

# **Differentielle Induktion von antimikrobiellen Peptiden in der Haut durch kommensale und pathogene Staphylokokken**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Ines Wanke  
aus Karl-Marx-Stadt

Tübingen  
2012

Tag der mündlichen Qualifikation: 09.01.2013  
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Birgit Schitteck  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schwarz

Frau Prof. Dr. Birgit Schittek danke ich für die Motivation zur Anfertigung der Arbeit, für die Finanzierung des Projekts und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Des Weiteren danke ich ihr für die immer ehrliche, wenn auch manchmal etwas direkte, Kritik bei der Betreuung meiner Dissertation.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Michael Schwarz für die Betreuung dieser Arbeit danken.

Ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Schittek und Meier, für die schöne Zeit, die gute Atmosphäre und die vielen Unternehmungen. Tobias Sinnberg danke ich für viele Ratschläge und interessante Diskussionen. Besonders möchte ich Maren Paulmann, Birgit Sauer und Evelyn Maczey für ihre freundschaftliche Unterstützung danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, Johanna Mahr, Albrecht Buchmann, sowie Elke und Klaus Zabinsky für die Unterstützung in den letzten Jahren, ohne die ich das Wagnis Doktorarbeit nicht erneut in Angriff genommen hätte.

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Ines Wanke, Heiko Steffen, Christina Christ, Bernhard Krismer, Friedrich Götz, Andreas Peschel, Martin Schaller and Birgit Schitteck. *Skin Commensals Amplify the Innate Immune Response to Pathogens by Activation of Distinct Signaling Pathways*. *Journal of Investigative Dermatology* (2011) 131, 382–390; published online 4 November 2010

## Abkürzungen:

<b>ALP</b>	<i>Anti Leukoprotease</i>
<b>Amp</b>	<i>Ampicillin</i>
<b>AMPs</b>	<i>Antimicrobial peptides/protiens</i>
<b>aP</b>	<i>Alkalische Phosphatase</i>
<b>AP-1</b>	<i>Activator Protein-1</i>
<b>ASK</b>	<i>Apoptosis signal-regulating kinase</i>
<b>BCM</b>	<i>Bacterial Conditioned Medium</i>
<b>BIR</b>	<i>Baculovirus Inhibitor Repeat</i>
<b>CAP</b>	<i>Cathelicidin Antimicrobial Peptide</i>
<b>CARD</b>	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
<b>CCR</b>	<i>C-C Chemokine Receptor</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CRAMP</b>	<i>Cathelin-Related Antimicrobial Peptide</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>GAS</b>	<i>Group A Stretococci</i>
<b>HBD</b>	<i>Human beta Defensin</i>
<b>HBSS</b>	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney Cell</i>
<b>IGF</b>	<i>Insulin-like growth factor</i>
<b>Ikk</b>	<i>IkB Kinase Complex</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukin</i>
<b>IRAK</b>	<i>Il-1-receptor Associated Kinases</i>
<b>IRF</b>	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>Inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
<b>KGM</b>	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
<b>LB-Medium</b>	<i>Luria Bertani Medium // Lysogenic Broth Medium</i>
<b>LD</b>	<i>Lethal Dose</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharid</i>

<b>LRR</b>	<i>Leucin Rich Repeats</i>
<b>Mal</b>	<i>MyD88 Adaptor-like Protein</i>
<b>MAP</b>	<i>Mitogen activated protein</i>
<b>mBD</b>	<i>Mouse beta Defensin</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
<b>NLRC</b>	<i>NLR family CARD domain-containing Protein</i>
<b>NLRP</b>	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing Protein</i>
<b>NLRs</b>	<i>NOD-like Receptors</i>
<b>NODs</b>	<i>Nucleotidebinding Oligomerization Domains</i>
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PRRs</b>	<i>Pathogen Recognition Receptors</i>
<b>PSMs</b>	<i>Phenol Soluble Modulins</i>
<b>PYD</b>	<i>Pyrin Domain</i>
<b>RIG</b>	<i>Retinoic acid-Inducible Gene I</i>
<b>RLR</b>	<i>RIG-I-Like Receptors</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<b>RNase</b>	<i>Ribonuclease</i>
<b>SKALP</b>	<i>Skin derived Anti Leukoprotease</i>
<b>TANK</b>	<i>TRAF family member-associated NF<math>\kappa</math>B activator</i>
<b>TBK</b>	<i>TANK Binding Kinase</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>Th</b>	<i>T-Helferzellen</i>
<b>TICAM</b>	<i>TIR-domain-containing Adaptor Molecule</i>
<b>TIR</b>	<i>Toll-IL-1 Rezeptor</i>
<b>TIRAP</b>	<i>TIR-domain-containing Adaptor Protein</i>
<b>TLRs</b>	<i>Toll Like Receptors</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TRAF</b>	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
<b>TRAM</b>	<i>TRIF Related Adaptor Molecule</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR-domain-containing adapter-Inducing Interferon-<math>\beta</math></i>

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau der Haut .....	1
1.2 Epidermis .....	1
1.3 Die Haut als Barriere .....	2
1.4 Das Mikrobiom der Haut .....	4
1.5 Rezeptoren der angeborenen Immunität.....	6
1.5.1 Drosophila Toll.....	8
1.5.2 Toll-like Rezeptoren.....	8
1.5.3 Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren.....	10
1.5.4 NOD-like Rezeptoren (NLRs) .....	12
1.6 Antimikrobielle Peptide/Proteine.....	13
1.6.1 Antimikrobielle Peptide/Proteine der Haut .....	14
1.6.2 humanes beta Defensin 2.....	16
1.6.3 humanes beta Defensin 3.....	17
1.6.4 Ribonuklease7 .....	18
1.7 Regulation der Expression antimikrobieller Peptide in der Haut..	19
1.7.1 Regulation der HBD-2 Expression .....	19
1.7.2 Induktionsmechanismen von HBD-3 und RNase7.....	21
1.8 Fragestellung.....	22
<b>2 Materialien und Hilfsmittel .....</b>	<b>23</b>
2.1 Biochemikalien und Chemikalien.....	23
2.1.1 Antikörper .....	23
2.1.2 Zellstimulantien: Zytokine, Inhibitoren.....	24
2.2 Plasmide.....	25
2.3 Zellen .....	25
2.4 Bakterien .....	26
2.5 Primer.....	29
2.6 Lösungen und Medien.....	30

2.6.1	Lösungen und Medien für die Zellkultur.....	30
2.6.2	Sonstige Lösungen .....	32
2.7	Geräte und Software .....	33
2.7.1	Software.....	33
2.7.2	Geräte.....	35
2.8	Kits und Verbrauchsmaterialien.....	34
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>36</b>
3.1	Zellkultur.....	36
3.1.1	Auftauen tiefgefrorener Zellen .....	37
3.1.2	Passagierung.....	37
3.1.3	Einfrieren von adhärennten Zellen.....	38
3.1.4	Zellzahlbestimmung.....	39
3.1.5	Isolierung primärer humaner Keratinozyten (Meier <i>et al.</i> , 2000).....	39
3.1.6	Behandlung der Zellen .....	40
3.2	Real-time RT-PCR .....	42
3.3	Analyse von Ausbeute und Reinheit isolierter RNA oder DNA....	44
3.3.1	Photometrische Bestimmung.....	44
3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	45
3.4	Plasmidpräparation .....	46
3.4.1	Plasmidvermehrung in transformationskompetenten.....	46
	<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	46
3.4.2	Plasmidisolierung.....	47
3.5	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	49
3.5.1	Transfektion mit PrimeFect™ II .....	50
3.6	Dual-Luciferase®-Reporter Assay.....	51
3.7	Proteinbestimmung nach Bradford .....	52
3.8	Western Blot.....	53
3.8.1	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten .....	53
3.8.2	Diskontinuierliche SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54



3.8.3	Transfer auf PVDF-Membranen.....	55
3.8.4	Immundetektion.....	55
3.8.5	Quantifizierung der Chemolumineszenzsignale .....	57
3.9	ELISA.....	58
3.10	antimikrobieller Test.....	59
3.11	Propidiumjodid-Färbung.....	60
3.12	Tierversuch: epikutane Besiedlung der Haut mit <i>S. aureus</i> .....	61
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
4.1	Differenzierung von primären humanen Keratinozyten .....	63
4.2	Bestimmung der Toxizität verschiedener Bakterienpräparationen.....	64
4.3	Induktion antimikrobieller Peptide.....	65
4.3.1	Zeitverlauf der Induktion antimikrobieller Peptide .....	65
4.3.2	Abhängigkeit der Induktion antimikrobieller Peptide von verschiedenen bakteriellen Komponenten .....	66
4.3.3	Abhängigkeit der Induktion antimikrobieller Peptide vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten.....	68
4.4	<i>S. aureus</i> , aber nicht <i>S. epidermidis</i> , induziert in Keratinozyten eine antimikrobielle Antwort, die gegen sich selbst gerichtet ist..	70
4.5	Einfluss verschiedener Bakterienstämme auf die Induktion antimikrobieller Peptide .....	71
4.6	<i>S. epidermidis</i> amplifiziert die AMP Antwort gegen <i>S. aureus</i> ....	73
4.7	Einfluss von Staphylokokken auf den NFκB Signalweg .....	74
4.8	Expression von Toll-like Rezeptoren .....	76
4.9	Einfluss des TLR2/NFκB- und EGFR Signalwegs.....	77
4.9.1	Stimulation von TLR2 mit synthetischen Lipopeptiden .....	77
4.9.2	Blockierung des TLR2/NFκB- und des EGFR-Signalwegs.....	78
4.10	Vergleich des <i>S. aureus</i> wildtyp Stamms SA113 mit der Protein A defizienten Variante SA113 dSPa.....	83
4.11	Etablierung eines murinen epikutanen Hautinfektionsmodells .....	86

<b>5 Diskussion .....</b>	<b>89</b>
5.1 Induktion von HBD-2 .....	90
5.2 Induktion von HBD-3 und RNase7 .....	91
5.3 Einfluss von Staphylokokken auf den NF $\kappa$ B Signalweg .....	93
5.4 Einfluss von Staphylokokken auf die TLR Expression.....	94
5.5 Sensibilität von <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i> gegenüber der antimikrobiellen Antwort der Haut.....	94
5.6. Induktion der HBD-3 und RNase7 Expression durch <i>S. aureus</i> Stämme von Atopikern.....	95
5.7 Untersuchung der Kolonisierung der Maushaut mit Staphylokokken .....	96
5.8 Ausblick.....	97
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>101</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Haut

Die Haut stellt mit 1,5 bis 2 Quadratmetern Fläche eines der größten Organe des Menschen dar und erfüllt als Grenzorgan zur Umwelt Sinnes-, Kontakt- und Schutzfunktionen. Wesentliche Bestandteile sind die Epidermis (Oberhaut), die bindegewebige Dermis (Korium, Lederhaut) und die Subkutis (Unterhaut). Die Epidermis liegt einer Basallamina auf und besteht aus einem mehrschichtigen, von innen nach außen verhornenden Plattenepithel, das sich zu 90% aus Keratinozyten und zu 10% aus Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen zusammensetzt. Die Dermis besteht aus elastischem Gewebe und enthält Nerven und Gefäße. Zwischen Kollagenfaserbündeln, elastischen und retikulären Fasern liegen Fibroblasten, Mastzellen und weitere Gewebszellen. Die im Wesentlichen aus Fettgewebe bestehende Subkutis, dient der Wärmeisolierung und als Energiereservoir und bildet ein mechanisches Schutzpolster (Sterry *et al.*, 2011)

## 1.2 Epidermis

Die Epidermis wird in verschiedene Schichten untergliedert. Dabei sitzt die sogenannte Basalzellschicht (Stratum basale) einer Basalmembran auf. Nur die basalen Keratinozyten sind in der Lage sich mitotisch zu teilen. Hier findet die Regeneration der Haut statt. Ausgehend von der Basalzellschicht wandern die Keratinozyten vertikal durch die verschiedenen Schichten der Epidermis, wobei sie einen Differenzierungsprozeß durchlaufen, der schließlich mit dem Absterben und der Verhornung der Zellen in der Hornschicht (Stratum corneum) seinen Abschluss findet. Der Differenzierungsprozess ist an einen Calcium-Ionen Gradienten gekoppelt, wobei die höchsten Calciumkonzentrationen in der Körnerschicht (Stratum granulosum) erreicht werden (Menon, 1994). Während der Differenzierung und Verhornung verändern die Keratinozyten ihre Form und weisen einen veränderten Gehalt an Proteinen und Lipiden auf. So werden zu Beginn des Differenzierungsprozesses die für die basalen Keratinozyten typischen Keratine K5, K14 und K15 vermindert exprimiert, während die Expression

der Keratine Typ II K1 und Typ I K10 zunimmt (Fuchs und Green, 1980; Waseem *et al.*, 1999). Im weiteren Differenzierungsprozess werden die Zellen flacher und weisen eine vermehrte Granulation auf (Stratum granulosum). Der Hauptbestandteil dieser Granula bildet Keratohyalin, welches zu einem großen Teil aus Profilaggrin besteht (Matoltsy 1975, Scott und Harding, 1981). Mit weiteren Proteinen wie Loricrin, Envoplakin und Periplakin bilden sich stabile Heterotetramere, an die Involucrin mittels der membrangebundenen Transglutaminase 1 kovalent gebunden wird (Kalinin *et al.*, 2004). Diese Proteine bilden ein zytosolisches Netzwerk, welches mit einer Lipidhülle aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren versehen wird. Auch antimikrobielle Peptide wie beta-Defensin-2 oder katabolische Enzyme sind dort zu finden. Sie werden in sogenannten Lamellarkörperchen, die vom Golgi-Apparat herrühren, gespeichert und schließlich, als Antwort auf verschiedene Signale, wie zum Beispiel einem Anstieg der Calcium-Ionen-Konzentration, in den interzellulären Raum via Exozytose abgegeben (Oren *et al.*, 2003; Downing *et al.*, 1987). Schließlich sterben die verhornten Keratinozyten, die nun als Korneozyten bezeichnet werden, ab und bilden das Stratum corneum. Diese Form eines programmierten Zelltods, auch als terminale Differenzierung bezeichnet, unterscheidet sich in mehreren Aspekten von der typischen Apoptose. Die Zerstörung des Zellkerns verläuft anders als während der Apoptose und viele für die Apoptose typische Caspasen werden nicht aktiviert (Lippens *et al.*, 2005; Tschachler 2005). Hingegen wurde die Aktivierung der Caspase 14, die nahezu ausschließlich in der Epidermis exprimiert wird, beobachtet (Eckhart *et al.*, 2000, Lippens *et al.*, 2000).

### **1.3 Die Haut als Barriere**

Die Haut bildet eine effektive Barriere zwischen dem Organismus und der Umwelt. Sie verhindert dabei das Eindringen von Pathogenen, genauso wie sie chemische und physikalische Einflüsse abwehrt. Außerdem reguliert sie den Verlust von Wasser und darin gelöster Substanzen. Bezüglich der Abwehr von Mikroorganismen erfüllt die Haut mechanisch-physikalische, chemische sowie immunologische Barriereaufgaben.

Die mechanisch-physikalischen Barrierefunktionen werden dem Stratum corneum und den Keratinozyten, die mit ihren Zell-Zell-Verbindungen und assoziierten Proteinen des Zytoskeletts eine schwer zu durchdringende Schicht bilden, zugeordnet. Dafür sind vor allem die Verbindungsproteine der *Tight junctions* wie Occludin, Claudine-1, 4 und 7, JAM-1, Zonula Occludens Protein 1 und MUPP-1 verantwortlich (Brandner *et al.*, 2006; Brandner *et al.*, 2008). Auch *Adherens junctions* (Layvraz *et al.*, 2005), Desmosomen (Elias *et al.*, 2001) und *Gap junctions* (Maass *et al.*, 2004) spielen hierbei eine Rolle.

Die chemische Barriere setzt sich aus unpolaren Lipiden, Ceramiden, freien Fettsäuren, Cholesterol sowie hydrolytischen Enzymen zusammen. Einen wesentlichen Beitrag zur chemischen Barrierefunktion leistet der leicht saure pH-Wert der Haut, welcher im Bereich von pH 5,5 bis pH 6,5 liegt und auch als Säureschutzmantel der Haut bezeichnet wird (Schade and Marchionini, 1928; Lambers *et al.*, 2006). Verantwortlich für den niedrigeren pH-Wert der Haut sind sowohl endogene als auch exogene Mechanismen. Endogen werden in den Lamellarkörperchen freie Fettsäuren, durch Phospholipase A2 vermittelte Hydrolyse von Phospholipiden, gebildet. Der in den Keratinozyten der äußeren Epidermisschichten exprimierte Natrium/Protonen Ionenaustauscher NHE-1 trägt ebenfalls wesentlich zur Acidifizierung der Hautoberfläche bei (Fluhr *et al.*, 2004). Als exogen werden die Bildung freier Fettsäuren aus Triglyzeriden der Talgdrüsen durch bakterielle Lipasen, die Bildung von Sphingosinen aus Ceramiden durch die Ceramidase, als auch der Einfluß von Produkten der ekkrinen Schweißdrüsen wie Milchsäure, bezeichnet (Bibel *et al.*, 1989, Bibel *et al.*, 1992, Thueson *et al.*, 1998). Antimikrobielle Peptide (siehe 1.6.) wie LL37 oder die beta-Defensine (Gallo *et al.*, 2002) sind in der Lage, Bakterien zu zerstören oder deren Wachstum zumindest einzudämmen. Man kann sie entsprechend ihrer Natur der chemischen Barrierefunktion zuordnen. Da sie andererseits einen wesentlichen Bestandteil des angeborenen Immunsystems darstellen und neben ihrer antimikrobiellen Wirkung auch aktivierend bzw. chemotaktisch auf Immunzellen wirken, haben sie eine Brückenfunktion zwischen der chemischen und immunologischen Barrierefunktion der Haut.

Die immunologische Barriere wird durch Mechanismen der angeborenen, unspezifischen sowie der adaptiven, spezifischen Abwehr gewährleistet. Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen können, durch Phagozytose von Bakterien oder Zerstörung von virusinfizierten Zellen, Infektionen direkt abwehren. Freisetzung von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden aus Keratinozyten und Makrophagen, als Antwort auf eine Infektion, führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Zellen der adaptiven Immunabwehr. Diese können die Infektion durch Bildung von Antikörpern (B-Lymphozyten) oder aufgrund direkter cytotoxischer Effekte (T-Lymphozyten) bekämpfen (Janeway, Jr. & Medzhitov, 2002).

#### 1.4 Das Mikrobiom der Haut

Die Haut stellt ein Ökosystem mit hoher Diversität dar. Die verschiedenen Hautareale, sowie spezialisierte Nischen wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen weisen dabei unterschiedliche Lebensbedingungen auf. Eine besondere Herausforderung für Mikroorganismen stellen dabei der niedrige pH-Wert von pH 5,5 bis pH 6,5 und die teilweise anaeroben Lebensbedingungen dar. Die Haut ist mit einer Sammlung verschiedenartigster Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Pilzen und sogar Milben kolonisiert. Die Gesamtheit der Mikroorganismen, die ein Individuum besiedeln wird als Mikrobiom bezeichnet. Die meisten dieser Mikroorganismen sind für den Menschen ungefährlich und werden als Kommensale bezeichnet. Profitieren beide Partner, also sowohl kommensaler Keim wie auch Wirtsorganismus voneinander, so bezeichnet man deren Lebensgemeinschaft als Symbiose. Die Besiedlung der Haut mit symbiontischen Mikroorganismen kann einen Schutz gegen die Invasion gefährlicher pathogener Keime darstellen. Im einfachsten Fall handelt es sich dabei um eine Konkurrenz um Platz und Nährstoffe. Direkte toxische Wirkungen durch Bakteriozine und in Phenol löslicher Moduline (*phenol soluble modulins*: PSMs) (Cotter *et al.*, 2005; Cogen *et al.*, 2010a; Cogen *et al.*, 2010b), entzündungshemmende und kolonisierungshemmende Effekte (Lai *et al.*, 2009, Iwase *et al.*, 2010) und eine Verstärkung der natürlichen Immunantwort (Lai *et al.*, 2010) werden ebenfalls diskutiert.

Frühere, mikrobiologische Studien, bei denen nur Bakterien erfasst wurden, die in Flüssigmedium oder auf Agarplatten kultivierbar sind, zeigten eine Besiedlung der Haut mit *Staphylococcus epidermidis* und anderen Koagulase-negativen Staphylokokken als hauptsächliche kommensale Bakterien. Des Weiteren wurden Aktinobakterien, wie Corynebakterien, Propionibakterien und Brevibakterien, sowie Mikrokokken nachgewiesen. Gram-negative Bakterien wurden von der Haut mit Ausnahme von wenigen Acinetobacter Spezies nicht isoliert (Roth *et al.*, 1988). Pilze, insbesondere der Spezies Malassezia sowie Milben (*Demodex folliculorum* und *Demodex brevis*) wurden ebenfalls der normalen Hautflora zugeordnet (Roth und James, 1988,1989; Noble, 1984)

Molekularbiologische Analysen der Hautflora werden heute mittels Sequenzierung der bakteriellen ribosomalen 16S RNA (Metagenomik) durchgeführt. Hierbei wird die Spezifität der Sequenz der ribosomalen 16S RNA für das jeweilige Bakterium ausgenutzt. Man erhält mit dieser Methode ein differenzierteres Bild der Besiedlung der Haut, da hier auch schlecht kultivierbare Mikroorganismen erfasst werden können. Es werden neben den lebenden, auch bereits abgestorbene Mikroorganismen identifiziert, so dass man Aussagen über das Mikrobiom des entsprechenden Hautareals über einen etwas längeren Zeitraum treffen kann ohne den aktuellen Zustand exakt abbilden zu können.

Man findet spezifische Besiedlungsmuster für feuchte, trockene und fettige Haut. Fettige Areale zeigen die geringste Diversität. Hier überwiegen Propionibakterien, Staphylokokken und Corynebakterien. Feuchte Hautareale weisen hauptsächlich Besiedlung mit Corynebakterien und Staphylokokken auf. Die höchste Diversität der Mikroorganismen findet man auf trockener Haut. Dort konnten Vertreter der Actinobakterien, Proteobakterien, Firmicuten und Bacteroideten nachgewiesen werden. Auch Gram-negative Organismen wurden identifiziert (Grice *et al.*, 2009).

Für die individuellen Unterschiede im Mikrobiom der Haut werden endogene und exogene Faktoren diskutiert. Zu den endogenen Faktoren gehören Alter (Leyden *et al.*, 1975; Somerville, 1969) und Geschlecht (Marples, 1982; Fierer *et al.*, 2008). Krankheiten, wie Diabetes und vorherige Exposition mit Mikroorganismen spielen ebenfalls eine Rolle. Exo-

gene Faktoren wie unterschiedliches Klima und geographische Lage (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, UV-Strahlung) tragen zu den Unterschieden im Mikrobiom bei (McBride *et al.*, 1977, Faergemann and Larko, 1987).

Einige Hautkrankheiten sind mit den Mikroorganismen der Haut assoziiert. So ist *Propionibacter acnes* als fakultativ pathogener Erreger in die Pathogenese der Akne vulgaris, einer entzündlichen Veränderung der Talgdrüsen involviert (Dessinioti und Katsambas, 2010). *S. epidermidis* ein sehr häufiger Kommensale der Haut ist gleichzeitig auch der häufigste Keim, der im Krankenhaus zu schweren Infektionen von Kathetern oder Herzklappen führen kann (Uckay *et al.*, 2009).

Bei atopischer Dermatitis (AD) findet man bei über 90 Prozent der Patienten eine Besiedlung, sowohl läsionaler als auch nichtläsionaler Haut, mit *Staphylococcus aureus*, während dieser potentiell pathogene Keim nur bei weniger als 5 Prozent der Menschen mit gesunder Haut vorkommt (Hanifin und Rogge, 1977; Leyden *et al.*, 1974). Kong *et al.* (Kong *et al.*, 2012) zeigten, dass zudem behandlungsabhängige Veränderungen im Mikrobiom von Atopikern auftraten. Während akuter Phasen der atopischen Dermatitis wurden sehr häufig Staphylokokken wie *S. aureus* aber auch *S. epidermidis* gefunden, während nach erfolgreicher Behandlung vermehrt Streptokokken, Propionibakterien und Corynebakterien detektiert wurden. Auch in psoriatischer Haut wurden signifikante Unterschiede festgestellt. So fand man weniger Staphylokokken und Propionibakterien verglichen mit der Haut von gesunden Probanden (Fahlen *et al.*, 2012).

## 1.5 Rezeptoren der angeborenen Immunität

Die angeborene Immunität beruht auf der Erkennung von Pathogenen durch keimbahnkodierte Rezeptoren, die bestimmte Strukturmerkmale von Fremdorganismen erkennen. Diese molekularen Strukturen sind in der Regel für das Überleben der Pathogene essentiell, so dass sie sehr konserviert sind und konstitutiv exprimiert werden. Man nennt diese Molekülerkennungsrezeptoren *pathogen recognition receptors* (PRRs) und die detektierten Strukturen *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) (Medzhitov & Janeway, Jr., 1997; Brandl, 2005).



Die PRRs können funktionell in drei Klassen unterteilt werden: Sezernierte, endozytierende und signaltransferierende (Janeway, Jr. & Medzhitov, 2002; Brandl, 2005). Die sezernierten PRRs binden an mikrobielle Zellwände und markieren sie durch sogenannte Opsonierung zur weiteren Erkennung durch das Komplementsystem und durch Phagozyten. Die zweite Gruppe von PRRs, die endozytierenden PRRs, kommen auf der Oberfläche von Phagozyten vor. Nach der Bindung bestimmter mikrobieller Ligandenmoleküle an den Rezeptor erfolgt eine Endozytose mit anschließender Zerstörung der Pathogene in Lysosomen. Pathogeneigene Proteine werden dann proteolytisch prozessiert und auf MHC-Molekülen der Makrophagenoberfläche präsentiert. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung verschiedener Effektoren und Zytokine (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000; Brandl, 2005). Der Mannose-Rezeptor auf Makrophagen, ein Mitglied der C-Typ Lektin Familie (Aderem & Underhill, 1999; Fraser *et al.*, 1998), und sogenannte Scavenger Rezeptoren (z.B. CD36 und CD91) (Febbraio *et al.*, 2001; Herz & Strickland, 2001) sind Mitglieder dieser Gruppe. Eine weitere Gruppe der PRRs ist dadurch gekennzeichnet, dass sie die Information der Pathogenerkennung mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden in die Zelle weiterleiten und daraufhin die Expression verschiedener Gene der Immunantwort induzieren können (Brandl, 2005). Neben den *toll like receptors* (TLRs) (siehe 1.6.1-1.6.3) spielen die Familien der *nucleotidebinding-oligomerization-domain* (NODs) (siehe 1.6.4) und RIG-1-like Rezeptoren eine zunehmend wichtige Rolle in der angeborenen Immunität. *RIG-I-like* Rezeptoren (RLRs) haben eine wichtige Funktion bei der Detektion von Infektionen mit RNA-Viren und können antivirale Abwehrmechanismen initiieren. Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Produktion von Typ I Interferon sowie vermehrter Expression antiviraler Gene. Die Rezeptoren werden in den meisten Geweben basal in niedrigen Konzentrationen exprimiert. Diese Expression kann aber durch Interferon und bei Infektion mit Viren massiv gesteigert werden (Yoneyama *et al.*, 2004, 2005; Loo und Gale, 2011).

### 1.5.1 *Drosophila* Toll

Das Toll-Protein wurde ursprünglich 1984 von der Biochemikerin Christiane Nüsslein-Volhard in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert (Anderson und Nüsslein-Volhard, 1984). Es spielt eine wichtige Rolle bei der dorsoventralen Entwicklung des Embryos. Später wurde erkannt, dass diese Toll-Proteine auch bei der Abwehr von Pilzinfektionen in *Drosophila melanogaster* von Bedeutung sind (Lemaitre *et al.*, 1996; Hoffmann, 2003). Nach Aktivierung von Toll kommt es zur Rekrutierung der Adaptorproteine Tube, Pelle und Cactus und letztendlich zur Stimulierung des NF- $\kappa$ B ähnlichen Transkriptionsfaktors Dorsal und zur Induktion antimikrobieller Proteine wie Drosomycin, Diptericin und Defensin (Rutschmann *et al.*, 2002)

### 1.5.2 Toll-like Rezeptoren

Die bekannteste Gruppe von PRRs, welche Effektoren der angeborenen Immunität mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden aktiviert, ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs). Sie erkennen eine große Bandbreite von PAMPs (Akira *et al.*, 2006, Beutler 2009; Hoffman, 2003; Medzithov, 2007). TLRs sind Typ I Transmembran Rezeptoren, die aus einer Leucinreichen Ektodomäne (*leucin rich repeats* LRR), die für die Erkennung der PAMPs zuständig ist, einer Transmembranregion und zytosolischen Domänen bestehen. Die zytosolischen TLR-Domänen weisen Homologie zur zytosolischen Interleukin-1-Rezeptordomäne auf, werden als Toll-IL-1 Rezeptor (TIR) Domänen bezeichnet und lösen nach Aktivierung des TLR die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege aus (Medzhitov 2001; Takeida *et al.*, 2003). Bisher sind 10 humane (TLR1-10) und 12 funktionale TLRs der Maus (TLR1-9 und TLR11-13) (Kaisho and Akira, 2006) bekannt. Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie werden sowohl von verschiedenen Immunzellen, wie z.B. Makrophagen, Dendritischen Zellen, B-Zellen, speziellen T-Zellpopulationen als auch von vaskulären Endothelzellen, Adipozyten, kardialen Myozyten, Fibroblasten, Keratinozyten sowie intestinalen und bronchialen Epithelzellen exprimiert (Muzio *et al.*, 2000; Akira *et al.*, 2001; Akira *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2007.). In humanen primären Keratinozyten wurden die TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR9 und

TLR10, in der immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT auch der TLR4 nachgewiesen (Baker *et al.*, 2003; Begon *et al.*, 2007; Köllisch *et al.*, 2005). TLRs werden entweder an der Zelloberfläche exprimiert oder sind mit intrazellulären Vesikeln assoziiert. Die TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sind in der Regel auf der Zelloberfläche zu finden und erkennen hauptsächlich mikrobielle Membrankomponenten, während die TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 im Endosom bzw. Lysosom lokalisiert sind und Nukleinsäuren erkennen (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002; Heil *et al.*, 2003; Latz *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2003). Das Expressionslevel der TLR kann durch Zytokine, eingedrungene Pathogene oder auch durch umgebende Stressfaktoren moduliert werden (Akira *et al.*, 2006). Tabelle 1 zeigt die Bindungspartner der jeweiligen TLRs. Dabei erkennt jeder TLR bestimmte PAMPs, die von Bakterien, Mykobakterien, Pilzen, Viren oder Parasiten stammen. Lipoproteine z. Bsp aktivieren die TLR2, TLR1 und TLR6. TLR3 erkennt doppelsträngige DNA. Lipopolysaccharide werden von TLR4, Flagellin von TLR5, einzelsträngige RNA von TLR7 und TLR8 detektiert, während TLR9 für die Erkennung von bakterieller DNA zuständig ist.

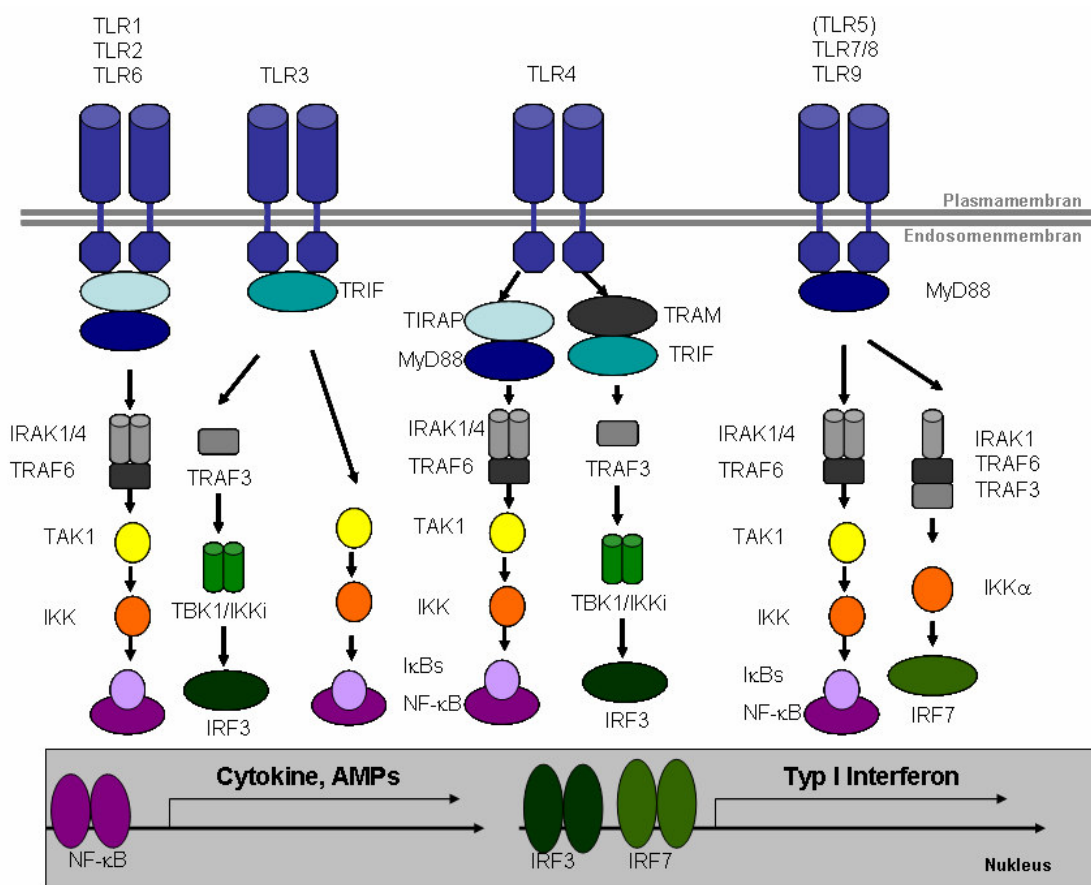
Spezies	PAMPs	TLR
Bakterien, Mykobakterien	LPS Lipoproteine, LTA, PGN, Lipoarabinomannan  Flagellin DNA RNA	TLR4 TLR2/1 TLR2/6 TLR5 TLR9 TLR7
Viren	DNA RNA Strukturproteine	TLR9 TLR3,7,8 TLR2,4
Pilze	Zymosan, beta-Glucan Mannan DNA RNA	TLR2,6 TLR2,4 TLR9 TLR7
Parasiten	tGPI-Mutin ( <i>Trypanosoma</i> ) Glycoinositolphospholipide ( <i>Trypanosoma</i> ) DNA Hemozoin ( <i>Plasmodium</i> ) Profilin-like Molekül ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	TLR2 TLR4 TLR9 TLR9 TLR11
Synthetische Liganden	Pam3CysSK4 Pam2CysSK4 Poly(I:C) Imidazochinolin ähnliche Substanzen CpG Oligodesoxynukleotide	TLR2/1 TLR2/6 TLR3 TLR7,8 TLR9

**Tabelle 1: PAMP Detektion durch TLRs, modifiziert nach Akira *et al.*, 2006**

### 1.5.3 Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren

Nach Bindung eines Liganden an den jeweiligen TLR kommt es zu einer intramolekularen Konformationsänderung, die eine Anlagerung von Adaptermolekülen an der TIR-Domäne des Rezeptordimers ermöglicht (Latz *et al.*, 2007; Triantafilou *et al.*, 2006). Bislang sind fünf Adapterproteine bekannt: *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) (Underhill *et al.*, 1999; Kawai *et al.*, 1999; Hemmi *et al.*, 2002; Hacker *et al.*, 2000; Schnare *et al.*, 2000), *TIR domain-containing protein inducing IFN/TIR containing adaptor molecule 1* (TRIF/TICAM1), *TRIF-related adaptor molecule/TIR containing adaptor molecule 2* (TRAM/TICAM2) (Yamamoto *et al.*, 2003; Fitzgerald *et al.*, 2003;), *TIR domain-containing adaptor/MyD88-adaptor-like protein* (TIRAP/Mal) (Fitzgerald *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2002) und *sterile alpha and armadillo motif-containing protein* (SARM) (O'Neill und Bowie, 2007). Letzteres stellt einen Negativregulator im TRIF abhängigen Signalweg dar (Carty *et al.*, 2006; Bätz, 2007).

MyD88 wird von allen Toll-like Rezeptoren, mit Ausnahme des TLR3, genutzt. Die TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 benötigen zur Rekrutierung von MyD88 das Adaptermolekül TIRAP, während die TLR5, TLR7, TLR8 und TLR9 MyD88 direkt binden können. Die Bindung von MyD88 an das Adapterprotein erfolgt über dessen C-terminale TIR Domäne. Anschließend bindet dann die N-terminale Domäne von MyD88 an Mitglieder der IRAK-Familie (*IL-1-receptor associated kinases*). Nach Phosphorylierung von IRAK1 und -4 dissoziieren diese Moleküle vom Rezeptorkomplex und führen zur Aktivierung von *tumornecrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6* (TRAF6) (Cao *et al.*, 1996). Dieser Komplex führt einerseits zur Aktivierung von *mitogen activated protein* -Kinasen (MAP-Kinasen), *c-jun N-terminal* Kinasen (JNK) und der *extracellular signal regulated* Kinasen (ERK), andererseits leitet er die Aktivierung des *I $\kappa$ B kinase* Komplexes (IKK) ein. Hierbei wird der *inhibitor of NF $\kappa$ B* (I $\kappa$ B) durch IKK phosphoryliert, was zu dessen Degradierung und zur gleichzeitigen Freisetzung von *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B) führt. NF $\kappa$ B und MAP-Kinase abhängige Transkriptionsfaktoren wie *activating protein-1* (AP-1) können dann in den Kern translozieren und dort die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen oder antimikrobiellen Peptiden bewirken (Bätz; 2007).



**Abb. 1 Prinzipielle Wege der Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren in Makrophagen und dendritischen Zellen:** Gezeigt ist die Aktivierung der NF-κB und IRF abhängigen Transkription, die Aktivierung der MAPKinasen wurde nicht berücksichtigt (modifiziert nach Kawai und Akira, 2011).

Die Aktivierung der TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 und TLR9 führt zur Induktion von Typ I Interferonen. Dabei verwendet TLR4 einen MyD88 unabhängigen Signalweg bei dem die Adaptermoleküle TRAM und TRIF benutzt werden um den *TNF receptor associated factor 3* (TRAF3) und die Proteinkinasen: *TANK binding kinase 1* (TBK1) und IKKi zu rekrutieren. Anschließend erfolgt eine Phosphorylierung des *interferon regulatory factor* (IRF3), welcher dann als Transkriptionsfaktor die Expression von Typ I Interferonen bewirkt (Barton und Kagan, 2009). Die TLR7, TLR8 und TLR9 rekrutieren TRAF3, TRAF6, IRAK1, IKKalpha und IRF7 mittels MyD88. IRF7 wird durch IRAK1 und IKKalpha phosphoryliert und dann in den Kern transloziert um dort die Expression von Typ I Interferonen zu regulieren (Gotoh *et al.*, 2010; Kawai und Akira, 2006; Bätz, 2007).

TLR3 benutzt ausschließlich das Adapterprotein TRIF zur Signalübertragung. Auch hier münden die Signalwege einerseits in der Aktivierung von NF $\kappa$ B und der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden und andererseits in der Aktivierung von IRF3 und der Synthese von Typ I Interferonen (Akira *et al.*, 2006; Bätz, 2007).

#### 1.5.4 NOD-like Rezeptoren (NLRs)

NLRs sind intrazelluläre Rezeptoren, die nicht nur in Zellen des Immunsystems, wie den Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und antigenpräsentierenden Zellen zu finden sind, sondern auch in epithelialen und mesothelialen Zellen exprimiert werden. Im Menschen wurden bisher 22 Mitglieder der NLR-Familie beschrieben, während es in der Maus mindestens 33 NLR Gene gibt. NLRs bestehen aus drei Komponenten. Die N-terminale Domäne ist variabel und für die Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich. Sie wird entweder als CARD, Pyrin Domäne (PYD), saure Transaktivierungsdomäne oder *Baculovirus inhibitor repeat* Domäne (BIR) ausgebildet. Zentral liegt die *nucleotid binding oligomerization domain* (NOD), deren Aufgabe die Oligomerisierung der Rezeptoren nach Aktivierung durch einen Liganden ist. C-terminal befinden sich Leucin-reiche Regionen (*leucine rich repeats*, LRR), welche die Bindung von PAMPs vermitteln (Athman & Philpott, 2004; Chen *et al.*, 2008). NOD1 und NOD2 erkennen verschiedene Peptidoglykanstrukturen (Athman & Philpott, 2004). Nach Aktivierung kommt es zur Interaktion der CARD-Domänen von NOD1 bzw. NOD2 mit der CARD-Domäne von *receptor interacting protein 2* (Rip2), diese vermittelt die Aktivierung des NF $\kappa$ B bzw. MAP-Kinase Signalwegs und führt letztendlich zur Induktion von inflammatorischen Zytokinen wie z. Bsp. TNF, IL-6, IL-8 (Chen *et al.*, 2008). Der dritte wichtige NLR-Signalweg, der durch die Rezeptoren NLRP1, NLRP3, und NLRC4 aktiviert werden kann, führt zur Ausbildung des Inflammasoms, zur Aktivierung von Caspase-1 und damit zur Spaltung von Pro-IL-1 $\beta$  und Pro-IL-18 in die jeweils biologisch aktive Form. (Chen *et al.*, 2008).

## 1.6 Antimikrobielle Peptide/Proteine

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind Effektormoleküle des Abwehrsystems von Pflanzen, Insekten, Fischen, Amphibien, Vögeln und Säugetieren (Boman, 1995). Bisher sind mehr als 1000 natürlich vorkommende Peptide bekannt (siehe <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Die meisten AMPs zeigen ein breites Wirkungsspektrum gegen Grampositive und Gramnegative Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren (Coote *et al.*, 1998; Van-Compernelle *et al.*, 2005). Die Mehrheit der bisher bekannten AMPs wirken antibakteriell (77,7 Prozent). Während noch ca. 28 Prozent antifungal wirksam sind wurden bisher hingegen nur wenige Peptide mit antiviraler Aktivität gefunden (5,7 Prozent).

Fast alle AMPs werden als größere Vorstufen synthetisiert und erst durch proteolytische Spaltung sowie weitere posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, carboxyterminale Amidierung, Isomerisierung von Aminosäuren oder Halogenierung zum aktiven Peptid prozessiert. Einige Peptide entstehen durch proteolytische Spaltung aus größeren Proteinen mit völlig anderer Funktion. So entsteht z. Bsp. Buforin II aus Histone 2A oder Lactoferricin aus Lactoferrin (Zasloff, 2002).

Antimikrobielle Peptide weisen eine hohe Diversität bezüglich ihrer Länge, Netto-Ladung sowie ihrer Konformation auf (Wu *et al.*, 1999). Meist sind es kurze; 10-60 Aminosäuren lange Peptide, die entsprechend ihrer Ladung in kationische oder anionische Peptide eingeteilt werden können. Andere Klassifizierungsmöglichkeiten, anhand ihrer Primär- oder Sekundärstruktur, sind ebenfalls gebräuchlich (Zasloff, 2002). Auch kleine antimikrobielle Proteine, die etwas mehr als 100 Aminosäuren aufweisen, wie Lysozym, Psoriasin oder RNase7 kann man funktionell in die Gruppe der antimikrobiellen Peptide/Proteine einordnen.

Oft beruht die Wirksamkeit der AMPs auf ihrer Fähigkeit die Membran des Erregers anzugreifen. Dabei kommt es zunächst zur Anlagerung der meist kationischen Peptide an die negativ geladene Plasmamembran. Anschließend können die Erreger durch Ruptur der Membran, Porenbildung oder durch die Ausbildung von Ionenkanälen geschädigt werden (Brogden, 2005). Weitere Mechanismen sind z. Bsp. die Inhibition der bakteriellen Zellwandsynthese (Sass *et al.*, 2008; 2010) oder Hemmung der Protein-

biosynthese oder Proteinfaltung (Kragol *et al.*, 2001) sowie der Synthese von DNA oder RNA in den Erregerzellen (Brogden *et al.*, 2005). Die meisten antimikrobiellen Peptide haben noch weitere Funktionen im Organismus. Sie können chemotaktisch auf Immunzellen (Garcia *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003) und antiproliferativ auf Tumorzellen wirken (Kang *et al.*, 2012; Hoskin *et al.*, 2008).

### 1.6.1 Antimikrobielle Peptide/Proteine der Haut

Lysozym war das erste antimikrobielle Protein, das in der menschlichen Haut entdeckt wurde (Ogawa *et al.*, 1971, Klenha and Krs 1967). Es wurde bereits 1922 von Alexander Fleming als „bakteriolytisches Element“ im Nasensekret beschrieben (Fleming, 1922). Seine Rolle in der Haut ist allerdings unklar, da es ausschließlich im Cytoplasma von Zellen des Stratum granulosum (Ogawa *et al.*, 1971; Papini *et al.*, 1982), Haarfollikelzellen oder auch ekkriner Schweißdrüsen jedoch nicht im Stratum corneum (Ogawa *et al.* 1971) oder in Haut-Waschlösungen (Gläser *et al.*, 2005) gefunden wurde.

**Dermcidin** ist, nach bisherigem Erkenntnisstand, das wesentliche antimikrobielle Peptid im Schweiß. Es wird konstitutiv von ekkrinen Schweißdrüsen sezerniert und durch Verletzung der Haut oder Entzündungsreaktionen nicht induziert (Schitteck *et al.*, 2001, Rieg *et al.*, 2004) DCD-1L, DCD-1 und dessen durch proteolytische Spaltung erhaltenen Fragmente wie zum Beispiel SSL-25 weisen eine breites antimikrobielles Wirkspektrum auf (Steffen *et al.*, 2006).

**Psoriasin**, auch als S100A7 bekannt, ist das häufigste antimikrobielle Protein menschlicher Haut, welches vor allem an Stellen mit hoher bakterieller Kolonisation, wie den Handflächen, der Nase oder den Haarfollikeln, vorkommt. Es ist sehr wirkungsvoll gegen Gram-negative Keime, so dass es die Besiedlung der Haut mit dem Darmkeim *E.coli* verhindern kann, während es gegen *S. epidermidis*, einem kommensalen Bakterium der Haut, kaum Wirkung zeigt (Gläser *et al.*, 2005).

Einige Mitglieder der RNase A Superfamilie zeigen antimikrobielle Aktivität. Hier sind neben RNase7 die RNase ECP/RNase3 (Lehrer *et al.*, 1989) und RNase5, auch als Angiogenin bekannt (Hooper *et al.*, 2003), zu nen-



nen. **RNase7** (siehe 1.7.3) ist eines der wichtigsten antimikrobiellen Peptide der Haut, welches bereits konstitutiv in hoher Konzentration vorkommt (Harder und Schroeder, 2002) und zum Bsp. in psoriatischen Läsionen weiter induzierbar ist (Harder und Schroeder, 2005a; 2005b).

In der Haut wurden des Weiteren die **beta-Defensine 1 bis 4** gefunden. **HBD-1** wurde bereits 1997 im Zusammenhang mit Nierenerkrankungen entdeckt (Bensch *et al.*, 1995) und gilt als nichtinduzierbares antimikrobielles Peptid der Haut (Harder *et al.*, 2004). Es zeigt jedoch eine Abhängigkeit von der Calcium-Ionen-Konzentration *in vitro*, so dass ein Zusammenhang mit der Differenzierung der Keratinozyten diskutiert wird (Abiko *et al.*, 2003; Frye *et al.*, 2001, Harder *et al.*, 2004). Schroeder *et al.* konnten zeigen, dass durch Reduktion der Disulfidbrücken, gefolgt von der Ausbildung einer veränderten Struktur die antimikrobielle Aktivität von HBD-1 gesteigert werden konnte. Reduziertes HBD-1 erwies sich als potentes antimikrobielles Agenz gegen *Candida albicans* und gegen anaerobe Grampositive Bakterien wie Bifidobakterien und Lactobazillen (Schroeder *et al.*, 2011). **HBD-2** (siehe 1.7.2) und **HBD-3** (siehe 1.7.3) wurden erstmals aus psoriatischer Haut isoliert und weisen Unterschiede in ihrem antimikrobiellen Wirkspektrum auf (Harder *et al.*, 1997; Harder *et al.*, 2001). **HBD-4** zeigte im mikromolaren Konzentrationsbereich antimikrobielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* und *S. carnosus* (Garcia *et al.*, 2001). Das Cathelicidin hCAP-18 und das davon abgeleitete antimikrobielle Peptid **LL-37** ist eines der Hauptproteine der Granula neutrophiler Granulozyten, kommt aber auch in vielen verschiedenen anderen Geweben vor (Frohm *et al.*, 1997). LL-37 zeigt ebenfalls ein breites Wirkspektrum und ist auch bei hohen Salzkonzentrationen noch wirksam (Turner *et al.*, 1998). Die Wirksamkeit gegen *C. albicans* ist umstritten (Turner *et al.*, 1998, Lopez-Garcia *et al.*, 2005). Sogar eukaryotische Parasiten wie Trypanosomen und auch periphere Leukozyten sind empfindlich gegen LL-37, wobei dessen Toxizität durch Serumkomponenten aufgehoben werden kann (Johansson *et al.*, 1998). Die *in vivo* Relevanz von LL-37 wurde im Mausmodell an CRAMP, dem Maus Homolog, -defizienten Mäusen gezeigt, die empfindlicher auf Infektionen mit Gruppe A Streptokokken (GAS) reagieren (Dorschner *et al.*, 2001).

Weitere antimikrobielle Peptide der Haut sind z. Bsp. Adrenomedullin, sowie die Serin-Protease Inhibitoren *Antileukoprotease* (ALP) und Elafin, auch *Skin Derived Antileukoprotease* (SKALP) genannt (Schittek *et al.*, 2008).

### 1.6.2 humanes beta Defensin 2

Humanes beta Defensin-2 (HBD-2) ist ein kleines, cysteinreiches, kationisches Peptid, welches aus 41 Aminosäuren aufgebaut ist. Es weist, wie die meisten antimikrobiellen Peptide, eine amphiphile Ladungsverteilung auf. Röntgenstrukturanalysen von Hoover *et al.* zeigten, dass das Monomer eine dreisträngige beta-Faltblatt Struktur ausbildet, die durch drei Cysteinbrücken stabilisiert wird. Das Peptid lag im Kristall als Dimer vor, dabei bildete sich ein intermolekulares 6-strängiges beta-Faltblatt aus. Darüber hinaus fand man eine Anordnung in quartären Oktameren (Hoover *et al.*, 2000).

HBD-2 wird hauptsächlich in epithelialen Geweben exprimiert. Neben der Haut kommt es in den Epithelien der Atemwege, wie in Trachea oder Lunge sowie im entzündeten Darmepithel vor (Ali *et al.*, 2001; Wehkamp *et al.*, 2003).

Beta Defensin 2 wurde vorwiegend in den Keratinozyten der oberen Hautschichten wie dem Stratum granulosum und Stratum corneum detektiert, während es im Stratum basale und in einer Basalzellcarcinom-Linie immunologisch nicht nachgewiesen werden konnte (Ali *et al.*, 2001). Primäre Keratinozyten, die durch hohe Konzentrationen an Calcium-Ionen zur Differenzierung gebracht wurden, wiesen ebenfalls eine erhöhte Expression von HBD-2 auf (Harder *et al.*, 2004; Pernet *et al.*, 2003). Harder *et al.* isolierten beta Defensin 2 erstmals aus psoriatischer Haut, die einen deutlich höheren Gehalt an diesem Peptid aufweist als gesunde Haut (Harder *et al.*, 1997, Schröder und Harder, 1999). Die antimikrobielle Wirkung des natürlichen, aus psoriatischer Haut isolierten, beta Defensins-2 richtete sich präferentiell gegen Gram negative Bakterien wie *P. aeruginosa* und *E.coli* (LD<sub>90</sub>; 10 µg/ml). Es war etwas schwächer wirksam gegen *C. albicans* (LD<sub>90</sub>; 25 µg/ml) und zeigte nur bakteriostatische Aktivität

gegen *S. aureus* (Harder *et al.*, 1997). Untersuchungen mit HBD-2, welches in Insektenzellen überexprimiert wurde, zeigten hingegen nicht nur antimikrobielle Aktivität gegen *E.coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* sondern auch gegen *S. aureus* (Harder und Schröder; 2005; Liu *et al.*, 2002; Bals *et al.*, 1998; Singh *et.al.*, 1998). Synthetisches HBD-2-Peptid erwies sich als wirksam gegen verschiedene Bakterien der Mundhöhle, die Zahnfleischentzündungen hervorrufen können (Nishimura *et al.*, 2004; Mineshima *et al.*, 2003). Einige Bakterien, wie z.Bsp. *Burkholderia cepacia* (Baird *et al.*, 1999) oder *Treponema denticola* sind resistent gegenüber HBD-2. Für den letztgenannten Bakterienstamm wird vermutet, dass ein Mangel an Lipopolysaccharid (LPS) für die Resistenz verantwortlich ist (Brissette *et al.*, 2002). In einigen Studien wurde festgestellt, dass die antimikrobielle Aktivität von HBD-2 von der Ionenkomposition abhängt und mit zunehmender Salz (NaCl) -Konzentration abnimmt (Bals *et al.*, 1998, Tomita *et al.*, 2000), daher ist es fraglich ob HBD-2 als antimikrobielles Agens im Serum oder auf der Hautoberfläche, welche mit evaporiertem Schweiß bedeckt ist, wirksam sein kann.

### 1.6.3 humanes beta Defensin 3

Humanes beta Defensin-3 (HBD-3) ist ein kationisches Peptid, das aus 45 Aminosäuren besteht und in neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen produziert wird. Es weist eine asymmetrische Ladungsverteilung auf. Dabei befinden sich die geladenen Aminosäuren hauptsächlich am carboxyterminalen Ende (Boniotto *et al.*, 2003; Schutte *et al.*, 2002). Es können sich drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Mittels NMR-Spektroskopie in wässriger Lösung, bei niedrigem pH konnte gezeigt werden, dass sich drei antiparallele beta-Faltblätter und eine kurze N-terminale helikale Schleife ausbilden können. Weitere strukturelle Analysen zeigten das beta Defensin-3 eine amphipatische symmetrische Dimerstruktur ausbilden kann (Schibli *et al.*, 2002).

Für HBD-3 konnte ein breites antimikrobielles Wirkspektrum nachgewiesen werden. Untersuchungen mit synthetischem Peptid zeigten eine salzunabhängige Wirksamkeit gegen viele potentiell pathogene Gram-

negative und Grampositive Bakterien sowie Pilze, einschließlich gefährlicher methicillinresistenter *S. aureus* Stämme (MRSA) und vancomycinresistentem *Enterococcus faecium* (VRE) (Harder *et al.*, 2001; Hoover *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Shelburne *et al.*, 2005). Beta-Defensin-3 zeigte hingegen keine zytotoxische Aktivität gegen eukaryotische Zellen (Harder *et al.*, 2001; Klüver *et al.*, 2005). Studien mit Transmissions-elektronenmikroskopie führten zu der Annahme, dass die Plasmamembran den Angriffsort des Peptides darstellt (Harder *et al.*, 2005). Membranpermeabilisierung konnte in Gramnegativen (*E.coli*) und Grampositiven (*S. aureus*) Bakterien festgestellt werden, wobei dieser Effekt bei Grampositiven Bakterien erst nach längerer Inkubation mit dem Peptid auftrat (Boniotto *et al.*, 2003). In *Xenopus laevis* wurde außerdem die Ausbildung von Ionenkanälen beobachtet (Garcia *et al.*, 2001). 2010 konnten Sass *et al.* eine Störung der bakteriellen Zellwandsynthese in Staphylokokken als wesentlichen Mechanismus der antimikrobiellen Aktivität von HBD-3 nachweisen (Sass *et al.*, 2010).

Neben seiner antimikrobiellen Aktivität zeigte HBD-3 chemotaktische Wirkungen auf Monozyten und CCR6-transfizierte HEK 293 Zellen (Garcia *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003). Die chemotaktische Wirkung ist im Gegensatz zur antimikrobiellen Aktivität an die Ausbildung der Disulfidbindungen gebunden (Wu *et al.*, 2003).

#### **1.6.4 Ribonuklease7**

Ribonuklease 7 (RNase7) ist ein kationisches Protein, das aus 128 Aminosäuren besteht und dessen Masse 14,56 Dalton beträgt. Seine Struktur besteht aus 3 alpha-Helices und 2 dreisträngigen antiparallelen beta-Faltblättern (Huang *et al.*, 2006).

RNase7 wurde in hohen Konzentrationen in der Haut, außerdem in weiteren Geweben wie Niere, Mandeln und Speicheldrüsen gefunden (Harder Schröder, 2002). Neben einem breiten Wirkspektrum gegen Grampositive, Gramnegative Bakterien und *C. albicans*, zeigt es eine extrem effiziente Wirkung gegen *E. faecium* in Konzentrationen von nur 30nM (Harder und Schroeder, 2002). Simanski *et al.* zeigten 2010, dass RNase7 in der Lage ist die Besiedlung von Skin Explantaten mit *S. aureus* zu ver-

hindern. Eine Patientenstudie von Zanger *et al.*, zeigte eine höhere RNAse7 Expression in der Haut gesunder nicht infizierter Personen, im Vergleich zu gesunder Haut von Patienten die bakterielle Infektionen aufwiesen (Zanger *et al.*, 2009; Simanski *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2010).

## **1.7 Regulation der Expression antimikrobieller Peptide in der Haut**

Zur Gewährleistung ihrer Schutzfunktion gegenüber Mikroorganismen hat die Haut eine gute basale Ausstattung mit antimikrobiellen Peptiden (siehe 1.6.). Sie muss darüber hinaus in der Lage sein, bei Kontakt oder Infektion mit potentiellen Pathogenen die Menge an AMPs rasch anzupassen. Diese Regulation kann als spezifische Reaktion auf PAMPs der Mikroorganismen erfolgen oder durch Mediatoren der Entzündungsreaktion wie Zytokine ausgelöst werden (Schröder und Harder, 2005).

### **1.7.1 Regulation der HBD-2 Expression**

Die HBD-2 Promotorregion weist einige mutmaßliche Bindungsstellen für NF $\kappa$ B, AP-1, AP-2 (*activator protein 1, -2*) und NF-IL-6 auf, die als wichtige Regulatoren der Entzündungsreaktion bekannt sind (Harder *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1998). In Keratinozyten und epithelialen Zellen des Respirationstraktes erwiesen sich Interleukin-1alpha und -beta als sehr effektive Stimuli der HBD-2 Expression, während TNF oder IL-6 nur eine geringfügige Erhöhung des Gehalts der Zellen an HBD-2 hervorriefen (Harder *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002; Harder *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003). Bei entzündlichen Darmerkrankungen, wie der ulzerativen Colitis wurde eine bis zu 1000-fache Induktion von HBD-2 nachgewiesen (Wehkamp *et al.*, 2003). In tracheobronchialen epithelialen Zellen konnte eine, durch CD14 und NF $\kappa$ B vermittelte Induktion der HBD-2 Expression durch LPS (Lipopolysaccharid) nachgewiesen werden (Becker *et al.*, 2000).

Die Rolle von TLR4 bei der Induktion von HBD-2 in Keratinozyten war zunächst widersprüchlich. In einigen Studien wurde eine LPS vermittelte Erhöhung des HBD-2 Gehalts der Zellen beobachtet (Pivarcsi *et al.*, 2003; 2004; Nagy *et al.*, 2005) in anderen Studien nicht (Sorensen *et al.*, 2005).

Untersuchungen von Kawai *et al.* zeigten, dass die gefundene LPS abhängige HBD-2 Induktion vermutlich auf eine Verunreinigung der LPS-Präparationen mit Bakterienkomponenten zurückzuführen ist, die den TLR2 Signalweg oder zusätzliche Signalwege aktivieren konnten (Kawai *et al.*, 2002).

In oralen epithelialen Zellen bzw. Zelllinien kann die HBD-2 Expression direkt durch Bakterien (oder deren Zellwandkomponenten) wie *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Fusobacterium nucleatum* jedoch nicht, oder nur in einem geringeren Ausmaß, von *Streptococcus pyogenes* und *Porphyromonas gingivalis* stimuliert werden (Chung and Dale, 2004; Krisanaprakornkit *et al.*, 2000; 2002). Die hohe Potenz eines *P. aeruginosa* Stamms mit mucoidem Phänotyp HBD-2 zu induzieren, führte zu der Annahme, dass bisher unbekannt, TLR unabhängige Signalwege involviert sein könnten (Harder *et al.*, 2000). Eine interessante Studie von Krisanaprakornkit zeigte anhand kinetischer Untersuchungen, dass verschiedene Signalwege involviert sein müssen. Desweiteren wurde der Einfluß von p38 und JNK sowie des MAP-Kinase Signalweges nachgewiesen (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000; Harder *et al.*, 2004). Auch UV-Strahlung kann zur Induktion von HBD-2 führen (Gläser *et al.*, 2009)

Über inhibitorische Signale, die die HBD-2 Expression vermindern, oder deren Induktion negativ beeinflussen ist nur wenig bekannt. So konnten Kortikosteroide die LPS induzierte HBD-2 Induktion in einer humanen Zelllinie der Luftwege inhibieren (Tomita *et al.*, 2002) und in Keratinozyten konnte all-trans Retinsäure unter anderem die durch verschiedene Stimuli induzierte Expression von HBD-2, -3 und -4 vermindern (Harder *et al.*, 2004). Bei Patienten mit Morbus Crohn wurde eine verminderte Fähigkeit des Kolonepithels beobachtet HBD-2 unter inflammatorischen Bedingungen zu induzieren (Wehkamp *et al.*, 2003)

### 1.7.2 Induktionsmechanismen von HBD-3 und RNase7

Beta Defensin-3 kann durch Zytokine wie TNF und besonders deutlich durch  $\text{INF}\gamma$  (Harder *et al.*, 2001; Joly *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 2003) induziert werden, ebenso ist ein Einfluss von Bakterien bekannt (Harder *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2001, Midorikawa *et al.*, 2003). Auch für HBD-3, wie für HBD-2 und RNase7 erwies sich eine mucoide Variante von *P. aeruginosa* als sehr potenter Induktor (Harder *et al.*, 2000). Menzies und Kenoyer beschrieben eine TLR2 abhängige Induktion von HBD-3 durch *S. aureus* und Lipoteichonsäuren. Diese Arbeitsgruppe fand auch einen Zusammenhang der *S. aureus* induzierten HBD-3 Expression mit der Aktivierung der p38 MAP Kinase (Menzies und Kenoyer; 2006) Die Aktivierung der „*apoptosis signal-regulating kinase-1*“ (ASK-1) führte, vermittelt über den p38 MAP Kinase Signalweg, ebenfalls zu einer Induktion von HBD-3 (Sayama *et al.*, 2005). Zusätzlich zu den bereits genannten Signalen kommt es im Rahmen der Wundheilung zu einer durch „*insulin-like growth factor*“ (IGF-1) und „*transforming growth factor- $\alpha$* “ (TGF $\alpha$ ) induzierten, verstärkten Expression von HBD-3 in humanen Keratinozyten, die durch die Aktivierung des „*epithelial growth factor receptors*“ (EGFR) vermittelt wird (Sorensen *et al.*, 2003; 2006). Für RNase7 wurde ebenfalls eine Induktion durch Bakterien, sowie durch die Zytokine IL-1 $\beta$ ,  $\text{INF}\gamma$  und in geringerem Ausmaß durch TNF beobachtet (Harder und Schroeder, 2002). Auch UV-Bestrahlung kann zur Induktion von HBD-3 und RNase7 führen (Gläser *et al.*, 2009).

## 1.8 Fragestellung

Obwohl menschliche Haut ständig einer Vielzahl von potentiell pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt ist, wird sie nur selten infiziert. So findet man beispielsweise *S. aureus* sehr häufig auf läsionaler und nicht läsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis aber nur selten auf der Haut gesunder Menschen. *S. epidermidis* hingegen ist als Kommensale bei den meisten Menschen als konstanter Bestandteil der Hautflora zu finden.

Ziel der Arbeit ist es, Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen der Haut des Menschen und den beiden verschiedenen Staphylokokkenspezies zu finden, die die differentielle Besiedlung der Haut erklären. Dazu werden humane primäre Keratinozyten in Kultur genommen und Präparationen von *S. epidermidis* und *S. aureus* ausgesetzt. Nach Ausschluß von toxischen Effekten durch die Behandlung, soll der Einfluß der Bakterien auf die Expression antimikrobieller Peptide/Proteine untersucht werden. Weiterführend können dann die involvierten Signalwege im Western-Blot oder durch Blockierungsexperimente mit Rezeptorantikörpern, sowie mittels chemischer Inhibition bestimmter Signalmoleküle untersucht werden. Schließlich soll ein *in vivo* Maus-Modell etabliert werden mit dessen Hilfe die epikutane Besiedlung der Haut mit Staphylokokken näher untersucht werden kann.



## 2 Materialien und Hilfsmittel

### 2.1 Biochemikalien und Chemikalien

Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Fermentas (St. Leon-Roth), Merck (Darmstadt), Promega (Heidelberg), Roche (Mannheim), Sigma Aldrich (München) und Roth (Karlsruhe) bezogen, soweit nicht anders angegeben.

#### 2.1.1 Antikörper

Spezifität	Spender	Verwendung	Bezugsquelle
human-TLR2	Maus	Rezeptor Antagonist	Imgenex, San Diego, CA, USA
human-EGFR	Maus	Rezeptor Antagonist	Millipore, Schwalbach
human-beta-Aktin	Kaninchen	1. Ak WB	Cell Signaling (NEB), Frankfurt a. M.
human-AKT	Kaninchen	1. Ak WB	Cell Signaling (NEB), Frankfurt a. M.
human-p-AKT	Kaninchen	1. Ak WB	Cell Signaling (NEB), Frankfurt a. M.
human-ERK	Kaninchen	1. Ak WB	Cell Signaling (NEB), Frankfurt a. M.
human-p-ERK	Kaninchen	1. Ak WB	Cell Signaling (NEB), Frankfurt a. M.
human-NF $\kappa$ B p65	Kaninchen	1. Ak WB	Cell Signaling (NEB), Frankfurt a. M.
human-p-NF $\kappa$ B p65	Kaninchen	1. Ak WB	Cell Signaling (NEB), Frankfurt a. M.

human-I $\kappa$ B	Kaninchen	1. Ak WB	Cell Signaling (NEB), Frankfurt a. M.
human-hBD-3	Kaninchen	ELISA	Peprotech, Hamburg
Kaninchen-IgG AP konjugiert	Ziege	2. Ak WB	Applied Biosystems, Darmstadt Novus Biologicals, Cambridge, UK
Kaninchen-IgG+IgM biotinyliert	Ziege	ELISA	DAKO, Hamburg

### 2.1.2 Zellstimulantien: Zytokine, Inhibitoren

Substanz	Verwendung	Hersteller
humanes EGF	EGFR-Stimulation	Life Technologies, Darmstadt
humanes TGF-alpha	EGFR-Stimulation	R&D Systems, Wiesbaden
humanes TNF	TNFR-Stimulation	Sigma-Aldrich, Steinheim
humanes Il-1beta	IL1R Stimulation	Promocell, Heidelberg
synth. Pam2-Cys	TLR2/6 Stimulation	Genaxxon Bioscience, Ulm
synth. Pam3-Cys	TLR2/1 Stimulation	Genaxxon Bioscience, Ulm
Gefitinib	EGFR Inhibition	Biaffin GmbH, Kassel
Celastrol	NF $\kappa$ B Inhibition	InvivoGen, Toulouse, France
JSH-23	NF $\kappa$ B Inhibition	Calbiochem, Bad Soden

## 2.2 Plasmide

### pRL-TK:

Beschreibung: Expressionsvektor für *renilla*-Luciferase (*Renilla reniformis*)

Bezugsquelle: Promega, Heidelberg

Promotor: Thymidinkinase

Antibiotikaresistenz: Ampicillin

### pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro]

Beschreibung: NF $\kappa$ B abhängiges „Firefly Luciferase“ Reporter-  
genkonstrukt

Bezugsquelle: Promega, Heidelberg

Promotor: NF $\kappa$ B Konsensus Sequenz (GGGAATTTCC)<sub>5</sub>

Antibiotikaresistenz: Ampicillin, Hygromycin

## 2.3 Zellen

### HaCaT -Zelllinie

Es handelt sich um eine immortalisierte humane Keratinozyten Zelllinie (Boukamp *et al.*, 1988).

### Primäre humane Keratinozyten (FK)

Primäre humane Keratinozyten (Vorhaut Keratinozyten: FK) wurden aus der Haut von Jungen (Alter max. 10 Jahre), bei denen eine Vorhautbeschneidung vorgenommen wurde, isoliert (siehe 3.1.7). Hierfür liegt ein Ethikvotum mit der Nummer 3331/1010B02 vor.

## 2.4 Bakterien

Die Bakterienstämme haben wir aus den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Fritz Götz und Prof. Dr. Andreas Peschel des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Tübingen erhalten (AD = Atopische Dermatitis).

<b>Stamm/ Isolat</b>	<b>Beschreibung</b>
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	ATCC Laborstamm
<i>S. epidermidis</i> 1457	Zentralvenenkathederisolat:
<i>S. epidermidis</i> 0-47	Klinisches Isolat; Biofilm bildend
<i>S. epidermidis</i> RP62a	Methicillin-resistent Biofilm bildendes Isolat: ATCC 35984
<i>S. epidermidis</i> Se12	Isolat aus Blutkultur
<i>S. epidermidis</i> Se1	Zentralvenenkathederisolat
<i>S. epidermidis</i> ica	Biofilm bildende Variante von <i>S. epidermidis</i> 1457
<i>S. aureus</i> ATCC25923	ATCC Laborstamm
<i>S. aureus</i> Newman	Laborstamm
<i>S. aureus</i> 113	Wildtyp ATCC 35556
<i>S. aureus</i> 113 spa <sup>-</sup> (dSpa)	Protein A defiziente Variante von SA113
<i>S. aureus</i> SA1	Zentralvenenkathederisolat
<i>S. aureus</i> SA2	Isolat aus Blutkultur
<i>S. aureus</i> SA5	Klinisches Isolat von AD-Patienten
<i>S. aureus</i> SA6	Klinisches Isolat von AD-Patienten
<i>S. aureus</i> SA7	Klinisches Isolat von AD-Patienten

<b>Stamm</b>	<b>Entnahmestelle</b>	<b>Alter/Geschlecht</b>
A.D. 3.2	nicht läsionale Haut	20/weiblich
A.D. 4.1	Hautläsion	54/weiblich
A.D. 5.4	nicht läsionale Haut	44/weiblich
A.D. 6.1	Hautläsion	24/weiblich
A.D. 6.4	nicht läsionale Haut	24/weiblich
A.D. 7.1	Hautläsion	37/weiblich
A.D. 9.2	Hautläsion	25/weiblich
A.D. 9.4	nicht läsionale Haut	25/weiblich
A.D. 11.1	Hautläsion	26/männlich
A.D. 12.1	Hautläsion	39/weiblich
A.D. 12.2	Hautläsion	39/weiblich
A.D. 13.1	Hautläsion	52/weiblich
A.D. 13.2	Hautläsion	52/weiblich
A.D. 13.3	nicht läsionale Haut	52/weiblich
A.D. 14.1	Hautläsion	23/weiblich
A.D. 14.2	Hautläsion	23/weiblich
A.D. 16.1	Hautläsion	20/weiblich
A.D. 17.1	Hautläsion	32/weiblich
A.D. 17.3	nicht läsionale Haut	32/weiblich
A.D.18.2	Hautläsion	20/weiblich
A.D.19.1	Hautläsion	36/weiblich
A.D.19.3	Hautläsion	36/weiblich
A.D. 22.2	Hautläsion	22 weiblich

<b>Nasenisolate gesunder Spender</b>	
<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>S. epidermidis</i></b>
-	IVK1
-	IVK2
-	IVK4
-	IVK6
-	IVK7
-	IVK8
-	IVK10
-	IVK11
-	IVK12
-	IVK15
-	IVK16
IVK5	IVK6
IVK24	IVK25
IVK26	IVK27
IVK30	IVK29
IVK33	IVK34,35
IVK58	IVK59,60
IVK62	IVK61,63
IVK72	IVK73
IVK78	IVK79
IVK80	IVK81
IVK82	IVK83
IVK95	IVK96
21_2	21_1
48_1	48_2
51_2	51_1
54_1	54_2
58_2	58_1;_3
66_1	66_2;_3
68_1	68_2

## 2.5 Primer

Gen	Primer	Sequenz
<b>Referenz</b>	beta-Actin	5'-ttgttacaggaagtcccttgcc-3' 5'-atgctatcacctcccctgtgtg-3'
<b>Differenzierung</b>	Involucrin	5'-ctccaccaagcctctgc-3' 5'-ctgcttaagctgc tgctc-3'
<b>AMPs</b>	HBD-1	5'-tgtctgagatggcctcaggt-3' 5'-gggcaggcagaatagagaca-3'
	HBD-2	5'-tcagccatgagggcttgta-3' 5'-ggatcgcctataaccaccaa-3'
	HBD-3	5'-ttgctcttctgttttggtg-3' 5'-cgctctgactctgcaataa-3';
	RNase 7	5'-gaagaccaagcgcaaagc-3' 5'-cagcagaagcagcagaagg-3';
<b>TLR</b>	TLR1	5'-aaccattccgcagtactcca-3' 5'-aaggccacgtttgctctttc-3';
	TLR2	5'-ggaggc tgcatattccaagg-3' 5'-gccaggcatctc acagg-3'
	TLR3	5'-acaacttagcacggctctgga-3' 5'-acctcaactgggatctcgta-3'
	TLR4	5'-agt ttc ctg caa tgg atc aag g-3` 5'-ctg ctt atc tga agg tgt tgc ac-3`
	TLR5	5'-cgaacctggagacaggaaaa-3' 5'-tctccc atgatcctcgttgt-3'
	TLR6	5'-cccattcca cagaacagcat-3' 5'-ataagtccgctgcgtcatga-3'
	TLR7	5'-tgg aaa ttg ccc tcg ttg tt-3` 5'-gtc agc gca tca aaa gca tt-3`
	TLR8	5'-ctt cga tac cta aac ctc tct agc ac-3` 5'-aag atc cag cac ctt cag atg a-3`
	TLR9	5'-agtcaatggctcccagttcct-3' 5'-cgtgaatgagtgctcgtgta-3`
	TLR10	5'-tgt tat gac agc aga ggg tga tg-3` 5'-gag ttg aaa aag gag gtt ata gga taa atc-3`

## 2.6 Lösungen und Medien

### 2.6.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

#### Pufferlösungen zum Waschen der Zellen

- PBS (PAA) für HaCaT: gebrauchsfertige Lösung für Zellkultur
- HBSS (PAA) für FK: gebrauchsfertige Lösung für Zellkultur

#### Trypsin/EDTA zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale

- Trypsin/EDTA-Lösung (T/E) in HBSS für FK: 0,05% (w/v) Trypsin/  
0,05% (w/v) EDTA  
(GibCo):
- Trypsin/EDTA-Lösung (T/E) in PBS für HaCaT: 0,05% (w/v) Trypsin/  
0,02% (w/v) EDTA  
(Biochrom):

#### Stoplösung zum Beenden der Trypsinierung (Serum enthält Trypsininhibitor)

- FK Stoplösung: 90ml HBSS (PAA)/10ml dialysiertes FCS (Biochrom):
- HaCaT Stoplösung: DMEM Komplettmedium

#### DMEM Komplettmedium für HaCaT-Zelllinie

DMEM (GibCo, PAA) wird mit 10% FCS (Biochrom) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom) -Lösung versetzt.



**Basismedium für Keratinozyten (KGM Base)**

Eine Flasche MCDB 153 (Sigma) Medium wurde in 900ml deionisiertem Wasser gelöst und 1,176g Natriumhydrogenkarbonat (Sigma) zugegeben (Molekulargewicht 84,01). Anschließend wurden die Aminosäuren in den in der Tabelle angegebenen Konzentration hinzugegeben.

<b>Aminosäure</b>	<b>Endkonz.</b>	<b>Molekulargewicht</b>	<b>g/l</b>
L-Histidin (Sigma)	$2,4 \times 10^{-4}$	209,6	0,05
L-Isoleucin (Sigma)	$7,5 \times 10^{-4}$	131,2	0,098
L-Methionin (Sigma)	$9,0 \times 10^{-3}$	149,2	0,013
L-Phenylalanin (Sigma)	$9,0 \times 10^{-3}$	165,2	0,015
L-Tryptophan (Sigma)	$4,5 \times 10^{-3}$	204,2	0,009
L-Tyrosin (Sigma)	$7,5 \times 10^{-3}$	225,2	0,017

Der pH-Wert wurde mit 50%iger NaOH auf pH 7,4-7,6 eingestellt und die Lösung mit bidest. Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Nach dem Sterilfiltrieren (Porengröße 0,22 $\mu$ m) wurden je 250ml Aliquots des Basismediums bei -20°C eingefroren.

**Komplettmedium für Keratinozyten (KGM komplett)**

Zu 250ml des Basismediums für Keratinozyten wurden unten aufgeführte Zusätze hinzugegeben. Vor der Zugabe des bovinen Hypophysenextrakts wurde das Medium sterilfiltriert (Porengröße 0,22 $\mu$ M).

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumina</b>	<b>Endkonzentration</b>
KGM Base	250ml	
Insulin (Sigma)	250 $\mu$ l	5mg/l
Ethanolamin (Sigma)	250 $\mu$ l	0,1mM
Phosphoethanolamin (Sigma)	250 $\mu$ l	0,1mM
Penicillin/Streptomycin (GibCo)	2,5ml	Pen. 100.000IU/l; Strep. 100mg/l
EGF (GibCo)	1000 $\mu$ l	0,4 $\mu$ g/l
Hydrocortison (Sigma)	25 $\mu$ l	$5 \times 10^{-7}$ M
<b>sterilfiltrieren</b>		
Bovines Hypophysenextrakt (GibCo)	1 Röhrchen	100mg/ml

2.6.2 Sonstige Lösungen

<b>LB-Ampicillin-Medium</b>	1,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (w/v) NaCl	autoklavieren, abkühlen lassen und mit 0,1% (v/v) einer wäßrigen sterilen Ampicillinlösung (100 mg/ml) versetzen
<b>LB-Ampicillin-Agar-Platten</b>	1,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (w/v) NaCl 1,5% Bacto-Agar	autoklavieren, auf 50-60 °C abkühlen lassen, mit 0,1% (v/v) einer wäßrigen sterilen Ampicillinlösung (100 mg/ml) versetzen und in 10cm – Kulturschalen gießen
<b>10 x TBE</b>	9M Tris-Base 9M Borsäurel 250mM EDTA	<i>Einwaage ad 10Liter bidest. H<sub>2</sub>O</i> 1090g Tris-Base 557g Borsäure 73g EDTA
<b>10 x PBS</b>	1,37M NaCl 27mM KCl 20mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>Einwaage ad 1Liter bidest. H<sub>2</sub>O</i> 80g NaCl 2g KCl 2,7g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 14,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<b>SDS-PAGE Laufpuffer</b>	25mM Tris Base 250mM Glycin 0,1% (w/v)	<i>Einwaage ad 1Liter bidest.. H<sub>2</sub>O</i> 3g Tris Base 18,8g Glycin 1g SDS
<b>2 x SDS-PAGE Probenpuffer</b>	100mM Tris-HCl 4% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerin 200mM β-ME 0,2%(w/v)BP	<i>Einwaage ad 10ml bidest. H<sub>2</sub>O</i> 1ml 1M Tris-HCl pH6,8 0,4g SDS 1ml 99% Glycerin 1ml β-Mercaptoethanol 0,05g Bromphenolblau
<b>10 x Ladepuffer für Agrosegele</b>	50% (v/v) Glycerol 0,1M EDTA 0,25% BP 0,25% Xylencyanol	<i>Einwaage ad 10ml bidest. H<sub>2</sub>O</i> 6,25ml 80% Glycerol 2ml 0,5M EDTA pH 8,0 25mg Bromphenolblau 25mg Xylencyanol

## 2.7 Geräte und Software

### 2.7.1 Software

Programm	Hersteller
Acrobat Reader	Adobe
Word	Microsoft
Excel	Microsoft
Powerpoint	Microsoft
Photoshop	Adobe
Probefinder	Roche
ICycler iQ	Bio-Rad
LC480	Roche
Microwin 2000 4.41	Microtek

### 2.7.2 Geräte

Gerät	Typ und Hersteller
Absaugvorrichtung	IV-500 Vacuset Multi-Tip Kit (Inotech)
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad)
Brutschränke	HERAcell 240 CO2 Incubator BBD 6220 ; T6 function line (Heraeus)
Elektrophorese-System	Mini-PROTEAN (Bio-Rad)
Folienschweißgerät	Folio FS 3602 (Severin)
Heizblock	Dry-Block DB-2D (Techne)
Hybridisierungsöfen	Hybaid Shake 'n' Stack (Thermo Scientific)
Kamera	E-300 (Olympus)
Kühlschränke	FKS 500 (Liebherr); HFU 586 (Heraeus)
Magnetrührer	RCT basic (IKA Labortechnik)
Mikroskope	CK 40 (Olympus) ; IX50 (Olympus)

Mikrowelle	MW600 (Bosch)
Netzgeräte	Power Supply EPS 200 (Pharmacia Biotech); Power Pac 300 (BioRad)
pH-Messgerät	Knick pH-Meter 761 (Calimatic)
Photospektrometer	Smartspec plus (Biorad)
Platten-Spektrometer	TriStar LB 941 (Berthold Technologies)
Realtime PCR System	iCycler (Biorad); LC480 (Roche)
Rollenmischer	RM5 (Fröbel Labortechnik)
Röntgenkassetten	Röntgenkassette (Dr. Goos-Suprema)
Schüttelinkubator	HT (Infors)
Schüttler	HS250 (IKA Labortechnik)
Sicherheitswerkbank	Herasafe HS18 (Heraeus); MRF-B (Steag)
Thermocycler	PTC200 (MJ Research)
Ultrazentrifuge	10SW Rotor (Sorvall)
Vakuumpumpe	N180.3 (KNF Neuberger)
Vortexer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
Waagen	LC 821 (Sartorius); Kern 770 (Kern)
Wasserbad	1083 (Gesellschaft für Labortechnik)
Zentrifugen	Biofuge pico (Heraeus) Biofuge 13 (Heraeus) Megafuge 1.0R (Heraeus) Varifuge 3.0R (Heraeus) Biofuge fresco (Heraeus) ZK 401 (Hermle)

## 2.8 Kits und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, vom Zentrallager des Universitätsklinikums Tübingen bezogen. Für die Zellkultur wurden Materialien von Gibco (Invitrogen, Darmstadt) und BD Biosciences (Heidelberg) eingesetzt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Dual Luciferase Assay	Promega, Heidelberg
ELISA Platten Maxisorp	NUNC, Langenselbold
Immobilon PVDF-Membran	Roche, Mannheim
LDH Release Assay	Roche, Mannheim
Biocoat: Kollagen I beschichtete Zellkulturmaterialien	BD Biosciences, Heidelberg
Epikutanpflaster: <i>Finn Chambers on Scanpor</i>	Smart Practice, Phoenix, USA
Nucleospin RNAII Kit	Macherey&Nagel, Düren
Rasierer	Wahl, Unterkirnach
Röntgenfilm Kodak X-OMAT	Eastman Kodak Company, Rochester
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
SYBR Green real-time PCR Mix	BioRad, München; Roche, Mannheim
Pflaster: Fixomull stretch	BSN Medical, Hamburg
Primefect II DNA Transfektions Reagenz	Lonza, Köln
Whatman 3mm-Papier	Roth, Karlsruhe

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurde dazu unter einer sterilen Werkbank ausschließlich mit sterilen Arbeitsmitteln und Lösungen gearbeitet. Dazu wurden steril verpackte Materialien wie Einmalpipetten, Kulturplatten usw., sowie autoklavierte bzw. durch trockene Hitze sterilisierte Plastik- und Glasgefäße benutzt. Lösungen wurden entweder sterilfiltriert (Porengröße 0,22µm) oder autoklaviert. Alle Lösungen, die mit den Zellen in Berührung kamen, wurden vorher auf 37°C temperiert. Die Zellkultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank. Vor jeder Manipulation an den Zellen wie Medienwechsel, Passagierung usw. erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellkulturen auf Zelldichte, „Zellgesundheit“ und insbesondere auf sichtbare Kontaminationen.

#### Zellkulturbedingungen:

<b>Kulturplatte</b>	<b>Volumen an Medium pro Platte/ Vertiefung</b>	<b>Volumen an T/E pro Platte/ Vertiefung</b>	<b>Kulturfläche pro Platte/ Vertiefung</b>
T75 Flasche	12ml	3ml	75cm <sup>2</sup>
T25 Flasche	4ml	1ml	25cm <sup>2</sup>
6-well-Platte	2ml	0,5ml	9,6cm <sup>2</sup>
24-well-Platte	0,5-1ml	0,2ml	2,0cm <sup>2</sup>
96-well-Platte	0,1-0,2ml	0,05ml	0,32cm <sup>2</sup>

Zellen	Medium	T/E	Stopp- lösung	Sub-kulti- vierung	Medium- wechsel
HaCaT	DMEM +10% FCS	in PBS	DMEM +10% FCS	1:5 1:10	2-3 Tage
Primäre Keratino- zyten	KGM komplett	in HBSS	10% dFCS in HBSS	1:2 1:3	2-3 Tage

### 3.1.1 Auftauen tiefgefrorener Zellen

Ein Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstofftank entnommen und unter leichtem Schwenken schnell bei 37 C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde sofort in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Durch vorsichtiges Schwenken der Flasche konnte eine gleichmäßige Verteilung gewährleistet werden.

Vor der Überführung in den Brutschrank fand eine mikroskopische Überprüfung der Zelldichte und Lebensfähigkeit (Trypanblau Färbung) der Zellen statt. Bei geringer Zellzahl bzw. schlechter Lebensfähigkeit wurden die Zellen entsprechend in T25 Kulturflaschen, bzw. bei höheren Zellzahlen in mehreren Flaschen kultiviert.

### 3.1.2 Passagierung

#### Angaben für T75 Zellkulturflaschen:

Das Medium wurde mit einer sterilen Pasteurpipette von den Zellen abgesaugt und die Zellen gegebenenfalls einmal mit 10ml Puffer gewaschen. Anschließend wurden 3ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen pipettiert und die Flasche für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch Aufklopfen der Platten gegen Ende der Inkubationszeit lösten sich die Zellen besser ab und ließen sich anschließend leichter vereinzeln. Das Ende der Inkubationszeit wurde durch mikroskopische Kontrolle (abgerundete Zellen) bzw. makroskopisch (sichtbares Ablösen der Zellen beim Aufklopfen) bestimmt. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 9ml Stopplösung (mit 10% FCS: enthält Trypsininhibitor) beendet. Mehrmaliges Triturieren

mit Hilfe einer 10ml Pipette führte zu Vereinzeln und Resuspendierung der Zellen. Die Zellzahl wurde gegebenenfalls in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen anschließend in der gewünschten Zellzahl in frische Kulturplatten ausgesät. Dazu wurden 10ml Medium vorgelegt und ein entsprechendes Aliquot der Zellsuspension hinzugegeben. Durch vorsichtiges „über Kreuz“ –Schwenken erfolgte eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen

Bei Zellen und Zelllinien, bei denen Reste der Trypsin/EDTA-Lösung das Wachstum bzw. das Anheften der Zellen an die Oberfläche der Zellkulturplatte auffällig störte, wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei Raumtemperatur und 200g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R: 1.200 UpM, 5min, RT) und anschließend in frischem Medium resuspendiert, bevor die Zellaussaat erfolgte.

### **3.1.3 Einfrieren von adhärennten Zellen**

Für das Einfrieren wurden Zellen der logarithmischen Wachstumsphase benutzt, die eine Konfluenz von ca. 80% aufwiesen

#### Einfriermedium:

**HaCaT:** DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO (v/v)

**FK:** KGM mit 10% Glycerol

#### Angaben für T75 Zellkulturflaschen:

Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit 10ml PBS/HBSS gewaschen und anschließend mit 3ml Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit 9ml Stopplösung beendet und die Zellen anschließend durch Triturieren vereinzelt. Ein Aliquot wurde für die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer entnommen und die restliche Zellsuspension 5min bei Raumtemperatur und 200g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R: 1.200 UpM, 5 min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3ml frischem eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und auf drei vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zum langsamen Abkühlen in die Einfriervorrichtung „Mr. Frosty“ gegeben und über Nacht in den -80 °C Gefrierschrank gestellt. Danach wurden die Kryoröhrchen zur Langzeit-Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.



### 3.1.4 Zellzahlbestimmung

Die vorbereitete Zählkammer wurde mit der Zellsuspension oder mit deren Verdünnung luftblasenfrei gefüllt (ca. 10µl) und 4 Quadrate aus je 16 Kleinquadraten (Volumen der 16 Kleinquadrate = 0,1µl) ausgezählt.

Die Zellzahl/ml wurde durch Multiplizieren des Mittelwerts der vier ausgezählten Quadrate mit 10.000 und gegebenenfalls mit dem Verdünnungsfaktor erhalten.

### 3.1.5 Isolierung primärer humaner Keratinozyten (Meier *et al.*, 2000)

Menschliche Präputien (Vorhäute) wurden von Dr. Frunder aus der Loretto-Klinik in Tübingen erhalten. Das OP-Material wurde steril entnommen und sofort in die Transportlösung gegeben und bei 4 °C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt. Die Aufarbeitung sollte spätestens 2 Tage nach der OP erfolgen.

#### Durchführung für eine Vorhaut

Zunächst wurde die Vorhaut von Fett, Blutgefäßen und überschüssigem Gewebe befreit, so dass die Hautprobe flach dalag und die weiße Epidermis deutlich zu erkennen war. Das Gewebe wurde anschließend in ca. 0,5-1cm<sup>2</sup> große Stückchen geschnitten und über Nacht bei 4 °C in ca. 6ml Lösung B inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Gewebestückchen in Lösung A überführt und die Epidermiszellen mit dem Skalpell abgekratzt. Die so erhaltene Suspension wurde in ein 15ml Falconröhrchen überführt und die Zellen durch ca. 60-maliges Triturieren vereinzelt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur und 200g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R: 1.200UpM, 5min, RT), der Überstand abgesaugt, das Pellett in ca. 10ml KGM Komplettmedium aufgenommen, erneut gründlich resuspendiert und in eine kollagenbeschichtete T75 Zellkulturflasche überführt.

Nach 3 bis 4 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte eine erste Kontrolle, ob sich die Zellen angeheftet haben und gegebenenfalls ein Mediumwechsel.

**Lösung B**

	<b>Endkonzentration</b>	<b>Molekulargewicht</b>	<b>g/500 ml</b>
<b>Hepes</b>	30mM	238,3	3,57
<b>Glucose</b>	4mM	180,2	0,36
<b>KCl</b>	3mM	74,56	0,11
<b>NaCl</b>	130mM	58,44	3,8
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O</b>	1mM	268,07	0,13
<b>Trypsin</b>	0,25%		1,25

Der pH-Wert wurde mit 50%-iger NaOH auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert (0,2µm Filter) und als 12ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

**Lösung A**

	<b>Endkonzentration</b>	<b>Molekulargewicht</b>	<b>g/500 ml</b>
<b>Hepes</b>	30mM	238,3	3,57
<b>Glucose</b>	10mM	180,2	0,9
<b>KCl</b>	3mM	74,56	0,11
<b>NaCl</b>	130mM	58,44	3,8
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O</b>	1mM	268,07	0,13

Der pH-Wert wurde mit 50%-iger NaOH auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert (0,2µm Filter). Zu 500ml Lösung wurden 10 ml dialysiertes FCS geben und als 12ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

**3.1.6 Behandlung der Zellen**

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% in Vollmedium kultiviert. Dann wurden die Zellen für 24h ohne FCS oder andere wachstumsstimulierende Zusätze kultiviert (DMEM – HACAT; KGM Basis – FK). Zur Differenzierung der primären Keratinozyten wurde zusätzlich 1,7mM CaCl<sub>2</sub> zugefügt. Anschließend wurden die Zellen über den jeweils angegebenen Zeitraum mit Bakterienpräparationen oder den jeweils angegebenen Stimulantien bzw. Inhibitoren (siehe unten) behandelt.

Bakterienpräparation:

Bakterien wurden aus einer Vorkultur oder von einer frischen Agarplatte in das jeweilige Basismedium eingebracht und über Nacht bei 37°C im Schüttler (200Upm) inkubiert. Nach Bestimmung der Bakterienzahl mittels der OD600 wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert. Der Überstand, das bakteriell konditionierte Medium (BCM), wurde so verdünnt, dass dessen Konzentration der eines Mediums mit einer Bakterienzahl von  $5 \times 10^8$  CFU/ml entspricht. Das Bakterienpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und auf eine Konzentration von  $0,25 \times 10^6$  CFU/ml eingestellt. Für die Herstellung hitzeinaktivierter Bakterien wurden die Bakterien gewaschen, die Bakterienzahl auf  $0,25 \times 10^7$  CFU/ml eingestellt und die Suspension bei 65°C 45 Minuten inkubiert.

**Lösungen für die Behandlung der Zellen**

<b>Stimulus/Inhibitor</b>	<b>Konzentration im Medium</b>
TLR2 Ak	10µg/ml
EGFR Ak	10µg/ml
Pam2Cys	100ng/ml
Pam3Cys	100-1000ng/ml
TGF alpha	100ng/ml
Celastrol	1µM
Gefitinib	0,025µM

### 3.2 Real-time RT-PCR

Mit Hilfe der real-time RT-PCR können Veränderungen in der mRNA Expression verschiedener Gene untersucht werden. Dabei wird zunächst RNA isoliert und diese mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in die zur mRNA correspondierende DNA (cDNA) umgeschrieben. Ausgehend von der cDNA wird dann eine PCR durchgeführt. Dabei wird SYBR-Green ein Farbstoff der nach Bindung an DNA und Fluoreszenzanregung ca. 1000-fach stärker fluoresziert als der freie Farbstoff, zur Detektion des entstandenen PCR Produkts verwendet. Die Zunahme der Fluoreszenz wird mittels entsprechender Detektoren ermittelt. Als Messwert dient der Ct (Schwellenwert, *threshold*) oder auch Cp-Wert (Crossing point). Dies entspricht dem Cyclus der PCR an dem eine Signalintensität erreicht wird, die signifikant höher als das Hintergrundrauschen ist. Exakter ist die Wendepunktmethode, bei der der Wendepunkt, also die 2. Ableitung der erhaltenen Fluoreszenzkurve als Messwert dient.

Die Auswertung wurde nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode in Excel durchgeführt. Man geht bei dieser Methode von einer PCR-Effizienz von 2 aus, d.h. das Templat wird idealerweise in jedem Cyclus verdoppelt. Exaktere und vergleichbarere Ergebnisse erhält man, wenn die tatsächliche PCR-effizienz mit Hilfe einer Verdünnungskurve ermittelt und mit einberechnet wird. Es handelt sich um eine relative Auswertung, bei der man Unterschiede zwischen zu analysierendem Gen und einem Referenzgen im Verhältnis von veränderten Proben zu Kontrollproben analysiert (Ratio). Die Ratio wird z. Bsp. als x-fache Induktion eines Gens angegeben. Das Referenzgen darf durch die Behandlung selbst nicht beeinflusst werden.

$$\Delta Ct = Ct (\text{AnalyseGen}) - Ct (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{stimuliert Probe}) - \Delta Ct (\text{unstimulierte Probe})$$

$$Ratio = 2^{\Delta\Delta Ct} = \frac{2^{\Delta Ct_{stimuliert}}}{2^{\Delta Ct_{unstimuliert}}}$$

Das erhaltene Produkt wird mittels einer Schmelzpunktanalyse auf Einheitlichkeit des Produkts und exakte Schmelztemperatur untersucht. Dabei weist das Produkt eine spezifische Schmelztemperatur entsprechend seiner Länge und Basenpaarzusammensetzung auf. Die Produktlänge kann auch mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt werden. Dies erfolgt zumeist nur bei der Applikation einer neuen Methode.

#### Durchführung:

Die stimulierten Keratinozyten wurden mit PBS gewaschen und die Gesamt-RNA mit dem Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. 1 µg RNA wurde in cDNA umgeschrieben (Superscript II, Invitrogen). Dabei kamen „random“ Hexamer Primer zum Einsatz. cDNA, die einer RNA-Menge von 25ng entspricht wurde für die real-time PCR Reaktion verwendet.

Für die semiquantitative Analyse der cDNA wurden zwei verschiedene Analysesysteme verwendet. Zunächst erfolgte die Messung mittels des iQ™ SYBR® Green Supermix im Bio-Rad Thermocycler iCycler. Spätere Experimente erfolgten im Roche Lightcycler® 480 mit dem Roche Lightcycler® 480 SYBR Green I MasterMix.

**Bio-Rad:**

2 x Reagenz	12,5µl		Enzymaktivierung	95 °C 10min
H <sub>2</sub> O	7,5µl		Denaturierung	95 °C; 1 min
Primer 1	1µl		Primer-Anlagerung: „annealing“	56 – 62°C; 30s (Primerabhängig)
Primer 2	1µl		Nukleotidanbau: „elongation“	72°C; 1min
cDNA/H <sub>2</sub> O (Neg.Ko)	3µl		Schmelzkurve	50-95°C

**LC480:**

2 x Reagenz	5µl		Enzymaktivierung	95°C 5min
H <sub>2</sub> O	3,5µl		Denaturierung	95°C; 10s
Primer 1	0,5µl		Primer-Anlagerung: „annealing“	56 – 62°C; 10s
Primer 2	0,5µl		Nukleotidanbau: „elongation“	72°C; 10s
cDNA/H <sub>2</sub> O (Neg.Ko)	1µl		Schmelzkurve	65-95°C je 10s

**3.3 Analyse von Ausbeute und Reinheit isolierter RNA oder DNA****3.3.1 Photometrische Bestimmung**

Die Ausbeute an isolierter RNA oder DNA wurde photometrisch über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei gilt bei einer Schichtdicke der Küvette von 1cm:  $A_{260} = 1$  entspricht 40ng/µl RNA. bzw. 50ng/µl DNA (Messbereich möglichst zwischen  $A_{260} = 0,1$  und  $A_{260} = 1$ )

Das Verhältnis der Absorptionswerte  $A_{260/280}$  ist zudem ein Maß für die Reinheit der DNA. Der Quotient sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

### 3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

RNA- bzw. DNA-Fragmente verschiedener Größe wandern in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell durch ein Agarosegel. Die negativ geladene RNA oder DNA wandert in Richtung Anode und wird dabei vom Netz der Agarosemoleküle behindert. Große Fragmente werden dabei stärker zurückgehalten als Kleine. Durch die Verwendung eines Standards mit definierten Fragmentlängen kann die Länge eines unbekanntes RNA-/DNA-Stücks bestimmt werden. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die RNA/DNA, wodurch seine Fluoreszenz, angeregt durch UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254nm, stark zunimmt. Die RNA/DNA kann somit sichtbar gemacht werden.

#### Durchführung:

Je nach Länge der aufzutrennenden RNA/DNA wurde ein 0,8-2%iges (w/v) Agarosegel eingesetzt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht bis sich die Agarose komplett gelöst hatte. Nachdem die Agaroselösung etwas abgekühlt war, konnte das Gel in die Gelkammer gegossen werden. Die Probe wurde im Verhältnis 10:1 mit Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen, eine Spur wurde jeweils mit Standard-DNA gefüllt (DNA-Leitern, Generuler, Fermentas). Als Laufpuffer kam 1xTBE zum Einsatz. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 100-150V für ca. 1 Stunde. Anschließend wurde das Gel für 5-10 Minuten in einer 0,01%igen Ethidiumbromidlösung inkubiert und mit einer CSC-Kamera unter UV-Licht fotografiert.

### 3.4 Plasmidpräparation

Die Plasmide für die Transfektionsversuche wurden aus mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *E.coli* DH5 $\alpha$  erhalten.

#### 3.4.1 Plasmidvermehrung in transformationskompetenten

##### *E.coli* DH5 $\alpha$

Bakterienzellen, mit deren Hilfe Plasmide vermehrt werden sollen, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Zum einen sollte die Effizienz, mit der die Zellen die Plasmid-DNA aufnehmen können, möglichst hoch sein (Kompetenz), zum anderen sollten die Bakterien die aufgenommene Plasmid-DNA nicht als Fremd-DNA erkennen und über Restriktionsenzyme abbauen. Transformationskompetente *E.coli* - Stämme müssen daher einen bestimmten Genotyp aufweisen. So wird Fremd-DNA in Bakterien unter anderem mit Hilfe eines Adenin-methylierungsabhängigen Restriktionssystems erkannt und abgebaut. Dabei handelt es sich um einen Enzymkomplex, der aus einer Untereinheit für die Erkennung spezifischer Sequenzen, einer Methylierungsuntereinheit und einer Restriktionseinheit aufgebaut ist. Um Fremd-DNA also z.Bsp. nichtmethylierte DNA oder DNA mit einem anderen Methylierungsmuster in Bakterienzellen zu vermehren, müssen diese Bakterienstämme Mutationen in diesem Enzymkomplex (z. Bsp. in der Restriktionsuntereinheit) aufweisen.

Die Plasmide müssen ein Gen tragen, das die spätere Selektion der transformierten Zellen ermöglicht. In unserem Fall ist dies das Gen für die Ampicillinresistenz, d.h. nur die Bakterienzellen, die das Plasmid aufgenommen haben, können im ampicillinhaltigen Medium wachsen.

Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen, müssen die *E.coli* -Zellen vorbehandelt werden. Dabei werden die Bakterien bei 18°C kultiviert, mit Kalium-, Calcium- und Mangansalzen behandelt und anschliessend für die Lagerung mit DMSO-Zusatz bei -70°C eingefroren. Dabei kann man hochkompetente Zellen mit einer Transformationseffizienz von  $10^8$  -  $10^9$  Transformanten pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA erhalten (Inoue *et al.* 1990).



### Durchführung von Bakterientransformation und Anzucht:

Ein 100µl- Aliquot der transformationskompetenten *E.coli* DH5α wurden auf Eis aufgetaut und resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 0,02µg Plasmid-DNA gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Durch Erhitzen im Wasserbad für 45 Sekunden auf 42°C konnte die DNA aufgenommen werden. Dann wurde erneut 5 Minuten auf Eis inkubiert und die Suspension entweder direkt auf die vorbereiteten LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen oder vorher ca. 30-60min in 0,5ml LB bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelklone, die auf den LB-Amp-Agarplatten gewachsen sind, wurden steril gepickt und in je 4ml LB-Amp-Medium gegeben und dann ca. 8h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit den so erhaltenen Vorkulturen wurden je 100ml LB-Amp-Medium angeimpft. Nach weiteren 12-16 Stunden Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurden die Bakterien durch Zentrifugieren (15min bei 4°C und 6.000g) pelletiert und gegebenenfalls bei -20°C eingefroren, bis sie zur Plasmidisolierung verwendet werden konnten.

### **3.4.2 Plasmidisolierung**

Zuerst müssen die Bakterien lysiert und die Plasmid-DNA grob von genomischer DNA, RNA, Proteinen und Zelltrümmern abgetrennt werden. Dazu resuspendiert man die Bakterien (Puffer pH 8) zunächst in Bakterienpuffer und lysiert sie anschließend alkalisch in NaOH/SDS-Lösung. Durch Neutralisieren der Lösung mit Kaliumacetatpuffer werden Proteine und Zelltrümmer aufgrund ihrer Adsorption an das schwerlösliche Kaliumdodecylsulfat ausgefällt. Die in Lösung bleibende Plasmid-DNA wird dabei auch effizient von genomischer DNA getrennt, da letztere durch die Verknüpfung mit dem endoplasmatischen Retikulum mit in den Niederschlag gelangt. Fragmente der genomischen DNA verbleiben hingegen in Lösung, weshalb Scherkräfte bei diesem Arbeitsschritt möglichst zu vermeiden sind. Die Lösung, welche die Plasmid-DNA sowie RNA enthält wird durch Zentrifugation gewonnen. Nun wird zunächst eine Isopropanol Fällung und anschließend LiCl zur Präzipitation verwendet.

Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels Ethanolfällung, gefolgt von einem RNase-Verdau und einer Chloroform/Phenol Extraktion der DNA mit erneuter Ethanolfällung.

### Durchführung: (100ml E.coli Kultur)

Die Bakterienkultur wurde 5min bei 6000rpm (Heraeus Megafuge 1.0 R) und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R) und der Überstand verworfen. Man resuspendierte das Bakterienpellet in 4,5ml Bakterienpuffer, gab 10ml 0,2M NaOH mit 1% SDS zu und inkubierte nach vorsichtigem Mischen 5min auf Eis. Anschließend wurden 7,5ml 3M Kaliumacetatpuffer (pH 5,3) zugegeben und erneut 15min auf Eis inkubiert. Das entstehende Präzipitat wurde 5min bei 6000rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R)

Den Überstand filtrierte man durch ein Stück Gaze in ein neues 50ml Röhrchen. Zur Fällung von Plasmid-DNA und RNA gab man 13,5ml Isopropanol zu und inkubierte 10min bei RT. Der Überstand wurde durch Zentrifugation bei 4°C für 10min bei 6000rpm (Heraeus Megafuge 1.0 R) abgetrennt und verworfen. Das entstandene Pellet (sollte möglichst trocken sein) wurde nun in 2ml TE-Puffer gelöst, mit 2ml 4M LiCl versetzt und für 5min auf Eis inkubiert. Es wurde erneut 5min bei 6000rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues 15ml Röhrchen überführt, 10ml eiskalter Ethanol zugegeben und 15min bei -20°C inkubiert.

Durch Abzentrifugieren (5min bei 6000rpm und 4°C) erhielt man ein Pellet, dass man nun mit 5ml eiskaltem 70% Ethanol wäscht und erneut zentrifugiert (5min bei 6000rpm und 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Pellet an der Luft getrocknet. Nun wurde das Pellet in 0,5ml TE-Puffer resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte der Verdau der RNA durch Zugabe von 5µl RNase (10mg/ml) für 30min bei 37°C. Anschließend wurden 50µl 3M Natrium Acetat pH 5,6 zugegeben.

Für die Extraktion wurden 400µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und 2min kräftig geschüttelt. Um die Phasentrennung durchzuführen wurden die Gefäße 3min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge pico). Die obere (wässrige) Phase wurde vollständig abgenommen und in neues Gefäß überführt. Der Überstand wurde erneut

mit 400µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt, zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die wässrige Phase (ca. 400µl) wurde mit dem 0,6 fachen Volumen Isopropanol versetzt, gut gemischt und 10min bei RT inkubiert.

Die ausgefallene Plasmid-DNA (mit bloßem Auge erkennbar) wurde 3min bei 13000rpm und 4°C (Biofuge pico) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Anschließend konnte die erhaltene Plasmid-DNA in ca. 300µl TE-Puffer aufgenommen werden. Die Konzentrationsbestimmung wurde erst nach einigen Stunden durchgeführt, am besten über Nacht stehen lassen.

<b>Bakterienpuffer</b>	<b>Kaliumacetatpuffer</b>	<b>TE-Puffer</b>
50mM Glucose	29,4g KAcetat	10mM Tris/HCl pH 8
25mM Tris/HCl pH 8	5ml Eisessig	1mM EDTA
10mM EDTA	ad 100ml H <sub>2</sub> O	

### 3.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen durch chemische oder physikalische Methoden. Dies geschieht im Regelfall, um Gene in den Zielzellen zu exprimieren, oder zur Analyse von Genregulation. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden transiente Transfektionen mit anschließenden Reporteranalysen durchgeführt. Dabei sollte der Einfluss von Bakterienpräparationen auf ein NFκB reguliertes Reporter gen untersucht werden.

Die verwendete Methode gehört zu den chemischen Verfahren zur Transfektion von Zellen, die auf dem Prinzip der Lipofektion beruhen. Dabei werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden wie z. Bsp. Diolexypropyl-3-trimethylammoniumbromid (DOTMA) und Helferlipiden, wie Cholesterol oder Diolelylphosphatidylethanolamin (DOPE) verwendet. Die DNA wird nicht in die Liposomen eingeschlossen, sondern ionisch an deren Oberfläche gebunden. Die DNA-Liposomen-Komplexe binden

wahrscheinlich an negativ geladene Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche und werden dann, vermutlich durch adsorptive Endocytose, in die Zelle aufgenommen. Der genaue Aufnahmemechanismus ist allerdings noch nicht geklärt. Ebenso ungeklärt ist der Weg auf dem die aufgenommene DNA schließlich aus den Endosomen in den Zellkern gelangt.

### 3.5.1 Transfektion mit PrimeFect™ II

#### Durchführung in 24-well-Platten:

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in je 500µl Kulturmedium pro Vertiefung ausgesät, so dass nach einem Tag eine Konfluenz von 30-50% erreicht werden konnte.

Zunächst wurden 2,5µg DNA (2,25µg NFκB-Reporter + 0,25µg pRL-CMV-Luc) mit 225µl Primefect Diluent gemischt (nicht vortexen!) und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden 45µl Primefect mit 180µl Primefect Diluent gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden DNA-Verdünnung und Primefect-Verdünnung gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5ml KGM Komplettmedium zugegeben

Für die Transfektion wurde das Medium abgenommen, gegebenenfalls mit HBSS gewaschen und je 0,2ml der DNA/ Primefect™/Medium -Mischung zu den Zellen gegeben. Nach 4h fand ein Mediumwechsel mit 500µl KGM komplett statt. Nach 24h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel auf KGM Basismedium + 1,7mM CaCl<sub>2</sub>. Nach weiteren 24h erfolgte die Behandlung der Zellen entsprechend dem jeweiligen Versuchsaufbau. Zur Beendigung des Versuchs wurden die Zellen in PLB-Puffer (Promega) lysiert und gegebenenfalls bei -20°C eingefroren. Die Analyse erfolgte mittels des Dual-Luciferase-Reporterassays (Promega).

### 3.6 Dual-Luciferase®-Reporter Assay

Reportersysteme sind eine gebräuchliche Methode zur Analyse von eukaryontischer Genexpression. In der Doktorarbeit wurde das Dual-Luciferase®-Reporter Assay – System von Promega eingesetzt. Das Reportersystem verwendet neben der *Firefly- (Photinus pyralis)* Luciferase (experimenteller Reportervektor) auch einen Koreporter, nämlich ein Plasmid, das konstitutiv *Renilla reniformis*-Luciferase exprimiert. Dieser Koreporter sollte im Idealfall als Maß für die Transfektionseffizienz dienen und behandlungsunabhängig exprimiert werden. Das System ermöglicht wegen der evolutionär unabhängigen Herkunft der Luciferasen und der damit unterschiedlichen Substrate die sequentielle Messung beider Luciferasen im selben Lysat.

#### Durchführung in 24-well-Platten:

Die Zellen wurden mit 500µl PBS gewaschen und 100µl 1 x PLB zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen ca. 15 Minuten oder gegebenenfalls länger (abhängig von Zelltyp und Konfluenz) unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur lysiert (passive Lyse). Das Lysat wurde entweder direkt zur Messung eingesetzt, bis zur Messung auf Eis gelagert oder bei –20 °C für 3-4 Wochen bzw. bei –70 °C für Langzeitlagerung eingefroren.

Die Messung der Lumineszenz erfolgte am Tristar-Luminometer (Berthold). Dazu wurden je 10µl Lysat (Triplikate) pro Vertiefung einer weißen 96-well Platte gegeben. Zunächst wurden 50µl LAR II (*firefly Luciferase*) und anschließend 50µl S&G (*renilla Luciferase*) zugegeben. Die Messzeit betrug jeweils 10 Sekunden. Für die Auswertung wurde der Quotient aus *Firefly-/Renilla*-Luciferase gebildet und die Werte aus Mehrfachbestimmungen jeweils gemittelt.

### 3.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der differentiellen Farbänderung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 in Gegenwart verschiedener Proteinkonzentrationen. In saurer Lösung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs bei Bindung an Proteine von 465nm auf 595nm. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes ist dabei über einen 10-fachen Konzentrationsbereich konstant. Bei Erweiterung der Konzentrationsspanne ergibt der Assay ein reproduzierbares aber nichtlineares Signal. Die Proteinbestimmung ist einfach und schnell durchzuführen sowie relativ unempfindlich gegen Störungen. Jedoch zeigt der Assay signifikante Unterschiede zwischen individuellen Proteinen.

#### Durchführung in einer 96-well Platte

Zunächst wurde das Reagenz (BioRad) 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt. Proben und Standards wurden in Dreifachbestimmung analysiert. Dazu wurden in einer durchsichtigen 96-well-Platte mit planem Boden je 5µl der verdünnten Proben bzw. Proteinstandards mit 200µl des verdünnten Farb-Reagenz versetzt und gut gemischt. Die Absorption bei 595 nm wurde nach 5 Minuten bestimmt.

Die Proteinstandards wurden nach folgendem Schema hergestellt (Annahme Proben 1:10 verdünnt eingesetzt).

<b>Gesamtprotein [µg/ml]</b>	<b>µl BSA 5mg/ml H<sub>2</sub>O</b>	<b>µl Bidest. Wasser</b>	<b>µl Lyse-Puffer*</b>
Nullwert	0	900	100
50	10	890	100
100	20	880	100
150	30	870	100
200	40	860	100
250	50	850	100
300	60	840	100
400	80	820	100

### 3.8 Western Blot

#### 3.8.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Herstellung von Gesamtzell-Lysaten wurden Zellpellets, die durch Trypsinieren oder Abkratzen aller Zellen jeweils einer T75 Flasche gewonnen wurden, verwendet. Für die Herstellung von Gesamtzell-Lysaten wurden sowohl frische, als auch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Zellpellets verwendet. Die Zellpellets wurden in  $200\text{-}300\mu\text{l}$  Lysepuffer resuspendiert und  $30\text{min}$  untergelegentlichem Vortexen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugieren für  $10\text{min}$  bei  $13000\text{rpm}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf-Zentrifuge) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches  $1,5\text{ml}$  Reaktionsgefäß überführt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Zusammensetzung des Lysepuffers:

Substanz/Lösung	Konzentration	Volumen für 10 ml
NaF	20mM	400 $\mu\text{l}$
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$	1mM	100 $\mu\text{l}$
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1mM	100 $\mu\text{l}$
EDTA	5mM	100 $\mu\text{l}$
Triton X100	0,5%	50 $\mu\text{l}$
* PMSF	0,1M	10 $\mu\text{l}$
* Pepstatin A	10mM	68,4 $\mu\text{l}$
* Leupeptin	10mM	23,4 $\mu\text{l}$
* Aprotinin	10 $\mu\text{g/ml}$	25,0 $\mu\text{l}$
PBS		ad 10ml

Der Lysepuffer kann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden, die Proteaseinhibitoren (Pepstatin, Leupeptin, Aprotinin und PMSF) dürfen jedoch erst kurz vor Gebrauch zugesetzt werden.

### 3.8.2 Diskontinuierliche SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Im elektrischen Feld zweier Elektroden bewegen sich Proteine durch ein Polyacrylamidgel. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von ihrer Größe, ihrer Form und ihrer Ladung ab. SDS lagert sich an Proteine in stöchiometrischem Verhältnis an. Dadurch erhalten die Proteine eine einheitliche, weitgehend entfaltete Form und eine zu ihrer Größe proportionale negative Ladung.

Die hier durchgeführte sogenannte diskontinuierliche SDS-PAGE ist eine Weiterentwicklung der SDS-PAGE: Im Sammelgel mit niedrigerem pH-Wert kommt es während der Elektrophorese zu einer Ladungsträgerverarmung (pH 6,8: isoelektrischer Punkt des Glycins), so dass die Proteine einem starken elektrischem Feld ausgesetzt sind und somit beschleunigt werden. Bei Erreichen des Trenngels (pH 8,9) liegt Glycin wieder geladen vor, die Ladungsträgerverarmung hört abrupt auf und vorausgeeilte Proteine werden gebremst. Durch diese Anordnung von Sammel- und Trenngel kommt es zur Fokussierung der Proteine in einer schmalen Bande. Im weiteren Verlauf werden die Proteine im Trenngel entsprechend ihrer molaren Masse aufgetrennt.

#### Durchführung:

Es wurden, abhängig von der Größe des zu detektierenden Proteins 10 bis 15%-ige Gele verwendet (Lämmli *et al.*, 1970). Die Proben wurden mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und 5min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde von jeder Probe das Volumen, das einem Proteingehalt von 30µg entspricht auf das Gel aufgetragen. Für die Größenordnung wurde jeweils ein Proteinmarker (RainbowMarker; Amersham) mitgeführt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für 30min bei 100Volt und anschließend bei 150-200Volt bis die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.



### 3.8.3 Transfer auf PVDF-Membranen

Nach dem Auftrennen der Proteine in der SDS-PAGE werden die Proteine durch elektrischen Strom vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen, auf der sie durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen fixiert werden. Auf dieser Membran kann anschließend die Detektion des interessierenden Proteins durch spezifische Antikörper erfolgen.

#### Durchführung:

Der Transfer wurde als „Wet-Blot“ in einem Puffertank (BioRad) oder als „SemiDry“-Methode (BioRad) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Es konnte jeweils der gleiche Transferpuffer eingesetzt werden. Vor dem Blotten wurde die PVDF-Membran durch kurzes Schwenken in Methanol aktiviert werden um eine Benetzbarkeit der Membran mit Wasser zu erreichen. Beim „Wet-Blot“ erfolgte der Transfer für 3h bei 400mA, bei der „SemiDry“-Methode lagen pro Gel ca. 150mA für 1h an.

#### **1 x Transferpuffer:**

Tris-Base	25mM	3g
Glycin	192mM	14,4g
SDS	0,04%	0,74g
Methanol	20% v/v	400ml
bidestilliertes Wasser		ad 2000ml

### 3.8.4 Immundetektion

Die Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe eines alkalische Phosphatase spezifischen Chemolumineszenzsystems. Spezifisch durch einen Primärantikörper markierte Proteine werden von einem mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Sekundärantikörper erkannt. Das Enzym alkalische Phosphatase dephosphoryliert CDP-Star, ein spezielles 1,2-Dioxethan-Chemolumineszenz-substrat.

Es entsteht ein metastabiles Zwischenprodukt, welches unter Emission eines Lichtquants zerfällt. Dieses Signal wird auf einem lichtempfindlichen

Film oder mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert. Die CDP-Star-Chemolumineszenz kann bei ausreichender Substratkonzentration über einen Zeitraum von mehreren Stunden beobachtet werden. Das Signal entwickelt sich erst allmählich. Um ein maximales Signal zu erhalten sollte die Membran etwa eine Stunde mit der CDP-Star-Lösung inkubiert werden, bevor die Auswertung erfolgt.

Durchführung: (Alle Inkubations- und Waschschrte wurden unter leichtem Schwenken (Schüttler) in mindestens 10ml Lösung oder in 50ml Röhrchen auf einem Taumelmischer in 5ml Lösung durchgeführt)

Die Membran wurde nach dem Proteintransfer kurz in PBS gewaschen und konnte gegebenenfalls getrocknet werden, falls die Detektion erst zu einem späteren Zeitpunkt möglich war. Dazu musste die getrocknete Membran erneut in Methanol und dann in PBS äquilibriert werden. Zum Absättigen potentieller Proteinbindungsstellen, also zur Verminderung von unspezifischer Bindung der Antikörper an die Membran wurde diese mindestens 1h bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der 1. Antikörper in Blockpuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation mit dem 1.Ak erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5min in PBST gewaschen und anschließend für mindestens 1h bei RT mit dem 2.Antikörper (Verdünnung ebenfalls in Blockpuffer versetzt. Nach gründlichem Waschen (mindestens 3 x 5min) wurde die Membran in Detektionspuffer äquilibriert und anschließend mit ca. 500µl Substrat (CDP-Star: 1:200 in Detektionspuffer) in Folie eingeschweißt. Die eingeschweißte Membran wurde in der Dunkelkammer unter Rotlicht auf einen Röntgenfilm aufgelegt und beides in einer lichtdichten Kassette entsprechend der gewünschten Belichtungszeit aufbewahrt. Für die Entwicklung des Röntgenfilms wurde dieser in 250ml Entwicklerlösung (50ml Entwickler in 200ml H<sub>2</sub>O) inkubiert, bis die Banden gut sichtbar waren. Der Film wurde kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für ca. 5min in 250ml Fixierlösung (50ml Fixierer in 200ml H<sub>2</sub>O) inkubiert. Anschließend wurde der Film für mindestens 30min in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend getrocknet.

**PBST:** 1 Liter 1 x PBS + 0,5ml Tween 20 (0,05%)

**Blockierungspuffer:** 1 l PBST + 50g Milchpulver ( 5%)  
oder 50g Albumin (5%)  
+0,2g Na-Azid (0,02%)

Die **Primärantikörper** wurden entsprechend den Herstellerangaben 1:1000 in Blockierungspuffer verdünnt eingesetzt.

Die **Sekundärantikörper** wurden entsprechend den Herstellerangaben 1:10000 oder 1:3000 in Blockierungspuffer verdünnt eingesetzt.

#### 10 x Detektions-Puffer; pH 9,5:

Tris-Base	2M	12,1g
* MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	100mM	10,2g
bidestilliertes Wasser		ad 500ml

\* Es wurde zunächst Tris-Base zum Wasser gegeben und der pH-Wert auf 9,5 eingestellt, erst danach wurde MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O zugegeben.

### 3.8.5 Quantifizierung der Chemolumineszenzsignale

Die Quantifizierung der Chemolumineszenzsignale kann mit Hilfe des Software-Programms Scion Image durchgeführt werden. Mit diesem Programm ist es möglich, über die in einem definierten Bildbereich aufgenommenen Grauwerte zu integrieren.

Um jede zu quantifizierende Bande wurde ein Kästchen gelegt und die Gesamtgraustufensumme (in relativen OD-Einheiten) bestimmt. Zur Berücksichtigung eventueller Hintergrundlumineszenz wurde über jeder Bande ein Kästchen identischer Größe auf dessen Gesamtgraustufensumme untersucht.

Die hintergrundbereinigten Gesamtgraustufensummen (Bandenstärke) jeder Bande ergaben sich aus der Differenz der Graustufensummen von spezifischer Bande und Hintergrund.

$$\text{Bandenstärke} = \text{OD}_{\text{Bande}} - \text{OD}_{\text{Hintergrund}}$$

Dies ermöglicht einen Vergleich der relativen Bandenstärken innerhalb eines Blots.

### 3.9 ELISA

Im ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay) werden Peptide oder Proteine mittels enzymgekoppelter Immunreaktionen nachgewiesen. Die Analyse erfolgte im 96-well-Format an sogenannten Maxi-Sorp-Platten (Nunc™) die eine sehr gute Bindungsfähigkeit für Peptide oder Proteine aufweisen. Dabei wurden die Proben zunächst über Nacht inkubiert, um die Proteine an die Plastikoberfläche zu adsorbieren, anschließend erfolgte die Markierung des Antigens mittels spezifischem Primärantikörper, biotinyliertem Sekundärantikörper, sowie Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 405nm nach enzymatischer Dephosphorylierung von p-Nitrophenolphosphat.

#### Durchführung:

Eine 96-Well Platte (Nunc™ Brand Products, MaxiSorb™ Surface) wurde mit je 100µl der Probe oder des Peptid-Standards beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Waschen wurden die Vertiefungen jeweils 3x mit je 200µl Waschpuffer gefüllt, ausgeleert und die restliche Flüssigkeit durch gründliches Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Nach jedem der folgenden Inkubationsschritte wurde ein entsprechender Waschschritt durchgeführt. Es wurden in jede Vertiefung 200µl Blockierungspuffer gegeben und die Platte für 1h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Markierung des Antigens durch Inkubation mit 100µl des Primärantikörpers für 1h bei RT, gefolgt von einer Inkubation für 1h bei RT mit 100µl des biotinylierten Sekundärantikörpers. 100µl des Streptavidin-AP-Konjugats wurden zugegeben und 1h bei RT inkubiert. Die enzymatische Dephosphorylierung des anschließend zugegebenen Nitrophenolphosphat

Chromogens (100µl) wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 405nm am Tristar Luminometer (Berthold) detektiert.

Für die Quantifizierung von HBD-3 wurde eine Standardreihe in bidest. Wasser wie folgt erstellt (für Duplikate; 0-100ng/ml): Die Standardlösung (100ng/µl) wurde hierfür zunächst 1:10 auf 10ng/µl verdünnt.

	1:100	1:1,25	1:2	1:1,34	1:1,5	1:2	1:34	1:1,5	1:2	1:2,5
Zu überführen:	6,5µl	440µl	330µl	448µl	395µl	275µl	336µl	240µl	145µl	84µl
H <sub>2</sub> O:	673,5µl	110µl	330µl	152µl	197,5µl	275µl	114µl	120µl	145µl	136µl
<b>Summe:</b>	<b>650µl</b>	<b>550µl</b>	<b>660µl</b>	<b>600µl</b>	<b>592,5µl</b>	<b>550µl</b>	<b>450µl</b>	<b>360µl</b>	<b>290µl</b>	<b>210µl</b>
Konz.[ng/ml]:	100	80	40	30	20	10	7,5	5	2,5	1

Der **Primärantikörper** wurde 1:500, der **Sekundärantikörper** (goat-anti rabbit-biotinyliert; DAKO) wurde 1:1500 in Ak-Puffer verdünnt. Das **Konjugat** (Streptavidin-AP; Roche) wurde 1:1000 in Ak-Puffer verdünnt. Das **Chromogen** (p-Nitrophenolphosphat wurde durch Lösen einer Tablette in 15ml Detektionspuffer hergestellt.

**Waschpuffer:** 0,05% Tween 20 (1l 1xPBS + 0,5ml Tween 20)

**Blockierungspuffer:** 2% BSA in PBS (2g BSA in 100ml)

**Ak-Puffer:** 0,5% BSA in Waschpuffer (0,5g BSA in 100ml)

**Detektionspuffer:** 3,75g Glycin, 0,1g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,068g ZnCl<sub>2</sub> in 500 ml H<sub>2</sub>O pH:10,4

### 3.10 antimikrobieller Test

Die Fähigkeit von Substanzen das Wachstum von Bakterien zu inhibieren wird mittels antimikrobieller Tests untersucht. Benutzt wurde ein sogenannter CFU-(colony forming unit) Assay, in welchem die Zahl der Bakterien bestimmt wird, die nach Inkubation mit dem zu testenden Agens in der Lage sind auf Agarplatten als Kolonie anzuwachsen. Getestet wurde die antimikrobielle Aktivität von Lysaten primärer humaner Keratinozyten, die zuvor mit bakteriellen Präparationen stimuliert wurden.

Durchführung:

Primäre humane Keratinozyten wurden mit BCM von *S. epidermidis* und *S. aureus* über 24h stimuliert. Die Zellen einer T75 Flasche wurden durch Abkratzen geerntet und mittels hypotoner Lyse in eiskaltem 1:10 verdünnten PBS mit Proteaseinhibitoren (complete Mini; Roche) unter gelegentlichem Vortexen und unter Ultraschalleinwirkung bei 4°C lysiert. Nach Zentrifugation 10min bei 13000rpm wurde der Überstand in eine neues Eppendorf-Gefäß überführt, dessen Proteinkonzentration bestimmt und entweder wurde der Test direkt durchgeführt oder die Proben zunächst bei -20°C eingefroren.

Am Vortag des CFU-Assays wurde je eine über Nacht Kultur von *S. epidermidis* und *S. aureus* in LB-Medium angeimpft und diese ca. 16h bei 37°C im Bakterieneschüttler inkubiert. Ca. 2h vor dem Test wurden die Bakterien im Verhältnis 1:100 in ein neues 5ml LB-Röhrchen überimpft, so dass sich die Bakterien zum Zeitpunkt des Tests in der logarithmischen Wachstumsphase (OD600: 0,2-0,8 befanden).

In 100µl 1:10 verdünntem PBS wurden  $1 \times 10^5$  Bakterien und ein Lysatvolumen, dessen Proteingehalt 20mg entsprach gemischt und für 2h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension verdünnt und auf Blut-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Zahl der gewachsenen Bakterienkolonien ausgezählt

**3.11 Propidiumjodid-Färbung**

Propidiumjodid (PI) ist ein Farbstoff der nach Bindung an die DNA verstärkte Fluoreszenz zeigt, dabei jedoch nicht durch die Zellmembran intakter Zellen hindurchtreten kann. Daher werden nur tote oder geschädigte Zellen angefärbt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt im Durchflußzytometer.

Durchführung:

Behandelte Zellen einer Vertiefung einer 6-well-Platte wurden abtrypsinisiert. Die Zellen im Überstand wurden ebenfalls mittels Zentrifugation gesammelt und mit den abtrypsinisierten Zellen vereinigt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend 30min auf Eis mit 500µl 10µg/ml Propidiumjodid/PBS-Lösung inkubiert, erneut gewaschen und im Durchflusszytometer (LSRII, BD Biosciences) analysiert.

**Excitation: 488 nm, Emission: 575 nm;**

**3.12 Tierversuch: epikutane Besiedlung der Haut mit *S. aureus***

Zur Bestätigung der Zellkulturversuche wurde ein Tiermodell zur epikutanen Besiedlung der Haut mit Bakterien etabliert. Die Versuche wurden sowohl auf unbehandelter Haut mit intakter Barrierefunktion als auch auf leicht und stark verwundeter Haut durchgeführt. Die Versuche fanden im IVF-Bereich des Tierstalls der Tübinger HNO-Klinik in enger Zusammenarbeit mit Dr. Erwin Bohn und Yuliya Skabytska statt (HT2/10).

Durchführung:

Circa 8 Wochen alte C57/Bl6 Mäuse wurden mit Ketanest 100mg/kg und Rompun 5mg/kg für die Behandlung anästhesiert. Während der Betäubung wurde zunächst der Rücken der Mäuse rasiert. Durch mehrmaliges Aufbringen und Abziehen eines Pflasters (Fixomull stretch), dem sogenannten *Tapestripping* wurde die Haut einiger Mäuse leicht verwundet. Es wurde mildes (3x) und starkes (7x) Tapestripping durchgeführt. *S. aureus* SA113-Bakterien sowie weitere *S. aureus* Stämme wurden in einer Bakterienzahl von  $1 \times 10^7$  in 15 µl PBS auf je ein Filterpapierplättchen mit 7mm Durchmesser aufgebracht. Pro Maus wurden mittels eines Epikutantestpflasters (Finn Chambers on Scanpor) zwei Filterplättchen an beiden Seiten des Mausrückens appliziert und dieses schließlich mittels eines 2cm breiten Pflasters (Fixomull stretch) fixiert. 24h nach der Behandlung wurden die Filter aller Behandlungsgruppen entfernt, die behandelten Hautstellen farblich markiert und die Mäuse wurden einzeln in Käfige gesetzt. Die Untersuchungen erfolgten zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten.

Zur Probengewinnung wurden die Mäuse mittels CO<sub>2</sub> getötet. Die behandelten Hautstückchen wurden herausgeschnitten. Von jeder Maus wurden zwei Proben (links und rechts) gewonnen. Die Hälfte eines Hautstückes wurde für die spätere RNA-Isolierung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Hälfte des anderen Hautstückes wurde in TissueTek für Gefrierschnitte eingefroren. Die andere Hälfte jedes Hautstückes wurde für die Bestimmung der Bakterienzahl aufgearbeitet. Dazu wurde das Gewebe zunächst in 1ml PBS gewaschen um oberflächlich anhaftende Bakterien getrennt zu erfassen. Danach wurde das Hautstück in 1ml PBS mittels eines Skalpellts gründlich abgeschabt.

Die durch Waschen bzw. Abschaben erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der gewachsenen Bakterienkolonien (colony forming units: CFU).



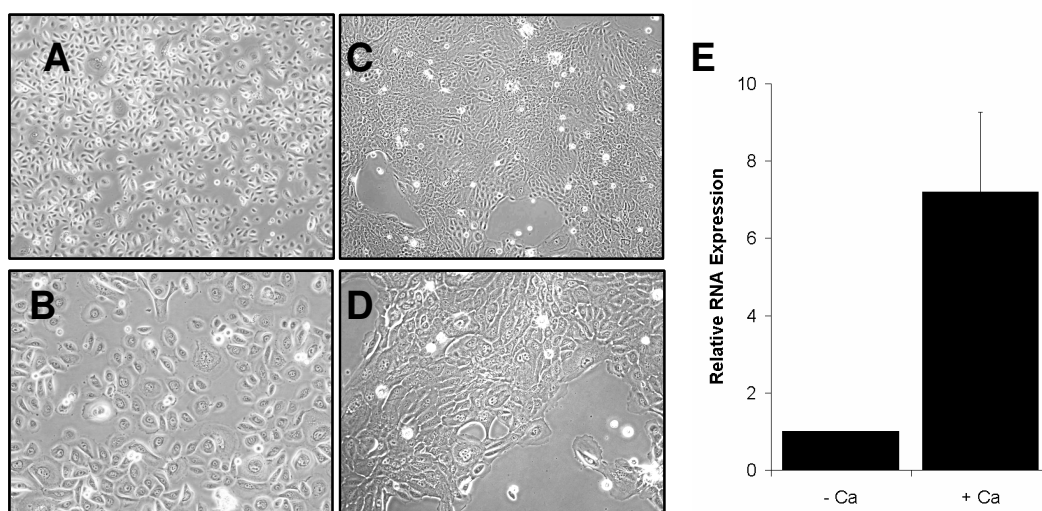
## 4 Ergebnisse

Ziel der Arbeit ist es, Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen der Haut des Menschen und kommensalen und pathogenen Staphylokokken zu finden, welche die differentielle Besiedlung der Haut erklären. Dazu werden humane primäre Keratinozyten in Kultur genommen und Präparationen von *S. epidermidis* und *S. aureus* ausgesetzt. In der Arbeit kommen dabei hauptsächlich die Stämme *S. epidermidis* SE1457 und *S. aureus* SA113 bzw. dessen Protein A defiziente Variante SA113 dSpa zum Einsatz. Nach Ausschluß von toxischen Effekten durch die Behandlung soll der Einfluß der Bakterien auf die Expression antimikrobieller Peptide/Proteine untersucht werden. Weiterführend können dann die involvierten Signalwege im Western-Blot oder durch Blockierungsexperimente mit Rezeptorantikörpern sowie mittels chemischer Inhibition bestimmter Signalwege untersucht werden. Durch Untersuchungen von Wechselwirkungen weiterer kommensaler und pathogener Bakterienstämme mit primären humanen Keratinozyten soll geklärt werden, ob die Ergebnisse allgemeingültig sind. Schließlich soll ein *in vivo* Maus-Modell etabliert werden, mit dessen Hilfe die epikutane Besiedlung der Haut mit Staphylokokken näher untersucht werden kann.

### 4.1 Differenzierung von primären humanen Keratinozyten

In der Epidermis findet ausgehend vom Stratum basale eine Differenzierung der Keratinozyten statt (siehe 1.2.). Die äußersten Zellagen der Epidermis, die auch in direktem Kontakt mit Bakterien kommen können, weisen dabei den höchsten Differenzierungsgrad auf, während weniger differenzierte Keratinozyten weiter innen liegen und vermutlich nur Kontakt mit sezernierten Faktoren der Bakterien haben. Es soll in späteren Versuchen untersucht werden, welche Unterschiede in der Expression und Induktion von AMPs zwischen verschiedenen differenzierten Keratinozyten bestehen, daher sollte zunächst getestet werden, mit welchen Mitteln eine unterschiedliche Differenzierung erreicht werden kann. Primäre humane Keratinozyten, die aus Vorhäuten gewonnen wurden, können durch Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Kulturmedium von 0,15mM auf 1,7mM  $\text{CaCl}_2$  in ein Stadium gebracht werden, das einem höheren Diff-

erenzierungsgrad entspricht. Dabei verändern sich die Zellen sowohl morphologisch als auch in ihrem Expressionsmuster. Abb. 2 A-D zeigt die morphologischen Veränderungen der Zellen. Bei der Differenzierung nimmt die Größe der Zellen ab. Gleichzeitig nimmt die Adhäsion der Zellen untereinander stark zu. Es kommt zur Bildung von Zellclustern. Abb. 2E zeigt die relative Zunahme des RNA-Gehalts an Involucrin, einem Gen welches in differenzierten Keratinozyten vermehrt exprimiert wird. Durch Kultivierung in Medium, welches 1,7mM  $\text{CaCl}_2$  enthält, lassen sich primäre humane Keratinozyten also erfolgreich differenzieren.



### Abb. 2: Differenzierung von humanen primären Keratinozyten

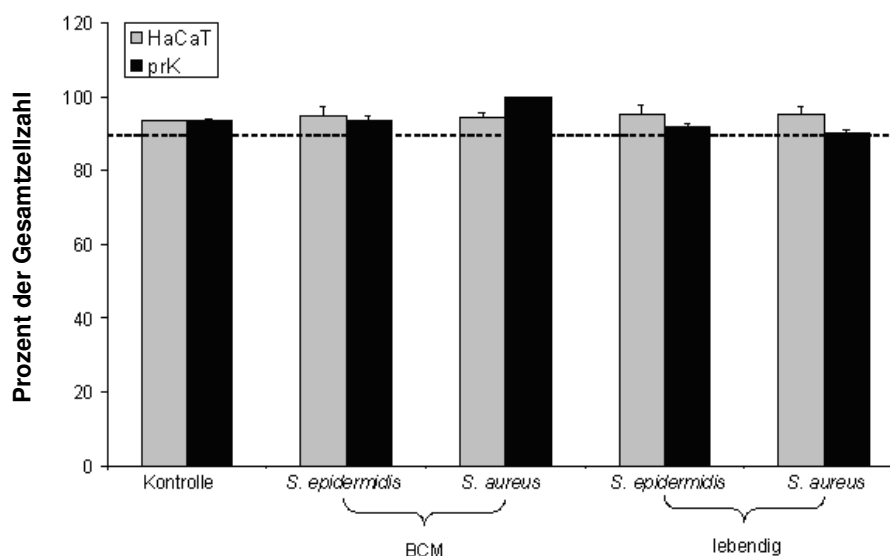
Primäre humane Keratinozyten wurden 48h mit 1,7mM  $\text{CaCl}_2$  behandelt und anschließend wurden **A-D** lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht und **E** die relative RNA Expression von Involucrin bestimmt. **A, B** zeigt die Morphologie undifferenzierter Zellen; **C, D** zeigt die Morphologie differenzierter Zellen. **A,C** Objektiv 10,4; **B,D** Objektiv 40

**E:** Expressionsunterschiede wurden mittels Real-time PCR bestimmt. Als Bezugspunkt wurde die Expression der nicht differenzierten humanen primären Keratinozyten (0,15mM  $\text{CaCl}_2$ ) verwendet und gleich 1 gesetzt

## 4.2 Bestimmung der Toxizität verschiedener Bakterienpräparationen

Primäre humane Keratinozyten oder HaCaT-Zellen wurden durch Dr. Heiko Steffen für 24h mit 1,7mM  $\text{CaCl}_2$  differenziert und anschließend für weitere 24h mit lebendigen *S. epidermidis* oder *S. aureus* Bakterien ( $0,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) oder bakteriell konditionierten Medium (BCM) beider

Staphylokokkenspezies inkubiert. Der Anteil geschädigter Zellen wurde mittels Propidiumjodidfärbung und anschließender durchflußzytometrischer Analyse ermittelt (Abb. 3). Dabei lag der Anteil der gesunden Zellen nach Inkubation mit lebendigen Bakterien oder BCM über 90%. Das Behandlungsschema kann daher für weitere Versuche verwendet werden.



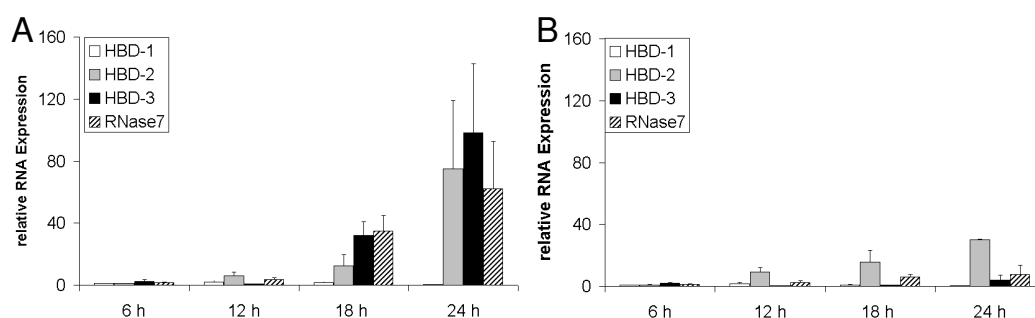
**Abb.3: Zusammenfassung der durchflußzytometrischer Analyse einer Propidiumjodid Färbung für geschädigte Zellen nach 24h Differenzierung mit 1,7mM CaCl<sub>2</sub> und 24h Inkubation mit verschiedenen Bakterienpräparationen.** Gezeigt wird der Anteil der geschädigten Zellen an der Gesamtzellpopulation von HaCaT-Zellen oder differenzierten humanen primären Keratinozyten (prK) nach Behandlung mit lebendigen *S. aureus* SA1113 *dSpa* oder *S. epidermidis* SE1457 Bakterien bzw. deren BCM.

### 4.3 Induktion antimikrobieller Peptide

#### 4.3.1 Zeitverlauf der Induktion antimikrobieller Peptide

Es sollte zunächst die Abhängigkeit der Induktion der RNA Expression verschiedener antimikrobieller Peptide (AMPs) von der Zeit untersucht werden. Dafür wurden humane primäre Keratinozyten für 24h mit 1,7mM CaCl<sub>2</sub> differenziert und anschließend bis zu 24h mit lebendigen *S. epidermidis* oder *S. aureus* Bakterien inkubiert. Die RNA Expression von HBD-1, HBD-2, HBD-3 und RNase7 wurde zum jeweiligen Zeitpunkt mittels Real-time PCR analysiert. Bereits nach 18h wurde eine Zunahme der RNA Expression von HBD-2, HBD-3 und RNase7 registriert, welche sich im Beobachtungszeitraum von 24h weiter verstärkte. Während die HBD-2

RNA Expression sowohl von *S. epidermidis* als auch von *S. aureus* Bakterien induziert wurde, zeigten HBD-3 und RNase7 eine differentielle Expression. So löste *S. aureus* eine starke Erhöhung des HBD-3 und RNase7 RNA Gehalts der Keratinozyten aus, während nach Inkubation mit *S. epidermidis* nur eine schwache Induktion zu verzeichnen war. Die Expression von HBD-1 wurde von beiden Staphylokokkenspezies nicht beeinflusst (Abb. 4)



**Abb. 4: Zeitverlauf der RNA-Expression der angegebenen AMPs**

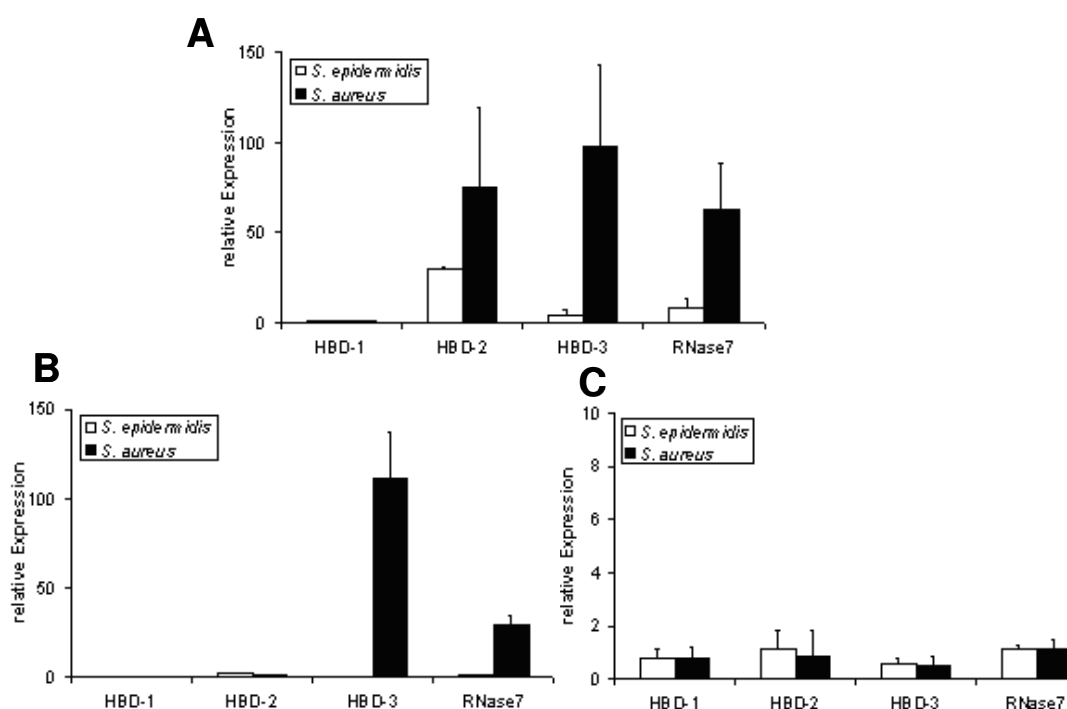
Die Abhängigkeit der RNA Expression von HBD-1, HBD-2, HBD-3 und RNase7 in differenzierten primären humanen Keratinozyten von der Zeit bei Inkubation mit lebendigen **A: SE1457 B: SA113 dSpa**. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Unbehandelte humane primäre Keratinozyten des jeweiligen Zeitpunktes wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich1 gesetzt.

#### 4.3.2 Abhängigkeit der Induktion antimikrobieller Peptide von verschiedenen bakteriellen Komponenten

Um zu untersuchen, ob Komponenten der bakteriellen Zellhülle oder sezernierte Faktoren der Bakterien für die Induktion antimikrobieller Peptide verantwortlich sind, wurden lebendige und hitzeinaktivierte Bakterien sowie bakteriell konditioniertes Medium (BCM) für 24h mit differenzierten humanen primären Keratinozyten koinkubiert. Während lebendige Bakterien, insbesondere des *S. aureus* Stamms SA113 dSpa, den RNA Gehalt der Keratinozyten an HBD-2, HBD-3 und RNase7 erhöhten (Abb 5A), zeigte das bakteriell konditionierte Medium (BCM) keine Wirkung auf die HBD-2 Expression. Hingegen wurde die Expression von HBD-3 und RNase7 vom *S. aureus* BCM deutlich induziert (Abb 5B). Somit ist für die Induktion von HBD-2 ein direkter Bakterienkontakt notwendig, während für die Induktion von HBD-3 und RNase7 die Einwirkung löslicher Faktoren

aus dem BCM bereits ausreichend ist. Lebendige Bakterien und BCM führten zu differentiellen Expressionsänderungen von HBD-3 und RNase7. Die Behandlung mit *S. epidermidis* führte dabei nur zu geringer, die Behandlung mit *S. aureus* hingegen zu einer starken Expression beider Gene.

Hitzeinaktivierte Bakterien hatten keinerlei Einfluss auf die RNA Konzentrationen der getesteten antimikrobiellen Peptide (Abb. 5C). Der negative Ausgang der Behandlung mit hitzeinaktivierten Bakterien könnte einerseits dafür sprechen, dass der Bakterienkontakt allein für eine Induktion der AMP nicht ausreicht, andererseits könnte es durch die Hitzeinaktivierung auch zu einer Veränderung der bakteriellen Oberflächenmoleküle gekommen sein, so dass eine Aktivierung der Keratinozyten nicht mehr möglich war.

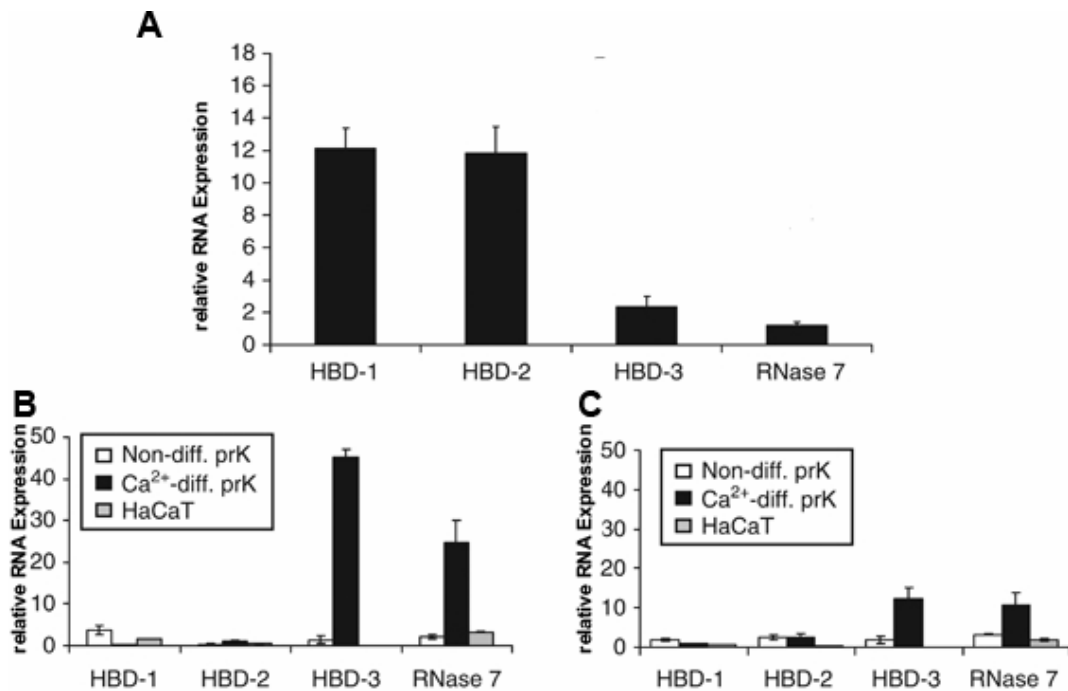


**Abb. 5: Abhängigkeit der RNA-Expression der angegebenen AMPs von verschiedenen bakteriellen Komponenten.** Differenzierte humane primäre Keratinozyten wurden 24h mit *S. epidermidis* SE1457 oder *S. aureus* SA113 dSpa Präparationen behandelt. **A** lebendige Bakterien; **B** BCM, **C** hitzeinaktivierte Bakterien: Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Unbehandelte humane primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich 1 gesetzt.

### 4.3.3 Abhängigkeit der Induktion antimikrobieller Peptide vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten

Zunächst wurde der Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Differenzierung auf die Basalexpression antimikrobieller Peptide untersucht. Dabei zeigte sich nach 48h Behandlungszeit mit 1,7mM  $\text{CaCl}_2$  eine um etwa 10-fach verstärkte RNA Expression von HBD-1 und HBD-2, während für HBD-3 und RNase7 nur eine schwache Induktion nachweisbar war (Abb. 6A).

Des Weiteren wurde der Einfluss des Differenzierungsgrades der Keratinozyten auf die bakterieninduzierte Erhöhung des RNA-Expressionsniveaus der AMPs untersucht. Dazu wurden undifferenzierte, durch Calcium differenzierte primäre humane Keratinozyten und die Zelllinie HaCaT für 24h mit BCM von *S. epidermidis* SE1457 (Abb.6C) oder *S. aureus* SA113 dSpa (Abb.6B) behandelt. Der Vergleich der relativen RNA-Expression der verschiedenen Keratinozyten in Abb. 6B und 6C zeigt, dass eine deutliche Induktion der RNA-Expression von HBD-3 und RNase7 nur in den differenzierten primären Keratinozyten zu finden war, während undifferenzierte und HaCaT Zellen nur eine sehr schwache Reaktion auf die Behandlung mit BCM zeigten (Abb. 6B und C).



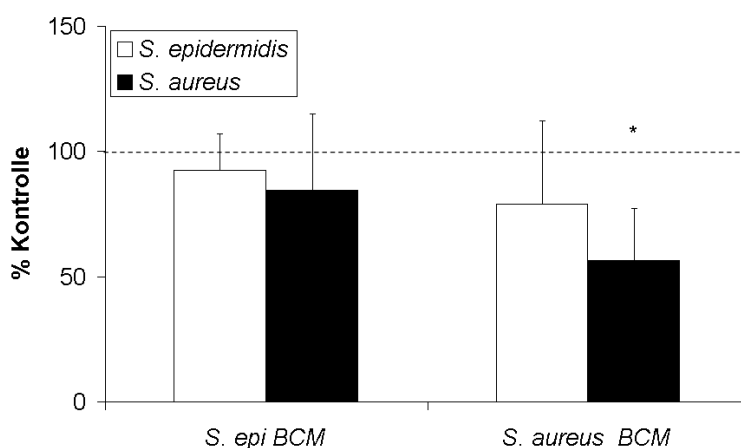
**Abb. 6: Einfluss des Differenzierungsgrades auf die RNA-Expression der angegebenen AMPs in humanen Keratinozyten:**

**A:** 48h Inkubation mit 1,7mM Calcium: Einfluss auf die Expression der gezeigten AMPs in primären humanen Keratinozyten. Humane primäre Keratinozyten, die ohne zusätzliches Calcium kultiviert wurden dienten als Bezugspunkt und wurden gleich 1 gesetzt.

**B-C:** Einfluss von 24h Inkubation mit *SA 113 dSpa* BCM (**B**) bzw. *SE1457* BCM (**C**) auf die RNA-Expression der angegebenen AMPs in nicht differenzierten (non-diff. prK), Calcium differenzierten primären Keratinozyten (Ca<sup>2+</sup>-diff prK) oder HaCaT-Zellen. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Unbehandelte Kontrollen der jeweiligen Zellpopulation wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich 1 gesetzt.

#### 4.4 *S. aureus*, aber nicht *S. epidermidis*, induziert in Keratinozyten eine antimikrobielle Antwort, die gegen sich selbst gerichtet ist

Die Frage, ob die differentielle Induktion der AMPs HBD-3 und RNase7 durch BCM von *S. aureus* oder *S. epidermidis* zu einer funktionellen Verbesserung der Abwehrleistung der Keratinozyten führt, wurde mittels eines „CFU-Assays“ (Colony forming units) untersucht. Hierfür wurden Lysate der mit BCM vorbehandelten Zellen mit den jeweiligen Bakterien für 2h inkubiert und anschließend die Zahl der koloniebildenden Bakterien ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die Behandlung mit *S. epidermidis* BCM nicht zu einer signifikanten Verbesserung der antimikrobiellen Kompetenz der Keratinozyten führte. *S. aureus* BCM hingegen induziert eine Keratinozytenantwort, die dazu führt, dass die CFU der *S. aureus* Bakterien vermindert wurde. Interessant ist hierbei auch, dass *S. epidermidis* Bakterien deutlich resistenter gegen die mit *S. aureus* BCM behandelten Keratinozytenlysate sind (Abb. 7). Ob die Verminderung der koloniebildenden *S. aureus* Bakterien ausschließlich auf die Induktion von HBD-3 und RNase7 zurückzuführen ist, konnte in diesem Ansatz nicht geklärt werden.



**Abb. 7: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität differenzierter humaner primärer Keratinozyten mittels des CFU Assays.** Differenzierte primäre humane Keratinozyten wurden 24h mit BCM von *S. epidermidis* SE1457 (*S. epi BCM*) oder BCM von *S. aureus* SA113 dSpa (*S. aureus BCM*) behandelt. Deren Lysate wurden 2h mit *S. aureus* SA113 dSpa und *S. epidermidis* SE1457 inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der koloniebildenden Bakterien auf einer Blutagarplatte ermittelt (CFU). Die CFU-Anzahl der Lysate der unbehandelten Zellen wurde als Bezugspunkt gewählt und gleich 100 Prozent gesetzt.



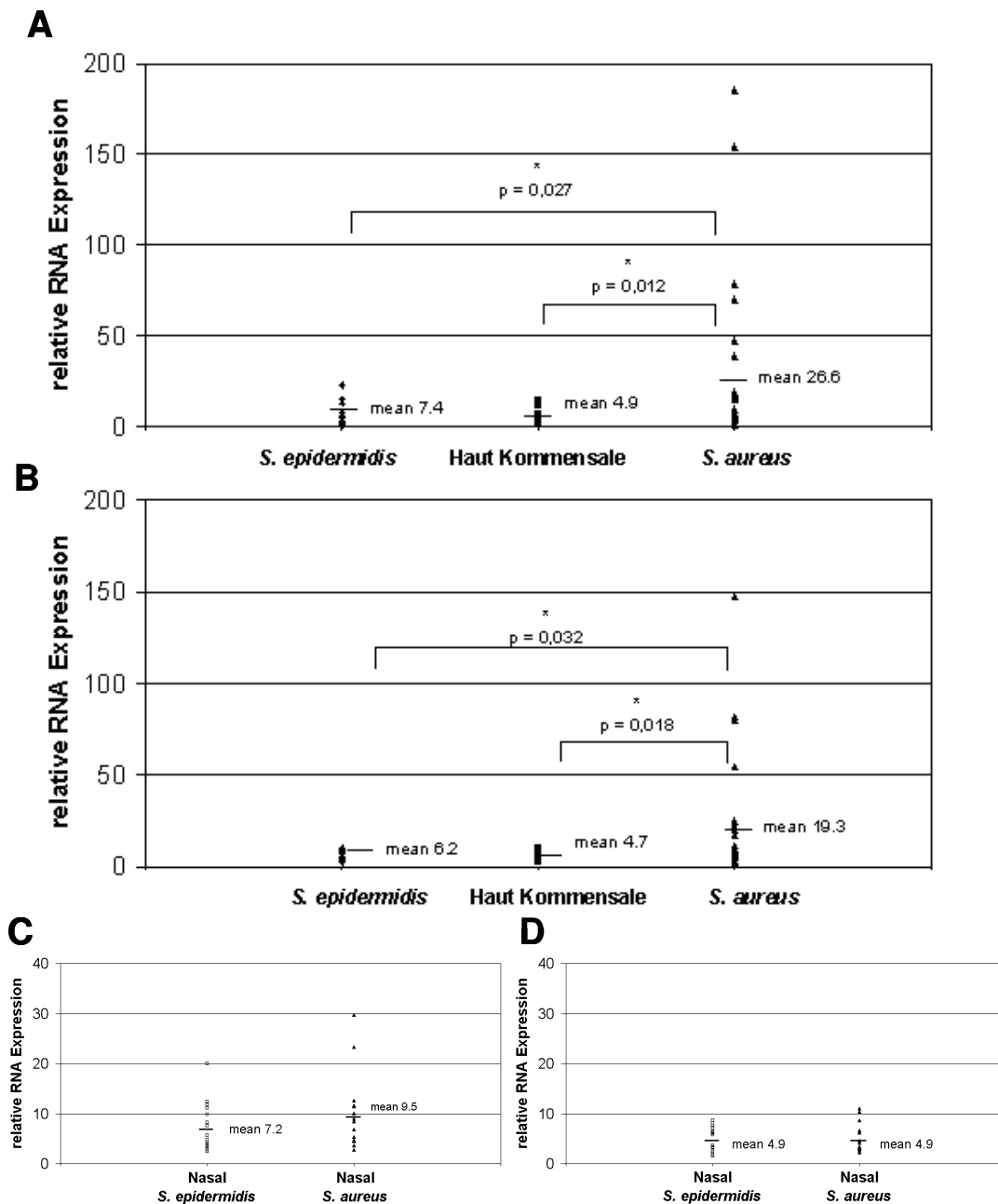
#### 4.5 Einfluss verschiedener Bakterienstämme auf die Induktion antimikrobieller Peptide

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit den beiden Laborstämmen *S. epidermidis* SE1457 und *S. aureus* SA1113 durchgeführt. Um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse auf weitere Bakterienstämme übertragen lassen, es sich also um eine allgemeingültige Beobachtung handelt, wurden verschiedene Bakterienstämme, bezüglich ihrer Fähigkeit, die RNA Expression von HBD-3 und RNase7 zu erhöhen, untersucht.

Zunächst wurden differenzierte humane primäre Keratinozyten mit BCM von 11 *S. epidermidis* Stämmen aus der Nase und 12 Hautisolaten von gesunden Spendern sowie mit 29 *S. aureus* Stämmen, die entweder von Patienten mit atopischer Dermatitis stammen oder etablierte Laborstämmen darstellen, behandelt. Wie in Abb. 8A und B zu sehen ist, lösten einige *S. aureus* Stämme eine stark erhöhte AMP Antwort aus, während die *S. epidermidis* Stämme und andere kommensale Bakterien der Haut durchgängig nur eine relative schwache AMP-Induktion hervorriefen.

Des Weiteren wurden in Kooperation mit Bernhard Krismer (Med. Mikrobiologie Tübingen) aus Nasenabstrichen gesunder Probanden 16 *S. epidermidis*/*S. aureus* Paare jeweils derselben Person isoliert und ebenfalls analysiert. Diese klinisch unauffälligen *S. epidermidis* und *S. aureus* Isolate bewirkten nur ähnlich geringe Änderungen der RNA Expression wie die bereits analysierten kommensalen Bakterien (Abb. 8C, D).

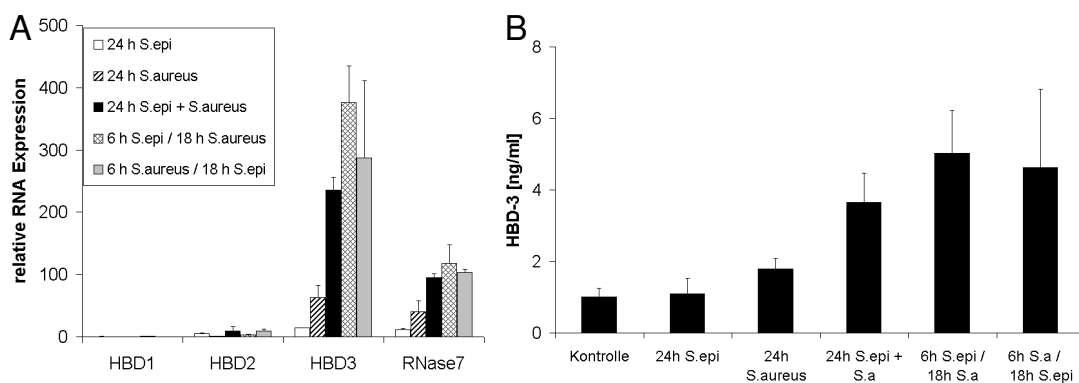
Es konnte daher festgestellt werden, dass es sich bei den *S. aureus* Stämmen, die eine verstärkte AMP Antwort hervorriefen, um Stämme handelte, die mit klinischen Symptomen assoziiert waren (Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis) oder etablierte Laborstämmen waren. Hingegen konnten die Staphylokokken Stämme, die symptomlos Nase oder Haut kolonisierten, keine deutliche Induktion von AMPs induzieren.



**Abb. 8: Einfluss unterschiedlicher Bakterienstämme auf die RNA Expression der angegebenen AMPs.** Differenzierte primäre humane Keratinozyten wurden 24h mit BCM verschiedener Staphylokokkenstämmen behandelt. **A, B:** Es wurden 11 *S. epidermidis* Nasisolate, 12 Hautisolate von gesunden Spendern sowie 29 *S. aureus* Stämme (Laborstämmen, oder von Atopikern) getestet. **C, D:** Es wurden 16 *S. epidermidis* / *S. aureus* Nasisolat-Paare gesunder Probanden getestet. Gezeigt wird in **A, C** die HBD-3- und in **B, D** die RNase7 RNA-Expression. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Unbehandelte humane primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich 1 gesetzt.

#### 4.6 *S. epidermidis* amplifiziert die AMP Antwort gegen *S. aureus*

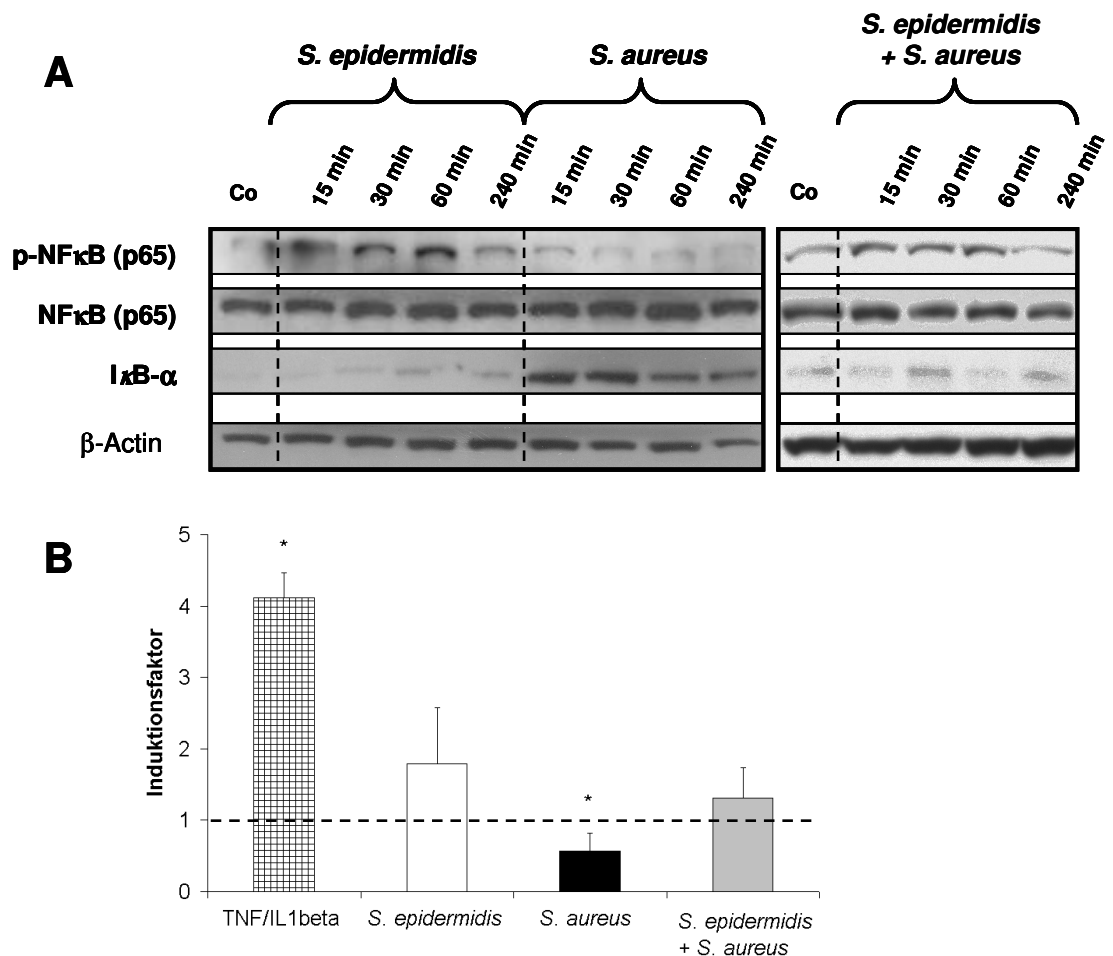
Um die *in vivo* Situation einer gesunden Haut nachzustellen, wurden differenzierte humane primäre Keratinozyten gleichzeitig oder sequentiell mit BCM von *S. epidermidis* und *S. aureus* behandelt. Die Ergebnisse in Abb. 9A zeigen, dass eine Kombinationsbehandlung, im Vergleich mit *S. aureus* BCM allein, zu einer weiteren Verstärkung der HBD-3 und RNase7 RNA-Expression führte. Der stärkste Effekt wurde bei einer sequentiellen Behandlung mit 6h *S. epidermidis*, gefolgt von 18h *S. aureus* gefunden. Es konnte also eine Amplifikation der AMP Antwort durch *S. epidermidis* sezernierte Faktoren nachgewiesen werden. Am Beispiel von HBD-3 wurde in Abb. 9B gezeigt, dass der erhöhte RNA-Gehalt der Keratinozyten sich auch auf der Proteinebene, im Peptidgehalt des Zellkulturüberstandes, widerspiegelt. Es kam also nicht nur zur Induktion der RNA Expression, sondern auch zu verstärkter Sekretion von HBD-3 aus den Zellen.



**Abb. 9: Einfluss der Kombination von *S. aureus* mit *S. epidermidis* auf die RNA Expression und Proteinsekretion von AMPs.** Differenzierte primäre Keratinozyten wurden einzeln, sequentiell oder gleichzeitig mit BCM von *S. aureus* SA113 *dSpa* und *S. epidermidis* SE1457 behandelt. Gezeigt wird in **A**: die RNA-Expression der genannten AMPs nach insgesamt 24h und in **B** die HBD-3 Peptidsekretion. **A**: Unbehandelte humane primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich 1 gesetzt. **B**: Der Peptidgehalt wurde anhand einer HBD-3 Peptid-Standardkurve mittels ELISA ermittelt.

#### 4.7 Einfluss von Staphylokokken auf den NF $\kappa$ B Signalweg

Differenzierte humane primäre Keratinozyten wurden 15min bis 4h mit konditioniertem Medium von *S. epidermidis*, *S. aureus* oder einer Kombination von beiden Medien behandelt. Western Blot Analysen (Abb. 10A) zeigten, dass *S. epidermidis* BCM in der Lage war, NF $\kappa$ B (p65) zu phosphorylieren, während bei Behandlung mit *S. aureus* BCM keine NF $\kappa$ B Phosphorylierung zu beobachten war. Stattdessen führten sezernierte Faktoren von *S. aureus* zu einer verstärkten Proteinexpression von I $\kappa$ B. In Zellen, die mit der Kombination beider BCMs behandelt wurden, fand man zwar nur eine sehr schwache Phosphorylierung von NF $\kappa$ B(p65), die *S. aureus* abhängige I $\kappa$ B Induktion wurde hier jedoch durch *S. epidermidis* aufgehoben. Analysen eines NF $\kappa$ B-abhängigen Reportergens zeigten, dass die NF $\kappa$ B-abhängige Transkriptionsrate durch *S. epidermidis* sezernierte Faktoren leicht anstieg, während sie durch BCM von *S. aureus* signifikant verringert wurde. In der Doppelbehandlung wiesen die Keratinozyten jedoch wieder eine leicht erhöhte Reporter-genaktivität auf (Abb 10B). Die Reportergenanalyse spiegelte somit die im Western Blot auf Proteinebene gefundenen Veränderungen im NF $\kappa$ B Signalweg wieder. Die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von NF $\kappa$ B durch *S. aureus* wurde also durch *S. epidermidis* aufgehoben. Vermutlich beruht dieser Effekt darauf, dass in der Doppelbehandlung keine I $\kappa$ B Induktion mehr zu beobachten war.

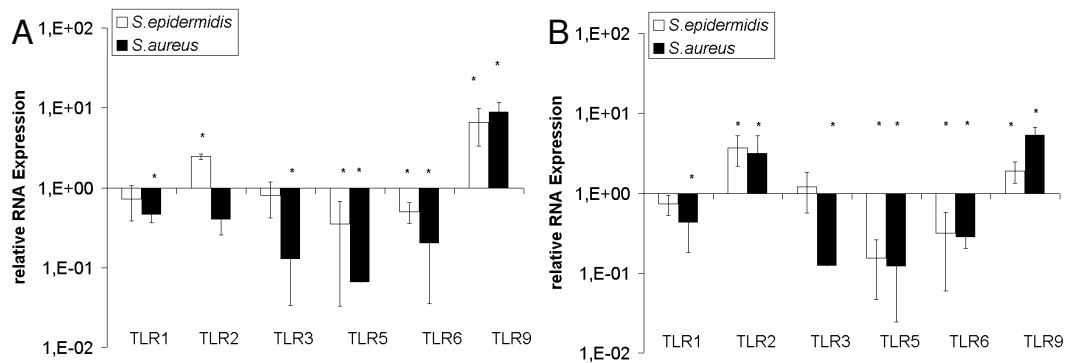


**Abb. 10: Einfluss von *S. aureus* und *S. epidermidis* BCM auf den NFκB Signalweg:**

**A:** Eine Western Blot Analyse zeigt die Phosphorylierung von NFκB (p-NFκB) und den Proteingehalt des NFκB Inhibitors IκB nach Behandlung differenzierter humaner primärer Keratinozyten mit BCM von *S. aureus* SA113 dSpa, *S. epidermidis* SE1457 oder einer Kombination beider Staphylokokkenstämme. (Die Einzelbehandlungen, nicht aber die Doppelbehandlungen wurden von Christina Christ durchgeführt) **B:** Dual Luciferase Assay: NFκB abhängige Reporter genanalyse. Gezeigt wird die Beeinflussung der Reporter genaktivität (firefly/renilla Luciferase) nach 24h Inkubation mit BCM von *S. aureus* SA113 dSpa, *S. epidermidis* SE1457 oder einer Kombination beider Staphylokokkenstämme. Transfizierte, unbehandelte humane primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und deren Luciferaseaktivität gleich 1 gesetzt (von Christina Christ durchgeführt).

#### 4.8 Expression von Toll-like Rezeptoren

Die RNA Expression der Toll-like Rezeptoren (TLR) 1, 2, 3, 5, 6 und 9 wurde mittels Real-time PCR analysiert. Dabei wurden humane primäre Keratinozyten entweder mit BCM von *S. epidermidis* oder *S. aureus* (Abb. 11A) oder mit lebendigen Bakterien beider Staphylokokkenstämme (Abb. 11B) behandelt. TLR-5, und -6 wiesen nach Behandlung mit beiden Bakterienpräparationen jeweils verminderte RNA Expressionslevel auf, wobei keine Unterschiede zwischen *S. epidermidis* und *S. aureus* zu erkennen waren (Abb. 11A, B). Die TLR-1 RNA Expression wurde durch *S. aureus* jeweils leicht vermindert (Abb. 11A, B). Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Staphylokokkenstämmen konnte jedoch nicht ermittelt werden. Eine differentielle RNA-Expression wurde hingegen bei TLR-3 beobachtet. Hier fand man jeweils einen sehr stark verminderten RNA Gehalt der Keratinozyten nach *S. aureus* Behandlung, während unter der Behandlung mit *S. epidermidis* kaum Veränderungen beobachtet wurden. Die Untersuchung der RNA Expression von TLR-9 zeigte, dass beide Staphylokokkenstämme induzierend wirkten. Die lebendigen Bakterien führten zu einem signifikanten Unterschied der TLR-9 RNA-Expression zwischen *S. epidermidis* und *S. aureus* behandelten Keratinozyten. Man fand hingegen keine signifikanten TLR-9 Expressionsunterschiede bei Behandlung mit BCM. Am interessantesten sind die Ergebnisse bezüglich TLR2. Hier wurde durch die Behandlung mit BCM eine gegensätzliche Regulation gefunden. *S. epidermidis* induzierte die RNA Expression leicht, während *S. aureus* die TLR2 RNA Expression der Zellen hemmte. Im Gegensatz dazu wurde unter der Behandlung der Keratinozyten mit lebendigen Bakterien eine leicht erhöhte TLR2 RNA Expression durch beide Staphylokokkenstämmen detektiert (Abb. 11).



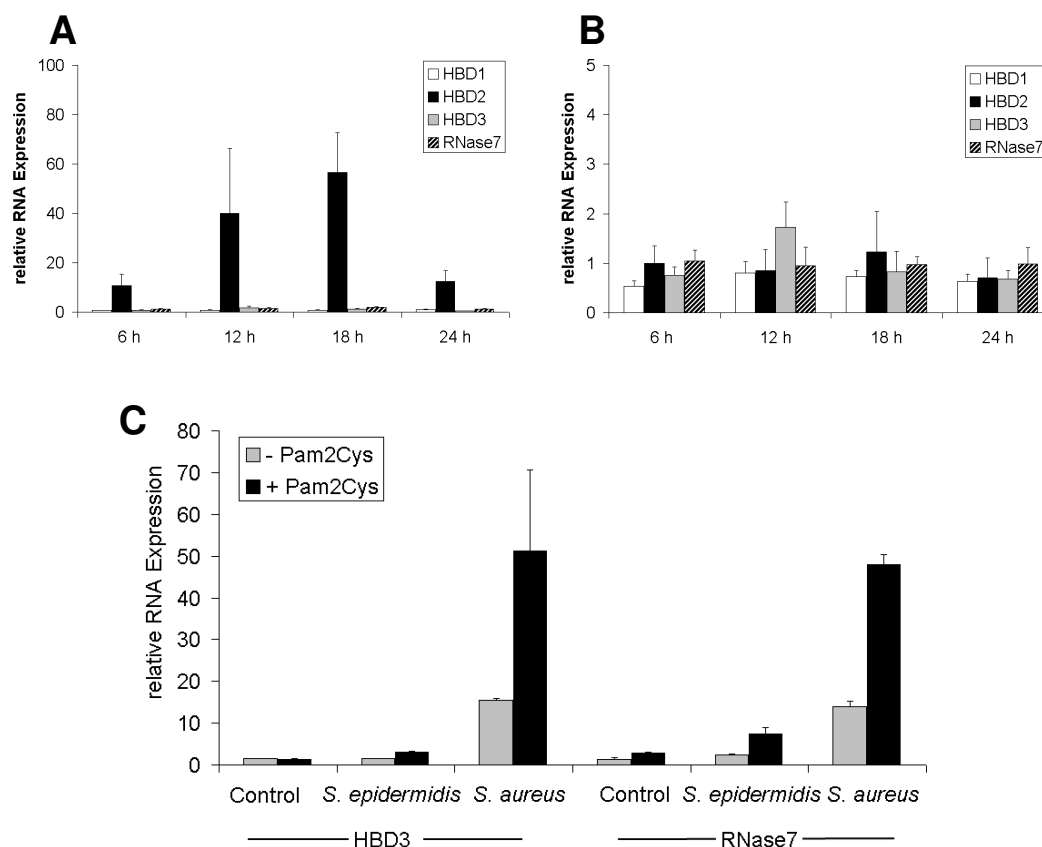
**Abb. 11: RNA Expression von TLR unter Behandlung mit *S.epidermidis* und *S. aureus***

Differenzierte humane primäre Keratinozyten wurden (A) mit BCM oder (B) mit lebendigen *S. epidermidis* SE1457 oder *S. aureus* SA113 *dSpa* Bakterien inkubiert. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Unbehandelte humane primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und deren Expression gleich 1 gesetzt.

#### 4.9 Einfluss des TLR2/NFκB- und EGFR Signalwegs

##### 4.9.1 Stimulation von TLR2 mit synthetischen Lipopeptiden

Für die Stimulation der entsprechenden Rezeptoren wurde Pam2Cys als Agonist des TLR2/TLR-6 und Pam3Cys als Agonist des TLR2/TLR-1 heterodimeren Rezeptors eingesetzt. Abb. 12A und B zeigen den zeitlichen Verlauf der AMP RNA Expression in differenzierten primären humanen Keratinozyten unter der Behandlung mit beiden Rezeptoragonisten. Pam2Cys konnte eine Erhöhung der HBD-2 RNA-Expression hervorrufen, während Pam3Cys keinerlei Einfluss auf die AMP Expression zeigte. Obwohl Pam2Cys allein nicht in der Lage war die HBD-3 oder RNase7 RNA Expression zu erhöhen, führte die Kombination mit BCM von *S. epidermidis* und *S. aureus* zu einer deutlichen Steigerung der Induktion dieser beiden Gene. Somit war die Aktivierung des TLR2 Signalwegs am TLR2/TLR-6 Heterodimer ausreichend, um HBD-2 zu induzieren, während für die Induktion von HBD-3 und RNase7 zusätzliche bakterielle Signale erforderlich waren.



**Abb. 12: Einfluss von synthetischen Lipopeptiden auf die RNA Expression antimikrobieller Peptide.**

Differenzierte humane primäre Keratinozyten wurden zeitabhängig mit jeweils 100 ng/ml der TLR2 Liganden **(A)** Pam2Cys oder **(B)** Pam3Cys inkubiert. **C:** Differenzierte humane primäre Keratinozyten wurden mit *S. epidermidis* BCM und *S. aureus* BCM behandelt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 100 ng/ml Pam2Cys. **A-C:** Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Unbehandelte humane primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und deren Expression gleich 1 gesetzt.

#### 4.9.2 Blockierung des TLR2/NF $\kappa$ B- und des EGFR-Signalwegs

Der Einfluss des TLR2/NF $\kappa$ B- bzw. EGF-Rezeptor-Signalwegs auf die differenzielle Expression von HBD-3 und RNase7 durch BCM von *S. epidermidis* und *S. aureus* sollte im Folgenden untersucht werden. Dazu wurden zunächst die entsprechenden Signalwege stimuliert und die AMP Antwort in differenzierten humanen Keratinozyten analysiert. Die Behandlung mit dem TLR2/-6 Rezeptor Agonist Pam2Cys führte, wie bereits in Abb. 12 gezeigt, zur Induktion der RNA-Expression von HBD-2, während HBD-3



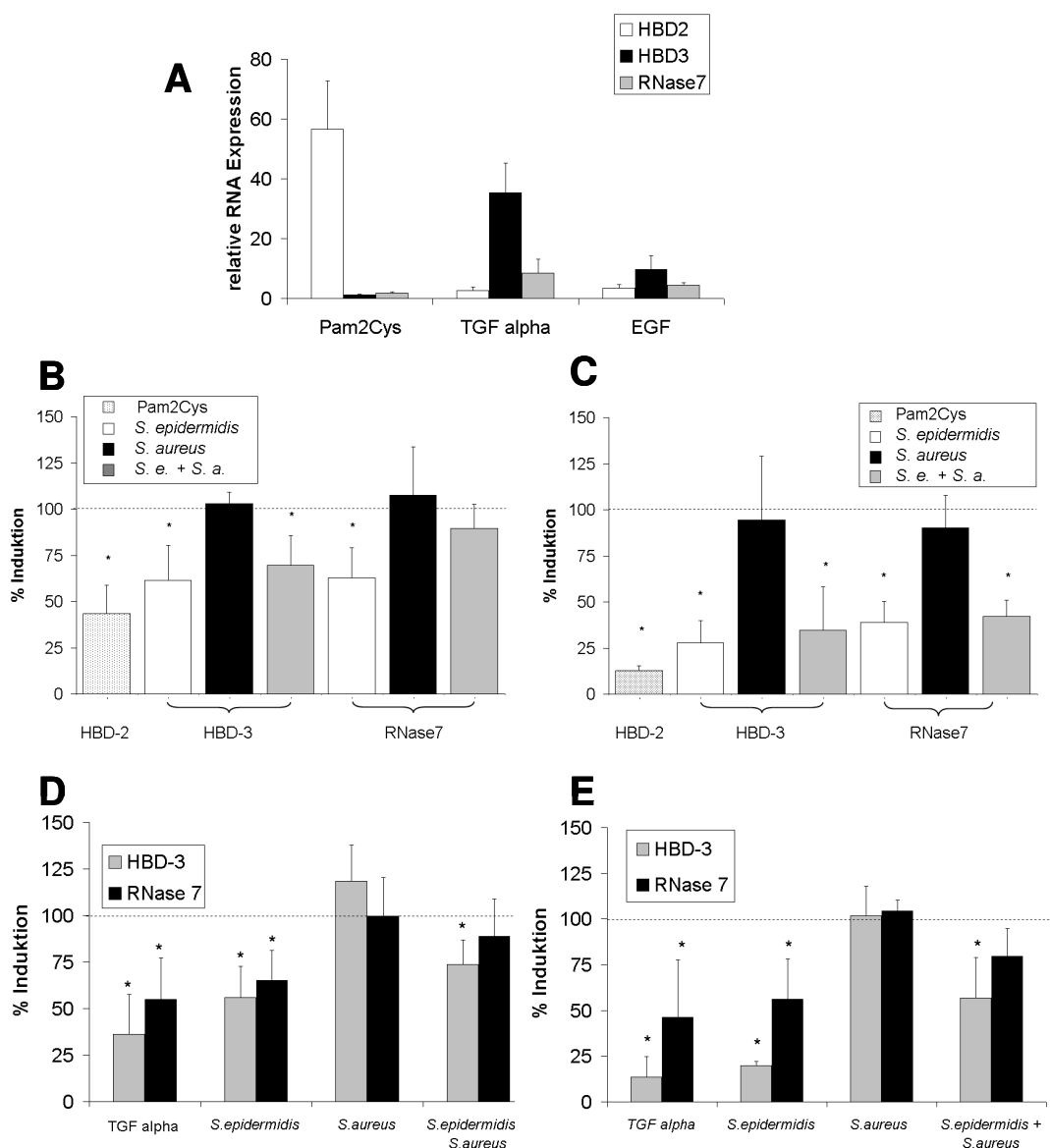
und RNase7 kaum beeinflusst wurden. Bei Aktivierung des EGF-Rezeptors mit EGF oder TGF-alpha konnte man hingegen eine Erhöhung der RNA Expression von HBD-3 und RNase7 beobachten, während der Gehalt der Zellen an HBD-2 RNA kaum verändert wurde (Abb. 13A). Die Pam2Cys abhängige HBD-2 Antwort sowie die Induktion von HBD-3 und RNase7 durch TGF-alpha wurden in den folgenden Versuchen als Kontrolle verwendet (Abb. 13B-E).

In Abb. 13B-E ist zu beachten, dass die BCM induzierte Induktion der RNA Expression des jeweiligen antimikrobiellen Peptides als Bezugspunkt gewählt und auf 100 Prozent gesetzt wurde. Die *S. epidermidis* abhängige Induktion der RNA Expression war jedoch immer deutlich schwächer als die von *S. aureus* oder durch die Kombinationsbehandlung verursachten Steigerungen der RNA Expressionslevel. Abb. 13B zeigt den Einfluss eines TLR2 blockierenden Antikörpers auf die Induktion der antimikrobiellen Peptide HBD-3 und RNase7 durch BCM von *S. epidermidis*, *S. aureus* oder einer Kombination aus beiden. Das Ergebnis ist insofern sehr interessant, als man eine TLR2 Abhängigkeit der AMP Antwort bei *S. epidermidis* (61% der HBD3-Induktion) und der Kombinationsbehandlung (63% der HBD-3-Induktion) nicht aber bei *S. aureus* BCM beobachten konnte. Die Pam2Cys abhängige HBD-2 Induktion war mit dem TLR2 blockierenden Antikörper gut inhibierbar (Abb. 13B).

Abb. 13C zeigt die Abhängigkeit der Induktion der antimikrobiellen Peptide HBD-3 und RNase7 in differenzierten humanen Keratinozyten vom NFκB-Signalweg. Dazu wurden die Zellen parallel mit BCM von *S. epidermidis* oder *S. aureus* oder einer Kombination aus beiden und dem NFκB-Inhibitor Celastrol behandelt. Es wurden der Blockierung des TLR2 ähnliche, jedoch stärker ausgeprägte Effekte auf die AMP Expression gefunden. Die *S. epidermidis* BCM (28% der HBD-3 Induktion) sowie die kombinationsbehandlungsabhängige (34% der HBD-3 Induktion) Induktion von HBD-3 und RNase7 konnte deutlich gehemmt werden, während die *S. aureus* BCM abhängige Induktion beider AMPs nicht beeinflussbar war. Die Hemmung des NFκB-Signalwegs mit Celastrol führte ebenfalls zu einer deutlichen Verminderung der HBD-2 RNA-Expression, die durch Pam2Cys induziert wurde (Abb. 13C).

Der Einfluss des EGFR-Signalwegs auf die differentielle Expression von HBD-3 und RNase7 wurde mit Hilfe eines EGFR blockierenden Antikörpers (Abb. 13D) und Gefitinib, einem Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors (Abb. 13E) untersucht. Dabei konnte anhand der Inhibition der durch TGF- $\alpha$  ausgelösten Induktion der RNA Expression von HBD-3 und RNase 7 zunächst die Wirksamkeit beider Agenzien bestätigt werden. Die Induktion der RNA Expression von HBD-3 und RNase7 durch *S. epidermidis* BCM (20% der HBD-3 Induktion) oder die Kombinationsbehandlung (56% der HBD-3 Induktion) konnte durch beide Agenzien gehemmt werden, während die *S. aureus* BCM abhängige AMP Antwort nicht beeinflusst wurde. Die Blockierung mittels des EGFR Antikörpers erwies sich als etwas weniger effektiv als die chemische Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die durch sezernierte Faktoren von *S. epidermidis* ausgelöste Induktion der RNA Expression von HBD-3 und RNase7 sowohl TLR2/NF $\kappa$ B abhängig, als auch EGFR abhängig ist, während die durch *S. aureus* vermittelte antimikrobielle Antwort unabhängig von diesen Signalwegen induziert wird. Daher muss *S. aureus* Faktoren sezernieren, die über die Aktivierung anderer Signalwege zur Induktion der RNA Expression von HBD-3 und RNase beitragen. In der Kombinationsbehandlung der sezernierten Faktoren beider Staphylokokken können dann sowohl die bekannten TLR2/NF $\kappa$ B, EGFR-Signalwege, als auch die bisher unbekanntes Signalwege zur AMP Induktion beitragen.

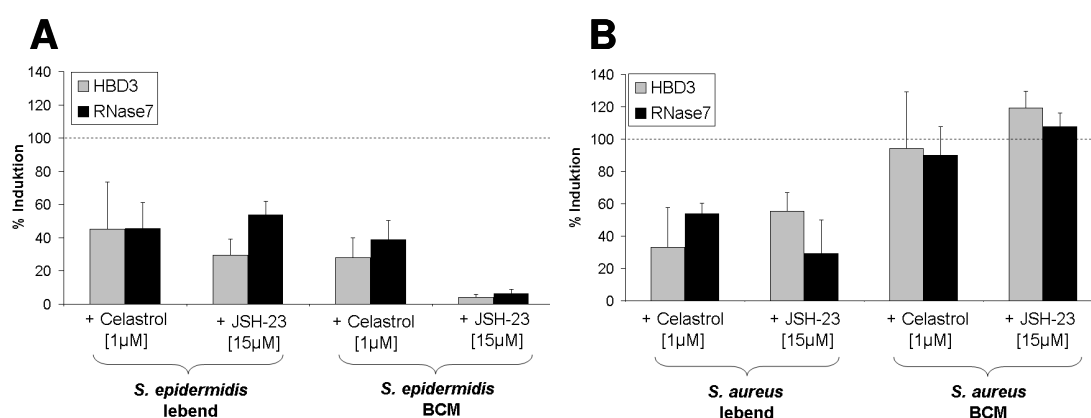


**Abb. 13: Einfluss des TLR2/NFκB- und des EGFR-Signalwegs auf die AMP Induktion**

Differenzierte humane primäre Keratinozyten wurden **A** mit Pam2Cys, TGFalpha oder EGF behandelt. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Unbehandelte humane primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich 1 gesetzt.

**B-E** Gezeigt sind Blockadeexperimente mit differenzierten humanen primären Keratinozyten die mit BCM von *S. epidermidis* SE1457, *S. aureus* SA113 dSpa oder einer Kombination behandelt wurden. Blockierung mit **B**: TLR2 Rezeptor Antikörper, **C**: NFκB Inhibitor Celastrol, **D** EGFR blockierenden Antikörper und **E**, Gefitinib als Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. BCM behandelte primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich 100 Prozent gesetzt.

Abb. 14 zeigt den Einfluss des NF $\kappa$ B-Signalweges auf die Induktion der RNA Expression von HBD-3 und RNase7 durch *S. epidermidis* und *S. aureus*. Die durch lebendige Bakterien und BCM von *S. epidermidis* vermittelte AMP Induktion war durch die beiden NF $\kappa$ B-Inhibitoren Celastrol und JSH-23 hemmbar (Abb. 14A). Im Gegensatz dazu konnte ein Einfluss der beiden NF $\kappa$ B Inhibitoren auf die *S. aureus* vermittelte Induktion der HBD-3 und RNase7 RNA Expression nur bei der Behandlung mit lebendigen Bakterien, nicht aber bei Inkubation mit BCM beobachtet werden (Abb. 14B). Daher sind Untersuchungen mit lebendigen Bakterien und BCM von *S. aureus* ein gutes Modell, um die zur Induktion der AMPs führenden Signalwege in humanen primären Keratinozyten getrennt zu untersuchen. Während man durch die Behandlung mit *S. aureus* BCM den Einfluss des TLR2/NF $\kappa$ B und EGFR Signalwegs weitestgehend ausschalten kann, dominieren die beiden genannten Mechanismen bei Behandlung mit lebendigen Bakterien.



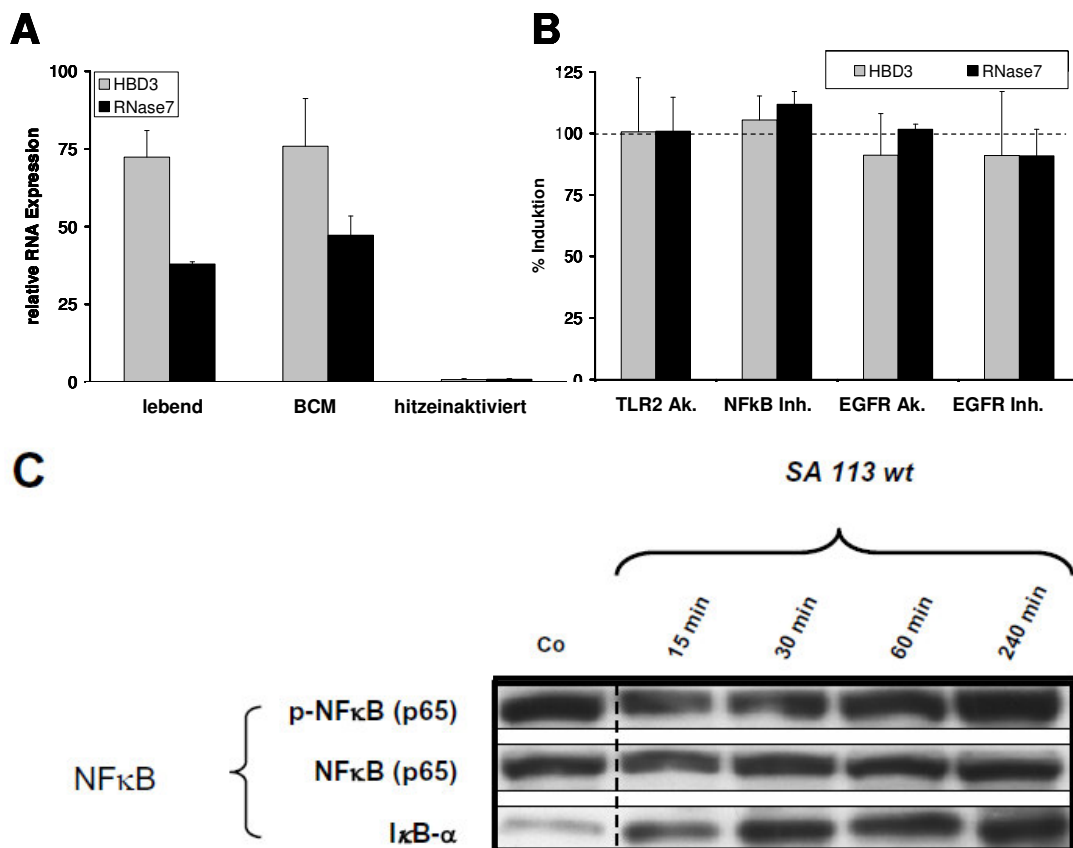
#### Abb. 14: Einfluss der NF $\kappa$ B Inhibition auf die AMP Induktion

Differenzierte humane primäre Keratinozyten wurden 24h mit lebenden Bakterien oder BCM von *S. epidermidis* (A) oder *S. aureus* (B) sowie den NF $\kappa$ B Inhibitoren Celastrol (1µM) oder JSH-23 (15µM) inkubiert. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. BCM behandelte primäre Keratinozyten wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich 100 Prozent gesetzt.

Aus den Experimenten kann somit geschlossen werden, dass die schwache Induktion der Expression von HBD-3 und RNase7 durch *S. epidermidis* sowohl über den EGFR- als auch durch den TLR2/NF $\kappa$ B-Signalweg vermittelt wurde, während für die starke Induktion durch *S. aureus* BCM andere Mechanismen verantwortlich sein müssen. Dennoch spielt der NF $\kappa$ B-Signalweg auch bei der durch *S. aureus* vermittelten Induktion der RNA Expression von HBD-3 und RNase7 eine wichtige Rolle, wie die Experimente mit lebendigen Bakterien gezeigt haben. Daher ist es notwendig, weitere Untersuchungen in physiologischeren Systemen, wie einem Mausmodell, Hautexplantaten oder Hautrekonstrukten durchzuführen.

#### **4.10 Vergleich des *S. aureus* wildtyp Stamms SA113 mit der Protein A defizienten Variante SA113 dSpa**

Die Untersuchungen zur Induktion antimikrobieller Peptide wurden in der vorliegenden Arbeit mit der Protein A defizienten Variante von *S. aureus* SA113 dSpa durchgeführt. Um auszuschließen, dass die erzielten Ergebnisse nur für diese Variante spezifisch sind, wurden einige grundlegende Experimente mit dem *S. aureus* wildtyp SA113 wiederholt. Zunächst wurde die Fähigkeit des BCM und der lebendigen *S. aureus* SA113 Bakterien, die antimikrobiellen Peptide HBD-3 und RNase7 zu induzieren überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass lebendige SA113 Bakterien, genauso wie das BCM von SA113, in der Lage sind, eine mit SA113 dSpa vergleichbare antimikrobielle Antwort in differenzierten primären humanen Keratinozyten zu induzieren, während hitzeinaktivierte SA113 Bakterien keine Induktion antimikrobieller Peptide bewirken konnten (Abb. 15A und Abb. 5). Es fand außerdem, genau wie in den mit SA113dSpa behandelten Zellen, keine Inhibition der Induktion der antimikrobiellen Peptide durch TLR2 oder EGFR blockierende Antikörper oder durch chemische Inhibitoren des NF $\kappa$ B oder EGFR-Signalwegs statt (Abb. 15B).



**Abb. 15: Einfluß von *S. aureus* SA113 wildtyp auf die Induktion antimikrobieller Peptide und die Aktivierung der TLR2/NFκB und EGFR-Signalwege**

**A:** Die Induktion der genannten antimikrobiellen Peptide in differenzierten primären humanen Keratinozyten wurde gezeigt. Die Zellen wurden 24h mit lebendigen oder hitzeinaktivierten SA113 Bakterien bzw. dessen BCM inkubiert. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Die RNA Expression unbehandelter Zellen wurde als Bezugspunkt gewählt und gleich 1 gesetzt.

**B:** Differenzierte primäre humane Keratinozyten wurden über 24h parallel mit BCM von SA113 und den angegebenen blockierenden Antikörpern oder chemischen Inhibitoren behandelt. Unterschiede wurden mittels Real-time PCR ermittelt. Die Induktion der RNA Expression von nur mit BCM von SA113 behandelten Zellen wurde als Bezugspunkt gewählt und gleich 100 Prozent gesetzt.

**C:** Eine Western Blot Analyse zeigt die Phosphorylierung von NFκB (p-NFκB) und den Proteingehalt des NFκB Inhibitors IκB nach Behandlung differenzierter humaner primärer Keratinozyten mit BCM von *S. aureus* SA113

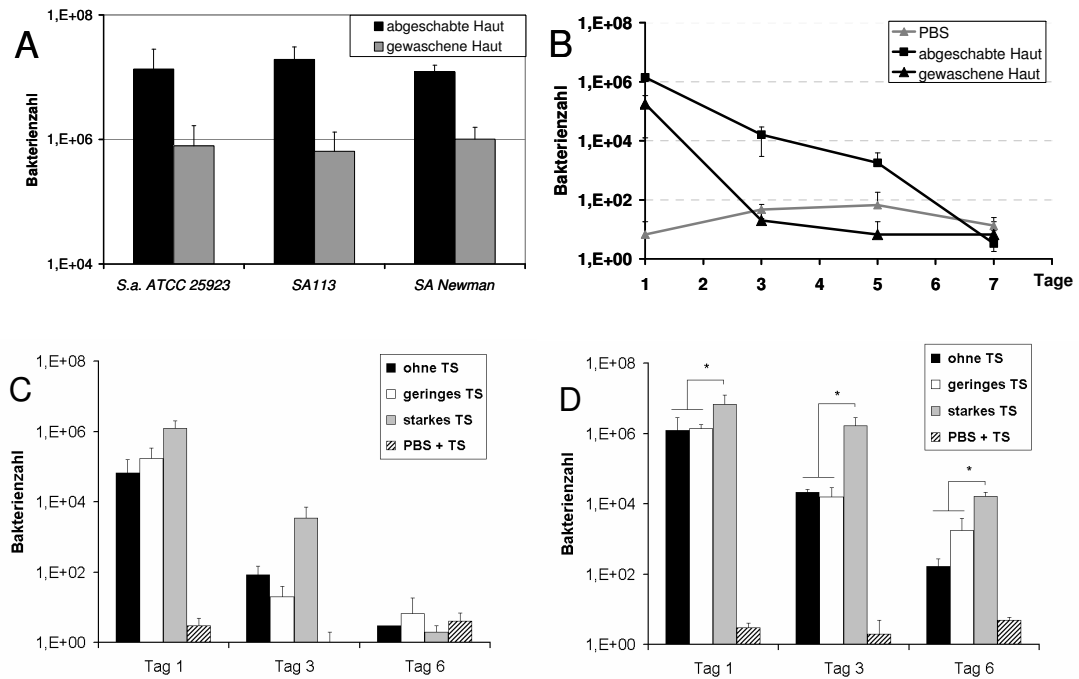
Wie der Western-Blot in Abb. 15C zeigt sind die sezernierten Faktoren von *S. aureus* SA113, genauso wie die von SA113 dSpA (Abb. 10A) nicht in der Lage, eine Phosphorylierung von NFκB zu bewirken. Es wird stattdessen die Proteinexpression von IκB erhöht, was durch Inhibierung der Translokation von NFκB in den Zellkern, zu verminderter Aktivität der

transkriptionellen Aktivität von NF $\kappa$ B führen kann. Zusammenfassend kann man also feststellen, dass sich der Wildtyp von *S. aureus SA113* bezüglich der Fragestellung genau so verhält wie die Protein A defiziente *S. aureus SA113 dSpa* Variante

#### 4.11 Etablierung eines murinen epikutanen Hautinfektionsmodells

Es wurden bisher einige experimentelle Mausmodelle beschrieben, die gezeigt haben, dass pathogene Mikroorganismen nach subkutaner Injektion in der Lage sind, schnell lokale Infektionen in Epidermis und Dermis auszulösen. Eine subkutane Injektion entspricht allerdings nicht dem natürlichen Infektionsweg. Vor kurzem wurde ein Infektionsmodell mit epikutaner Inokulation der Bakterien auf die Maushaut beschrieben, bei dem die epitheliale Barriere der Haut vorab durch mechanische Schädigung leicht permeabilisiert wurde (Hahn *et al.*, 2009; Onunkwo *et al.*, 2010). Da in den Publikationen nur die bakterielle Invasion untersucht wurde, sollte dieses Modell erweitert werden. Die Korrelation zwischen der Schädigung der epithelialen Barriere und der Besiedlung und Persistenz von *S. aureus* sowie der Induktion antimikrobieller Peptide wurden analysiert. Besonders interessant sind dabei die beta-Defensine der Maus. So stellt das beta-Defensin-14 (mBD14) der Maus ein Ortholog zu HBD-3 dar (Röhrl *et al.*, 2008), während die beta-Defensine-3, und -4 (mBD3; mBD4) jeweils 50% Sequenzhomologie zu HBD-2 aufweisen. mBD4 verhält sich auch funktionell ähnlich zu HBD-2 und wird daher als Ortholog angesehen (Röhrl *et al.*, 2010).

8-10 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden in den folgenden Versuchen epikutan inokuliert. Die Verwundung der Haut erfolgte durch sogenanntes „Tapestripping“. Dafür wurde ein Pflaster (Fixomull stretch) mehrmals fest auf die Maushaut aufgeklebt und wieder abgezogen. Durch 3-maliges „Tapestripping“ bewirkte man nur eine leichte, durch 7-maliges „Tapestripping“ eine stärkere Schädigung der Haut.



**Abb. 16: Epikutane Besiedlung der Maushaut**

**A:** 24h nach epikutaner Inokulation der Maushaut von C57BL/6 mit den angegebenen Bakterienstämmen wurde die Zahl der koloniebildenden Bakterien in gewaschenen und abgeschabten Hautproben ermittelt. **B:**  $1 \times 10^7$  *S. aureus* SA113 Bakterien wurden, nach vorheriger leichter Schädigung, auf die Haut von C57BL/6 Mäusen aufgebracht. Die Eliminierungsrate der Bakterien in gewaschenen und abgeschabten Hautproben wurde mit Hilfe des CFU-Assays ermittelt. Als Kontrolle wurde PBS auf die Haut aufgebracht. **C; D:**  $1 \times 10^7$  *S. aureus* SA113 Bakterien wurden auf die Haut von C57BL/6 Mäusen aufgebracht, die nicht (ohne „Tapestripping“), leicht (3x „Tapestripping“) oder stark (7x „Tapestripping“) vorgeschädigt wurde („Tapestripping“ = TS). Die Eliminierungsrate der Bakterien in gewaschenen (**C**) und abgeschabten (**D**) Hautproben wurde mit Hilfe des CFU-Assays ermittelt. Als Kontrolle wurde PBS auf Haut mit und ohne Schädigung aufgebracht. Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen den mit Klammern markierten Behandlungsgruppen (t-Test:  $p \leq 0,05$ ).

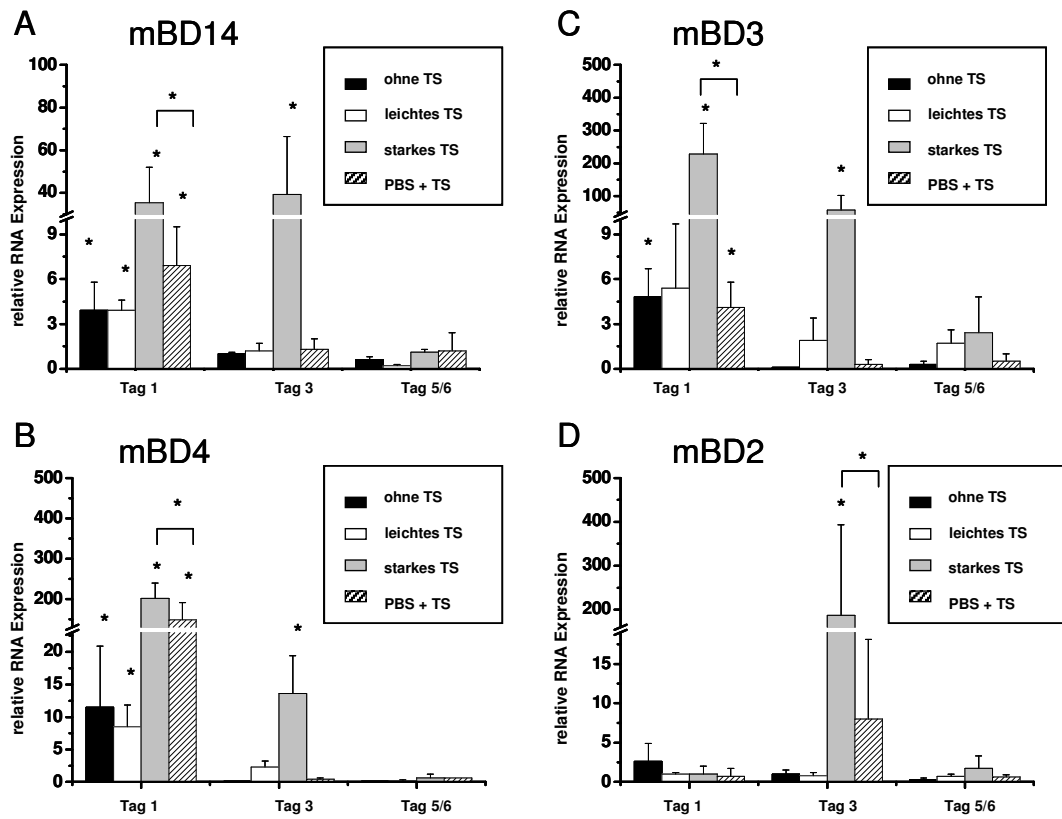
In einem ersten Versuch wurde die Infektionseffizienz verschiedener *S. aureus* Bakterienstämme (*S.a. ATCC25923*; SA113 und SA Newman) bei leichtem „Tapestripping“ getestet. Es zeigte sich, dass 24h nach der epikutanen Inokulation von  $1 \times 10^7$  *S. aureus* Bakterien bei allen drei getesteten Bakterienstämmen noch circa  $1 \times 10^7$  Bakterien in der Haut nachweisbar waren. Ein Zehntel der aufgetragenen Bakterien, jeweils  $1 \times 10^6$  Bakterien, waren nur locker mit der Haut assoziiert und konnten durch Waschen mit PBS entfernt werden (Abb. 16A). In einem weiteren Versuch, bei dem die Haut der Mäuse durch mildes „Tapestripping“ geringfügig geschädigt



wurde, konnte gezeigt werden, dass die Maushaut für einige Tage von *S. aureus* kolonisiert wurde. Innerhalb von 7 Tagen gelang es den C57BL/6 Mäusen die Bakterien vollständig von der Haut zu eliminieren (Abb. 16B). Die Geschwindigkeit der Elimination der Bakterien wies Unterschiede auf, je nachdem wie stark die Haut vorher geschädigt wurde (Abb. 16C,D). Stark vorgeschädigte Haut, mit beeinträchtigter epithelialer Barrierefunktion, wies im Vergleich zu unbehandelter oder nur geringfügig geschädigter Haut eine signifikant verminderte Fähigkeit auf, die Bakterien zu bekämpfen.

Vergleicht man die RNA-Expression antimikrobieller Peptide der Maushaut zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen unbehandelter und geschädigter Haut (Abb. 17). Generell konnte eine starke Induktion der Maus beta-Defensine 4, 14, und 3 an Tag 1 beobachtet werden, die dann im Laufe der nächsten Tage allmählich abnahm. Beta-Defensin 2 zeigte hingegen ein Maximum an Tag 2. Die Induktion der beta-Defensine in vorgeschädigter Haut fällt mehr als 10-fach stärker aus als in gesunder oder wenig geschädigter Haut. Allerdings zeigte die stark geschädigte Haut, die nur mit PBS behandelt wurde, bereits eine starke Induktion, insbesondere von mBD4 sodass sich hier vermutlich die Effekte der Verwundung der Haut und der Bakterien überlagern und gegenseitig verstärken.

Es konnte festgestellt werden, dass die Persistenz der Bakterien in stärker geschädigter Haut deutlich verlängert war, während gleichzeitig verstärkt antimikrobielle Peptide exprimiert wurden. Es überwiegen also zunächst die besseren Lebensbedingungen, wie reichlicheres Nahrungsangebot und feuchtes, warmes Klima in der Wunde, gegenüber der Abwehrreaktion des Körpers. Dies entspricht der *in vivo* Situation bei Hauterkrankungen mit gestörter Barrierefunktion, wie atopischer Dermatitis (Harder *et al.*, 2011; Schitteck, 2011). Daher ist das neu etablierte Modell ausgezeichnet geeignet, um Unterschiede in der Kolonisierung der Haut sowie Unterschiede in der Infektionsabwehr zwischen gesunder Haut und geschädigter Haut näher zu untersuchen.

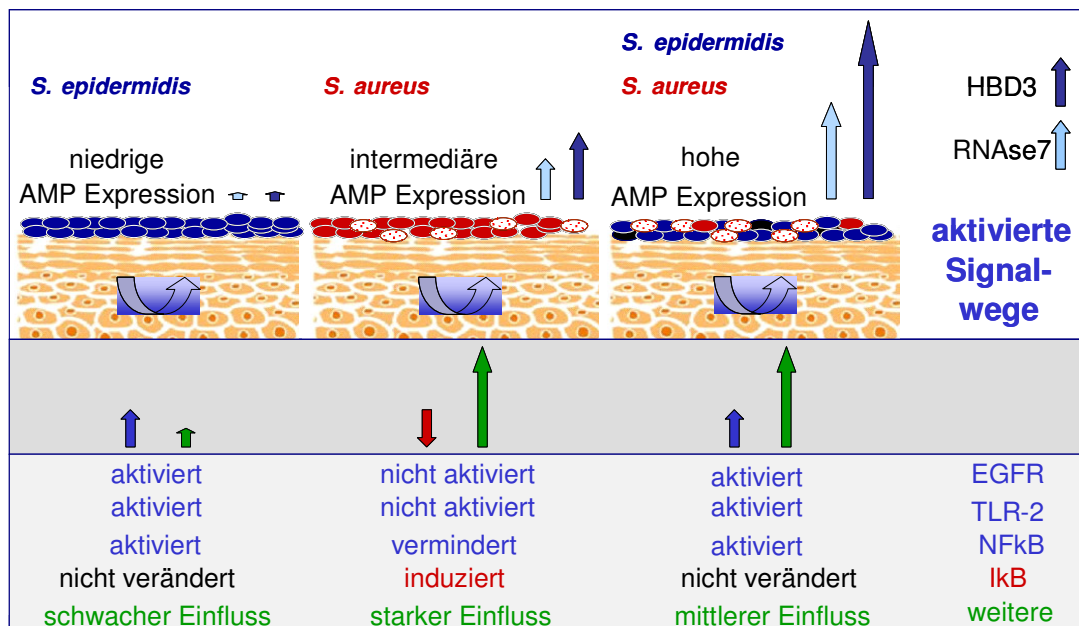


### Abb. 17: RNA Expression von AMPs der Maus

Nach epikutaner Inokulation der Maushaut von C57BL/6 mit  $1 \times 10^7$  *SA113* Bakterien wurde die RNA Expression von **A** mBD14, **B** mBD4, **C** mBD3 und **D** mBD2 per Real-time PCR analysiert. Die Unterschiede wurden in Abhängigkeit von der Intensität des *tape strippings* (TS) ermittelt. Die RNA Expression von PBS-Kontrollmäusen ohne TS wurden als Bezugspunkt gewählt und gleich 1 gesetzt.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass differenzierte primäre humane Keratinozyten nach Stimulation mit kommensalen oder pathogenen Staphylokokken hinsichtlich der Induktion der antimikrobiellen Peptide HBD-3 und RNase7 unterschiedlich reagieren. Die differentielle Induktion der antimikrobiellen Peptide basierte auf der Aktivierung verschiedener Signalwege (Abb. 18). So führte die Behandlung von differenzierten humanen primären Keratinozyten mit sezernierten Faktoren von *S. epidermidis* zur Aktivierung der TLR2/NF $\kappa$ B- und EGFR-Signalwege, gefolgt von einer geringen Induktion der antimikrobiellen Peptide HBD-3 und RNase7. Sezernierte Faktoren von *S. aureus* konnten diese Signalwege nicht signifikant aktivieren. Es wurde sogar eine Inhibition der transkriptionellen Aktivität von NF $\kappa$ B, die vermutlich durch die Induktion des NF $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B vermittelt wurde, gefunden. Die beobachtete starke Induktion der beiden antimikrobiellen Peptide durch sezernierte Faktoren beruhte daher auf der Aktivierung anderer Signalwege. Die wichtigste Aussage der vorliegenden Arbeit bestand darin, dass *in vitro* eine Amplifikation der angeborenen Immunantwort zu beobachten war. So führte die Koinkubation von differenzierten humanen primären Keratinozyten mit sezernierten Faktoren von *S. epidermidis* und *S. aureus* zu einer weiteren deutlichen Steigerung der Expression von HBD-3 und RNase7 im Vergleich zu der von *S. aureus* vermittelten Induktion. Einen wesentlichen Beitrag zu dieser Amplifikation leistete dabei vermutlich die Aufhebung der vermehrten I $\kappa$ B Proteinexpression durch *S. epidermidis*. Die additive oder synergistische Interaktion der durch *S. epidermidis* aktivierten mit den noch unbekanntenen *S. aureus* abhängigen Signalwegen könnte daher zu einer Amplifikation der angeborenen Immunantwort führen (Abb.18). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde ein Mausmodell etabliert, welches als geeignet erscheint, die gefundenen Zusammenhänge *in vivo* zu untersuchen.



**Abb. 18: Einfluss der verschiedenen Signalwege auf die Induktion von HBD-3 und RNase7 durch sezernierte Faktoren von *S. epidermidis* und *S. aureus*. (modifiziert nach Schittek *et al.*, 2008)**

Die vergleichsweise geringe Induktion der AMPs HBD-3 und RNase7 durch *S. epidermidis* wurde durch Aktivierung des EGFR und des TLR2/NFκB Signalwegs vermittelt, während die mittlere Expression der beiden AMPs durch *S. aureus* die Aktivierung anderer Signalwege erfordert, da der NFκB Signalweg durch einen erhöhten Gehalt der Keratinozyten an IκB Protein blockiert wurde. Durch die Kombination beider Staphylokokkenspezies kommt es zum Abbau von IκB und damit zu einer Amplifikation der antimikrobiellen Antwort durch zusätzliche Aktivierung des TLR2/NFκB Signalwegs.

### 5.1 Induktion von HBD-2

Zunächst konnte in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Unterschied in der RNA Expression zwischen nicht differenzierten und durch Calcium differenzierten humanen primären Keratinozyten festgestellt werden. Dies bestätigt vorangegangene Studien, in denen HBD-2 vorwiegend in den Zellen des Stratum granulosum und im Stratum corneum gefunden wurde. Einige *in vitro* Studien zeigten ebenfalls einen differenzierungsabhängigen Unterschied des HBD-2 Gehalts von Keratinozyten (Ali *et al.*, 2001; Harder *et al.*, 2004; Pernet *et al.*, 2003).

Der Kontakt von differenzierten primären Keratinozyten mit lebendigen Staphylokokken führte zu einer deutlichen Induktion von HBD-2. Es wur-

den keine signifikanten Unterschiede zwischen *S. epidermidis* und *S. aureus* festgestellt. Dies bestätigt vorangegangene Studien anderer Arbeitsgruppen (Dinulus *et al.*, 2003; Mempel *et al.*, 2003). Die Induktion von HBD-2 wurde vermutlich durch Bestandteile der bakteriellen Zellhülle ausgelöst, deren Struktur und Funktion durch Hitzebehandlung gestört wurde. Es wurde weiterhin gezeigt, dass Pam2Cys, ein Agonist des TLR2-/TLR6 Heterodimers, in der Lage ist, eine Erhöhung der HBD-2 Expression in differenzierten humanen primären Keratinozyten auszulösen. Es ist durch einige Studien belegt, dass verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie TNF oder IL-1 $\beta$  in der Lage sind, die HBD-2 Expression zu erhöhen. Genauso fanden frühere Studien eine Induktion der HBD-2 Expression durch mikrobielle Stimuli, wie zum Beispiel durch *P. aeruginosa* (Harder *et al.*, 1997, 2000, 2001, 2004, Liu *et al.*, 2002, Wehkamp *et al.*, 2006). Signalwege, wie der p38 MAP-Kinase Signalweg, der NF $\kappa$ B- und der AP-1 Signalweg sowie Aktivierung des NOD2 Rezeptors sind an der Regulation der HBD-2 Expression in Keratinozyten beteiligt (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000; Chung and Dale, 2004; Wehkamp *et al.*, 2004, 2006; Voss *et al.*, 2006). Allerdings gab es auch Studien, die eine NF $\kappa$ B und AP-1 unabhängige Induktion der HBD-2 Expression durch andere mikrobielle Stimuli nachgewiesen haben (Ogushi *et al.*, 2001; Krisanakrapornkit *et al.*, 2002; Chung and Dale, 2004). Daher bestimmt der jeweilige Stimulus, welcher Weg zur Induktion der HBD-2 Expression in der epithelialen Zelle beschriftet wird.

## 5.2 Induktion von HBD-3 und RNase7

In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass die Expression von HBD-3 und RNase7 durch Stimulation von Keratinozyten mit verschiedenen Zytokinen wie TNF, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  sowie durch Kontakt mit Grampositiven oder Gramnegativen Bakterien gesteigert werden kann (Harder *et al.*, 2001; Harder und Schröder, 2002). Für die Induktion von HBD-3 durch Bakterien kann z. Bsp. die Bindung von Komponenten der bakteriellen Zellhülle, wie Lipoteichonsäuren an TLR2 Rezeptoren verantwortlich sein (Menzies und Kenoyer, 2005, 2006). Menzies und Kenoyer beschrieben 2006, dass lebende Staphylokokken einen stärkeren Sti-

mulus für die Induktion von HBD-3 darstellen, als die Komponenten der bakteriellen Zellhülle allein. Somit kann angenommen werden, dass auch die von den Bakterien sezernierten Faktoren eine wichtige Rolle bei der Induktion dieses antimikrobiellen Peptids spielen (Menzies und Kenoyer, 2006). Tatsächlich wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass insbesondere von *S. aureus* sezernierte Substanzen ebenso wie die lebendigen *S. aureus* Bakterien in der Lage sind, die Expression der antimikrobiellen Peptide HBD-3 und RNase7 deutlich zu steigern. Es konnte ganz klar gezeigt werden, dass die starke, durch sezernierte Faktoren von *S. aureus* induzierte HBD-3 und RNase7 Expression unabhängig von den TLR2/NF $\kappa$ B- und EGFR-Signalwegen stattfand. Betrachtete man lebendige *S. aureus* Bakterien, so war hingegen eine Abhängigkeit der Induktion von HBD-3 und RNase7 von den beiden genannten Signalwegen zu beobachten. Sezernierte Faktoren von *S. epidermidis*, wie auch lebendige *S. epidermidis* Bakterien führten nur zu einem schwachen Anstieg der Expression von HBD-3 und RNase7, welche durch die TLR2/NF $\kappa$ B- und EGFR-Signalwege vermittelt wurde. Nur eine Studie von Menzies und Kenoyer zeigte, dass es einen Einfluss des NF $\kappa$ B-Signalweges auf die Induktion von HBD-3 gibt. Andere Studien konnten diesen Einfluß nicht bestätigen (Menzies und Kenoyer, 2006; Chung and Dale, 2004). Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in der vorliegenden Arbeit der TLR2/TLR6 Agonist Pam2Cys zwar nicht in der Lage war, allein eine deutliche Veränderung der HBD-3 und RNase7 Expression zu bewirken, aber zusammen mit den sezernierten Faktoren von *S. aureus* zu einer Amplifikation der Induktion von HBD-3 und RNase7 führte. Insofern ist die Aktivierung von NF $\kappa$ B nicht als essentiell für eine Induktion von HBD-3 und RNase7 zu betrachten, kann jedoch verstärkend wirken. Die Induktion der HBD-3 Expression nach Kontakt mit Bakterien kann also durch verschiedene bakterielle Faktoren ausgelöst und im Zusammenspiel mehrerer Signalwege vermittelt werden. HBD-3 wurde auch im Zusammenhang mit der Verwundung der Haut diskutiert. Sorensen *et al.*, (2005,2006) konnten zeigen, dass bei Verwundung der Haut eine EGFR vermittelte Induktion von HBD-3 auftrat. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Befund bestätigt werden. Die Behandlung von differenzierten hu-

manen primären Keratinozyten mit TGF $\alpha$  führte zu einer erhöhten Expression von HBD-3, welche mittels eines EGFR blockierenden Antikörpers und Gefitinib, einem Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR, verringert werden konnte. Auch zeigte sich eine Abhängigkeit der Induktion von HBD-3 und RNase7 durch sezernierte Faktoren von *S. epidermidis* vom EGFR, die bei den sezernierten Faktoren von *S. aureus* nicht zu beobachten war.

### 5.3 Einfluss von Staphylokokken auf den NF $\kappa$ B Signalweg

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass probiotische Darmbakterien in der Lage sind, die Synthese von inflammatorischen Effektormolekülen wie IL-6 nach Kontakt von epithelialen Zellen mit diversen proinflammatorischen Stimuli wie TNF oder pathogenen Mikroorganismen zu vermindern (Neish *et al.*, 2000). Dieser immunsuppressive Effekt wurde durch die Inhibition des NF $\kappa$ B Signalwegs vermittelt. Durch den Kontakt mit den Bakterien wurde die Degradierung des NF $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B verhindert. In der vorliegenden Arbeit konnte ein ähnlicher Effekt gefunden werden. Hier nutzte allerdings das Pathogen *S. aureus* die Inhibition des NF $\kappa$ B Signalwegs zu seinem Vorteil. Sezernierte Faktoren des *S. aureus* Stamms führten zu einer Induktion von I $\kappa$ B. Dadurch fiel die antimikrobielle Antwort zunächst etwas schwächer aus. Erst im Zusammenspiel mit dem Kommensalen *S. epidermidis*, der die Induktion von I $\kappa$ B aufheben konnte, kam es zur vollen Ausprägung der Induktion der beiden antimikrobiellen Peptide HBD-3 und RNase7. Da lebende *S. aureus* Bakterien, im Gegensatz zu deren sezernierten Faktoren, zu einer Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges führten, muss durch *in vivo* Experimente geklärt werden wie stark die Einflüsse der sezernierten Faktoren tatsächlich sind. Interessant ist auch die Frage, welche antimikrobielle Antwort in den verschiedenen Hautschichten ausgelöst werden kann. So kommt nur die äußerste Zellschicht einer intakten Haut mit den Bakterien in direkten Kontakt, während weiter innen liegende Zellen nur von den sezernierten Faktoren erreicht werden können.

#### 5.4 Einfluss von Staphylokokken auf die TLR Expression

In der vorliegenden Arbeit wurden differentielle Expressionsunterschiede der TLR2, -3, und -9 gefunden. Die Expressionsunterschiede des TLR2 korrelierten dabei mit der Fähigkeit eines TLR2 Antikörpers bzw. eines chemischen Inhibitors des NF $\kappa$ B-Signalwegs die durch Staphylokokken induzierte Expression von HBD-3 und RNase 7 zu reduzieren. Diese Abhängigkeit der HBD-3 Expression von TLR2 wurde bereits von Menzies und Kenoyer beschrieben (2005, 2006). Die TLR9 Expression wurde von *S. aureus* und *S. epidermidis* erhöht. Eine differentielle Induktion wurde jedoch nur durch lebendige Bakterien beobachtet. Die Fähigkeit des TLR9 durch Bindung von bakterieller DNA zur Induktion von HBD-3 beizutragen wurde bereits beschrieben (Röhrl et al, 2008). Sehr interessant ist auch der Befund, dass TLR3 stark vermindert exprimiert wird, wenn man die Keratinozyten mit *S. aureus* behandelt. Lai et al, (2009) zeigten, dass TLR3 für die Entzündungsreaktion der Haut essentiell ist, so könnte dessen verminderte Expression einen Vorteil für das Überleben von *S. aureus* darstellen.

#### 5.5 Sensibilität von *S. epidermidis* und *S. aureus* gegenüber der antimikrobiellen Antwort der Haut

Es wurde bereits beschrieben, dass HBD-3 und RNase7 die beiden wichtigsten antimikrobiellen Peptide der Haut sind, die in der Lage sind eine Infektion mit *S. aureus* zu verhindern oder einzudämmen (Kisich *et al.*, 2007; Zanger *et al.*, 2009). Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die antimikrobielle Antwort, welche in den Keratinozyten durch *S. aureus* ausgelöst wurde, ausreichend war, die Zahl an *S. aureus* Bakterien zu verringern, während die Zahl der *S. epidermidis* Bakterien nahezu konstant blieb. Diese unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber antimikrobiellen Peptiden kann durch Unterschiede in den Resistenzsystemen beider Staphylokokken erklärt werden. So besitzt *S. epidermidis* ein Sensor/Regulator System, welches aus drei Komponenten besteht und in der Lage ist, kationische antimikrobielle Peptide zu detektieren und eine bakterielle Abwehrreaktion auszulösen (Li *et al.*, 2007a). *S. aureus* hat



zwar ein ähnliches „*AMP sensing system*“ (aps), welches jedoch AMP selektiver ist als das von *S. epidermidis* (Li *et al.*, 2007b).

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die „*accessory-gene regulator response*“ (agr) Systeme von *S. epidermidis* und *S. aureus*, welche als *quorum sensing* Systeme den bakteriellen Stoffwechsel an die Bedingungen der stationären Wachstumsphase anpassen. Außerdem haben die agr Systeme die Aufgabe, eine Reihe von bakteriellen Virulenzfaktoren zu regulieren, die z. Bsp. zur Degradierung von antimikrobiellen Peptiden oder zu Anpassungsreaktionen im Bakterium führen können. So kann z. Bsp. eine Verminderung des oxidativen Stress im Bakterium erzielt werden (Yao *et al.*, 2006; Goerke *et al.*, 2003; 2004; Burian *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden auch *S. epidermidis* und *S. aureus* Nasenisolat gesunder Probanden zum Vergleich herangezogen. Diese Stämme konnten, genau wie weitere kommensale Bakterien, keine starke antimikrobielle Antwort auslösen. Dadurch kann deren Fähigkeit, die Nase von gesunden Menschen zu kolonisieren ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen mit begründet werden.

### **5.6 Induktion der HBD-3 und RNase7 Expression durch *S. aureus* Stämme von Atopikern**

Bei der Untersuchung von verschiedenen *S. aureus* Stämmen, konnte festgestellt werden, dass jene Bakterienstämme, die von Patienten mit atopischer Dermatitis isoliert wurden, besonders häufig in der Lage waren, die Expression von HBD-3 und RNase7 deutlich zu erhöhen. In der Haut von Atopikern müssen daher Bedingungen gegeben sein, die zu einer bevorzugten Kolonisierung mit diesen Stämmen führen können. Die Fähigkeit, eine starke antimikrobielle Antwort auszulösen sollte auf gesunder Haut zu einer negativen Selektion dieser Bakterienspezies führen. Zunächst stellen entzündliche Läsionen der Haut Eintrittspforten in den menschlichen Organismus dar, die trotz starker Abwehrreaktionen dem Bakterium verbesserte Lebensbedingungen bieten. So partizipiert das Bakterium in einer Wunde von dem reichlichen Nahrungsangebot des Körpers und kann zudem in einer feuchten, warmen Umgebung leben. Des Weiteren findet man bei Atopikern eine erhöhte Konzentration der

Th2 Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13, welche dafür bekannt sind, die Expression und Freisetzung von HBD-3 zu vermindern (Howell *et al.*, 2005; 2006a; 2006b, Kisich *et al.*, 2008). Diese Mechanismen könnten für die positive Selektion der *S. aureus* Stämme, die eine verstärkte antimikrobielle Immunantwort auslösen können, verantwortlich sein. Büchau *et al.* (2009) beschrieben darüber hinaus den Einfluß von Bcl-3 als wichtigen transkriptionellen Regulator der antimikrobiellen Antwort in atopischer Haut.

### **5.7 Untersuchung der Kolonisierung der Maushaut mit Staphylokokken**

Es wurden bisher einige experimentelle Mausmodelle beschrieben, die gezeigt haben, dass pathogene Mikroorganismen in der Lage sind, schnell lokale Infektionen in Epidermis und Dermis auszulösen. Die meisten dieser Modelle injizierten jedoch die Bakterien subkutan. Dies entspricht nicht dem natürlichen Infektionsweg. Vor kurzem wurde ein Infektionsmodell mit epikutaner Inokulation der Bakterien beschrieben, bei dem die epitheliale Barriere der Haut durch mechanische Schädigung mittels eines Pflasters (*tapestripping*) leicht permeabilisiert wurde (Hahn *et al.*, 2009; Onunkwo *et al.*, 2010). In den beiden Publikationen wurde jedoch nur die bakterielle Invasion untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell erweitert. Die Korrelation zwischen der Schädigung der epithelialen Barriere und der Besiedlung und Persistenz von *S. aureus* sowie der Induktion antimikrobieller Peptide wurden analysiert. Dazu wurde Bakterien auf gesunde, leicht und stärker verwundete Haut epikutan aufgetragen, so dass der natürliche Weg der Infektion nachgestellt wurde. In diesem Modell lassen sich daher die Unterschiede zwischen gesunder Haut und Haut mit gestörter epithelialer Barrierefunktion, wie z.Bsp. in atopischer Dermatitis, nachstellen. Es konnte festgestellt werden, dass die Persistenz der Bakterien in stärker geschädigter Haut deutlich verlängert war, während gleichzeitig verstärkt antimikrobielle Peptide exprimiert wurden. Im Mausmodell überwiegen also zunächst die besseren Lebensbedingungen, wie reichliches Nahrungsangebot des Körpers und feuchtes, warmes Klima in der Wunde gegenüber der Abwehrreaktion des Körpers. Dies entspricht der *in vivo*

Situation bei Hauterkrankungen mit gestörter Barrierefunktion. So findet man *S. aureus* selten auf gesunder Haut, während Patienten mit atopischer Dermatitis häufig eine Besiedelung mit *S. aureus* Bakterien aufweisen (Harder *et al.*, 2011; Schittek, 2011). Daher ist das etablierte Modell ausgezeichnet geeignet, um Unterschiede in der Kolonisierung der Haut sowie Unterschiede in der Infektionsabwehr zwischen gesunder Haut und geschädigter Haut näher zu untersuchen.

## 5.8 Ausblick

Obwohl es zunehmend klinische Evidenz gibt, dass probiotische oder kommensale Bakterien wichtig für die Infektionsabwehr sind, besteht über die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen Unklarheit. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass kommensale Bakterien im Vergleich zu Pathogenen unterschiedliche Signalwege aktivieren, um eine Immunkonditionierung von Epitheloberflächen zu erreichen. In weiterführenden Untersuchungen soll insbesondere der Effekt von *Staphylococcus epidermidis* auf die Aktivierung protektiver TLR2/NF $\kappa$ B und EGFR-Signalwege und die Induktion der Expression antimikrobieller Peptide, sowie auf die Aufhebung der *Staphylococcus aureus* induzierten NF $\kappa$ B-Inhibition näher untersucht werden. Dazu sollen Hautexplantate, organotypische Hautmodelle und das in der vorliegenden Arbeit etablierte epikutane Maus-Hautinfektionsmodell verwendet werden. Das Mausmodell bietet durch den Einsatz von TLR2, TLR9 sowie MyD88 knockout Mäusen die Möglichkeit, den Einfluß einzelner Bestandteile der Signalwege getrennt zu untersuchen.

Ebenso interessant ist die Frage, welche bakteriellen Komponenten für die Induktion der I $\kappa$ B Proteinexpression durch *S. aureus* verantwortlich sind und welche bakteriellen Faktoren von *S. epidermidis* in der Lage sind, diesen Effekt wieder aufzuheben. Dazu kann das bakteriell konditionierte Medium mittels Gelfiltration fraktioniert werden, die einzelnen Fraktionen *in vitro* auf ihre Wirksamkeit getestet und schließlich die Komponenten, gegebenenfalls nach weiterer Aufreinigung, mittels massenspektroskopischer Analytik identifiziert werden.

*In vitro* Experimente mit primären humanen Keratinozyten sollen des Weiteren zeigen, welche anderen Signalwege zur differentiellen Induktion der antimikrobiellen Peptide führen. Hierfür bieten sich moderne Phospho-Proteom Analysen an, deren Ergebnisse anschließend über Western-Blot bestätigt werden können. Auch die Frage, ob und wie die Expression von proinflammatorischen Zytokinen durch Faktoren von *S. epidermidis*, *S. aureus* bzw. deren Kombination verändert wird, ist bisher noch offen. Schließlich bleibt zu klären, wie eine Entzündungsreaktion, die Kolonisierung von Kommensalen und Pathogen auf der Haut beeinflusst.

## 6 Zusammenfassung

Obwohl es zunehmend klinische Evidenz gibt, dass probiotische oder kommensale Bakterien wichtig für die Infektionsabwehr pathogener Mikroorganismen sind, besteht über die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen Unklarheit. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass kommensale und pathogene Staphylokokken in primären humanen Keratinozyten die antimikrobiellen Peptide/Proteine HBD-3 und RNase7 unterschiedlich stark induzieren konnten. Dazu aktivierten sie verschiedene Signalwege. *S. epidermidis* führte nur zu einer geringen Induktion von HBD-3 und RNase7, welche über die TLR2/NFκB- und EGFR-Signalwege vermittelt wurde. *S. aureus* führte hingegen zu einer starken Erhöhung der HBD-3 und RNase7 Expression, die jedoch unabhängig von den genannten Signalwegen erfolgte. Stattdessen war dieses Pathogen in der Lage, den NFκB Signalweg zu hemmen, indem der NFκB-Inhibitor Iκb vermehrt exprimiert wurde. Kommensale Staphylokokken waren in der Lage, diese Inhibition des NFκB-Signalweges aufzuheben. Dies führte zu einer Amplifikation der antimikrobiellen Antwort der primären humanen Keratinozyten. Somit können die von beiden Staphylokokkenspezies aktivierten Signalwege synergistisch zusammenwirken und zu einer verbesserten Infektionsabwehr führen.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein epikutanes Hautinfektionsmodell in der Maus etabliert, um die *in vitro* erhobenen Daten *in vivo* zu überprüfen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* die Induktion antimikrobieller Peptide in der Haut der Mäuse bewirkt. Zusätzlich konnten, in Abhängigkeit von einer vorherigen Schädigung der Haut, Unterschiede in der Kolonisierung der Haut beobachtet werden. So führte eine Schädigung der Haut durch „Tapestripping“ zu verlängerter Persistenz der Bakterien, bei gleichzeitig stark erhöhter Expression antimikrobieller Peptide.

Die Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen, mit der die Haut zwischen kommensalen und pathogenen Mikroorganismen unterscheiden kann. Die Fähigkeit von kommensalen Bakterien die angeborene Immunantwort zu verstärken trägt dazu bei, schädliche Mikroorganismen von der gesunden Haut fernzuhalten. Erst bei

Schädigungen der epithelialen Barriere durch Verwundung oder Entzündungsreaktionen kommt es zu einer Kolonisierung bzw. Infektion mit Pathogenen. Es ist sicherlich denkbar, wirksame Komponenten kommensaler Bakterien therapeutisch, zur Steigerung der Abwehrreaktion, bei Infektionen der Haut einzusetzen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Yamazaki M, Arakawa T, Takuma T, Kaku T.: *Upregulated expression of human beta defensin-1 and -3 mRNA during differentiation of keratinocyte immortalized cell lines, HaCaT and PHK16-0b.* J Dermatol Sci. 2003 May;31(3):225-8. PMID:12727027
- Aderem A, Underhill DM: *Mechanisms of phagocytosis in macrophages.* Annu Rev Immunol. 1999;17:593-623. PMID:10358769
- Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H.: *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.* Eur J Immunol. 2002 Jul;32(7):1958-68. PMID:12115616
- Ahrens K, Schunck M, Podda GF, Meingassner J, Stuetz A, Schröder JM, Harder J, Proksch E: *Mechanical and metabolic injury to the skin barrier leads to increased expression of murine  $\beta$ -defensin-1, -3, and -14.* J Invest Dermatol. 2011 Feb;131(2):443-52. Epub 2010 Oct 14. PMID:20944649
- Akira S, Takeda K, Kaisho T: *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.* Nat Immunol. 2001 Aug;2(8):675-80. PMID:11477402
- Akira S, Takeda K.: *Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice.* C R Biol. 2004 Jun;327(6):581-9. PMID:15330257
- Akira S.: *TLR signaling.* Curr Top Microbiol Immunol. 2006;311:1-16. PMID:17048703
- Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG: *Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin.* J Invest Dermatol. 2001 Jul; 117(1):106-11. PMID:11442756
- Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C.: *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product.* Cell. 1985 Oct;42(3):779-89. PMID:3931918
- Anderson KV, Nüsslein-Volhard C.: *Information for the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA.* Nature. 1984 Sep 20-26; 311(5983):223-7. PMID:6434989
- Athman R, Philpott D.: *Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins.* Curr Opin Microbiol. 2004 Feb;7(1):25-32. PMID:15036136
- Bätz A.: *Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation des Proteins Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS1) in Zellen des angeborenen Immunsystems.* Dissertation Universität Heidelberg
- Baird RM, Brown H, Smith AW, Watson ML.: *Burkholderia cepacia is resistant to the antimicrobial activity of airway epithelial cells.* Immunopharmacology. 1999 Nov;44(3):267-72.. PMID:10598883
- Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, Corcoran S, Fry L: *Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis.* Br J Dermatol. 2003 Apr;148(4):670-9. PMID:12752123
- Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM: *Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung.* J Clin Invest. 1998 Sep 1;102(5):874-80. PMID:9727055
- Barton GM, Kagan JC.: *A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization.* Nat Rev Immunol. 2009 Aug;9(8):535-42. Epub 2009 Jun 26. PMID:19556980

- Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH.: *CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium*. J Biol Chem. 2000 Sep 22;275(38):29731-6.PMID:10882713
- Begon E, Michel L, Flageul B, Beaudoin I, Jean-Louis F, Bachelez H, Dubertret L, Musette P.: *Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin*. Eur J Dermatol. 2007 Nov-Dec;17(6):497-506. Epub 2007 Oct 19.PMID:17951129
- Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG.: *hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma*. FEBS Lett. 1995 Jul 17;368(2):331-5.PMID:7628632
- Beutler B.. *Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases*. Immunol Rev. 2009 Jan;227(1):248-63.PMID:19120489
- Bibel DJ, Aly R, Shinefield HR.: *Antimicrobial activity of sphingosines*. J Invest Dermatol. 1992 Mar;98(3):269-73.PMID:1545135
- Bibel DJ, Miller SJ, Brown BE, Pandey BB, Elias PM, Shinefield HR, Aly R.: *Antimicrobial activity of stratum corneum lipids from normal and essential fatty acid-deficient mice*. J Invest Dermatol. 1989 Apr;92(4):632-8.PMID:2649598
- Boman HG.: *Peptide antibiotics and their role in innate immunity*. Annu Rev Immunol. 1995;13:61-92.PMID:7612236
- Boniotto M, Antcheva N, Zelezetsky I, Tossi A, Palumbo V, Verga Falzacappa MV, Sgubin S, Braida L, Amoroso A, Crovella S.: *A study of host defence peptide beta-defensin 3 in primates*. Biochem J. 2003 Sep 15;374(Pt 3):707-14.PMID:12795637
- Brandl K.: *Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der Toll-like Rezeptoren in der Sepsis*. Dissertation Universität Regensburg
- Brandner JM, Kief S, Wladykowski E, Houdek P, Moll I.: *Tight junction proteins in the skin*. Skin Pharmacol Physiol. 2006;19(2):71-7. Epub 2006 May 9.PMID:16685145
- Brissette CA, Lukehart SA.: *Treponema denticola is resistant to human beta-defensins*. Infect Immun. 2002 Jul;70(7):3982-4.PMID:12065549
- Brogden KA.: *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nat Rev Microbiol. 2005 Mar;3(3):238-50.PMID:15703760
- Büchau AS, MacLeod DT, Morizane S, Kotol PF, Hata T, Gallo RL.: *Bcl-3 acts as an innate immune modulator by controlling antimicrobial responses in keratinocytes*. J Invest Dermatol. 2009 Sep;129(9):2148-55. Epub 2009 Mar 12.PMID:19282837
- Burian M, Wolz C, Goerke C.: *Regulatory adaptation of Staphylococcus aureus during nasal colonization of humans*. PLoS One. 2010 Apr 6;5(4):e10040.PMID:20386721
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV.: *TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1*. Nature. 1996 Oct 3;383(6599):443-6.PMID:8837778
- Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG.: *The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling*. Nat Immunol. 2006 Oct;7(10):1074-81. Epub 2006 Sep 10.PMID:16964262



- Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nuñez G.: *NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease*. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:365-98.PMID:18928408
- Cho JS, Xuan C, Miller LS.: *Lucky number seven: RNase 7 can prevent Staphylococcus aureus skin colonization*. *J Invest Dermatol*. 2010 Dec;130(12):2703-6.PMID:21068735
- Chung WO, Dale BA.: *Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species*. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):352-8.PMID:14688115
- Cogen AL, Yamasaki K, Muto J, Sanchez KM, Crotty Alexander L, Tanios J, Lai Y, Kim JE, Nizet V, Gallo RL.: *Staphylococcus epidermidis antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A Streptococcus*. *PLoS One*. 2010 Jan 5;5(1):e8557.PMID:20052280
- Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Dorschner RA, Lai Y, MacLeod DT, Torpey JW, Otto M, Nizet V, Kim JE, Gallo RL.: *Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from Staphylococcus epidermidis, a normal resident of the skin*. *J Invest Dermatol*. 2010 Jan;130(1):192-200.PMID:19710683
- Coote PJ, Holyoak CD, Bracey D, Ferdinando DP, Pearce JA.: *Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin s3 on Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Sep;42(9):2160-70.PMID:9736528
- Cotter PD, Hill C, Ross RP.: *Bacteriocins: developing innate immunity for food*. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Oct;3(10):777-88.PMID:16205711
- Dessinioti C, Katsambas AD.: *The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: facts and controversies*. *Clin Dermatol*. 2010 Jan-Feb;28(1):2-7.PMID:20082942
- Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo RL.: *Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus*. *J Invest Dermatol*. 2001 Jul;117(1):91-7.PMID:11442754
- Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Colton SW, Abraham W, Strauss JS.: *Skin lipids: an update*. *J Invest Dermatol*. 1987 Mar;88(3 Suppl):2s-6s.PMID:2950180
- Eckhart L, Declercq W, Ban J, Rendl M, Lengauer B, Mayer C, Lippens S, Vandenabeele P, Tschachler E.: *Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation*. *J Invest Dermatol*. 2000 Dec;115(6):1148-51.PMID:11121154
- Elias PM, Feingold KR.: *Coordinate regulation of epidermal differentiation and barrier homeostasis*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14 Suppl 1:28-34.PMID:11509904
- Faergemann J, Larkö O.: *The effect of UV-light on human skin microorganisms*. *Acta Derm Venereol*. 1987;67(1):69-72.PMID:2436418
- Fahlén A, Engstrand L, Baker BS, Powles A, Fry L.: *Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin*. *Arch Dermatol Res*. 2012 Jan;304(1):15-22. Epub 2011 Nov 8.PMID:22065152
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL.: *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism*. *J Clin Invest*. 2001 Sep;108(6):785-91.PMID:11560944

- Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R.: *The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Nov 18;105(46):17994-9. Epub 2008 Nov 12. PMID:19004758
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA.: *Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction.* Nature. 2001 Sep 6;413(6851):78-83. PMID:11544529
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT.: *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF.* J Exp Med. 2003 Oct 6;198(7):1043-55. Epub 2003 Sep 29. PMID:14517278
- Fleming A: *lysozyme, a bacteriolytic agent found in the tissues of a number of species of animals* Proc. Roy. Soc. London, Series B, 93, 306 (1922).
- Fluhr JW, Behne MJ, Brown BE, Moskowitz DG, Selden C, Mao-Qiang M, Mauro TM, Elias PM, Feingold KR.: *Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum.* J Invest Dermatol. 2004 Feb;122(2):320-9. PMID:15009712
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA.: *The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity.* Semin Immunol. 1998 Oct;10(5):363-72. PMID:9799711
- Frohman M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH.: *The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders.* J Biol Chem. 1997 Jun 13;272(24):15258-63. PMID:9182550
- Frye M, Bargon J, Gropp R.: *Expression of human beta-defensin-1 promotes differentiation of keratinocytes.* J Mol Med (Berl). 2001 Jun;79(5-6):275-82. PMID:11485020
- Fuchs E, Green H.: *Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte.* Cell. 1980 Apr;19(4):1033-42. PMID:6155214
- Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M.: *Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides.* J Allergy Clin Immunol. 2002 Dec;110(6):823-31. PMID:12464945
- García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R.: *Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction.* Cell Tissue Res. 2001 Nov;306(2):257-64. PMID:11702237
- García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG.: *Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity.* FASEB J. 2001 Aug;15(10):1819-21. PMID:11481241
- Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM.: *Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection.* Nat Immunol. 2005 Jan;6(1):57-64. Epub 2004 Nov 28. PMID:15568027
- Gläser R, Navid F, Schuller W, Jantschitsch C, Harder J, Schröder JM, Schwarz A, Schwarz T.: *UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo.* J Allergy Clin Immunol. 2009 May;123(5):1117-23. Epub 2009 Apr 1. PMID:19342087

- Goerke C, Kümmel M, Dietz K, Wolz C.: *Evaluation of intraspecies interference due to agr polymorphism in Staphylococcus aureus during infection and colonization.*J Infect Dis. 2003 Jul 15;188(2):250-6. Epub 2003 Jul 9.PMID:12854080
- Goerke C, Wolz C.: *Regulatory and genomic plasticity of Staphylococcus aureus during persistent colonization and infection.*Int J Med Microbiol. 2004 Sep;294(2-3):195-202.PMID:15493830
- Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Maeda N, Ishikawa T, Hoshino K, Uruno T, Cao Q, Higashi S, Kawaguchi Y, Enjoji M, Takayanagi R, Kaisho T, Yoshikai Y, Fukui Y.: *Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation.*J Exp Med. 2010 Apr 12;207(4):721-30. Epub 2010 Mar 15.PMID:20231379
- Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC; NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Turner ML, Segre JA.: *Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome.*Science. 2009 May 29;324(5931):1190-2.PMID:19478181
- Häcker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H.: *Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6.*J Exp Med. 2000 Aug 21;192(4):595-600.PMID:10952730
- Hahn BL, Onunkwo CC, Watts CJ, Sohnle PG.: *Systemic dissemination and cutaneous damage in a mouse model of staphylococcal skin infections.*Systemic dissemination and cutaneous damage in a mouse model of staphylococcal skin infections.PMID:19397991
- Hanifin JM, Rogge JL.: *Staphylococcal infections in patients with atopic dermatitis.*Arch Dermatol. 1977 Oct;113(10):1383-6.PMID:911165
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM.: *Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic.*J Biol Chem. 2001 Feb 23;276(8):5707-13. Epub 2000 Nov 20.PMID:11085990
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM.: *A peptide antibiotic from human skin.*Nature. 1997 Jun 26;387(6636):861.PMID:9202117
- Harder J, Gläser R, Schröder JM.: *The role and potential therapeutical applications of antimicrobial proteins in infectious and inflammatory diseases.*Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2007 Jun;7(2):75-82.PMID:17584147
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM.: *Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia.*Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 Jun;22(6):714-21.PMID:10837369
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM.: *Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid.*J Invest Dermatol. 2004 Sep;123(3):522-9.PMID:15304092
- Harder J, Schröder JM.: *RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin.*J Biol Chem. 2002 Nov 29;277(48):46779-84. Epub 2002 Sep 18.PMID:12244054
- Harder J, Schröder JM.: *Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins.*J Leukoc Biol. 2005 Apr;77(4):476-86. Epub 2005 Jan 3.PMID:15629886

- Harder J, Schröder JM.: *Antimicrobial peptides in human skin*. Chem Immunol Allergy. 2005;86:22-41.PMID:15976486
- Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S.: *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily*. Eur J Immunol. 2003 Nov;33(11):2987-97.PMID:14579267
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S.. *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol. 2002 Feb;3(2):196-200. Epub 2002 Jan 22.PMID:11812998
- Herz J, Strickland DK.: *LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor*. J Clin Invest. 2001 Sep;108(6):779-84.PMID:11560943
- Hoffmann JA.: *The immune response of Drosophila*. Nature. 2003 Nov 6;426(6962):33-8.PMID:14603309
- Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JL.: *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. Nat Immunol. 2003 Mar;4(3):269-73. Epub 2003 Jan 27.PMID:12548285
- Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, Puri A, Oppenheim JJ, Chertov O, Lubkowsky J.: *The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization*. J Biol Chem. 2000 Oct 20;275(42):32911-8.PMID:10906336
- Hoover DM, Wu Z, Tucker K, Lu W, Lubkowsky J.: *Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives*. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Sep;47(9):2804-9.
- Hornig T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R.: *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors*. Nature. 2002 Nov 21;420(6913):329-33.PMID:12447442
- Hoskin DW, Ramamoorthy A.: *Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides*. Biochim Biophys Acta. 2008 Feb;1778(2):357-75. Epub 2007 Nov 22.PMID:18078805
- Howell MD, Boguniewicz M, Pastore S, Novak N, Bieber T, Girolomoni G, Leung DY.. *Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis*. Clin Immunol. 2006 Dec;121(3):332-8. Epub 2006 Oct 2.PMID:17015038
- Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, Jones JF, Wong C, Streib JE, Leung DY.: *Zytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus*. Immunity. 2006 Mar;24(3):341-8.PMID:16546102
- Howell MD, Novak N, Bieber T, Pastore S, Girolomoni G, Boguniewicz M, Streib J, Wong C, Gallo RL, Leung DY.: *Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis*. J Invest Dermatol. 2005 Oct;125(4):738-45.PMID:16185274
- Huang YC, Lin YM, Chang TW, Wu SJ, Lee YS, Chang MD, Chen C, Wu SH, Liao YD.: *The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity*. J Biol Chem. 2007 Feb 16;282(7):4626-33. Epub 2006 Dec 6.PMID:17150966

- Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, Agata T, Mizunoe Y.: *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010 May 20;465(7296):346-9. PMID:20485435
- Janeway CA Jr, Medzhitov R.: *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216. Epub 2001 Oct 4. PMID:11861602
- Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B.: *Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37*. *J Biol Chem*. 1998 Feb 6;273(6):3718-24. PMID:9452503
- Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr, Guthmiller JM.: *Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes*. *Mol Immunol*. 2005 May;42(9):1073-84. Epub 2004 Dec 15. PMID:15829297
- Kaisho T, Akira S.: *Toll-like receptor function and signaling*. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 May;117(5):979-87; quiz 988. Epub 2006 Apr 3. PMID:16675322
- Kalinin AE, Idler WW, Marekov LN, McPhie P, Bowers B, Steinert PM, Steven AC.: *Co-assembly of envoplakin and periplakin into oligomers and Ca(2+)-dependent vesicle binding: implications for cornified cell envelope formation in stratified squamous epithelia*. *J Biol Chem*. 2004 May 21;279(21):22773-80. Epub 2004 Mar 18. PMID:15033990
- Kang SJ, Ji HY, Lee BJ.: *Anticancer activity of undecapeptide analogues derived from antimicrobial peptide, Brevinin-1EMa*. *Arch Pharm Res*. 2012 May;35(5):791-9. Epub 2012 May 29. PMID:22644847
- Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M.: *Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes*. *J Dermatol Sci*. 2002 Dec;30(3):185-94. PMID:12443841
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S.: *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. *Immunity*. 1999 Jul;11(1):115-22. PMID:10435584
- Kawai T, Akira S.: *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):637-50. PMID:21616434
- Kawai T, Akira S.: *TLR signaling*. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):816-25. PMID:16410796
- Kawai T, Akira S.: *Antiviral signaling through pattern recognition receptors*. *J Biochem*. 2007 Feb;141(2):137-45. Epub 2006 Dec 26. PMID:17190786
- Kisich KO, Carspecken CW, Fiéve S, Boguniewicz M, Leung DY.: *Defective killing of Staphylococcus aureus in atopic dermatitis is associated with reduced mobilization of human beta-defensin-3*. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jul;122(1):62-8. Epub 2008 Jun 5.
- Kisich KO, Howell MD, Boguniewicz M, Heizer HR, Watson NU, Leung DY.: *The constitutive capacity of human keratinocytes to kill Staphylococcus aureus is dependent on beta-defensin 3*. *J Invest Dermatol*. 2007 Oct;127(10):2368-80. Epub 2007 Apr 26. PMID:17460726
- Klenha J, Krs V.: *Lysozyme in mouse and human skin*. *J Invest Dermatol*. 1967 Oct;49(4):396-9. PMID:6058499
- Klüver E, Schulz-Maronde S, Scheid S, Meyer B, Forssmann WG, Adermann K.: *Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity*. *Biochemistry*. 2005 Jul 19;44(28):9804-16. PMID:1600836

- Köllisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J, Bauer S, Jakob T, Mempel M, Ollert M.: *Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes.* Immunology. 2005 Apr;114(4):531-41.PMID:15804290
- Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, Nomicos E, Polley EC, Komarow HD; NISC Comparative Sequence Program, Murray PR, Turner ML, Segre JA.: *Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis.* Genome Res. 2012 May;22(5):850-9. Epub 2012 Feb 6.PMID:22310478
- Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L Jr.: *The antibacterial peptide pyrrolic acid inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding.* Biochemistry. 2001 Mar 13;40(10):3016-26.PMID:11258915
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA.: *Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family.* J Immunol. 2002 Jan 1;168(1):316-24.PMID:11751976
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA.: *Inducible expression of human beta-defensin 2 by Fusobacterium nucleatum in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier.* Infect Immun. 2000 May;68(5):2907-15.PMID:10768988
- Laemmli U K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227:680-5, 1970,
- Lai Y, Cogen AL, Radek KA, Park HJ, Macleod DT, Leichtle A, Ryan AF, Di Nardo A, Gallo RL.: *Activation of TLR2 by a small molecule produced by Staphylococcus epidermidis increases antimicrobial defense against bacterial skin infections.* J Invest Dermatol. 2010 Sep;130(9):2211-21. Epub 2010 May 13.PMID:20463690
- Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, Leichtle A, Yang Y, Cogen AL, Wu ZR, Hooper LV, Schmidt RR, von Aulock S, Radek KA, Huang CM, Ryan AF, Gallo RL.: *Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury.* Nat Med. 2009 Dec;15(12):1377-82. Epub 2009 Nov 22.
- Lai Y, Gallo RL.: *AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense.* Trends Immunol. 2009 Mar;30(3):131-41. Epub 2009 Feb 13.PMID:19217824
- Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P.: *Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P.* Int J Cosmet Sci. 2006 Oct;28(5):359-70.PMID:18489300
- Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC, Monks BG, McKnight CJ, Lamphier MS, Duprex WP, Espevik T, Golenbock DT.: *Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9.* Nat Immunol. 2007 Jul;8(7):772-9. Epub 2007 Jun 17.PMID:17572678
- Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Espevik T, Golenbock DT.: *The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface.* J Endotoxin Res. 2003;9(6):375-80.PMID:14733724
- Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ.: *Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein.* J Immunol. 1989 Jun 15;142(12):4428-34.PMID:2656865

- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA.: *The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.*Cell. 1996 Sep 20;86(6):973-8PMID:8808632
- Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM.: *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis.Br J Dermatol. 1974 May;90(5):525-30.PMID:4601016
- Leyden JJ, McGinley KJ, Mills OH, Kligman AM.: *Age-related changes in the resident bacterial flora of the human face.*J Invest Dermatol. 1975 Oct;65(4):379-81.PMID:1176788
- Leyvraz C, Charles RP, Rubera I, Guitard M, Rotman S, Breiden B, Sandhoff K, Hummler E.: *The epidermal barrier function is dependent on the serine protease *CAP1/Prss8*.*J Cell Biol. 2005 Aug 1;170(3):487-96.PMID:16061697
- Li M, Cha DJ, Lai Y, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M.: *The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*.*Mol Microbiol. 2007 Dec;66(5):1136-47. Epub 2007 Oct 24.PMID:17961141
- Li M, Lai Y, Villaruz AE, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M.: *Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system.*Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 29;104(22):9469-74. Epub 2007 May 21.PMID:17517597
- Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W.: *Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification.*Cell Death Differ. 2005 Nov;12 Suppl 2:1497-508.PMID:16247497
- Lippens S, Kockx M, Knaapen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W.: *Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing.*Cell Death Differ. 2000 Dec;7(12):1218-24.PMID:11175259
- Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L, Ganz T.: *Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation.*J Invest Dermatol. 2002 Feb;118(2):275-81.PMID:11841544
- Liu L, Wang L, Jia HP, Zhao C, Heng HH, Schutte BC, McCray PB Jr, Ganz T.: *Structure and mapping of the human beta-defensin *HBD-2* gene and its expression at sites of inflammation.*Gene. 1998 Nov 19;222(2):237-44.PMID:9831658
- Loo YM, Gale M Jr.: *Immune signaling by *RIG-I*-like receptors.*Immunity. 2011 May 27;34(5):680-92.PMID:21616437
- López-García B, Lee PH, Yamasaki K, Gallo RL: *Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection.*J Invest Dermatol. 2005 Jul;125(1):108-15.PMID:15982310
- Maass K, Ghanem A, Kim JS, Saathoff M, Urschel S, Kirfel G, Grümmer R, Kretz M, Le-walter T, Tiemann K, Winterhager E, Herzog V, Willecke K.: *Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43.*Mol Biol Cell. 2004 Oct;15(10):4597-608. Epub 2004 Jul 28.PMID:15282340
- Marples RR.: *Sex, constancy, and skin bacteria.*Arch Dermatol Res. 1982;272(3-4):317-20.PMID:7165340
- Matoltsy AG.: *Desmosomes, filaments, and keratohyaline granules: their role in the stabilization and keratinization of the epidermis.*J Invest Dermatol. 1975 Jul;65(1):127-42.PMID:50384

- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T.: *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells.*J Immunol. 2003 Sep 15;171(6):3154-62.PMID:12960343
- Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzus K, Hess C, Heeg K, Bals R, Lang R, Dalpke AH.: *Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells.*J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):3134-42.PMID:17312161
- McBride ME, Duncan WC, Knox JM.. *The environment and the microbial ecology of human skin.*Appl Environ Microbiol. 1977 Mar;33(3):603-8.PMID:16345214
- Medzhitov R, Janeway C Jr.: *Innate immunity.*N Engl J Med. 2000 Aug 3;343(5):338-44.PMID:10922424
- Medzhitov R, Janeway CA Jr.: *Innate immunity: impact on the adaptive immune response.*Curr Opin Immunol. 1997 Feb;9(1):4-9.PMID:9039775
- Medzhitov R, Janeway CA Jr.: *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system.*Science. 2002 Apr 12;296(5566):298-300.PMID:11951031
- Medzhitov R.: *Recognition of microorganisms and activation of the immune response.*Nature. 2007 Oct 18;449(7164):819-26.PMID:17943118
- Medzhitov R.: *Toll-like receptors and innate immunity.*Nat Rev Immunol. 2001 Nov;1(2):135-45.PMID:11905821
- Meier F, Nesbit M, Hsu MY, Martin B, Van Belle P, Elder DE, Schaumburg-Lever G, Garbe C, Walz TM, Donatien P, Crombleholme TM, Herlyn M.: *Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF.*Am J Pathol. 2000 Jan;156(1):193-200.PMID:10623667
- Menon GK, Elias PM, Feingold KR.: *Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient*Br J Dermatol. 1994 Feb;130(2):139-47.PMID:8123567
- Menzies BE, Kenoyer A.: *Signal transduction and nuclear responses in Staphylococcus aureus-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes.*Infect Immun. 2006 Dec;74(12):6847-54. Epub 2006 Sep 5.PMID:16954397
- Menzies BE, Kenoyer A.: *Staphylococcus aureus infection of epidermal keratinocytes promotes expression of innate antimicrobial peptides.*Infect Immun. 2005 Aug;73(8):5241-4.PMID:16041048
- Mineshiba F, Takashiba S, Mineshiba J, Matsuura K, Kokeyuchi S, Murayama Y.: *Anti-bacterial activity of synthetic human B defensin-2 against periodontal bacteria.*J Int Acad Periodontol. 2003 Apr;5(2):35-40.PMID:12760504
- Muzio M, Poltarutti N, Bosisio D, Prahladan MK, Mantovani A.: *Toll like receptor family (TLT) and signalling pathway.*Eur Zytokine Netw. 2000 Sep;11(3):489-90.PMID:1120318
- Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L.: *Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors.*J Invest Dermatol. 2005 May;124(5):931-8.PMID:15854033
- Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL.: *Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I kappa B-alpha ubiquitination.*Science. 2000 Sep 1;289(5484):1560-3.PMID:10968793



- Nishimura E, Eto A, Kato M, Hashizume S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N.: *Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human beta-defensin-2: antimicrobial effects of hBD-2 on oral streptococci.*Curr Microbiol. 2004 Feb;48(2):85-7.PMID:15057473
- Noble WC.: *Skin microbiology: coming of age.*J Med Microbiol. 1984 Feb;17(1):1-12.PMID:6229637
- Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY.: *Zytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes.*J Immunol. 2003 Sep 15;171(6):3262-9.PMID:12960356
- Ogawa H, Miyazaki H, Kimura M.: *Isolation and characterization of human skin lysozyme.*J Invest Dermatol. 1971 Aug;57(2):111-6.PMID:5109987
- O'Neill LA, Bowie AG.: *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.*Nat Rev Immunol. 2007 May;7(5):353-64.PMID:17457343
- Onunkwo CC, Hahn BL, Sohnle PG.: *Clearance of experimental cutaneous Staphylococcus aureus infections in mice.*Arch Dermatol Res. 2010 Jul;302(5):375-82. Epub 2010 Feb 4.PMID:20130894
- Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T.: *In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies.*Exp Mol Pathol. 2003 Apr;74(2):180-2.PMID:12710950
- Papini M, Simonetti S, Franceschini S, Scaringi L, Binazzi M.: *Lysozyme distribution in healthy human skin.*Arch Dermatol Res. 1982;272(1-2):167-70.PMID:6762151
- Pernet I, Reymermier C, Guezennec A, Branka JE, Guesnet J, Perrier E, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Viac J.: *Calcium triggers beta-defensin (hBD-2 and hBD-3) and chemokine macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3alpha/CCL20) expression in monolayers of activated human keratinocytes.*Exp Dermatol. 2003 Dec;12(6):755-60.PMID:14714554
- Pivarcsi A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgő Z, Magócsi M, Rajnavölgyi E, Dobozy A, Kemény L.: *Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes.*Int Immunol. 2003 Jun;15(6):721-30.PMID:12750356
- Pivarcsi A, Koreck A, Bodai L, Széll M, Szeg C, Belso N, Kenderessy-Szabó A, Bata-Csörgő Z, Dobozy A, Kemény L.: *Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes.*Arch Dermatol Res. 2004 Aug;296(3):120-4. Epub 2004 May 18.PMID:15148609
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM.: *The skin: an indispensable barrier.*Exp Dermatol. 2008 Dec;17(12):1063-72.PMID:19043850
- Rieg S, Garbe C, Sauer B, Kalbacher H, Schitteck B.: *Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions.*Br J Dermatol. 2004 Sep;151(3):534-9.PMID:15377337
- Röhrl J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlhans T.: *Identification and Biological Characterization of Mouse beta-defensin 14, the orthologue of human beta-defensin 3.*J Biol Chem. 2008 Feb 29;283(9):5414-9. Epub 2007 Dec 31.PMID:18167348
- Röhrl J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlhans T.: *Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2.*J Immunol. 2010 Jun 15;184(12):6688-94. Epub 2010 May 17.PMID:20483750

- Roth RR, James WD.: *Microbial ecology of the skin*. Annu Rev Microbiol. 1988;42:441-64. PMID:3144238
- Roth RR, James WD.: *Microbiology of the skin: resident flora, ecology, infection*. J Am Acad Dermatol. 1989 Mar;20(3):367-90. PMID:2645319
- Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D.: *Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in Drosophila*. J Immunol. 2002 Feb 15;168(4):1542-6. PMID:11823479
- Sass V, Pag U, Tossi A, Bierbaum G, Sahl HG.: *Mode of action of human beta-defensin 3 against Staphylococcus aureus and transcriptional analysis of responses to defensin challenge*. Int J Med Microbiol. 2008 Oct;298(7-8):619-33. Epub 2008 May 1. PMID:18455476
- Sass V, Schneider T, Wilmes M, Körner C, Tossi A, Novikova N, Shamova O, Sahl HG.: *Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci*. Infect Immun. 2010 Jun;78(6):2793-800. Epub 2010 Apr 12. PMID:20385753
- Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K.: *New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2*. Eur J Immunol. 2005 Jun;35(6):1886-95. PMID:15864780
- Schade H, Marchionini A.: *Der Säuremantel der Haut*. Klin Wochenschau (1928) 7:12-24
- Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, Tack BF, Vogel HJ.: *The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 2002 Mar 8;277(10):8279-89. Epub 2001 Dec 11. PMID:11741980
- Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C.: *Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands*. Nat Immunol. 2001 Dec;2(12):1133-7. PMID:11694882
- Schittek B, Paulmann M, Senyürek I, Steffen H.: *The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases*. Infect Disord Drug Targets. 2008 Sep;8(3):135-43. PMID:18782030
- Schittek B.: *The antimicrobial skin barrier in patients with atopic dermatitis*. Curr Probl Dermatol. 2011;41:54-67. Epub 2011 May 12. PMID:21576947
- Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R.: *Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88*. Curr Biol. 2000 Sep 21;10(18):1139-42. PMID:10996797
- Schröder JM, Harder J.: *Human beta-defensin-2*. Int J Biochem Cell Biol. 1999 Jun;31(6):645-51. PMID:10404637
- Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, Beisner J, Buchner J, Schaller M, Stange EF, Wehkamp J.: *Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human  $\beta$ -defensin 1*. Nature. 2011 Jan 20;469(7330):419-23. PMID:21248850
- Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB Jr.: *Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 19;99(4):2129-33. PMID:11854508

- Scott IR, Harding CR.: *Studies on the synthesis and degradation of a high molecular weight, histidine-rich phosphoprotein from mammalian epidermis.*Biochim Biophys Acta. 1981 Jun 29;669(1):65-78.PMID:6170342
- Shelburne CE, Coulter WA, Olguin D, Lantz MS, Lopatin DE.: *Induction of {beta}-defensin resistance in the oral anaerobe Porphyromonas gingivalis.*Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jan;49(1):183-7.PMID:15616294
- Simanski M, Dressel S, Gläser R, Harder J.: *RNase 7 protects healthy skin from Staphylococcus aureus colonization.*J Invest Dermatol. 2010 Dec;130(12):2836-8. Epub 2010 Jul 29.PMID:20668470
- Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr.: *Production of beta-defensins by human airway epithelia.*Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 8;95(25):14961-6.PMID:9843998
- Somerville DA.: *The normal flora of the skin in different age groups.*Br J Dermatol. 1969 Apr;81(4):248-58.PMID:5778713
- Sørensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N.: *Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors.*J Immunol. 2003 Jun 1;170(11):5583-9.PMID:12759437
- Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T.: *Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli.*J Immunol. 2005 Apr 15;174(8):4870-9.PMID:15814714
- Sørensen OE, Thapa DR, Roupé KM, Valore EV, Sjöbring U, Roberts AA, Schmidtchen A, Ganz T.: *Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor.*J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):1878-85. Epub 2006 Jun 15.PMID:16778986
- Steffen H, Rieg S, Wiedemann I, Kalbacher H, Deeg M, Sahl HG, Peschel A, Götz F, Garbe C, Schittek B.: *Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge.*Antimicrob Agents Chemother. 2006 Aug;50(8):2608-20.PMID:16870749
- Sterry, W.: *Kurzlehrbuch Dermatologie.* Thieme Verlag:ISBN 978-3-13-146271-8
- Takeda K, Kaisho T, Akira S.: *Toll-like receptors.*Annu Rev Immunol. 2003;21:335-76. Epub 2001 Dec 19.PMID:12524386
- Thueson DO, Chan EK, Oechsli LM, Hahn GS: *The roles of pH and concentration in lactic acid-induced stimulation of epidermal turnover.*Dermatol Surg. 1998 Jun;24(6):641-5.PMID:9648571
- Tomita T, Hitomi S, Nagase T, Matsui H, Matsuse T, Kimura S, Ouchi Y.: *Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2.*Microbiol Immunol. 2000;44(9):749-54.PMID:11092238
- Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi Y, Yoshizumi M, Ouchi Y.: *Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad).*Respirology. 2002 Dec;7(4):305-10.PMID:12421237
- Triantafilou K, Triantafilou M.: *Innate recognition of bacteria: potential therapeutic targets for bacterial sepsis.*Expert Rev Clin Immunol. 2006 Sep;2(5):787-99.PMID:20477633

- Tschachler E.: *Apoptotic pathways in the epidermis*. *Exp Dermatol*. 2005 Oct;14(10):790-1. PMID:16176293
- Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI.: *Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Sep;42(9):2206-14. PMID:9736536
- Uçkay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F.: *Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis*. *Ann Med*. 2009;41(2):109-19. PMID:18720093
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A.: *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. *Nature*. 1999 Oct 21;401(6755):811-5. PMID:10548109
- VanCompernelle SE, Taylor RJ, Oswald-Richter K, Jiang J, Youree BE, Bowie JH, Tyler MJ, Conlon JM, Wade D, Aiken C, Dermody TS, KewalRamani VN, Rollins-Smith LA, Unutmaz D.: *Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells*. *J Virol*. 2005 Sep;79(18):11598-606. PMID:16140737
- Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schröder JM, Harder J.: *NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2*. *J Biol Chem*. 2006 Jan 27;281(4):2005-11. Epub 2005 Nov 30. PMID:16319062
- Waseem A, Dogan B, Tidman N, Alam Y, Purkis P, Jackson S, Lalli A, Machesney M, Leigh IM.: *Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes*. *J Invest Dermatol*. 1999 Mar;112(3):362-9. PMID:10084315
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF.: *NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium*. *Infect Immun*. 2004 Oct;72(10):5750-8. PMID:15385474
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF.: *Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis*. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Jul;9(4):215-23. PMID:12902844
- Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF.: *Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease*. *J Leukoc Biol*. 2005 Apr;77(4):460-5. Epub 2004 Dec 23. PMID:15618294
- Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE.: *Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1999 Jun 1;38(22):7235-42. PMID:10353835
- Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulègue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W.: *Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 22;100(15):8880-5. Epub 2003 Jul 2. PMID:12840147
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S.: *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. *Science*. 2003 Aug 1;301(5633):640-3. Epub 2003 Jul 10. PMID:12855817

- Yao Y, Vuong C, Kocianova S, Villaruz AE, Lai Y, Sturdevant DE, Otto M.: *Characterization of the Staphylococcus epidermidis accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense.*J Infect Dis. 2006 Mar 15;193(6):841-8. Epub 2006 Feb 14.PMID:16479519
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T.: *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.*Nat Immunol. 2004 Jul;5(7):730-7. Epub 2004 Jun 20.PMID:15208624
- Zanger P, Holzer J, Schleucher R, Steffen H, Schitteck B, Gabrysch S.: *Constitutive expression of the antimicrobial peptide RNase 7 is associated with Staphylococcus aureus infection of the skin.*J Infect Dis. 2009 Dec 15;200(12):1907-15.PMID:19919305
- Zasloff M.: *Antimicrobial peptides in health and disease.*N Engl J Med. 2002 Oct 10;347(15):1199-200.PMID:12374882