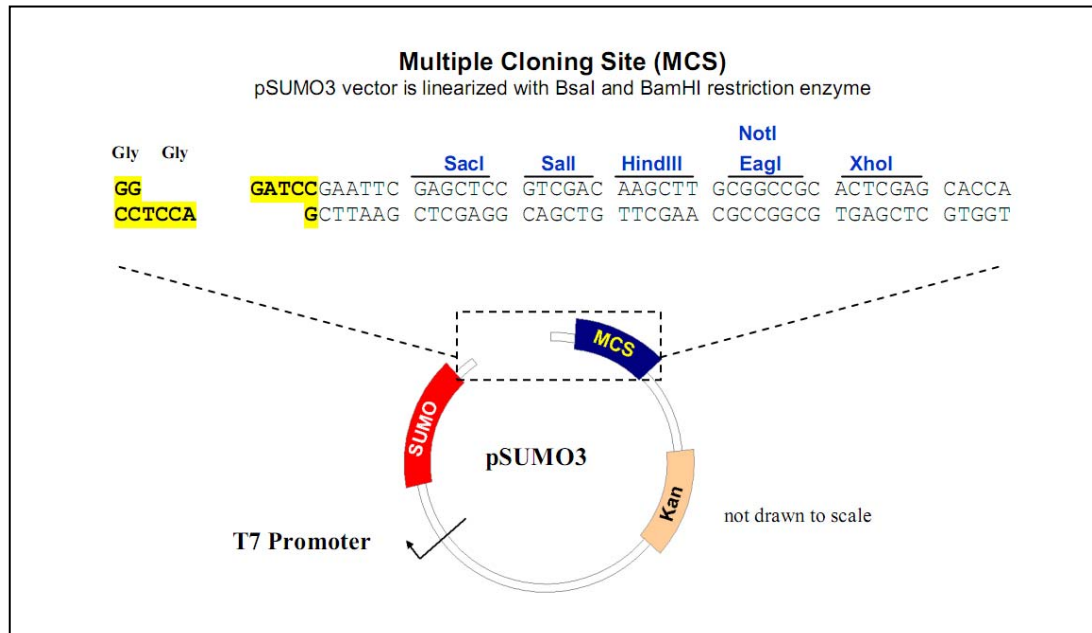


Abb. 6.1: Schematische Darstellung des pSUMO3-Expressionsvektors. Eingezeichnet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme und als Kästen verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Kan: Gen für Kanamycin-Resistenz; MCS: "Multiple Cloning Site"; SUMO: SUMO-Gensequenz. (Aus: Polylinker map (pSUMO3 vector, T7 Kan), LifeSensors.)

6.2 Proteinsequenzen und -daten

6.2.1 IFPS-1

Proteinsequenz des pSUMO3-IFPS-1-Fusionsproteins

GHHHHHHGGMSEEKPKKEGVKTENDHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPI
NETDTPAQLMEDEDTIDVVFQQQTGGQGTTHGQRGDTTRHGHSGHGQSTQTGSR

Anzahl der Aminosäuren: 129

Molekulargewicht : 14430.8

Theoretischer pI-Wert: 6.94

Extinktionskoeffizient [l /mol x cm]: 1490

Proteinsequenz des IFPS-1-Proteins (Aminosäuren 1311-1338)

QGTTHGQRGDTTRHGHSGHGQSTQTGSR

Anzahl der Aminosäuren: 28

Molekulargewicht : 2929.9

Theoretischer pI-Wert: 11.70

Extinktionskoeffizient [l /mol x cm]: -

Nukleotidsequenz (bp 3931-4014)

caaggaactactcatggacagagaggagataccactagacatggccattctggtcatggacagtctacacagacaggttccaga

Anzahl der Basenpaare: 110

Rot markierte Basen: 5'Primer

Blau markierte Basen: 3'Primer

6.2.2 IFPS-2

Proteinsequenz des pSUMO3-IFPS-2-Fusionsproteins

GHHHHHHGGMSEEKPKKEGVKTENDHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPI
NETDTPAQLMEDEDTIDVFQQQTGGVTRRRRSSQSENSDSEVHSKVSHRHSEHIHTQAGSHYPKSGSTVRRRQG
TTHGQRGDTTRHGHSGHGQSTQTGSR

Anzahl der Aminosäuren: 176

Molekulargewicht : 19848.6

Theoretischer pI-Wert: 9.56

Extinktionskoeffizient [l /mol x cm]: 2980

Proteinsequenz des IFPS-2-Proteins (Aminosäuren 1264-1338)

VTRRRRSSQSENSDSEVHSKVSHRHSEHIHTQAGSHYPKSGSTVRRRQGTTHGQRGDTTRHGHSGHGQSTQTGSR

Anzahl der Aminosäuren: 75

Molekulargewicht : 8347.8

Theoretischer pI-Wert: 11.77

Extinktionskoeffizient [l /mol x cm]: 1490

Nukleotidsequenz (bp 3790-4014)

gtaactagaagacgaagatctagccaaagtgagaacagtgacagtgaaagtgcactcaaaggtctcacacagacat
tcagaacacattcacacacaagctggatctcactacccaaagtcaggatccacagttcgcagaagacaaggaact
actcatggacagagaggagataccactagacatggccattctggtcatggacagtctacacagacaggttccaga

Anzahl der Basenpaare: 258

Rot markierte Basen: 5'Primer

Blau markierte Basen: 3'Primer

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alonso, L. und Fuchs, E., 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 Suppl 1, 11830.
- Bals, R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* 1, 141.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J., 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1.
- Brogden, K. A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238.
- Cabral, A., Sayin, A., de, W. S., Fischer, D. F., Pavel, S., Backendorf, C., 2001. SPRR4, a novel cornified envelope precursor: UV-dependent epidermal expression and selective incorporation into fragile envelopes. *J. Cell Sci.* 114, 3837.
- Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., Vogel, H. J., 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1184.
- Cogen, A. L., Nizet, V., Gallo, R. L., 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br. J. Dermatol.* 158, 442.
- Contzler, R., Favre, B., Huber, M., Hohl, D., 2005. Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. *J. Invest Dermatol.* 124, 990.
- Daher, K. A., Selsted, M. E., Lehrer, R. I., 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 60, 1068.
- Dale, B. A., Presland, R. B., Lewis, S. P., Underwood, R. A., Fleckman, P., 1997. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J. Invest Dermatol.* 108, 179.
- de Guzman, S. C., Conlan, S., Deming, C. B., Cheng, J., Sears, K. E., Segre, J. A., 2010. A milieu of regulatory elements in the epidermal differentiation complex syntenic block: implications for atopic dermatitis and psoriasis. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1453.
- Drake, D. R., Brogden, K. A., Dawson, D. V., Wertz, P. W., 2008. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J. Lipid Res.* 49, 4.
- Eggleston, K., Zhang, R., Zeckhauser, R. J., 2010. The global challenge of antimicrobial resistance: insights from economic analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 3141.
- Elias, P. M., 2005. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J. Invest Dermatol.* 125, 183.
- Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C. L., Knight, R., 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 17994.
- Fredricks, D. N., 2001. Microbial ecology of human skin in health and disease. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 6, 167.
- Fritsche, T. R., Rhomberg, P. R., Sader, H. S., Jones, R. N., 2008. Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride against contemporary fungal pathogens responsible for catheter-associated infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1187.

- Ganz, T. und Lehrer, R. I., 1994. Defensins. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 584.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M., 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* 6, 57.
- Gottler, L. M. und Ramamoorthy, A., 2009. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan—a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1680.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Murray, P. R., Green, E. D., Turner, M. L., Segre, J. A., 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324, 1190.
- Hamill, P., Brown, K., Jenssen, H., Hancock, R. E., 2008. Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 628.
- Hansmann, B., 2008. Proteinexpressionsanalysen und Funktionsuntersuchungen von Ifapsoriasin in der menschlichen Haut. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät.
- Harder, J., Gläser, R., Schröder, J. M., 2007. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J. Endotoxin. Res.* 13, 317.
- Hawser, S. P., Bouchillon, S. K., Hoban, D. J., Badal, R. E., Hsueh, P. R., Paterson, D. L., 2009. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3280.
- Hazrati, E., Galen, B., Lu, W., Wang, W., Ouyang, Y., Keller, M. J., Lehrer, R. I., Herold, B. C., 2006. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J. Immunol.* 177, 8658.
- Hoffjan, S. und Stemmler, S., 2007. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 157, 441.
- Houben, E., De, P. K., Rogiers, V., 2007. A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol. Physiol* 20, 122.
- Hsu, C. Y., Henry, J., Raymond, A. A., Mechin, M. C., Pendaries, V., Nassar, D., Hansmann, B., Balica, S., Burlet-Schiltz, O., Schmitt, A. M., Takahara, H., Paul, C., Serre, G., Simon, M., 2011. Deimination of human filaggrin-2 promotes its proteolysis by calpain 1. *J. Biol. Chem.* 286, 23222.
- Huber, M., Siegenthaler, G., Mirancea, N., Marenholz, I., Nizetic, D., Breitkreutz, D., Mischke, D., Hohl, D., 2005. Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *J. Invest Dermatol.* 124, 998.
- Izadpanah, A. und Gallo, R. L., 2005. Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52, 381.
- Jackson, B., Tilli, C. M., Hardman, M. J., Avilion, A. A., MacLeod, M. C., Ashcroft, G. S., Byrne, C., 2005. Late cornified envelope family in differentiating epithelia—response to calcium and ultraviolet irradiation. *J. Invest Dermatol.* 124, 1062.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R. E., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491.
- Kagan, B. L., Selsted, M. E., Ganz, T., Lehrer, R. I., 1990. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 210.
- Karsch, D., 2010. Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG₉₁₋₁₂₂ und FLG₈₇₋₁₉₇ in der kutanen Abwehr. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Medizinische Fakultät.

- Krieg, P., Schuppler, M., Koesters, R., Mincheva, A., Lichter, P., Marks, F., 1997. Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* 43, 339.
- Lee, S. C., Kim, I. G., Marekov, L. N., O'Keefe, E. J., Parry, D. A., Steinert, P. M., 1993. The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J. Biol. Chem.* 268, 12164.
- Legate, K. R., Wickstrom, S. A., Fassler, R., 2009. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23, 397.
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death. Differ.* 12 Suppl 2, 1497.
- Lohner, K. und Blondelle, S. E., 2005. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 8, 241.
- Lorand, L. und Graham, R. M., 2003. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140.
- Lüllmann-Rauch, R., 2003. In: *Histologie*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Madison, K. C., 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J. Invest Dermatol.* 121, 231.
- Makino, T., Takaishi, M., Morohashi, M., Huh, N. H., 2001. Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J. Biol. Chem.* 276, 47445.
- Makino, T., Takaishi, M., Toyoda, M., Morohashi, M., Huh, N. H., 2003. Expression of hornerin in stratified squamous epithelium in the mouse: a comparative analysis with profilaggrin. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 485.
- Marenholz, I., Heizmann, C. W., Fritz, G., 2004. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1111.
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., Hancock, R. E., 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 468.
- Miller, J. F., Dower, W. J., Tompkins, L. S., 1988. High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 856.
- Mischke, D., Korge, B. P., Marenholz, I., Volz, A., Ziegler, A., 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J. Invest Dermatol.* 106, 989.
- Nguyen, L. T., Chau, J. K., Perry, N. A., de, B. L., Zaat, S. A., Vogel, H. J., 2010. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS. One.* 5,
- Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W., Yang, D., 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* 62 Suppl 2, ii17.
- Oppenheim, J. J. und Yang, D., 2005. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 359.
- Oyston, P. C., Fox, M. A., Richards, S. J., Clark, G. C., 2009. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J. Med. Microbiol.* 58, 977.

- Parry, C., Bell, S., Minson, T., Browne, H., 2005. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein H binds to alphavbeta3 integrins. *J. Gen. Virol.* 86, 7.
- Pearton, D. J., Dale, B. A., Presland, R. B., 2002. Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J. Invest Dermatol.* 119, 661.
- Polakowska, R. R., Piacentini, M., Bartlett, R., Goldsmith, L. A., Haake, A. R., 1994. Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev. Dyn.* 199, 176.
- Presland, R. B. und Dale, B. A., 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* 11, 383.
- Presland, R. B., Haydock, P. V., Fleckman, P., Nirunsuksiri, W., Dale, B. A., 1992. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J. Biol. Chem.* 267, 23772.
- Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., Millard, P. J., 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2421.
- Schauber, J. und Gallo, R. L., 2007. Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 127, 510.
- Schröder, J. M. und Harder, J., 2006. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 469.
- Schröder, B. O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E. F., Wehkamp, J., 2011. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* 469, 419.
- Schulz, C., 2010. Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG₈₇₋₁₂₂ und FLG₁₂₃₋₂₀₀ in der kutanen Abwehr. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Medizinische Fakultät.
- Segre, J. A., 2006. Epidermal differentiation complex yields a secret: mutations in the cornification protein filaggrin underlie ichthyosis vulgaris. *J. Invest Dermatol.* 126, 1202.
- Spellberg, B., Gidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, W. M., Bartlett, J. G., Edwards, J., Jr., 2008. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 46, 155.
- Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H. G., Peschel, A., Gotz, F., Garbe, C., Schitteck, B., 2006. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2608.
- Steinberg, D. A. und Lehrer, R. I., 1997. Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. *Methods Mol. Biol.* 78, 169.
- Steinert, P. M., Kartasova, T., Marekov, L. N., 1998. Biochemical evidence that small proline-rich proteins and trichohyalin function in epithelia by modulation of the biomechanical properties of their cornified cell envelopes. *J. Biol. Chem.* 273, 11758.
- Steven, A. C., Bisher, M. E., Roop, D. R., Steinert, P. M., 1990. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin—two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J. Struct. Biol.* 104, 150.
- Sun, T.T. und Green, H., 1978. Keratin filaments of cultured human epidermal cells. Formation of intermolecular disulfide bonds during terminal differentiation. *J. Biol Chem.* 253, 2053.
- Takada, Y., Ye, X., Simon, S., 2007. The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.

- Todar, K., 2009. Online Textbook of Bacteriology. www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html
- Toulza, E., Mattiuzzo, N. R., Galliano, M. F., Jonca, N., Dossat, C., Jacob, D., de, D. A., Wincker, P., Serre, G., Guerrin, M., 2007. Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol.* 8, R107.
- Trotti, A., Garden, A., Warde, P., Symonds, P., Langer, C., Redman, R., Pajak, T. F., Fleming, T. R., Henke, M., Bourhis, J., Rosenthal, D. I., Junor, E., Cmelak, A., Sheehan, F., Pulliam, J., Vitt-Risse, P., Fuchs, H., Chambers, M., O'Sullivan, B., Ang, K. K., 2004. A multinational, randomized phase III trial of iseganan HCl oral solution for reducing the severity of oral mucositis in patients receiving radiotherapy for head-and-neck malignancy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 674.
- Volz, A., Korge, B. P., Compton, J. G., Ziegler, A., Steinert, P. M., Mischke, D., 1993. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics* 18, 92.
- Wang, G., Li, X., Wang, Z., 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 37, D933.
- Wiesner, J. und Vilcinskas, A., 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence.* 1, 440.
- Wu, Z., Hansmann, B., Meyer-Hoffert, U., Gläser, R., Schröder, J. M., 2009. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PLoS. One.* 4, e5227.
- Wu, Z., Latendorf, T., Meyer-Hoffert, U., Schröder, J. M., 2011. Identification of trichohyalin-like 1, an s100 fused-type protein selectively expressed in hair follicles. *J. Invest Dermatol.* 131, 1761.
- Wu, Z., 2005. Analysis of two human gene clusters involved in innate immunity. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät.
- Yang, D., Chertov, O., Oppenheim, J. J., 2001. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.* 69, 691.
- Yasin, B., Wang, W., Pang, M., Cheshenko, N., Hong, T., Waring, A. J., Herold, B. C., Wagar, E. A., Lehrer, R. I., 2004. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J. Virol.* 78, 5147.
- Yeaman, M. R. und Yount, N. Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27.
- Zaiou, M., 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J. Mol. Med.* 85, 317.
- Zhang, L. und Falla, T. J., 2006. Antimicrobial peptides: therapeutic potential. *Expert. Opin. Pharmacother.* 7, 653.

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Britta Hansmann und Ties Latendorf, die mich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt haben. Euer Optimismus, eure wertvollen Ratschläge sowie eure ermutigenden Worte haben mich bei der Anfertigung dieser Arbeit immer wieder vorangetrieben.

Mein Dank gilt insbesondere Jutta, Claudia, Ties und Britta für die Unterstützung bei der Durchführung von HPLC-Läufen.

Bei Frau Silvia Voss im Mikrobiologischen Institut bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der antimikrobiellen Testungen.

Für die angenehme Atmosphäre im Labor sowie für die vielen Tipps und Hilfestellungen möchte ich mich ganz herzlich bei Jan, Zhihong, Uli, Heilwig, Elvira, Dr. Bartels, Graziella, Kerstin und Manfred bedanken. Außerdem möchte ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik für die freundliche Unterstützung danken.

Weiterhin danke ich meiner Freundin Eva für die Durchsicht dieser Arbeit.

Till, dir möchte ich ganz herzlich für dein liebevolles Verständnis während des Zusammenschreibens sowie für die Unterstützung bei der Formatierung der Arbeit danken.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir immer Mut gemacht haben meinen eigenen Weg zu finden.

9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name: Anne-Kathrin Junge

Geburtsdatum: 25.02.1985

Geburtsort: Rostock

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung

1991-94	St.-Georg-Schule Rostock (Grundschule)
1994-95	Waldorfschule Rostock
1995-2000	Ernst-Barlach-Gymnasium Kiel
2000-01	Werner-Heisenberg-Gymnasium Heide
2001-04	Ernst-Barlach-Gymnasium Kiel, abgeschlossen mit Abitur

Hochschulstudium

2004-05	Studium an der Hochschule für Musik und Theater Hamburg
2005	Beginn Studium Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2007	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2008	Beginn der Doktorarbeit an der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J.-M. Schröder
2010	Beginn Praktisches Jahr
voraussichtlich 2011	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10 ERKLÄRUNG

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

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

Kiel, den 04.11.2011

Anne-Kathrin Junge

Publikation der vorliegenden Arbeit

Junge, A.K., Latendorf, T., Hansmann, B., Schröder, J.-M., 2011. Filaggrin-2 B-type repeats exhibit different antimicrobial activity. J Invest Dermatol 131 (Supplement 2s): S1-S138.