

"Expression und Regulation antimikrobieller Peptide
an der Augenoberfläche und im Tränenapparat
des Menschen“

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.),

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl. Biol. Fabian Garreis

geb. am 15.06.1979 in Beckendorf-Neindorf

Gutachter

1. Prof. Dr. Werner Roos, Institut für Pharmazie, Universität Halle Wittenberg
2. Prof. Dr. Friedrich Paulsen, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Jens-Michael Schröder, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Ort/Datum der Verteidigung: Halle (Saale) den 27.11.2012

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	iv
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Anatomie der Augenoberfläche und des Tränenapparates	1
1.2 Immunabwehr an der Augenoberfläche.....	4
1.3 Antimikrobielle Peptide	5
1.4 Defensine	8
1.4.1 Humane β -Defensine (hBD).....	9
1.5 S100-Proteine und S100 fused type Proteine im Tränenapparat	12
1.5.1 S100-Protein Psoriasin (S100A7c)	13
1.5.2 S100 fused-type Proteine Hornerin und Filaggrin-2	15
1.6 Ziel der Arbeit.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Gewebe, Zellen und Tiere.....	18
2.1.2 Medien, Lösungen und Puffer	19
2.1.3 Geräte und Apparaturen	19
2.1.4 Enzyme, Lösungen und Reagenzien	20
2.1.5 Antikörper.....	21
2.1.6 Oligonukleotide	22
2.2 Kultivierung humaner Zelllinien	23
2.2.1 Stimulation von Zellen (Stimulationsexperimente).....	24
2.3 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe	25
2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung	26
2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	27
2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.7 Realtime RT-PCR.....	29

2.8	Gelelektrophorese	30
2.9	DNA-Sequenzierung.....	30
2.10	Immunhistochemie	31
2.10.1	Paraffineinbettung von Gewebe	31
2.10.2	Immunhistochemie an Gewebe-Paraffinschnitten	31
2.10.3	Immunhistochemie an kultivierten Zellen.....	32
2.11	Proteinisolierung	33
2.12	Western Blot Analyse.....	34
2.13	ELISA.....	35
2.14	Korneadefekt (Scratch) Modell in der Maus	36
2.15	Statistische Auswertung.....	38
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Expression der humanen β -Defensine an der Augenoberfläche und im Tränenapparat.....	39
3.1.1	Nachweis der humanen β -Defensine mittels RT-PCR	39
3.1.2	Lokalisation der humanen β -Defensine im Tränenapparat	40
3.1.3	Quantifizierung der humanen β -Defensin Konzentration mittels ELISA	42
3.2	Regulation der hBD-2 und -3 Expression in kultivierten HCE und HCjE Zellen	44
3.2.1	Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die hBD Expression	44
3.2.2	Einfluss bakterieller Bestandteile auf die hBD Expression.....	47
3.3	Induktion von Maus β -Defensinen (mBD) in einem Maus Korneadefekt-Modell.....	51
3.4	hBD Expression in pathologisch veränderten Hornhäuten	52
3.5	Psoriasin (S100A7c) Expression im Tränenapparat.....	54
3.5.1	Nachweis der Expression des Psoriasin-Gens mittels RT-PCR.....	54
3.5.2	Nachweis von Psoriasin mittels Western Blot Analyse	55

3.5.3	Quantifizierung der Psoriasin Konzentration in Bindehaut, Geweben des Tränenapparates und in Tränenflüssigkeit	56
3.5.4	Lokalisation von Psoriasin in Geweben der Augenoberfläche und im Tränenapparat	57
3.6	Regulation der Psoriasin Genexpression im Zellkulturmodell.....	59
3.6.1	Psoriasin Genexpression in HCE Zellen	60
3.6.2	Einfluss von VEGF auf die Psoriasin Genexpression	61
3.6.3	Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Psoriasin Genexpression	62
3.6.4	Einfluss bakterieller Bestandteile (PAMPs) auf die Psoriasin Genexpression.....	64
3.7	Expression und Regulation der S100 Fused-Type Proteine Hornerin und Filaggrin-2	66
3.7.1	Nachweis von Hornerin und Filaggrin-2 mittels RT-PCR	67
3.7.2	Lokalisation von Hornerin und Filaggrin-2 an der Augenoberfläche und im Tränenapparat.....	68
3.7.3	Regulation von Hornerin und Filaggrin-2 in kultivierten HCjE- und HCE-Zellen	72
4	DISKUSSION	75
4.1	Bedeutung der humanen β -Defensine im Rahmen der angeborenen Immunabwehr an der Augenoberfläche	75
4.2	Expression und Regulation von Psoriasin im Tränenapparat	84
4.3	Expression der S100 fused-type Proteine Hornerin und Filaggrin-2.....	90
4.4	Therapeutische Nutzung der multifunktionellen antimikrobiellen Peptide....	94
4.5	Ausblick.....	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	LITERATURVERZEICHNIS	103
7	ANHANG.....	115

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Ak	Antikörper
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
ddH ₂ O	<i>Aqua bidestillata</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
FKS	Fetales Kälberserum
FLG2	Filaggrin-2
hBD-1	humanes β -Defensin 1
hBD-2	humanes β -Defensin 2
hBD-3	humanes β -Defensin 3
hBD-4	humanes β -Defensin 4
HRNR	Hornerin
HCE	<i>Human Corneal Epithelial Cell Line</i> (= humane Korna-Epithelzelllinie)
HCjE	<i>Human Conjunctival Epithelial Cell Line</i> (= humane Konjunktiva-Epithelzelllinie)
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
mBD2	Maus β -Defensin 2
mBD3	Maus β -Defensin 3
mBD4	Maus β -Defensin 4
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
mJ	Millijoule

ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
n	Anzahl, Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PG	Peptidoglykan
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transkriptase PCR</i>
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
μ l	Mikroliter

Alle weiteren im Text verwendeten Abkürzungen werden direkt erklärt oder als bekannt vorausgesetzt.

1 Einleitung

Im Zeitalter zunehmender Resistenzentwicklung pathogener Bakterien gegenüber klassischen Antibiotika gerät die physiologische und therapeutische Bedeutung kleiner antimikrobieller Peptide (AMP) immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass antimikrobielle Peptide nicht nur eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunabwehr innehaben, sondern auch ein wichtiges Bindeglied zur erworbenen Immunabwehr darstellen.

Die Augenoberfläche befindet sich in ständigem Kontakt mit der Umwelt und dadurch auch mit diversen Bakterien sowie deren Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs). Außer verschiedenen protektiven antimikrobiellen Substanzen in der Tränenflüssigkeit (IgA, Lysozym, Laktoferrin und Muzine) ist auch das Epithel von Hornhaut und Bindehaut in der Lage, sich vor einer mikrobiellen Invasion durch die Produktion eines ganzen Arsenal konstitutiv gebildeter und induzierbarer antimikrobieller Peptide zu schützen. In der vorliegenden Doktorarbeit soll die Expression bereits bekannter antimikrobieller Peptide wie den β -Defensinen sowie bislang an der Augenoberfläche unbekanntem antimikrobiell wirksamen Proteinen, wie Psoriasin (S100A7c), Hornerin und Filaggrin-2 eingehend charakterisiert werden. Ferner wird die Expressionsregulation der β -Defensine in Gewebebiopsiaten pathologisch veränderter Hornhäute sowie an der Augenoberfläche von Mäusen untersucht. Schließlich werden Expression und Regulation von β -Defensinen, Psoriasin, Hornerin und Filaggrin-2 in kultivierten Kornea- und Konjunktivaepithelzellen nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen sowie nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen analysiert. Die Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen und Wirkungsweise im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz rekombinanter AMPs an der Augenoberfläche beitragen.

1.1 Anatomie der Augenoberfläche und des Tränenapparates

Die Augenoberfläche und der Tränenapparat (Apparatus lacrimalis) bestehen aus der Hornhaut (Kornea), der Bindehaut (Konjunktiva), der Tränendrüse (Glandula

lacrimalis), den Lidrösen (Meibom-Drüsen, Moll-Drüsen und akzessorische Tränendrüsen) und den ableitenden Tränenwegen (Tränensack [Saccus lacrimalis] und Tränennasengang [Ductus nasolacrimalis]) (Abb. 1-1).

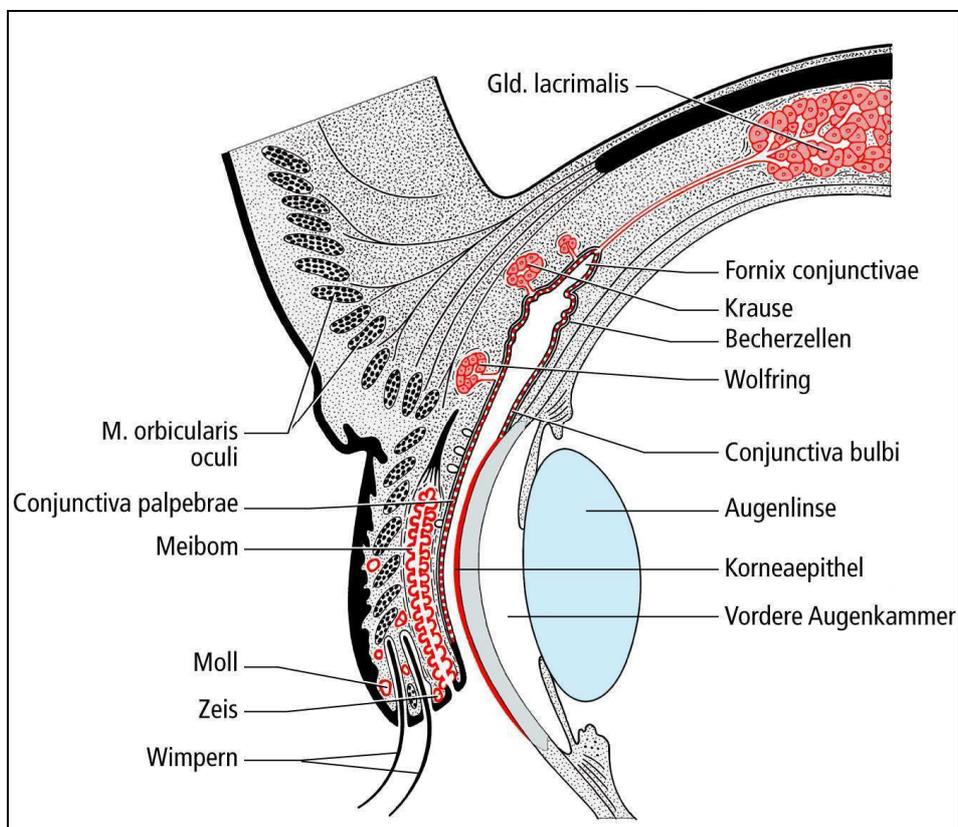


Abbildung 1-1: Augenoberfläche und Tränenapparat. Die zur Bildung der Tränenflüssigkeit beitragenden Strukturen: Kornea (Hornhaut), Bindehaut (unterteilt in: Conjunctiva bulbi, Conjunctiva palpebrae und Fornix conjunctivae), Tränendrüse (Glandula lacrimalis) sowie im Augenlid lokalisierte Meibom-Drüsen, Moll-Drüsen und akzessorische Tränendrüsen (Krause-Drüsen und Wolfring-Drüsen) sind rot markiert. (Schema J. Pekarsky, Institut für Anatomie II, FAU Erlangen-Nürnberg).

Die prinzipiell vergleichbar aufgebauten Ober- und Unterlider schützen die Augenoberfläche vor Verletzungen und Austrocknung und verteilen durch den periodischen Lidschlag, der von temporal nach nasal erfolgt, den Tränenfilm auf der Hornhaut und Bindehaut (Conjunctiva bulbi). Das Augenlid ist auf der Innenseite von einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel, der Conjunctiva palpebrae ausgekleidet. Diese geht im Bindehautsack (Fornix conjunctivae) in die Conjunctiva bulbi über. Das Skelett des Augenlids wird von einer straffen Bindegewebsplatte (Tarsus) gebildet, die außer Kollagen besonders aus Aggrecanmolekülen besteht (Milz et al., 2005). Vor dem Tarsus ist im lockeren Bindegewebe der für den Lidschluss verantwortliche Musculus orbicularis oculi eingelagert. Im Tarsus liegen ferner die baumartig verzweigten Meibom-Drüsen (Glandulae ciliares), nicht-Haar-

assoziierte holokrine Talgdrüsen. Die sekretbildenden Zellen der Meibom-Drüsen werden Meibozysten genannt. Sie bilden ein komplex zusammengesetztes Sekret aus verschiedenen Lipiden und Proteinen (McCulley und Shine, 2003), das nahe der freien inneren Lidkante sezerniert wird und die Lipidkomponente des Tränenfilms bildet (Knop et al., 2011). Im Bereich der Wimpern kommen außerdem die Wimpern-assoziierten Zeiss-Drüsen (*Glandulae sebaceae*) sowie apokrine Moll-Drüsen (*Glandulae tarsales*) vor; im Bindehautsack liegen die akzessorischen Tränendrüsen (Krause-Drüsen, Wolfring-Drüsen).

Die verzweigte, tubuloalveoläre Tränendrüse ist in Läppchen gegliedert und mündet mit 6-12 Ausführungsgängen in den Fornix conjunctivae superior. Die Azinuszellen der Tränendrüse produzieren die isotone Tränenflüssigkeit und sezernieren verschiedene antimikrobiell wirksame Substanzen sowie Muzine (Paulsen F, 2005; Paulsen und Berry, 2006; Sack et al., 2001). Durch den Lidschluss wird die Tränenflüssigkeit in Richtung auf den nasalen Augenwinkel gewischt. Verbrauchte Tränenflüssigkeit fließt hier über das obere und untere Tränenpünktchen (*Puncta lacrimalia superius* und *inferius*) in die Tränenkanälchen (*Canaliculi lacrimales*) ab, die meist nach einer kurzen gemeinsamen Verlaufsstrecke in den Tränensack einmünden. Von dort gelangt die Tränenflüssigkeit über den Tränennasengang in den unteren Nasengang (*Meatus nasi inferior*). Während der Passage durch die ableitenden Tränenwege kommt es zumindest beim Kaninchen zur Rückresorption von Tränenflüssigkeitsbestandteilen (Paulsen et al., 2002a) sowie zur Präsentation von Antigenen im Tränennasengang-assoziierten lymphatischen Gewebe (TALT) (Paulsen et al., 2000; Paulsen et al., 2002b). Die Konjunktiva geht am Limbus in die Kornea, den vorderen transparenten Teil der Augenoberfläche, über. Die Kornea ist frei von Lymph- und Blutgefäßen und besteht aus fünf Schichten: Epithel, Bowman-Membran, Stroma, Descemet-Membran und Endothel. Sie trägt maßgeblich zur Lichtbrechung bei der Bildfokussierung bei, stellt eine Diffusionsbarriere dar und verhindert das Eindringen von pathogenen Organismen. Alle diese Funktionen stehen in engem Kontakt zum Tränenfilm, der die Augenoberfläche unter physiologischen Bedingungen vollständig bedeckt.

Der präkorneale (präokuläre) Tränenfilm enthält Wasser, Lipide, Muzine, niedermolekulare Moleküle (Glukose, Harnstoff), Elektrolyte und verschiedene

protektive, antimikrobiell wirksame Substanzen (Sack et al., 2005; Sack et al., 2001). Man unterscheidet drei Hauptkomponenten: (1) eine Lipidkomponente, (2) eine wässrige Komponente und (3) eine muköse Komponente. Die Lipidkomponente wird von den Meibom-Drüsen gebildet und ist die äußerste Schicht des Tränenfilms. Die wässrige Komponente wird hauptsächlich von der Tränendrüse (~ 60%) und zusätzlich von den akzessorischen Tränendrüsen im Oberlid (Krause- und Wolfring-Drüsen) gebildet. Die muköse Komponente setzt sich aus dem Becherzellmucin MUC5AC der Konjunktiva, membrangebundenen Muzinen der Konjunktiva- und Korneaepithelzellen (MUC1, MUC4 und MUC16) sowie aus sekretorischen Muzinen der Azinuszellen der Tränendrüse und der akzessorischen Tränendrüsen (MUC5B und MUC7) zusammen. Mikroplicae, kleine Zellmembranleisten auf der Epithelzelloberfläche, eine negativ geladene Glykokalyx sowie membrangebundene Muzine (MUC1, MUC4 und MUC16) fixieren den Tränenfilm an der Augenoberfläche (Paulsen und Berry, 2006).

1.2 Immunabwehr an der Augenoberfläche

Die Augenoberfläche ist in ständigem Kontakt mit der Umwelt und somit auch einer ständigen Gefährdung durch potentiell pathogene Mikroorganismen und deren Bestandteilen ausgesetzt. Um unter physiologischen Bedingungen einen störungsfreien Visus zu ermöglichen, haben sich anatomische und immunologische Abwehrmechanismen zum Schutz der Augenoberfläche ausgebildet. Die anatomische Barriere wird durch die Augenlider, die Wimpern und den ständigen Lidschlag (Blinzeln) gebildet. Diese Barriere verhindert ein allzu leichtes Eindringen und die Kolonialisierung von Mikroorganismen an der Augenoberfläche. Dazu trägt auch die ständige Neubildung des Tränenfilms bei. Ferner stellt das Epithel von Kornea und Konjunktiva eine für Mikroorganismen schwer zu überwindende Barriere dar. Durch die apikale Ausbildung einer stark negativ geladenen Glykokalyx sowie durch den Besatz der Epithelzellen mit membrangebundenen Muzinen wird eine Besiedlung der Augenoberfläche effektiv verhindert/erschwert (Paulsen, 2008; Sack et al., 2001). Zu diesen anatomischen Barrieren kommen noch Faktoren des angeborenen und des erworbenen Immunsystems hinzu. Im Mittelpunkt der erworbenen (adaptiven) Immunabwehr an der Augenoberfläche steht die Aktivität von Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen; diese adaptive Abwehr ist durch

eine langsamere aber pathogen-spezifische Reaktion gekennzeichnet. Unterstützt wird die erworbene Immunabwehr durch ein definiert ausgebildetes Augen-assoziiertes lymphatisches Gewebe (eye-associated lymphoid tissue EALT), das in der Konjunktiva als CALT (conjunctiva-associated lymphoid tissue) und in den ableitenden Tränenwegen als TALT (tear duct-associated lymphoid tissue) bezeichnet wird (Knop und Knop, 2003; Paulsen, 2008; Paulsen et al., 2002b; Steven und Gebert, 2009). Die angeborene (innate) Immunabwehr beruht auf einer Vielzahl von Pathogen-unspezifischen Molekülen mit antimikrobieller Aktivität, wie Lysozym, Lactoferrin, Komponenten des Komplementsystems sowie zahlreichen anderen Faktoren (Kolar und McDermott, 2011; McDermott, 2009). Zu deren Bildung tragen außer Kornea- und Konjunktivaepithelzellen, die Stromafibroblasten und weitere zelluläre Bestandteile des Tränenapparates (Meibozysten der Meibom-Drüse, Azinuszellen der Tränendrüse) bei. Diese Moleküle werden teils konstitutiv gebildet, also in immer gleich bleibender Menge, oder erst durch den Kontakt mit bestimmten Mikroorganismen oder deren Bestandteilen (PAMPs) und/oder durch proinflammatorische Zytokine induziert und dann in die Tränenflüssigkeit abgegeben (Kolar und McDermott, 2011; McDermott, 2009).

1.3 Antimikrobielle Peptide

Die ständige Interaktion der Immunabwehr mehrzelliger Organismen mit potentiell infektiösen Mikroorganismen sorgt für die starke Vielfalt und die evolutionäre Konservierung antimikrobieller Peptide durch alle Spezies inklusive Bakterien, Insekten, Pflanzen bis hin zu den Säugetieren (Wiesner und Vilcinskis, 2010). In der Datenbank <http://aps.unmc.edu/AP/about.php> (Wang et al., 2009; Wang und Wang, 2004) sind über 1500 AMPs aus unterschiedlichen Spezies aufgelistet und charakterisiert. AMPs sind gekennzeichnet durch: (1) eine direkte antimikrobielle Wirkung, (2) eine Polypeptidsequenz unter 100 Aminosäuren und (3) eine Kodierung durch individuelle Gene die ribosomal exprimiert werden (Bals, 2000). Weiterhin besitzen AMPs durch ihren hohen Gehalt an kationischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) bei einem physiologischen pH-Wert eine positive Nettoladung. Ihre dreidimensionale Struktur ist durch eine hydrophobe und eine hydrophile Domäne gekennzeichnet (Hancock, 1997). Man spricht daher von amphiphilen AMPs. Auf der Grundlage ihrer Sekundärstruktur können AMPs in vier verschiedene Gruppen (Tab. 1-1) unterteilt werden: (1) lineare, α -helikale Peptide ohne Cysteine, (2) Peptide mit

β -Faltblättern und Disulfidbindungen, (3) Peptide mit einer Schleifen-Domäne und (4) Peptide mit einem hohen Anteil an ein oder zwei spezifischen Aminosäuren.

Tabelle 1-1: Übersicht über die Einteilung der antimikrobiellen Peptide, zusammen mit Strukturmerkmalen, typischen Vertretern und Vorkommen. Die Einteilung erfolgt aufgrund der Sekundärstruktur. Homologien in der Nukleotid- oder Aminosäuresequenz werden in dieser Einteilung nicht berücksichtigt. Aus Bals (2000).

Struktur	Typische Vertreter (Organismus)
Lineare, α -helikale Peptide ohne Cysteine	Magainine (Frosch) Cathelicidin LL-37 (Mensch)
Peptide mit β -Faltblättern und Disulfidbindungen	α - und β -Defensine (Säugetiere, Mensch) Protegrin (Schwein)
Peptide mit einer Schleifen-Domäne	Bactenecin (Rind)
Peptide mit einem hohen Anteil von ein oder zwei spezifischen Aminosäuren	PR-39 (Schwein) Indolicidin (Rind)

Abgesehen von diesen strukturellen Übereinstimmungen variieren AMPs in Länge, AS-Sequenz, Wirkmechanismus und Wirkspektrum. Das gemeinsame Wirkprinzip von AMPs, die direkte antimikrobielle Aktivität, beruht auf der Interaktion ihrer positiv geladenen Domänen mit der negativ geladenen Phospholipidmembran der Bakterien (Wiesner und Vilcinskas, 2010). Nach der ladungsabhängigen Interaktion kommt es zur Aggregation der AMPs und zur Ausbildung von Kanälen durch die Bakterienmembran. Im weiteren Verlauf bricht das Membranpotential, essentiell für die Energiegewinnung, zusammen und die Mikroorganismen werden lysiert. Für diesen Prozess sind verschiedene Modelle in der Literatur beschrieben (Shai, 2002; Wiesner und Vilcinskas, 2010). Die Grundlage in allen beschriebenen Modellen ist der amphiphile Charakter der AMPs. Ferner sind auch alternative Wirkmechanismen beschrieben, wie z.B. die Interaktion über spezifische Rezeptoren oder mit intrazellulären Molekülen (Wiesner und Vilcinskas, 2010).

Zusätzlich zur direkten antimikrobiellen Aktivität zeigen eine Vielzahl aktueller Studien, dass AMPs wichtige zellbiologische Prozesse wie Proliferation, Angiogenese, Wundheilung und Chemokin-ähnliche Aktivität fördern können sowie an der immunregulatorischen Beeinflussung der adaptiven (zellulären) Immunabwehr beteiligt sind (Bals und Wilson, 2003; Hoover et al., 2002; Rosenfeld et al., 2006;

Yang et al., 2002). Man bezeichnet sie daher, insbesondere im angloamerikanischen Sprachgebrauch, auch als „*Cationic host defence peptides* (HDPs)“. Ferner spielen AMPs im Rahmen verschiedener entzündlicher Erkrankungen wie Psoriasis (Schuppenflechte), Arthritis, Arteriosklerose sowie Erkrankungen der Atemwege und des Verdauungstrakts (Morbus Crohn) eine Rolle (Zaiou, 2007; Zasloff, 2002). In höheren Wirbeltieren werden AMPs wesentlich von Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute gebildet und stellen somit eine primär chemische Barriere gegen das Eindringen und die Kolonisation von pathogenen Mikroorganismen im Wirtsorganismus dar (Bulet et al., 2004; Schroder, 2004). Auch in spezialisierten Zellen zur Immunabwehr wie den Paneth-Zellen des Gastrointestinaltrakts oder in neutrophilen Granulozyten und in Makrophagen werden verschiedene AMPs gebildet und sezerniert (Ganz und Lehrer, 1999; Zasloff, 2002). Dabei wird zwischen gewebespezifischen und ubiquitär exprimierten AMPs unterschieden (Eckmann, 2005; Gallo et al., 2002).

Die wichtigsten AMPs beim Menschen stammen aus der Gruppe der Cathelicidine und der Defensine (siehe unten). Beim Menschen wurde bislang nur ein natives Cathelicidin identifiziert, das humane Cathelicidin LL-37, ein Spaltprodukt des Prä-Propeptids des humanen kationischen antimikrobiellen Proteins hCAP18, das durch das *CAMP*-Gen codiert wird (Bals und Wilson, 2003). Das kationische Peptid LL-37 wird von Epithelzellen der Kornea und der Konjunktiva gebildet und hat antibakterielle und antivirale Aktivität (Gordon et al., 2005). Die Expression von LL-37 wird durch pathogene Mikroorganismen und im Rahmen der epithelialen Wundheilung hochreguliert (Huang et al., 2006). Darüber hinaus sind weitere AMPs und Proteine mit antimikrobieller Aktivität, die in der gesunden Haut oder bei verschiedenen Hauterkrankungen beschrieben wurden, auch in Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates sowie in Tränenflüssigkeit nachgewiesen worden (Kolar und McDermott, 2011). So wurde CAP37 (*cationic antimicrobial protein 37*) als induzierbares antimikrobielles Peptid in der Kornea identifiziert (Ruan et al., 2002) und als Modulator der kornealen Epithelzellproliferation und -migration charakterisiert (Pereira et al., 2004). Ferner wurde Dermcidin als antimikrobielles Peptid aus den Sekreten der Schweißdrüsen der Haut isoliert (Schitteck et al., 2001) und im Tränenfilm nachgewiesen (McIntosh et al., 2005). McIntosh et al. (2005) zeigen auch, dass die beiden in der Leber erstmals beschriebenen antimikrobiellen

Peptide LEAP-1 (*liver expressed antimicrobial peptide 1* oder Heptcidin) und LEAP-2 in Zellen der Kornea und Konjunktiva exprimiert und reguliert werden. Dies gilt auch für Histatin-5, ein Mitglied der Histatin-reichen AMPs, die zunächst in den Kopfspeicheldrüsen identifiziert wurden. Histatine besitzen eine hohe Wirksamkeit gegen Pilze (Kavanagh und Dowd, 2004). Ferner konnten auch einige als „antimikrobielle Zytokine“ beschriebene Proteine wie CCL28 und CXCL-1 an der Augenoberfläche identifiziert werden (Cole et al., 2001; Spandau et al., 2003; Yang et al., 2003). In einer Arbeit von Mohammed et al. wird die Expression der antimikrobiell wirksamen und durch verschiedene proinflammatorische Faktoren induzierbaren RNase-7 in humaner Kornea und Konjunktiva nachgewiesen (Mohammed et al., 2011).

1.4 Defensine

Die humanen Defensine sind eine Gruppe von antimikrobiellen Peptiden aus 29 - 45 Aminosäuren, die durch drei β -Faltblattdomänen, sechs Cysteinreste mit entsprechenden intramolekularen Disulfidbrücken und durch eine stark positive Ladung charakterisiert sind (Abb. 1-2). Entsprechend der Verknüpfung der sechs Cysteinreste durch die Disulfidbrücken unterscheidet man zwei Unterklassen: α - und β -Defensine (Ganz, 2003). Eine dritte Klasse von Defensinen, die θ (theta)-Defensine (Minidefensine) wurden in Leukozyten von Nicht-Menschenaffen nachgewiesen. Es handelt sich dabei um ringförmige Spleißvarianten von zwei miteinander verschmolzenen α -Defensinen. Beim Menschen wurden sechs Pseudogene für die θ -Defensine nachgewiesen, die aber nicht funktionell exprimiert werden (Nguyen et al., 2003; Tang et al., 1999). Die Gene für α -Defensine sind auf Chromosom 8p23 lokalisiert und codieren für 29 bis 35 AS große Peptide, die durch intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten 1-6, 2-4 und 3-5 gekennzeichnet sind (Linzmeier et al., 1999; Linzmeier et al., 1993). Beim Menschen sind sechs α -Defensine bekannt. Die vier humanen neutrophilen Peptide (HNP)-1 bis -4 kommen in sehr hoher Konzentration in den Granula neutrophiler Granulozyten sowie in anderen Immunzellen vor (Agerberth et al., 2000; White et al., 1995).

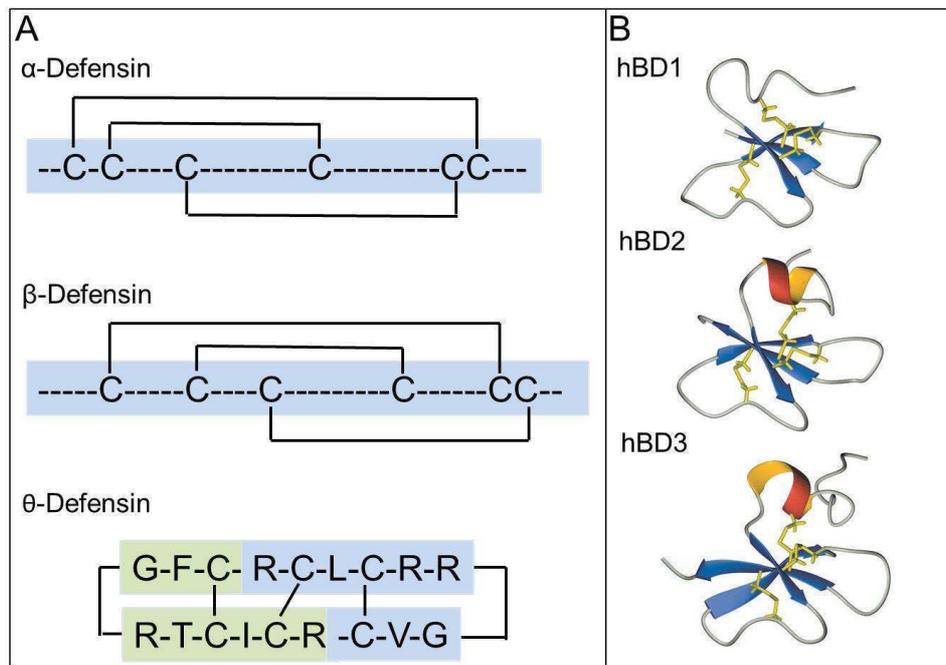


Abbildung 1-2: Darstellung der Defensin Unterklassen. (A) Schematische Abbildung der α -Defensine (oben), β -Defensine (mitte) und der θ -Defensine (unten) mit den charakteristischen sechs Cysteinresten (C) und den entsprechenden Disulfidbrücken. (B) Tertiärstruktur der humanen β -Defensine-1,-2 und -3 (Monomere). Ribbon-Diagramm mit Disulfidbrücken (gelb), β -Faltblättern (blau) und α -Helices (rot/gelb). Aus (Schibli et al., 2002)

Die α -Defensine 5 und -6 (HD5 und HD6) wurden primär in Paneth-Zellen des Dünndarms sowie im Urogenitaltrakt nachgewiesen (Jones und Bevins, 1992, 1993; Quayle et al., 1998). Alle humanen α -Defensine werden konstitutiv exprimiert und zeigen ein breites antimikrobielles Wirkspektrum (Wiesner und Vilcinskas, 2010).

1.4.1 Humane β -Defensine (hBD)

Die 36 bis 42 Aminosäure langen humanen β -Defensine (hBD) sind durch intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten 1-5, 2-4 und 3-6 charakterisiert (Tab. 1-2) und werden im Gegensatz zu α -Defensinen hauptsächlich von Epithelzellen der Epidermis und der Schleimhäute gebildet und sezerniert (Ganz, 2003). Im menschlichen Genom sind die Gene für hBD-1 bis -4 (*DEFB1*, *DEFB4*, *DEFB103* und *DEFB 104*) genau wie die der humanen α -Defensinen auf Chromosom 8p22-23 lokalisiert (Liu et al., 1997). In aktuellen Studien konnten mittels vergleichender Genomanalysen weitere potentielle β -Defensin-Gene und –Pseudogene identifiziert werden (Pazgier et al., 2006; Schutte et al., 2002). Generell ist die genomische Struktur der Defensin-Gene immer gleich. Sie besteht aus zwei Exons und einem Intron. Die erste Exon-Sequenz codiert für das Signalpeptid; das

zweite Exon codiert das inaktive Pro-Peptid (Lehrer und Ganz, 2002). Durch posttranslationale Modifikation mittels proteolytischer Enzyme werden die aktiven hBDs synthetisiert und anders als die in Vesikeln gespeicherten α -Defensine sezerniert (Ganz et al., 1993).

Tabelle 1-2: Aminosäuresequenzen (Einbuchstabencode) der humanen β -Defensin-1 bis 4. Sequenzdaten entnommen aus der UniProt-Datenbank für Proteine (<http://www.uniprot.org>). Die charakteristischen Cysteinreste sind hervorgehoben und die angegebene Nettoladung der Peptide ist berechnet für pH 7.

Peptid	UniProt Accession ID	Aminosäuresequenz	Nettoladung
hBD1	P60022	DHYN C VSSGGQ C LYSAC C PIFTKIQGT C YRGKAK CCK	+5
hBD2	O15263	GIGDPVT C CLKSGAI C HPVF C PRRYKQIGT C GLPGTK CCKK P	+6
hBD3	P81534	GIINTLQKYY C RVRRGGR C AVLS C LPKEEQIGK C STRGRK C CRRKK	+11
hBD4	Q8WTQ1	FELDRI C GGYTAR C RKK C RSQEYRIGR C PNTYAC C LRKW DESLLNRTKP	+6

Das 3,9 kDa große humane β -Defensin 1 (hBD-1) wird konstitutiv und in allen Epithelien ubiquitär exprimiert. Im Gegensatz zu anderen hBDs zeigt hBD-1 unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe antimikrobielle Aktivität (Bensch et al., 1995). Unter reduzierenden, hypoxischen Bedingungen im Darm erhöht sich hingegen die antimikrobielle Aktivität um ein Vielfaches und reguliert dabei die physiologisch vorkommende Mikroflora (Schroeder et al., 2011). HBD-2 und -3 wurden ursprünglich in der Epidermis von Patienten mit Psoriasis (Schuppenflechte) lokalisiert, konnten aber auch in gesunder Haut und in vielen anderen Epithelien und nicht-epithelialen Organen identifiziert werden (Harder et al., 1997; Hazlett und Wu, 2011). Ausgehend von einer schwachen Basisexpression werden beide Peptide durch die Stimulation mit verschiedenen Faktoren wie proinflammatorischen Mediatoren, Bestandteilen der Bakterienzellwand als auch pathogenen Mikroorganismen selbst in ihrer Expression heraufreguliert (Garreis et al., 2010; Harder et al., 2000; Hazlett und Wu, 2011; McDermott, 2009). HBD-2 besteht aus 41 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 4 kDa (Harder et al., 1997); das Molekulargewicht von hBD-3 beträgt 5,12 kDa (Harder et al., 2001). Beide hBDs zeigen ein breites Wirkspektrum gegen verschiedene Bakterien, Hefen als auch *in vitro* gegen HI-Viren (Chang und Klotman, 2004; Pazgier et al., 2006). HBD-4 konnte

beim Menschen im Hoden und im Uterus nachgewiesen werden. Die Expression von hBD-5 und -6 ist auf den Nebenhoden beschränkt (Yamaguchi et al., 2002). Ihr antimikrobielles Potential und Wirkspektrum ist noch nicht ausreichend geklärt. Darüber hinaus gibt es verschiedene humane β -Defensin Gene (*DEFB*), die mit Hilfe bioinformatischer Methoden identifiziert werden konnten, deren Expression und Lokalisation im Einzelnen jedoch noch nicht oder nur auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnten (Patil et al., 2005; Schutte et al., 2002). Die Arbeitsgruppe von Dua konnte in den Epithelien der Augenoberfläche die Expression eines weiteren β -Defensins, hBD-9, nachweisen. Interessanterweise scheint hBD-9, im Gegensatz zu anderen hBDs, bei Entzündungsprozessen und Infektionen herunterreguliert zu werden (Abedin et al., 2008; Mohammed et al., 2010).

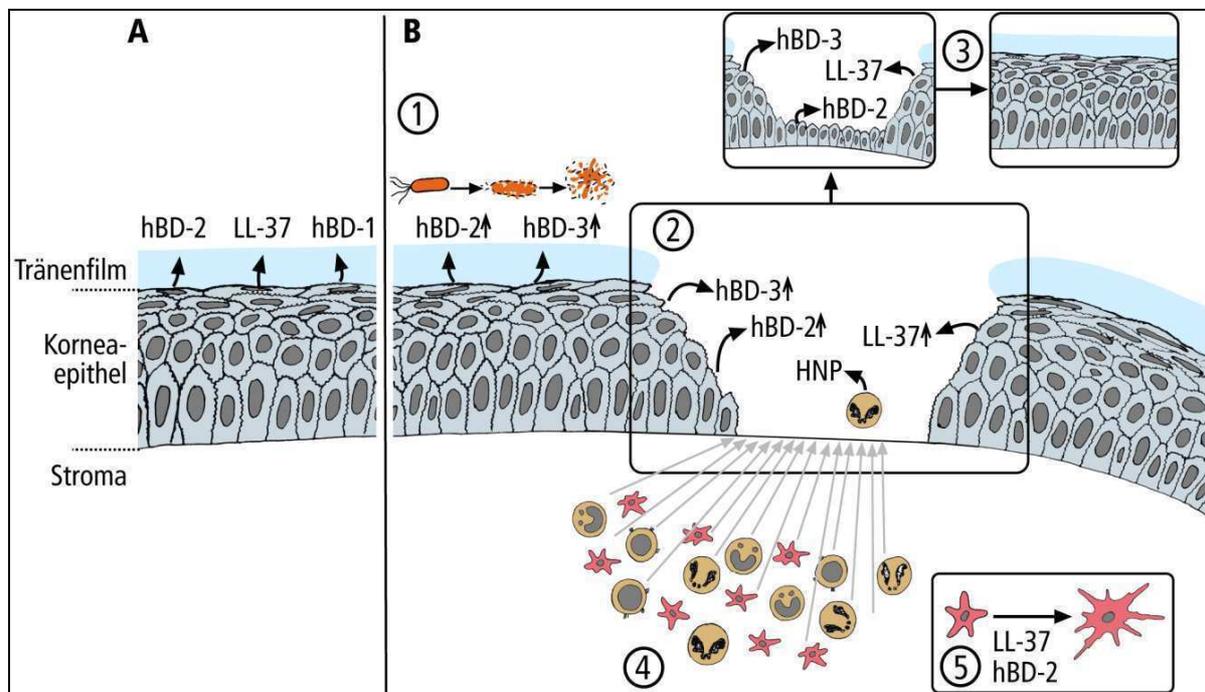


Abbildung 1-3: Funktion und Bedeutung der antimikrobiellen Peptide in der Kornea. (A) Die konstitutive Expression und Sekretion bestimmter antimikrobieller Peptide (z.B. hBD-1, LL-37 und hNP) in die Tränenflüssigkeit verhindert die mikrobielle Besiedlung der Augenoberfläche. (B) Induktion der epithelialen Expression und Sekretion von antimikrobiellen Peptiden (z.B. hBD-2 und hBD-3) in die Tränenflüssigkeit bei Verletzung, Entzündungsprozessen und bakterieller Infektion. Die antimikrobiellen Peptide sind an folgenden Prozessen beteiligt: (1) direkte Pathogen-unspezifische antimikrobielle Aktivität; (2) Förderung von Wundheilungsprozessen durch die Stimulation der Migration und (3) Proliferation in Korneaepithelzellen; (4) Aktivierung der adaptiven Immunabwehr in der Kornea durch chemotaktische Wirkung auf verschiedene Zellen des Immunsystems und (5) direkte Aktivierung unreifer dendritischer Zellen und anderer antigenpräsentierender Zellen. Das Schema fasst die wichtigsten Funktionen der antimikrobiellen Peptide in der Kornea zusammen (geändert nach McDermott, 2004).

In zahlreichen Studien (Abb. 1-3) konnte gezeigt werden, dass β -Defensine multifunktionelle Moleküle (*Host defence*-Peptide) mit einem breiten, nicht auf die antimikrobielle Aktivität beschränkten Spektrum sind. So spielen sie im Rahmen zentraler physiologischer Zellprozesse wie Proliferation (Aarbiou et al., 2002; Li et al., 2006; Murphy et al., 1993), Wundheilung (Aarbiou et al., 2004; Oono et al., 2002), Umbau der Extrazellulärmatrix (Varoga et al., 2005) und Migration (Niyonsaba et al., 2004; Niyonsaba et al., 2007; Soruri et al., 2007; Yang et al., 2000) eine Rolle. Auch konnte ein Einfluss auf die Pigmentierung der Haare sowie auf das Appetitverhalten bei Hunden nachgewiesen werden (Candille et al., 2007). Des Weiteren sind β -Defensine durch die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen ein wichtiges Bindeglied zur adaptiven Immunabwehr (McDermott, 2009). Eine veränderte β -Defensin-Expression wird im Zusammenhang mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis, atopischer Dermatitis, Morbus Crohn und cystischer Fibrose diskutiert (Zaiou, 2007).

1.5 S100-Proteine und S100 fused type Proteine im Tränenapparat

S100-Proteine und S100 fused type Proteine (SFTP) sind durch eine Calcium-bindende EF-Hand Domäne (Helix-Loop-Helix-Motiv) gekennzeichnet und werden in enger Nachbarschaft auf einem Genkluster auf Chromosom 1q21.3 codiert. Dieser 1,7 Mb große epidermale Differenzierungskomplex (*epidermal differentiation complex* EDC) codiert für eine Vielzahl von strukturellen und regulatorischen Proteinen, die beim Verhornungsprozess und bei der terminalen Differenzierung der Keratinozyten eine entscheidende Rolle einnehmen (Marenholz et al., 2001; Mischke et al., 1996; Volz et al., 1993). Aufgrund struktureller Besonderheiten werden die EDC-Proteine in vier verschiedene Untergruppen eingeteilt: (1) S100-Proteine, (2) late cornified envelope (LCE) Proteine, (3) cornified cell envelope Precursor (CCE) Proteine und (4) die S100 fused type Proteine (SFTP). Die genaue funktionelle Bedeutung der einzelnen EDC-Proteine in der Epidermis wird noch im Einzelnen diskutiert. Für einige Mitglieder konnte aber bereits eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden. Im Tränenapparat werden einzelne Proteine des epidermalen Differenzierungskomplexes, insbesondere die S100-Peptide, im Zusammenhang mit Veränderungen der Meibom-Drüsen-Ausführungsgänge bei der Meibom-Drüsen-Dysfunktion (Meibomian gland disease, MGD), der häufigsten Ursache für die

Ausbildung der hyperevaporativen Form eines Trockenen Auges (Keratoconjunctivitis sicca) verantwortlich gemacht (Liu et al., 2011; Tong et al., 2011). Auch bei anderen Erkrankungen der Augenoberfläche wie Pterygium (Flügelzell) oder Sjögren-Syndrom wird eine Beteiligung von S100-Proteinen beschrieben (Kawasaki et al., 2003; Zhou et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden das S100-Protein Psoriasin (S100A7c) und die beiden S100 fused type Proteine Hornerin (HRNR) und Filaggrin-2 (FLG2) eingehender studiert.

1.5.1 S100-Protein Psoriasin (S100A7c)

Psoriasin ist ein Mitglied der S100-Proteinfamilie und im epidermalen Differenzierungskomplex (EDC) lokalisiert (Mischke et al., 1996). Die S100-Proteine sind durch ein niedriges Molekulargewicht (9 - 13 kDa) und zwei Calcium-bindende EF-Hand Domänen gekennzeichnet (Heizmann, 2002; Schafer und Heizmann, 1996). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind insgesamt 21 S100-Proteine bekannt (Eckert et al., 2004). Von diesen sind 14 im epidermalen Differenzierungs-komplex lokalisiert. Die strukturelle Organisation der S100 Gene und Proteine ist hochkonserviert (Nakamura et al., 1998; Zimmer et al., 1996). Das typische S100-Gen besteht aus drei Exons, wobei das zweite Exon das Startcodon und die N-terminale EF-Hand Domäne und das dritte Exon die C-terminale EF-Hand Domäne codiert. Die Scharnierregion (*hinge region*) zwischen den EF-Domänen variiert stark in der S100-Familie hinsichtlich der Aminosäuresequenz (Heizmann, 2002; Pietas et al., 2002). Flankiert werden die beiden EF-Hand Domänen von hydrophoben Regionen, die Calcium-abhängig die Bindung an S100-Zielproteine ermöglichen (Abb. 1-4).

Die S100-Proteine konnten in zahlreichen verschiedenen Zelltypen und Geweben nachgewiesen werden, in denen sie regulatorische Funktionen in Calcium-Signalkaskaden übernehmen (Donato, 2003; Heizmann, 2002). Außer ihrer Funktion als intrazelluläre Calcium-Sensoren sind sie bei der Regulation und/oder der subzellulären Lokalisation bestimmter Zielproteine beteiligt und steuern zelluläre Vorgänge wie Enzymaktivität, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Calciumhomöostase (Eckert et al., 2004). Zwei S100-Proteine, Calprotectin (S100A8/S100A9-Heterotetramer) und Psoriasin (S100A7c) weisen antimikrobielle

Aktivität auf (Glaser et al., 2005; Miyasaki et al., 1993; Nisapakultorn et al., 2001; Steinbakk et al., 1990).

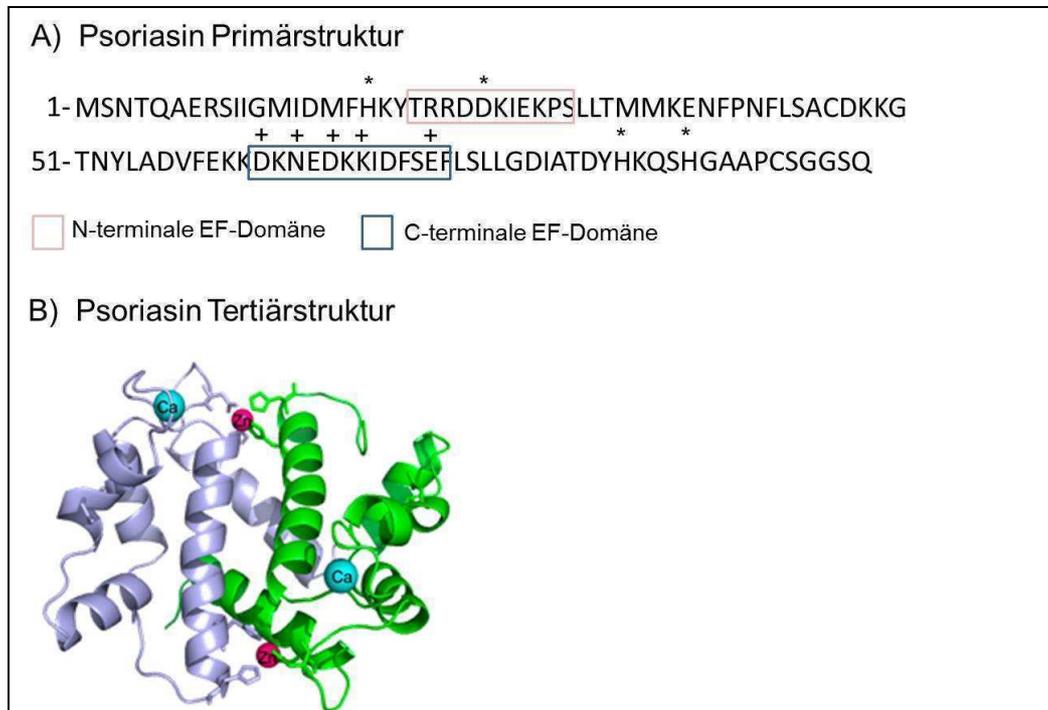


Abbildung 1-4: Proteinstruktur von humanen Psoriasin (S100A7c). (A) Primärstruktur von Psoriasin mit Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode), hervorgehoben sind die N- und C-terminale EF-Hand Domänen und die Aminosäurereste die an Zink- (*) als auch an der Calcium (+) Bindung beteiligt sind. (B) Modell eines Psoriasin Monodimers mit gebundenen Zink und Calcium Ionen (aus <http://atlasgeneticsoncology.org>).

Psoriasin (S100A7c) wurde primär in Keratinozyten von Patienten mit Psoriasis identifiziert, konnte aber auch in niedrigerer Konzentration in gesunder Epidermis nachgewiesen werden (Broome et al., 2003; Glaser et al., 2005; Madsen et al., 1991). Gläser et al. (2005) zeigten, dass Psoriasin eine hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber *Escherichia coli* aufweist. Psoriasin bildet damit einen wesentlichen Bestandteil der chemischen Barriere der Epidermis und verhindert so die Infektion der Haut gesunder Menschen mit diesem kommensalen Darmbakterium (Glaser et al., 2005). In höheren Konzentrationen zeigt Psoriasin auch bakterielle Aktivität gegen das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und das Gram-positive Bakterium *Staphylokokkus aureus* (Glaser et al., 2005; Lee und Eckert, 2007). Die Expression von Psoriasin kann in der Epidermis und in kultivierten Keratinozyten durch proinflammatorische Mediatoren, Bakterienbestandteile, UV-Bestrahlung und steigende intrazelluläre Calciumkonzentrationen gesteigert werden (Glaser et al., 2005; Glaser et al., 2009; Hoffmann et al., 1994; Niyonsaba et al.,

2008). Im Rahmen von Entzündungen und mikrobiellen Infektionen erwies sich Psoriasin als potentes Chemokin und Aktivator von CD4⁺ T-Lymphozyten und Neutrophilen (Jinquan et al., 1996; Zheng et al., 2008). An der Augenoberfläche und im Tränenapparat gibt es bislang keine Befunde zu Psoriasin.

1.5.2 S100 fused-type Proteine Hornerin und Filaggrin-2

Die Mitglieder der S100 fused type Proteine sind im epidermalen Differenzierungskomplex lokalisiert und weisen strukturelle Merkmale der EDC-Gene/Proteine auf. Die SFTP-Proteine sind durch eine S100-Domäne und durch eine weitere N-terminale EF-Hand Domäne, gefolgt von einer variablen Region von Tandem-Sequenz-wiederholungen gekennzeichnet (Abb. 1-5), die in ihrer Zusammensetzung und Länge je nach Protein variieren (Huber et al., 2005; Segre, 2006). Zu den Filament-assoziierten S100 fused type Proteine zählen: Profilaggrin, Filaggrin, Trichohyalin, Repetin, Cornulin und die beiden in dieser Arbeit untersuchten Proteine Hornerin (HRNR) und Filaggrin-2 (FLG2).

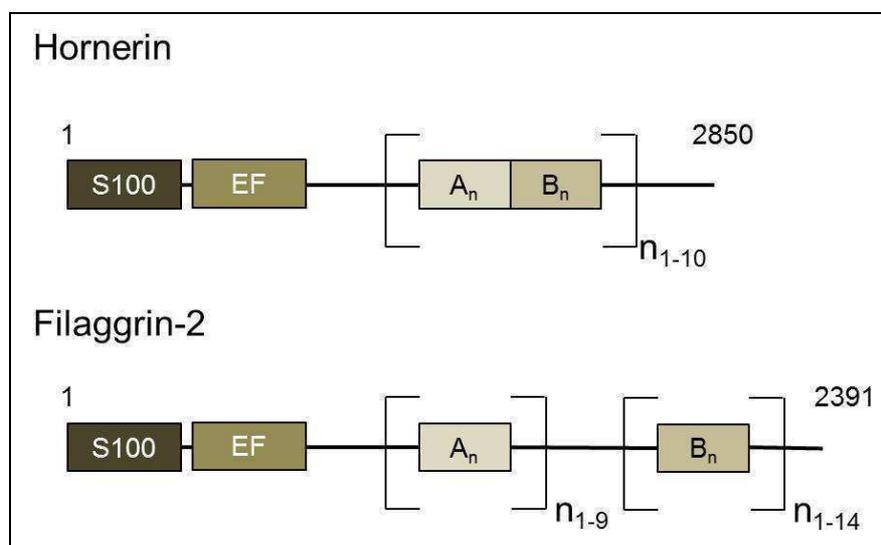


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Hornerin und Filaggrin-2. In der Abbildung hervorgehoben sind die N-terminale S100- und EF-Hand-Domäne sowie die repetitiven Domänen (A und B). Zusammensetzung und Länge (n) der repetitiven Domänen und der dazwischenliegenden Spacerregionen variieren.

Das 245 kDa große Hornerin wurde in Hautläsionen von Psoriasis-Patienten detektiert (Takaishi et al., 2005) und von Wu et al. (2009b) in gesunder Epidermis nachgewiesen. Die repetitiven Sequenzen (*tandem repeats*) sind glycin-, serin- und glutaminreich. Unter physiologischen Bedingungen ist HRNR im Stratum granulosum

und im Stratum corneum lokalisiert und bildet mit Keratinfilamenten und Profilaggrin hochmolekulare Proteinkomplexe (Makino et al., 2001; Wu et al., 2009b). Das 248 kDa große Filaggrin-2 wird ebenfalls in den oberen epidermalen Schichten exprimiert (Wu et al., 2009a). Das Maus-Homologe FLG2 ist an der Ausbildung der epidermalen Barrierefunktion beteiligt und wird bei einer metabolisch induzierten Hautbarriere-Dysfunktion herunter reguliert (Hansmann et al., 2012). FLG2 und Hornerin zeigen in *in vitro* Experimenten antimikrobielle Aktivität gegenüber Umweltkeimen wie beispielsweise unterschiedlichen *Pseudomonas*-Stämmen (Vortrag „Molecular Mechanisms of Epithelial Defense“ Jens-M. Schröder, Collaborative Research Center Universitäts-klinikum Kiel SFB 617, Ettal 2010). Über die Expression und die biologische Funktion der S100 fused type Proteine an der Augenoberfläche und im Tränenapparat liegen noch keine Befunde vor.

1.6 Ziel der Arbeit

Mikrobielle Erreger, die die anatomischen Barrieren der Augenoberfläche überwinden, treffen auf die unspezifische chemische Barriere der angeborenen Immunabwehr. In der Tränenflüssigkeit und im Epithel der Kornea und Konjunktiva sowie in einwandernden Immunzellen können verschiedene antimikrobiell wirksame Substanzen nachgewiesen werden. Unter anderem handelt es sich dabei um konstitutiv gebildete und durch verschiedene Faktoren induzierbare antimikrobielle Peptide (AMPs). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Wissen über die Expression und Regulation von AMPs an der Augenoberfläche und im Tränenapparat zu erweitern und deren Regulationsmechanismen und Wirkungsweise im Detail zu analysieren. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der funktionellen Charakterisierung der humanen β -Defensine. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Lokalisation und Charakterisierung von an der Augenoberfläche und im Tränenapparat bislang unbekanntem antimikrobiell wirksamen Proteinen (Psoriasin, Hornerin, Filaggrin-2) die im epidermalen Differenzierungskomplex lokalisiert sind und *in vitro* antimikrobielle Aktivität zeigen. Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

(1) Um die Regulationsmechanismen der AMPs an der Augenoberfläche besser zu verstehen, ist es zunächst absolut notwendig, die Synthesorte an der Augenoberfläche und im Tränenapparat zu lokalisieren. Dazu sollen die

unterschiedlichen Gewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates von verschiedenen Körperspendern systematisch auf die Expression der humanen β -Defensine, deren Expression aus der Literatur für einzelne Gewebe bereits bekannt ist, untersucht werden. Ferner soll auch die Expression von an der Augenoberfläche unbekanntem antimikrobiell wirksamen Proteinen aus der S100-Familie (Psoriasin, Hornerin und Filaggrin-2) unter gesunden Bedingungen untersucht werden.

(2) Entwicklung und Etablierung spezifischer Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) zur Quantifizierung der Konzentrationen von ausgewählten antimikrobiellen Peptiden (hBD-2, hBD-3 und Psoriasin) im Gewebe von Körperspendern sowie in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden.

(3) *In vitro* Analyse der Expressionsregulation der hBDs, Psoriasin, Hornerin und Filaggrin-2 in kultivierten Kornea- und Konjunktivaepithelzellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β und TNF α), Wachstumsfaktoren (VEGF), aufgereinigten (LPS, PG) und nicht-aufgereinigten bakteriellen Bestandteilen (verschiedenen Bakterienüberständen, PAMPs), und UV-B Strahlung sowie nach Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen.

(4) Funktionelle Expression der hBDs im Rahmen pathologisch-veränderter Hornhäute wie bullöse Keratopathie, Herpes-simplex-Keratitis, Fuchs-Endotheldystrophie und Keratokonus.

(5) Untersuchung der Expression der Maus β -Defensine (mBD2, -3 und -4) in einem *in vivo* Korneadefekt-Modell bei gleichzeitiger Applikation von Bakterienüberständen in den Bindehautsack.

(6) Erste Voruntersuchungen rücken die Bedeutung von Psoriasin (S100A7c) und der S100 fused type Proteine Hornerin und Filaggrin-2 in den Mittelpunkt des Interesses. So soll die Expression und Regulation der an der Augenoberfläche und im Tränenapparat unbekanntem Proteine eingehend untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebe, Zellen und Tiere

Für immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen wurden Gewebeproben aus Tränendrüse, Konjunktiva, Kornea und den ableitenden Tränenwegen von 9 männlichen und 11 weiblichen Körperspendern im Alter von 41 - 93 Jahren eingesetzt, die sich am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg testamentarisch für Wissenschaft und Lehre verfügt haben. Die Körperspender waren frei von Traumen, Augen- und Naseninfektionen oder Erkrankungen/Verletzungen, die die Augenoberfläche und den Tränenapparat beeinflussen könnten. Die Gewebeproben wurden in einem Zeitraum von 4 bis 24 Stunden post mortem entnommen. Nach der Präparation wurden die Gewebeproben für die immunhistochemischen Untersuchungen (jeweils rechtes Auge) in 4%-igem Paraformaldehyd fixiert und für die molekularbiologischen Untersuchungen (jeweils linkes Auge) bei -80°C eingefroren.

Ferner standen Paraffinschnitte von 26 Hornhäuten mit pathologischen Veränderungen für immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung: bullöse Keratopathie (n = 5), Herpes-simplex-Keratitits (n = 6), Fuchs-Endotheldystrophie (n = 5) und Keratokonus (n = 10). Die Patientenproben wurden während operativer Eingriffe in der Klinik für Augenheilkunde (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) entnommen und in 4%-igen Paraformaldehyd fixiert. Die Patienten wiesen keine Begleiterkrankungen auf, die die Augenoberfläche betrafen. Zwei Keratokonus-Patienten hatten Neurodermitis.

Zur Quantifizierung der Konzentration von verschiedenen antimikrobiellen Peptiden in der Tränenflüssigkeit wurden bei 8 gesunden Probanden (4 männliche und 4 weibliche) im Alter von 22 bis 55 Jahren Tränenflüssigkeit mittels steriler Glaskapillare entnommen und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Für ein *in vivo* Korneadefekt- („Scratch“) Modell in der Maus wurden 8 bis 12 Wochen alte BALB/c

Wildtyp Mäuse (n = 24) verwendet. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in der zentralen Tierhaltung gehalten. Für die tierexperimentellen Versuche lag eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung vor und die Experimente wurden in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Bedingungen des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt. Nach Beendigung des Versuches wurden die Augenbulbi entnommen und für weitergehende immunhistologische Analysen in 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Für die Zellkulturexperimente wurden eine spontan immortalisierte humane Konjunktiva-Epithelzelllinie (HCjE = human conjunctival epithelial cellline oder IOBA-NHC = Instituto de Oftalmobiología Aplicada – normal human conjunctiva) aus der Arbeitsgruppe von Dr. Yolanda Diebold (Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid, Spanien) sowie eine mit dem SV40-Virus immortalisierte humane Kornea-Epithelzelllinie (HCE = human corneal epithelial cellline) aus der Arbeitsgruppe von Dr. Kaoru Araki-Sasaki (Tane Memorial Eye Hospital, Osaka, Japan) verwendet. Beide Zelllinien wurden als Monolayer unter sterilen, standardisierten Bedingungen kultiviert und sind als Zellkulturmodell für die jeweiligen Zelltypen etabliert (Araki-Sasaki et al., 1995; Diebold et al., 2003).

2.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

Thermostabile wässrige Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck in einem Dampfdruckautoklaven autoklaviert. Lösungen, die nicht mit feuchter Hitze behandelt werden konnten, wurden über Cellulose-Acetat-Phthalat (CAP)-Membranfilter steril filtriert (0,22 µm; Filtropur, Sarstedt). Metall- und Keramikwaren wurden über 8 h bei 180°C trockener Hitze sterilisiert. Das Ansetzen von Pufferlösungen erfolgte stets mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore). Die für die Reagenzienherstellung benötigten Lösungsmittel und Feinchemikalien hatten Analysequalität und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.3 Geräte und Apparaturen

Für alle experimentellen Arbeiten wurden sterile RNase, DNase-freie Polypropylen-Einwegartikel und Glasmaterialien verwendet. Außer laborüblichen Standardgeräten wie Präzisionspipetten, Gel-Elektrophoresekammern, Laborzentrifugen, Magnet-

rühren u.ä. werden die verwendeten molekular- und zellbiologischen Geräte im folgenden Methodenteil genannt.

2.1.4 Enzyme, Lösungen und Reagenzien

Die für die molekularbiologischen und immunhistochemischen Routearbeiten genutzten kommerziell erhältlichen Enzyme, Lösungen und Reagenzien („Kits“) sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Die verwendeten Reagenzien wurden, wenn nicht anders im Methodenteil vermerkt, laut Herstellerprotokoll eingesetzt.

Tabelle 2-1: Auflistung verwendeter kommerzieller Enzyme, Lösungen und Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
ABComplex, ABC Kit	Vectastain, USA
ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, USA
Agarose	Biozym, Oldendorf
AEC Substratlösung	DAKO, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Invitrogen Karlsruhe
dNTP Mix (10mM)	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Hydrocortison	Sigma Aldrich, Deutschland
Insulin (bovine)	Sigma Aldrich, Deutschland
MassRuler™ DNA Ladder, Low Range	Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Oligo (dT) ₁₈ Primer (100 µM)	Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (P5726)	Sigma Aldrich, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma Aldrich, Deutschland
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon Rot
RiboLock™ Rnase Inhibitor (40 U/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon Rot
RQ1 RNase-freie Dnase (1U/µl)	Promega, Deutschland
Rneasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
2x SYBR®-Green Master Mix	Applied Biosystem
Taq DNA Polymerase (5 U/µl) Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TRIzol® Reagenz	Invitrogen Karlsruhe
Trypsin-EDTA (0,25%)	Sigma Aldrich, Deutschland
DMEM/HAM's F12	PAA, Österreich

2.1.5 Antikörper

Für die Expressions- und Regulationsanalysen auf Proteinebene wurden kommerziell erhältliche Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Die Antikörper gegen humanes Filaggrin-2 (α IFPS-2, α IFPS-4) und Hornerin (Anti-H2, -H3, -H4) wurden von der Arbeitsgruppe Schröder (Prof. Dr. Jens-Michael Schröder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitäts-Hautklinik, Christian-Albrechts-Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Affinitäts-aufgereinigte, polyklonale Ziegen-Antikörper gegen Epitope der entsprechenden Antigene (Wu et al., 2009a; Wu et al., 2009b). Psoriasis-Antikörper für die ELISA Experimente wurden von Prof. Dr. Regine Gläser (Universitäts-Hautklinik, Christian-Albrechts-Universität Kiel) bereitgestellt. In Tabelle 2-2 sind die jeweiligen Antikörper, der Hersteller/Referenz und die eingesetzten Verdünnungen für die jeweilige Methode angegeben. Darüber hinaus wurden alle Primärantikörper, soweit noch nicht getestet, auf ihre Spezifität, Sensitivität und Kreuzreaktivität hin getestet.

Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. Eingesetzte Antikörper-Verdünnung in der entsprechenden Methode: IHC = Immunhistochemie, WB = Western Blot, E = ELISA.

Antikörper	Hersteller/Referenz	Methode
Primärantikörper:		
β -defensin 1 (N-20)	Santa Cruz (sc-10849)	IHC (1:100)
β -defensin 2 (M-17)	Santa Cruz (sc-10858)	IHC (1:50)
β -defensin 3 (I-16)	Santa Cruz (sc-10860)	IHC (1:100)
Beta 4 Defensin	Abcam (ab14419-50)	IHC (1:100)
Anti-human BD-2	PeptoTech Inc. (500-P161G)	E (0,6 μ g/ml)
Biotinlierter anti-human BD-2	PeptoTech Inc. (500-P161GBt)	E (0,2 μ g/ml)
Anti-human BD-3	PeptoTech Inc. (500-P241)	E (0,6 μ g/ml)
Biotinlierter anti-human BD-3	PeptoTech Inc. (500-P241Bt)	E (0,2 μ g/ml)
Maus β -Defensin 2 (M-17)	Santa Cruz (sc-10858)	IHC (1:500)

Maus β -Defensin 3 (M-48)	Santa Cruz (sc-30116)	IHC (1:500)
Maus β -Defensin 4 (M-43)	Santa Cruz (sc-30118)	IHC (1:500)
Anti-Psoriasin/HID-5	IMGENEX (IMG-409A)	IHC und WB (1:100)
Anti-Psoriasin IgG (Klon HL15-4)	Gläser et al., 2005	E (50 μ g/ml)
Anti-Psoriasin IgG (Klon HL44-8)	Gläser et al., 2005	E (50 μ g/ml)
α -IFPS-2 (IFPS-Teilfragment AS 96-235)	Wu et al., 2009c	IHC (0,01 mg/ml)
α -IFPS-4 (IFPS-Teilfragment AS 2244-2391)	Wu et al., 2009c	IHC (0,01 mg/ml)
Anti-H2 (HRNR-Teilfragment AS 1075-1172)	Wu et al., 2009d	IHC (0,01 mg/ml)
Anti-H3 (gegen HRNR-Teilfragment AS 2591-2662)	Wu et al., 2009d	IHC (0,01 mg/ml)
Anti-H4 (gegen HRNR-Teilfragment AS 2727-2850)	Wu et al., 2009d	IHC (0,01 mg/ml)
β -Aktin (C4)	Santa Cruz (sc-47778)	WB (1:1000)
Nicht-immunisierte Ziege IgG	Cedarline (CLGT00)	IHC (0,01 mg/ml)
Nicht-immunisierte Maus IgG	Biozol (NG 4005.2)	IHC (0,01 mg/ml)
Nicht-immunisierte Kaninchen IgG	Cedarline (CLRB00)	IHC (0,01 mg/ml)
Sekundärantikörper:		
Kaninchen anti-Ziege IgG-Biotin	Santa Cruz (sc-2774)	IHC 1:400
Ziege anti-Kaninchen IgG-Biotin	Santa Cruz (sc-2040)	IHC 1:400
Ziege anti-Maus IgG-Biotin	Santa Cruz (sc-2039)	IHC 1:400

2.1.6 Oligonukleotide

Die für die Reverse Transkriptase-PCR und für die quantitative Realtime RT-PCR verwendeten Oligonukleotide (Primer), wurden bei der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 2-3 aufgelistet. Es handelt sich dabei um HPSF aufgereinigte Oligonukleotide im Maßstab von 0,01 μ mol. Alle Oligonukleotide wurden mittels der Software *Gene Runner* auf ihre Bindungsspezifität und mögliche Sekundärstrukturen getestet. Bei den ausgewählten Oligonukleotiden handelt es sich soweit möglich um Intron-umspannende Primer.

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide. Die Accession number (Zugangsnummer) bezieht sich auf die in der NCBI-Datenbank hinterlegte mRNA-Nukleotidsequenz der untersuchten Gene. S Sense-Primer, AS Antisense-Primer

Gen	Accession number (Zugangsnummer)	Oligonukleotidsequenz (5'-3')	Referenz
18s rRNA	NR_003286.2	S ACTCAACACGGGAAACCTCACC AS CGCTCCACCAACTAAGAACGG	Garreis et al., 2010
β-Aktin	NM_001101.3	S CAAGAGATGGCCACGGCTGCT AS TCCTTCTGCATCCTGTCTGGCA	Garreis et al., 2010
hBD-1 (DEFB1)	NM_005218.3	S CCCAGTTCCTGAAATCCTG AS CAGGTGCCTTGAATTTTGGT	Narayanan et al., 2003
hBD-2 (DEFB4A)	NM_004942.2	S ATCAGCCATGAGGGTCTTGT AS GAGACCACAGGTGCCAATTT	Harder et al., 2004
hBD-3 (DEFB103A)	NM_001081551.2	S AGCCTAGCAGCTATGAGGATC AS CTTCGGCAGCATTTTTCGGCCA	Narayanan et al., 2003
hBD-4 (DEFB104A)	NM_080389.2	S CCAGCATTATGCAGAGACTTG AS CATGCATAGGTGTTGGGACA	Harder et al., 2004
Psoriasisin (S100A7c)	NM_002963.3	S CACACATCTCACTCATCCTTCTACTCG AS GTTCTCCTTCATCATCGTCAGCAG	Gläser et al., 2005
Filaggrin-2 (FLG2)	NM_001014342.2	S ACCAGGTTCACTTAAACTTGCA AS ATGACATCCACTGTGTCTGGATC	Wu et al., 2009c
Hornerin (HRNR)	NM_001009931.1	S GGTTTCGTCTTCCCACTATGG AS AAGTAGCACCTCTGCTCTTGG	Wu et al., 2009d

2.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten immortalisierten humanen Epithelzelllinien HCE und HCjE wurden als Monolayer im entsprechendem Kulturmedium (Tab. 2-4) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 21% O₂) im CO₂-Brutschrank kultiviert. Konfluente Kulturen werden durch eine 0,25% Trypsin/EDTA-Lösung (5 min bei 37°C) abgelöst, mit FKS-haltigem Medium verdünnt und anschließend für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 2-4 ml Medium resuspendiert und die Zellen in entsprechender Verdünnung, für die einzelnen Stimulationsversuche auf sterile Zellkulturschalen ausgesät. Zur Kryokonservierung der Zelllinien wird das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO in FKS-freiem Medium) aufgenommen und nach einer 24h Zwischenlagerung bei -80°C im Kryoeinfriergerät (*Mr. Frosty*, Roth, Deutschland) in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt und gelagert.

Tabelle 2-4: Verwendete Zelllinien und Kulturmedium.

Zelllinie	Kulturmedien	Referenz
humane Konjunktiva-Epithelzelllinie (HCjE, auch IOBA-NHC)	DMEM/HAM's F12 1:1 10% fetales Kälberserum (FKS) 1 µg/ml Insulin 5 µg/ml Hydrocortison	Diebold et al., 2003
humane Kornea-Epithelzelllinie (HCE)	DMEM/HAM's F12 1:1 10% fetales Kälberserum (FKS)	Araki-Sasaki et al., 1993

2.2.1 Stimulation von Zellen (Stimulationsexperimente)

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit und Regulation der antimikrobiellen Peptide *in vitro* wurden die verwendeten Zelllinien über verschiedene Zeiträume mit unterschiedlichen proinflammatorischen Mediatoren, Wachstumsfaktoren, aufgereinigten Komponenten der Bakterienzellwand (PAMPs) und sterilen, inaktivierten Bakterienüberständen (s.u.) inkubiert. Die für die Stimulation der humanen Zelllinien verwendeten, kommerziell erworbenen Reagenzien sind in Tabelle 2-5 aufgelistet.

Tabelle 2-5: Verwendete Stimulanzen, Hersteller und eingesetzte Konzentrationen in den Stimulationsexperimenten.

Stimulanz	Lieferant	Best.-Nr.	eingesetzte Endkonzentration
TNF α	Immunotools	11343013	1-100 ng/ml
VEGF	Immunotools	11343662	1-100 ng/ml
Lipopolysaccharide (LPS <i>E.coli</i> O111:B4))	Chemicon	LPS25	10-100 µg/ml
Peptidoglykan (PG)	Fluka	77140	10-100 µg/ml

Die Bakterienüberstände von *Staphylococcus aureus* (ATCC 35556) *Burkholderia cenocepacia* (ATCC 2315), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692) und *Haemophilus influenzae* (klinisches Isolat von einem Patient mit Keratitis) wurden durch Herrn PD Dr. Dieter Worlitzsch vom Institut für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt und wie folgt hergestellt: Die Bakterienkulturen (5×10^7 CFU/ml) wurden zweimal bei 6000 rpm für

30 min zentrifugiert und anschließend doppelt steril filtriert (Porengröße 0,22 µm, Millipore). Jeweils ein Aliquot wurde auf Blutagar-Platten ausgestrichen und 2 Tage bei 37°C inkubiert, um die Keimfreiheit der Überstände nachzuweisen. Die Überstände wurden, soweit nicht anders erwähnt, in einer 1:100 Verdünnung in den Zellkulturexperimenten eingesetzt. Zur Kontrolle wurde steriles TSB (Tryptone Soy Broth) Medium, Wachstumsmedium der untersuchten Bakterienkulturen, in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro Gewebekulturschale (60 x 15 mm) ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit 1 x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gespült und über Nacht in FKS-freiem Medium inkubiert. Nach Zugabe der jeweiligen Stimulanz (Tab. 2-5) in FKS-freiem Medium wurden die Zellen über den Versuchszeitraum weiter im CO₂-Brutschrank kultiviert. Nach Beendigung der Versuche wurde das Zellkulturmedium für weiterführende ELISA-Experimente steril entnommen und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden entweder für die RNA-Isolierung mit TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen) abgelöst und bei -80°C gelagert oder immunhistochemisch (Kap. 2.10.3) untersucht. Jedes Stimulationsexperiment wurde in vier Ansätzen parallel durchgeführt, wobei die Inkubation der Zellen mit dem Lösungsmittel der untersuchten Stimulanz in FKS-freiem Medium als Kontrolle (unbehandelte Zellen) für die folgende Analyse (Kap. 2.7 und 2.13) diene.

2.3 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe

Die RNA ist für eine enzymatische Hydrolyse durch ubiquitär vorkommende RNasen sehr anfällig. Beim Arbeiten mit RNA wurde darauf geachtet, dass nur sterile, RNase-freie Verbrauchsmaterialien und Reagenzien eingesetzt wurden. Isolierte RNA wird in RNase-freiem DEPC-Wasser bei -80°C gelagert. Die Aufarbeitung der Gesamt-RNA aus zuvor homogenisiertem Gewebe erfolgte unter Verwendung eines Rneasy[®] Mini Kit (Qiagen). Die RNA-Isolierung aus den kultivierten Zellen wurde mittels TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen) durchgeführt.

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus kultivierten, stimulierten Zellen wurden diese mittels TRIzol[®] Reagenz von den Zellkulturschalen abgelöst und lysiert. Die Zell-TRIzol-Suspension wurde mit Chloroform im Verhältnis 1:5 gevortext und 5 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C für 15 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Tube überführt und mit der gleichen Menge an Isopropanol versetzt. Nach gründlichem Mischen erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, wiederholtes Vortexen sowie eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Im anschließenden DNase-Verdau wurden zu jeder Probe 2 µl RQ1 RNase-freie DNase (1 U/µl; Promega), 6 µl des 10-fachen RQ1 DNase-Puffers (Promega) und 2 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl, Fermentas) pipettiert. Die Proben wurden zunächst 30 min bei 37°C und anschließend nach Zugabe von 6 µl RQ1 DNase Stop Solution (Promega) für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Die RNA wurde mit 6 µl Natriumacetat und 200 µl Isopropanol für 30 min bei -20°C gefällt und anschließend 30 min bei 10.000 rpm erneut zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde schließlich zweimal mit 500 µl 75% Ethanol/DEPC gewaschen und jeweils für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Trocknen der Proben erfolgte bei Raumtemperatur und das Pellet wird in 30 µl DEPC-Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Für die RNA-Isolierung aus menschlichem Gewebe wurde das RNeasy® Mini Kit von Qiagen verwendet. Nach einem mechanischen Gewebeaufschluss in flüssigem Stickstoff wurden die Proben nach den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die aufgearbeitete RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) mit einem NanoVue Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Durch das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) wird die Reinheit der isolierten RNA bestimmt. RNA mit einer Ratio zwischen 1,6 und 2 wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt.

2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zum Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das RevertAid Reverse Transkriptase-Kit von Fermentas eingesetzt. Pro Ansatz wurden 2 µg RNA unter Verwendung des Oligo (dT)₁₈ Primers (100 µM, Fermentas) und unter Einhaltung des Hersteller-Protokolls umgeschrieben. Als interne Kontrolle der Integrität und Stabilität der so synthetisierten cDNA Proben wurde im Anschluss an die cDNA-Synthese zunächst eine β-Aktin PCR (Kap. 2.6) durchgeführt und diese Gel-elektrophoretisch ausgewertet. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die verwendeten Negativkontrollen (ohne Template Kontrolle) der RT-PCR wurde während der cDNA-Synthese die Reverse Transkriptase durch RNase-freies H₂O ersetzt und so bei der PCR eingesetzt.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur selektiven *in vitro* Amplifikation von definierten Nukleinsäuren, die von spezifischen Oligonukleotiden (Primern) begrenzt werden, genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl) von Invitrogen verwendet. Der PCR-Reaktionsansatz ist in Tabelle 2-6 aufgelistet. Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils 1 µl cDNA eingesetzt und ein Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Bio-Rad Laboratories Inc.) verwendet.

Tabelle 2-6: Standardreaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Reagenz	Volumen [µl]
10x Reaktionspuffer (ohne Mg)	2,5
10 mM dNTP Mix	0,5
50 mM MgCl ₂	1
10 pmol Oligonukleotid Mix	0,5
5 U/µl <i>Taq</i> DNA Polymerase	0,18
RNase-freies H ₂ O	19,32
cDNA	1
Ansatz:	25

Die für die konventionelle PCR und die Realtime RT-PCR verwendeten Gen-spezifischen Oligonukleotide (*Primer*) sind in Tabelle 2-3 aufgelistet (Kap. 2.1.6). Die

Primerpaar-spezifische Annealing-Temperaturen (A_T) sowie die berechnete Größe der PCR-Amplifikate sind in Tabelle 2-7 verzeichnet. Bei jedem PCR-Ansatz wurde immer eine Negativkontrolle (ohne Template-Kontrolle) und eine Positivkontrolle (Gen-spezifische cDNA) mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch die Agarosegelelektrophorese nachgewiesen.

Tabelle 2-7: Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide. Nukleotidsequenzen der Gen-spezifischen Oligonukleotide siehe Tabelle 2-3 (Kap. 2.1.6)

Gen	Amplifikat [bp]	Annealingtemperatur [°C]	Anwendung
18s rRNA	111	60	Realtime RT-PCR
β -Aktin	275	57 - 62	RT-PCR
hBD-1 (DEFB1)	215	60	RT-PCR
hBD-2 (DEFB4A)	172	60	RT-PCR und Realtime RT-PCR
hBD-3 (DEFB103A)	206	60	RT-PCR und Realtime RT-PCR
hBD-4 (DEFB104A)	178	59	RT-PCR
Psoriasis (S100A7)	178	62	RT-PCR und Realtime RT-PCR
Hornerin	674	60	RT-PCR
Filaggrin-2	198	60	RT-PCR

Zur semi-quantitativen Auswertung der Hornerin RT-PCR wurde die Signalintensität der PCR-Banden für Hornerin und β -Aktin (Referenzgen) nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit der Herolab E.A.S.Y. 429K Photodokumentationsanlage dokumentiert. Mittels der *ImageJ*-Software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) wurde die gemittelte Signalintensität (= Größe und Intensität des Fluoreszenzsignals) der Hornerin PCR-Bande (Signal) gegen die β -Aktin PCR-Bande für die einzelnen cDNA-Proben berechnet. Die exponentielle Phase der Hornerin PCR wurde in Vorexperimenten durch die notwendige Anzahl der PCR-Zyklen (20, 25, 30 und 35 Zyklen) für den Nachweis des Hornerin-Transkriptes in den

cDNA-Proben abgeschätzt. In den folgenden semi-quantitativen Hornerin PCR-Reaktionen wurde ein PCR-Programm mit 30 Zyklen gewählt.

2.7 Realtime RT-PCR

Die Realtime RT-PCR (Echtzeit-PCR) ist eine erweiterte Methode der konventionellen RT-PCR, die die herkömmliche Amplifikation bestimmter Nukleinsäuren mit der zusätzlichen Quantifizierung der gewonnenen DNA pro Zyklus verbindet. Die Quantifizierung wird durch die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR[®]-Green nach jedem PCR Zyklus ermöglicht.

Zur Untersuchung der cDNA-Proben (Kap. 2.5) wurde das DNA Engine Opticon[®] 2 Realtime System (MJ Research, Bio-Rad) verwendet. Für die Realtime RT-PCR Reaktionen wurde ein SYBR[®]-Green Master Mix von Applied Biosystem verwendet. Ein Standardansatz enthält: 10 µl 2x SYBR[®] Green Master Mix, 0,4 µl Primer Mix (10 pmol pro Primer), 1 µl cDNA und 8,6 µl RNase-freies H₂O. Das Standardprogramm für die Realtime RT-PCR ist in Tabelle 2-8 und die für die einzelnen Primerpaare verwendete Annealingtemperatur ist in Tabelle 2.7 aufgelistet.

Tabelle 2-8: Standardprotokoll für die Realtime RT-PCR mit SYBR[®]-Green. Annealingtemperatur (A_T) richtet sich nach den eingesetzten Oligonukleotiden (Tab. 2-7).

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Aktivierung DNA-Polymerase	2:00	50	1 x
Denaturierung	0:20	95	
Annealing	0:30	60	40 x
Amplifikation	0:40	72	
Fluoreszenzmessung			1 x
Schmelzkurve		55 – 95	1 x

Zur Berechnung der Realtime RT-PCR Effizienz für die einzelnen Gene wurde eine Standardverdünnungsreihe (800, 400, 200 und 100 ng/ml) mit cDNA aus unstimulierten Zellen bei jedem Ansatz mitgeführt. Aus den gemessenen Ct-Werten (*Cycle Threshold* für Schwellenwert-Zyklus) ließ sich die Effizienz für die einzelnen Realtime RT-PCR Reaktionen bestimmen. Für die relative Quantifizierung der

Genexpression wurde die 18S rRNA als Referenzgen (*Housekeeping-Gen*) benutzt. Das Referenzgen wird im Stimulationsmodell konstant exprimiert und bietet damit die Möglichkeit zur Normalisierung der Expressionsanalysen. Die Auswertung erfolgte nach der delta delta Ct-Methode (Pfaffl, 2001). Die Realtime RT-PCR fand in Doppelbestimmung an jeder einzelnen Probe statt. Um falsch-positive Fluoreszenzsignale durch Primer-Dimere auszuschließen wurde nach jedem Lauf eine Schmelzkurven-Analyse (55 bis 95°C) durchgeführt und ausgewertet.

2.8 Gelelektrophorese

Im Anschluss an die RT-PCR wurden die amplifizierten PCR-Amplifikate in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid Fluoreszenzsignal photometrisch dokumentiert. Dazu wurde 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und mit 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Die PCR-Proben wurden mit 4 µl 6 x Ladepuffer gemischt und im fertigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden nachfolgend durch Fluoreszenz bei 366 nm auf einem UV-Transilluminator mit einer Herolab E.A.S.Y. 429K Photodokumentationsanlage analysiert. Zur Auswertung der Amplifikatgröße wurde bei jedem Agarosegel ein DNA Größenmarker (MassRuler™ DNA Ladder, Low Range, Fermentas) mitgeführt. Zur Überprüfung der Spezifität der synthetisierten RT-PCR-Amplifikate wurden einmalig alle RT-PCR-Fragmente ansequenziert.

2.9 DNA-Sequenzierung

Die im Agarosegel durch Ethidiumbromid sichtbaren DNA-Fragmente wurden unter einem UV-Transilluminator ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas) laut Herstellerprotokoll eluiert und für die Sequenzierungs-PCR aufgereinigt. Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Laut Herstellerprotokoll erfolgt im Thermocycler eine Sequenzierungs-PCR mit anschließender Aufreinigung und Fällung der PCR-Produkte. Die getrockneten PCR-Produkte wurden durch den Sequenzierservice des Zentrums für Medizinische

Grundlagenforschung der MLU-Halle mittels eines ABI 3100 Genetic Analyzer C der Firma Applied Biosystems automatisch sequenziert. Die Sequenzergebnisse wurden mit Hilfe der NCBI Sequenz-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen und verifiziert.

2.10 Immunhistochemie

Zur Lokalisation der Expression der untersuchten antimikrobiellen Peptide auf Proteinebene wurden immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten der Konjunktiva, der Kornea, der Tränendrüse, der ableitenden Tränenwege und des Augenlides sowie an kultivierten HCE- und HCjE Zellen durchgeführt. Die dabei verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die eingesetzten Verdünnungen sind in Tabelle 2-2 aufgelistet. Bei jeder Immunhistochemie wurden entsprechende Positivkontrollen (Gewebeschnitte mit bekannter Expression der untersuchten Peptide/Proteine) und Negativkontrollen (Nicht-immunisierte Immunglobuline G) mitgeführt und analysiert. Die Auswertung der gefärbten Gewebe-Paraffinschnitte und Epithelzellen erfolgte an einem Zeiss Axiophot Mikroskop.

2.10.1 Paraffineinbettung von Gewebe

Die zu untersuchenden Gewebe der Körperspender wurden nach der Präparation mindestens 24h in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, über Nacht gewässert und in einem 2h Wechsel durch 50-, 60- und 70-prozentiges Ethanol geführt. Anschließend wurden sie in einen Gewebeeinbettautomaten (Shandon GmbH) eingebracht, durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70-, 80-, 90-, 96-prozentiges Ethanol für je 2h), Propanol und HistoClear geführt und schließlich in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden an einem Rotationsmikrotom (Medim) 7 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und auf Objektträger (HistoBond, Roth) aufgebracht. Nach 24h Trocknung bei 37°C wurden die Schnitte bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert oder direkt für die Immunhistochemie eingesetzt.

2.10.2 Immunhistochemie an Gewebe-Paraffinschnitten

Die Gewebeparaffinschnitte wurden über Nacht bei 60°C vorinkubiert und anschließend 2 x 10 min in HistoClear (Roth) und in einer absteigenden Alkoholreihe

(jeweils 5 min 95%, 80%, 70% und 60% Ethanol) bis in Aqua dest. entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Schnitte für 30 min mit 3% H₂O₂ behandelt und nach dreimaligem Spülen in Aqua dest. in Citratpuffer (pH 6) in der Mikrowelle aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Gewebeschnitte dreimal mit TBS Puffer gespült und anschließend für 20 min mit dem entsprechenden Normalserum (entspricht dem Wirtstier aus dem der Sekundärantikörper stammt) inkubiert. Nach einer zusätzlichen Inkubation mit einem Avidin/Biotin Blocking Kit (Dako) wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit der entsprechenden Primärantikörper-Verdünnung in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Anschließend wurde für 30 min ein ABCComplex/HRP (Dako) aufgetragen. Nach erneutem dreimaligem Spülen mit TBS-Puffer wurden die Schnitte für 1-5 min mit der AEC-Substratlösung (Dako) inkubiert. Die Reaktionszeit richtete sich dabei nach der Intensität der Färbung und wurde durch Abklopfen und mehrmaliges Spülen in Aqua dest. gestoppt. Es folgte eine 3 min Gegenfärbung (Zellkernfärbung) mit Hämalaun nach Mayer (Hämatoxylin-Färbung) und 15 min Bläuen mit Leitungswasser. Die so behandelten Paraffinschnitte wurden mit Aquatex eingedeckt und lichtgeschützt bis zur Auswertung unter dem Mikroskop (Axiophot, Zeiss) bei Raumtemperatur gelagert.

0,05 M TRIS (Stammlösung)

6,1g Trishydroxymethylaminomethan
in 50 ml Aqua dest. lösen
37 ml 1N HCL hinzufügen
auf 1l Aqua dest.
pH-Wert auf 7,6 einstellen

TBS-Puffer (Gebrauchslösung)

100 ml 0,05 M TRIS-Stammlösung
900 ml 0,85%ige NaCL-Lösung
pH-Wert auf 7,3 einstellen

Citratpuffer (pH 6)

4,5 ml 0,1 M Zitronensäure
20,5 ml 0,1 M Natriumzitat
225 ml Aqua dest.
Gebrauchslösung jeweils frisch angesetzt.

2.10.3 Immunhistochemie an kultivierten Zellen

Die HCE und HCjE Zellen wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen auf sterilen Deckgläschen (10 x 10 mm) ausgesät und bis zur 80-prozentigen

Konfluenz unter Standardbedingungen kultiviert. Stimulierte oder unstimulierte Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in TBS auf den Deckgläschen fixiert. Nach dreimaligem Spülen mit TBS wurden die Zellen für 30 min in einer Glycinlösung (1 g/100 ml Aqua dest.) inkubiert und im Anschluss wiederholt mit TBS gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte entsprechen dem Protokoll für Immunhistochemie an Gewebe-Paraffinschnitten (Kap. 2.10.2). Nach der Gegenfärbung (30 sec) mit Hämalun nach Mayer (Hämatoxylin-Färbung) wurden die Zellen auf einem Glasobjektträger übertragen und mit Aquatex eingebettet. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Objektträger lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

2.11 Proteinisolierung

Zum Proteinnachweis mittels Western Blot Analyse wurde die Gesamtheit der Proteine aus den untersuchten Geweben von Körperspendern und den kultivierten Zellen isoliert. Die Gewebeproben wurden mechanisch mittels Mörser und Pistell in flüssigem Stickstoff zerkleinert, mit 300 µl Ripa-Puffer versetzt und mit einem Rotor-Stator-Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zugabe eines Phosphatase- und Proteaseinhibitor Mixes (Sigma) wurden die Proben 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Protein-Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Proteinisolierung aus kultivierten Zellen wurden diese mittels Trypsin von den Kulturflaschenböden abgelöst, einmal in PBS gewaschen und das Zellpellet mit 150 µl Zellyse-Puffer (Triton X-100-Puffer + 2 µl Phosphatase/Proteaseinhibitor Mix) 30 min auf Eis lysiert. Das Lysat wird 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (Protein Assay Kit; Bio-Rad) photometrisch bestimmt. Die Proteinlösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Ripa-Puffer

790 mg Tris-Base

900 mg NaCl₂

2,5 ml Natriumdeoxycholate

1 ml 100 mM EDTA

auf 100 ml Aqua dest.

1% Triton X-100-Puffer

1 ml Triton X-100

auf 100 ml 1x PBS

10x PBS (Stammlösung)

40,9 g NaCl

8,18 g Na₂HPO₄·2H₂O

1,0 g KCl

1,2 g KH₂PO₄

auf 1l Aqua dest.

pH-Wert auf 7,4 einstellen

1x PBS (Gebrauchslösung)

100 ml 10x PBS-Stammlösung

auf 900 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung jeweils frisch angesetzt.

2.12 Western Blot Analyse

Die isolierten Proteingemische wurden nach der Laemmli-Methode unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis der untersuchten Proteine mittels spezifischer Primärantikörper (Tab. 2-2).

Tabelle 2-9: Zusammensetzung der eingesetzten Sammel- und Trenngel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

	12% Trenngel	4% Sammelgel
Polyacrylamid (30%)	4 ml	1 ml
Lösung 2	2,5 ml	-
Lösung 3	-	2,5 ml
Aqua dest.	3,5 ml	6,5 ml
Temed	20 µl	20 µl
APS (10 %)	100 µl	100 µl

Zur Gel-elektrophoretischen Trennung der Proteingemische wurden 20 µg der Proteinextrakte mit 15 µl RSB-Puffer versetzt, bei 100°C für 5 min aufgekocht und nach dem Abkühlen bei 9000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel (Tab. 2-9) aufgetragen und bei 125 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) geblottet. Nach Beendigung des Blot-Vorganges wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung (5% BSA in TBST) geblockt und anschließend mit den entsprechenden Primärantikörper (Tab. 2-2) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde

die Membran dreimal mit TBST (jeweils 5 min) gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 2-2) für eine Stunde bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (3 x 5 min TBST) wird der Blot mit dem ECL-Mix (Western blotting Luminol Reagent, Santa Cruz) 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm in der Dunkelkammer. Die Belichtungszeit variiert zwischen 5 und 60 min. Zur internen Kontrolle werden konstitutiv exprimierte Referenzproteine (β -Aktin) nachgewiesen.

10x TBS (Stammlösung)

80 g NaCl
2 g KCl
30 g TRIS
auf 1l Aqua dest.
pH-Wert auf 7,4 einstellen

1x TBST Puffer (Gebrauchslösung)

100 ml 10x TBS Stammlösung
900 ml Aqua dest.
1 ml Tween20

12,5xTransferpuffer (Stammlösung)

18,2 g TRIS-Base
90 g Glycin
auf 1l Aqua dest.

1x Transferpuffer (Gebrauchslösung)

80 ml 12,5x Transferpuffer
200 ml Methanol
auf 1l Aqua dest.
2 ml 10% SDS

Lösung 2

1,5 M TRIS pH 8,8
36,3 g TRIS
auf 200 ml Aqua dest.
pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen

Lösung 3

0,5 M TRIS pH 6,8
6 g TRIS
auf 100 ml Aqua dest.
pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen

2.13 ELISA

Medienüberstände (Zellkulturüberstände) von stimulierten HCE und HCjE Zellen, aufgereinigte Proteine der untersuchten Gewebe und mittels Glaskapillare gesammelte Tränenflüssigkeit gesunder Probanden wurden mittels spezifischer Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) auf die Konzentration der untersuchten antimikrobiellen Peptide hin untersucht. Für die Sandwich-ELISAs wurden 100 μ l des entsprechenden Capture-Antikörpers (0,6 μ g/ml in 0,05 M Carbonat-Puffer pH 9,6) über Nacht bei 4°C auf eine 96-Well Mikrotiterplatte (Greiner

Bio-one, Deutschland) vorgelegt. Am folgenden Tag wurde der Capture-Antikörper verworfen und die Mikrotiterplatte mit 200 µl Waschpuffer (1x PBS + 0,02% Tween20, 3 x 5 min) gewaschen. Nach einer 30 min Inkubation mit Blockierlösung (1% BSA im Waschpuffer) wurden jeweils 100 µl der zu untersuchenden Proben, Standards und Hintergrundkontrollen (Waschpuffer mit 0,1% BSA) aufgetragen und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit dem Waschpuffer wurden die Ansätze mit 100 µl biotiniliertem Detektions-Antikörper (0,2 µg/ml in 1x PBS + 0,1% BSA) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Streptavidin-HRP (1:10000 in PBS + 0,1% Tween20) für 30 min dazugeben. Für den enzymatischen Nachweis wurde das Chromogen TMB (100 µl/Well, Sigma) verwendet. Die Nachweisreaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von 1 N Schwefelsäure (100 µl/Well) gestoppt und die Extinktion bei 405 nm mit einem Multikanal ELISA-Reader (Bio-Tek) gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration der untersuchten Peptide wurden geeignete Standard-Verdünnungsreihen mitgeführt. Dazu wurden rekombinantes hBD-2 (2,5 bis 0,078 ng/ml, PeproTech Inc. 300-49) und hBD-3 (10 bis 0,0156, PeproTech Inc. 300-52) in 1x PBS + 0,1% BSA entsprechend verdünnt. Für den Psoriasis-ELISA wurde aus humaner Epidermis aufgereinigtes Psoriasisin (40 bis 0,6 ng/ml) für die Standardkurve eingesetzt (Glaser et al., 2005). Alle Proben wurden grundsätzlich doppelt aufgetragen und aus diesen Werten der Mittelwert für die weitere Auswertung gebildet. Verdünnungsfaktoren wurden immer in die Konzentrationsberechnung mit einbezogen.

0,05 M Carbonat-Puffer

2,93 g NaHCO₃

1,59 g Na₂CO₃

auf 800 ml Aqua dest.

pH-Wert auf 9,6 einstellen

auf 1l auffüllen

Waschpuffer

1l 1x PBS

200 µl Tween20 (0,02 %)

2.14 Korneadefekt (Scratch) Modell in der Maus

Die Expression von Maus β-Defensinen (mBD2, -3 und -4) wurde mit Hilfe eines Korneadefekt Modells in BALB/c Wildtyp Mäusen (8 bis 12 Wochen) untersucht. Dazu wurde das apikale Korneaepithel mechanisch gereizt/verletzt und gleichzeitig

ein inaktivierter Bakterienüberstand von *St. aureus* appliziert. Pro Versuchsgruppe wurden 8 Mäuse (n = 8) eingesetzt. Für die tierexperimentellen Versuche lag eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung vor und die Experimente wurden in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Bedingungen des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt.

Tabelle 2-10: Einteilung der Versuchsgruppen im Korneadefekt Modell in BALB/c Mäusen.

Gruppe	Korneadefekt	Applikation von <i>St. aureus</i> Überstand	Anzahl der Mäuse n
1	Ja	Nein	8
2	Nein	Ja	8
3	Ja	Ja	8

Zu Versuchsbeginn wurden die BALB/c Mäuse mit einem Cocktail aus 60 µl Rompun (Provet AG), 180 µl Ketavet (Warner-Lambert AG) und 1560 µl 0,9% NaCl entsprechend ihres Körpergewichts narkotisiert. Dann wurden die Augen der Versuchstiere unter Einsatz eines Stereomikroskops auf eventuelle Trübungen und morphologische Veränderungen untersucht. Für den Versuchsaufbau (Tab. 2-10) wurden drei Gruppen (n = 8 Mäuse pro Versuchsgruppe) gebildet: (1) Mäuse mit alleiniger kornealer Verletzung (= Scratch), (2) Mäuse bei denen nur der *St. aureus* Überstand in den Bindehautsack appliziert wurde und (3) Mäuse mit kornealem Scratch und zusätzlicher Applikation des Überstand von *St. aureus* in den Bindehautsack. In den Versuchsgruppen 1 und 3 wurde die Hornhaut des linken Auges oberflächlich mit einer sterilen 25 5/8 Kanüle durch dreimaliges Kratzen über das Korneaepithel verletzt. Hierbei erfolgte die Hornhautverletzung so „sanft“, dass die oberflächlichen Epithelzellen nicht zerstört oder „weggekratzt“ wurden, sondern dass lediglich ein Permeabilitätsdefekt gesetzt wurde. Anschließend wurden den Mäusen der Gruppen 2 und 3 10 µl eines inaktivierten *St. aureus* Überstands (10^7 CFU/ ml; Kap. 2.2.1) in den Bindehautsack des linken Auges appliziert. In der Versuchsgruppe 1 wurde das gleiche Volumen an 1 x PBS eingeträufelt. Das rechte Auge jeder Maus diente als unbehandelte Kontrolle und wurde mit ausgewertet. Sechs Stunden nach Verletzung und Applikation des *St. aureus* Überstandes wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet, die Augenbulbi entnommen und für die immunhistochemische Analyse in 4%-igem PFA fixiert. Gewebeproben aus der

Maus-Epidermis und dem Mäuse-Dünndarm wurden gewonnen und bei der anschließenden immunhistochemischen Auswertung als Positivkontrollen eingesetzt.

2.15 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Realtime RT-PCR und ELISA Experimente sind graphisch als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM) der analysierten Proben dargestellt. Unterschiede der Genexpression in den Stimulationsexperimenten sind als n-facher Anstieg/Abfall im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt. Die Ergebnisse der ELISA Experimente entsprechen den absoluten Konzentrationen der untersuchten Peptide/Proteine bezogen auf die Gesamtproteinmenge. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism 5 Software für Windows unter Verwendung des zweiseitigen Students T-Test. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und entsprechend gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Um die Regulationsmechanismen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen β -Defensine (hBD), Psoriasin (S100A7c) und der S100 fused-type Proteine Hornerin (HRNR) und Filaggrin-2 (FLG2) an der Augenoberfläche und im Tränenapparat besser zu verstehen, war es zunächst notwendig, die Syntheseorte unter physiologischen Bedingungen zu detektieren. Die Expression der β -Defensine wurde darüber hinaus auch im Rahmen pathologischer Hornhautveränderungen sowie in einem *in vivo* Korneadefekt-Modell in der Maus untersucht. Schließlich wurde die Expressionregulation von hBD-2, hBD-3, Psoriasin und Hornerin auf mRNA- und Protein-Ebene unter Simulation inflammatorischer Prozesse und nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen in kultivierten Kornea- und Konjunktivaepithelzellen analysiert.

3.1 Expression der humanen β -Defensine an der Augenoberfläche und im Tränenapparat

Die Expression von hBD-1 bis -4 in postmortalem Körperspendergewebe der Augenoberfläche und im Tränenapparat wurde mittels RT-PCR und Immunhistochemie untersucht. Zur Quantifizierung der hBD-2 und -3 Peptidkonzentration in Gewebeproben von Körperspendern und in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden wurden hochsensitive, spezifische ELISAs durchgeführt.

3.1.1 Nachweis der humanen β -Defensine mittels RT-PCR

Der Nachweis der humanen β -Defensine (hBD-1 bis -4) erfolgte auf mRNA-Ebene mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Das Amplifikationsprodukt von hBD-1 (215 bp) lässt sich in allen untersuchten Gewebeproben (n = 18 für jedes Gewebe) nachweisen. Die RT-PCR Amplifikate von hBD-2 (172 bp) und hBD-4 (178 bp) sind in Kornea und Konjunktiva nachweisbar, kommen aber nicht in der Tränendrüse und in den ableitenden Tränenwegen vor. HBD-3 (206 bp) mRNA wird ausschließlich in humaner Kornea detektiert, nicht aber in Konjunktiva, Tränendrüse oder ableitenden Tränenwegen (Abb. 3-1). Als

Negativkontrolle wurden RNA-Proben ohne Reverse Transkriptase umgeschrieben, so dass eventuelle Signale im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel auf Fehlbindungen der verwendeten Primer mit genomischer DNA-Verunreinigung zurückgeführt werden könnten. Die β -Aktin Kontroll-RT-PCR ist positiv und von gleicher Intensität für die untersuchten Gewebeproben. Die nach elektrophoretischer Auftrennung erzielten PCR-Fragmente stimmen mit den erwarteten Fragmentgrößen (bp) überein und ließen sich mittels Sequenzierung und Sequenzvergleich in der NCBI-Nukleinsäure-Datenbank bestätigen.

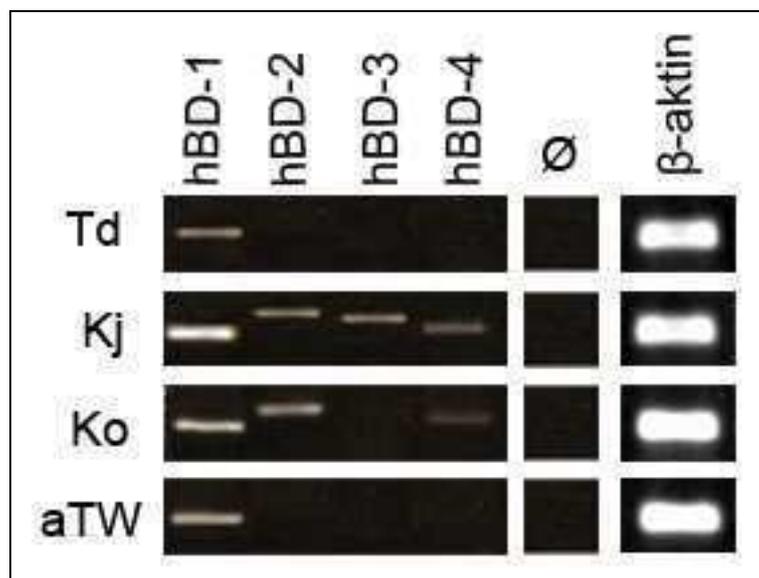


Abbildung 3-1: RT-PCR Analyse der humanen β -Defensin Genexpression in Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates. Repräsentatives Ergebnis ($n = 18$ für jedes Gewebe) der hBD-1, -2, -3 und -4 RT-PCR Reaktion im Ethidiumbromid gefärbten 1,5% Agarosegel. TD-Tränendrüse, Kj-Konjunktiva, Ko-Kornea, aTW-ableitende Tränenwege, Ø RT-PCR-Negativkontrolle (ohne Reverse Transkriptase bei cDNA-Synthese), β -Aktin als Referenzgen (Ladungskontrolle), DNA-Banden für hBD-1 (215 bp), hBD-2 (172 bp), hBD-3 (206 bp), hBD-4 (178 bp) und β -Aktin (275 bp) stimmen mit den erwarteten Größen überein.

3.1.2 Lokalisation der humanen β -Defensine im Tränenapparat

Für den immunhistochemischen Nachweis von hBD-1, -2, -3 und -4 auf Proteinebene wurden Paraffinschnitte (7 μ m) der Kornea, Konjunktiva (Conjunctiva palpebrae), Tränendrüse und der ableitenden Tränenwege von 18 verschiedenen Körperspendern ($n = 18$) verwendet. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität wurden nicht-immunisierte Immunglobuline G (IgG) eingesetzt. Alle so untersuchten Kontrollschnitte (Ø) zeigten keine Immunreaktion. Als Positivkontrolle wurden

Paraffinschnitte der Epidermis (hBD1), Knorpelgewebe von Arthrose-Patienten (hBD-2 und -3) und Lungengewebe (hBD-4) mitgeführt.

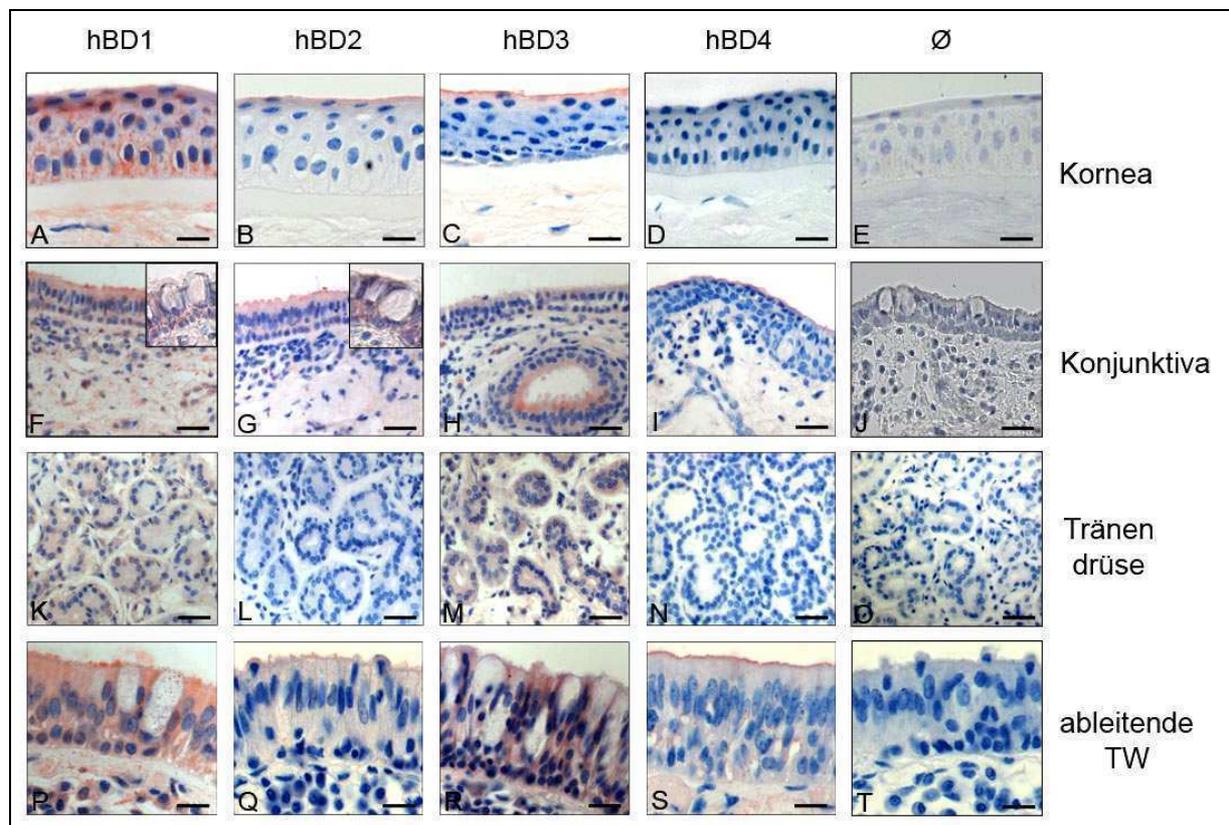


Abbildung 3-2: Immunhistochemische Lokalisation der humanen β -Defensine an der Augenoberfläche und im Tränenapparat. Nachweis der hBD-1, -2, -3 und -4 Peptide in Kornea (A-D), Konjunktiva (F-I), Tränen drüse (K-N) und ableitenden Tränenwegen (P-S). Nicht-immunisierte IgG (\emptyset) werden als Negativkontrolle eingesetzt. Inserts in F und G zeigen intraepitheliale Becherzellen. Das rote Reaktionsprodukt demonstriert die positive Immunreaktivität der eingesetzten Antikörper. Zellkernfärbung (blau) mit Hämatoxylin. Balken: A-E, P-T 42,5 μ m; F-O 176 μ m

Durch immunhistochemischen Nachweis (rotes Reaktionsprodukt = Immunreaktion) wurde die gewebespezifische Expression der hBDs wie folgt lokalisiert (Abb. 3-2):

Kornea: Die hBD-1 Expression ist intrazytoplasmatisch im gesamten mehrschichtig unverhornten Korneaepithel detektierbar (Abb. 3-2A). Auch das Stroma und das Korneaendothel reagieren mit dem eingesetzten hBD-1 Antikörper positiv. Die abgeplatteten Epithelzellen der Superfizialschicht der Kornea reagieren nur schwach mit den hBD-2 und -3 Antikörpern. Alle anderen Schichten zeigen keine Reaktivität gegenüber den verwendeten hBD-2 und -3 Antikörpern (Abb. 3-2B und C). HBD-4 lässt sich in keiner Kornea der untersuchten Körperspender nachweisen (Abb. 3-2D).

Konjunktiva: Alle analysierten Konjunktivapräparate zeigten eine immunhistochemische Reaktion mit den vier verwendeten hBD Antikörpern (Abb. 3-2F-J).

Die vier hBD-Peptide sind intrazytoplasmatisch in den hochprismatischen Zylinderepithelzellen der Konjunktiva lokalisiert. Eine nicht-quantifizierte, stärkere Antikörperfärbung tritt am apikalen Pol auf. Darüber hinaus reagieren die Basalzellen der Konjunktiva sowie subepithelial in der Lamina propria liegende Zellen mit hBD-1, -2 und -3 Antikörpern positiv. Der hBD-4 Antikörper zeigt keine Reaktivität in diesen Zellen. In den intraepithelialen Becherzellen und deren Muzin-haltigem Sekretionsprodukt ist keine Reaktivität mit den vier hBD Antikörpern festzustellen (Abb. 3-2 Vergrößerungen in F und G). *Tränendrüse*: Mittels Antikörpern gegen hBD-1 und hBD-3 lässt sich die Expression der entsprechenden Peptide intrazytoplasmatisch in den Azinuszellen der Tränendrüse von Körperspendern detektieren (Abb. 3-2K und M). Im Gegensatz dazu ist ein Nachweis von hBD-2 und -4 (Abb. 3-2L und N) in keiner der untersuchten Tränendrüsen möglich. *Ableitende Tränenwege*: Alle vier hBD Antikörper reagieren in den hochprismatischen Epithelzellen der ableitenden Tränenwege positiv (Abb. 3-2P-S). HBD-1 und -3 sind auch in der Basalzellschicht des Epithels und in freien Zellen der Lamina propria lokalisierbar. Intraepitheliale Becherzellen und deren Sekretionsprodukte zeigen keine Reaktivität. Die Antikörper gegen hBD-2 und -4 reagieren mit der apikalen Oberfläche der hochprismatischen Zylinderepithelzellen der ableitenden Tränenwege positiv; im Gegensatz dazu ist intra- und subepithelial nur eine schwache Reaktivität detektierbar (Abb. 3-2Q und S).

3.1.3 Quantifizierung der humanen β -Defensin Konzentration mittels ELISA

Zur Verifizierung und Quantifizierung der hBD-2 und -3 Expression wurden spezifische Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstests (ELISAs) durchgeführt. Dazu wurden die Gesamtproteine aus humanen Korneae (n = 5), Konjunktivae (n = 4), Tränendrüsen (n = 8), ableitenden Tränenwegen (n = 7) aus Körperspendergewebe und zusätzlich die Tränenflüssigkeit gesunder Probanden (n = 8) isoliert und auf die hBD-2 und -3 Konzentration hin untersucht. Zur Quantifizierung wurden rekombinante hBD-2 und -3 Peptide in einer entsprechenden Verdünnungsreihe eingesetzt. Die Spezifität der verwendeten hBD-2 und -3 Antikörper wurde durch Kreuzreaktivitätstests und eingesetzte Positivkontrollen (stimulierte Zellüberstände) sichergestellt.

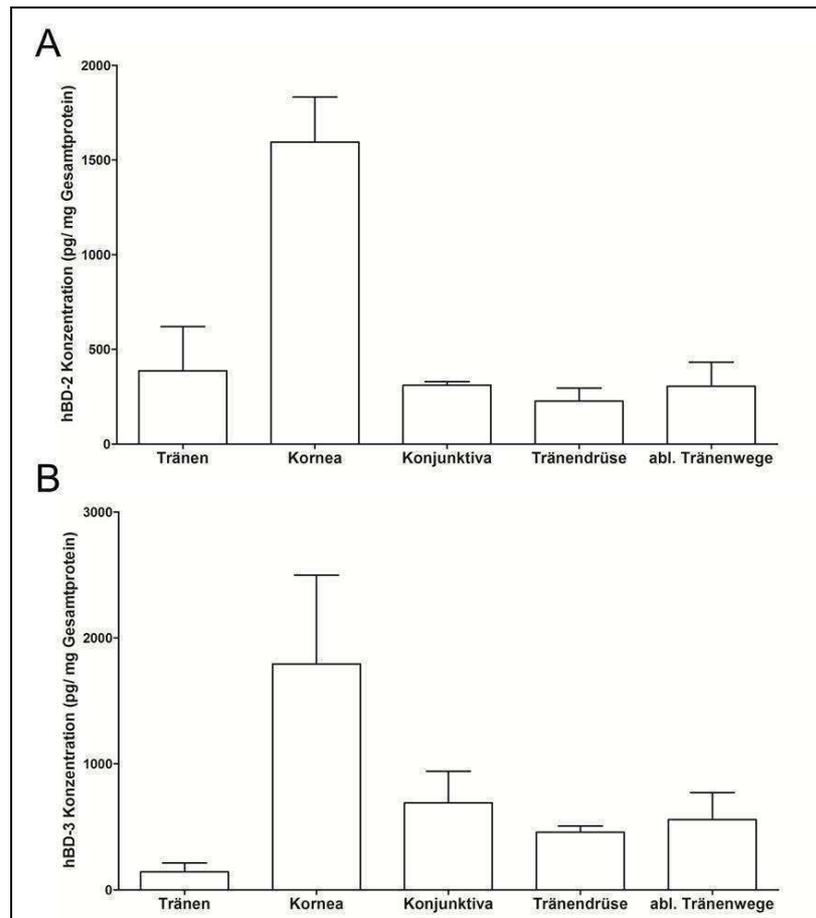


Abbildung 3-3: HBD-2 (A) und hBD-3 (B) Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden und in Gewebeproben von Körperspendern. Quantifizierung der hBD-2 und -3 Peptid Konzentrationen (ng/ mg Gesamtprotein) in Tränenflüssigkeit (n = 8), Korneae (n = 5), Konjunktivae (n = 4), Tränendrüsen (n = 8) und ableitenden Tränenwegen (n = 7) mittels ELISA-Messungen. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler der gemessenen Konzentrationen in den jeweiligen Proben.

Beide Peptide können in allen untersuchten okulären Geweben sowie in der Tränenflüssigkeit detektiert und quantifiziert werden. Für das hBD-2 Peptid wird die höchste Konzentration in humaner Kornea (1595 ± 238 pg/mg Gesamtprotein) gemessen. Die Tränenflüssigkeit enthält 387 ± 24 pg/mg, Konjunktiva 310 ± 19 pg/mg, Tränendrüsenewebe 226 ± 69 pg/mg und Gewebe der ableitenden Tränenwege 305 ± 128 pg/mg (Abb. 3-3A). Im Vergleich zur hBD-2 Konzentration ist die hBD-3 Konzentration in der Tränenflüssigkeit deutlich geringer (142 ± 71 pg/mg Gesamtprotein), wohingegen die untersuchten Gewebeproben eine höhere hBD-3 Konzentration aufweisen: Kornea (1793 ± 706 pg/mg), Konjunktiva (690 ± 251 pg/mg), Tränendrüse (457 ± 50 pg/mg) und ableitende Tränenwege (558 ± 214 pg/mg) (Abb. 3-3B).

3.2 Regulation der hBD-2 und -3 Expression in kultivierten HCE und HCjE Zellen

Als *in vitro* Modell für die Analyse der hBD-2 und -3 Expression wurde eine etablierte Kornea- (HCE) und eine Konjunktivaepithelzelllinie (HCjE) verwendet. Die kultivierten HCE- und HCjE Zellen wurden, wie im Methodenteil (Kap. 2.2.1) beschrieben, mit verschiedenen Stimulanzen behandelt. Anschließend wurde die relative Genexpression von hBD-2 und -3 mittels quantitativer Realtime RT-PCR bestimmt. Die Sekretion der hBD-2 und -3 Peptide in den Mediumüberstand wurde mittels ELISA-Experimenten quantifiziert. Zum Vergleich wurden bei jedem Experiment nicht-stimulierte HCE bzw. HCjE Zellen (Kontrolle) mitgeführt und analysiert.

3.2.1 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die hBD Expression

Der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Genexpression und Sekretion von hBD-2 und -3 wurde in kultivierten HCE- und HCjE Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 - 50 ng/ml) Interleukin (IL) 1 β und Tumornekrosefaktor (TNF) α für 24 Stunden inkubiert.

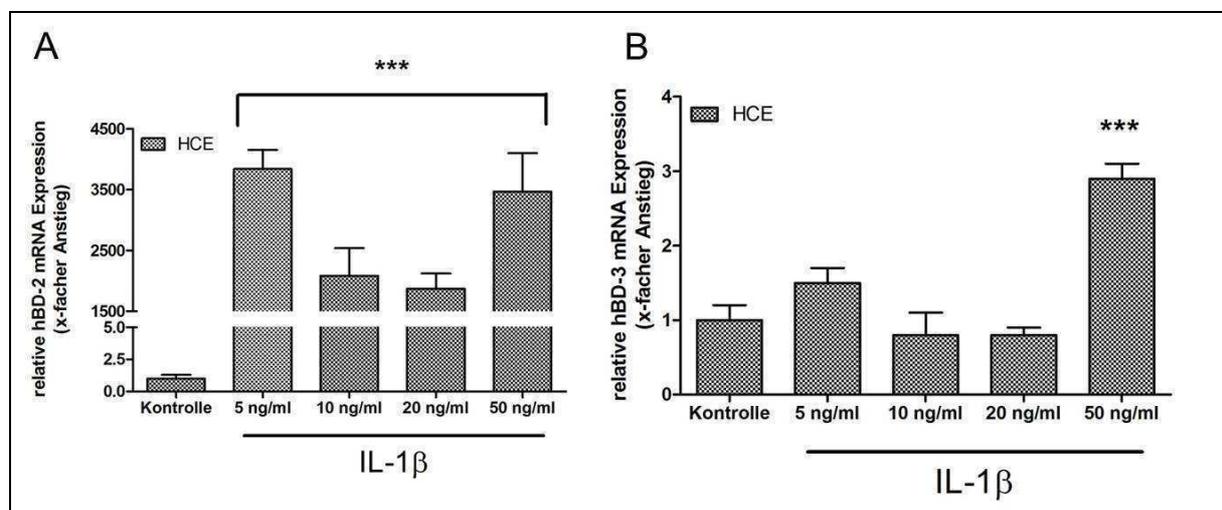


Abbildung 3-4: HBD-2 (A) und hBD-3 (B) Genexpression nach Stimulation mit unterschiedlichen IL-1 β Konzentrationen in kultivierten HCE Zellen. Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen hBD-2 und -3 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). HCE Zellen werden mit 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml IL-1 β über 24 Stunden stimuliert. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten (n = 4). Sternchen (zweiseitiger T-Test): ***p < 0,001

Auf mRNA-Ebene wurden folgende Ergebnisse erzielt: Die basale hBD-2 Genexpression in kultivierten HCE Zellen steigt nach Inkubation mit verschiedenen

IL-1 β Konzentrationen um das 1800-fache an (Abb. 3-4A). Die Realtime RT-PCR Experimente zeigen eine Heraufregulierung des hBD-2 Transkriptes nach Stimulation mit 5 ng/ml (3839 ± 313 -fach), 10 ng/ml (2082 ± 453 -fach), 20 ng/ml (1869 ± 250 -fach) und 50 ng/ml (3467 ± 630 -fach) IL-1 β im Vergleich mit nicht-stimulierten HCE Zellen.

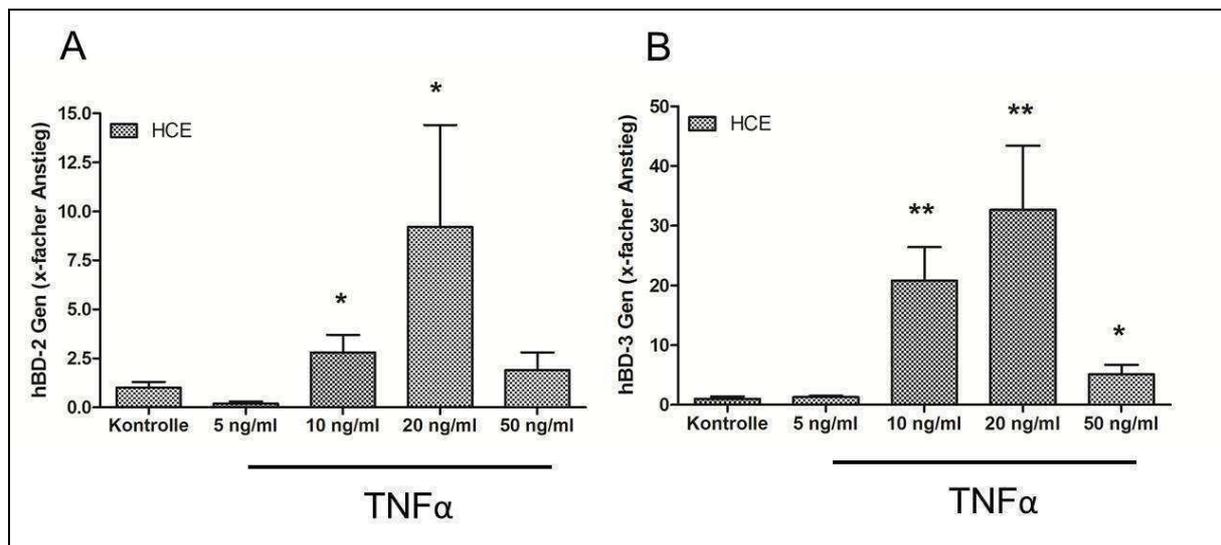


Abbildung 3-5: HBD-2 (A) und hBD-3 (B) Genexpression nach Stimulation mit unterschiedlichen TNF α Konzentrationen in kultivierten HCE Zellen. Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen hBD-2 und -3 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). HCE Zellen werden mit 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml TNF α über 24 Stunden behandelt. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,

Die Stimulation von HCE Zellen mit verschiedenen TNF α Konzentrationen für 24 Stunden führt zu einer $2,8 \pm 0,9$ -fachen Induktion der hBD-2 Genexpression nach Stimulation mit 10 ng/ml und zu einer $9,2 \pm 5,2$ -fachen Induktion nach Stimulation mit 20 ng/ml TNF α (Abb. 3-5A). Stimulationen mit 5 ng/ml oder 50 ng/ml TNF α zeigen keine signifikante Induktion der hBD-2 Genexpression. In HCE-Zellen kommt es nach Stimulation mit 50 ng/ml IL-1 β zu einem $3 \pm 0,2$ -fachen Anstieg der hBD-3 mRNA-Expression im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen. Niedrigere IL-1 β Konzentrationen (5, 10 und 20 ng/ml) zeigen keine signifikante Induktion der hBD-3 Expression (Abb. 3-4B). Zum Anstieg der hBD-3 Genexpression kommt es nach der Stimulation mit 10 ng/ml ($21,3 \pm 5,9$ -fach), 20 ng/ml ($32,2 \pm 10,4$ -fach) und 50 ng/ml ($4,8 \pm 1,9$ -fach) TNF α , wohingegen Stimulation mit 5 ng/ml TNF α keinen signifikanten Effekt nach sich zieht (Abb. 3-5B).

Um die so ermittelten Genexpressionsergebnisse von hBD-2 und -3 auf Proteinebene zu verifizieren, wurden Sandwich-ELISAs mit den entsprechenden Medienüberständen (Zellkulturüberstände) der Stimulationskulturen durchgeführt. Die in Abbildung 3-6 dargestellten Ergebnisse der hBD-2 und -3 Sekretion nach 24-stündiger Stimulation der HCE und HCjE Zellen mit 50 ng/ml IL-1 β oder 50 ng/ml TNF α zeigen, dass sowohl in den stimulierten als auch in den nicht-stimulierten Zellen hBD-2 und -3 Konzentrationen gemessen werden können.

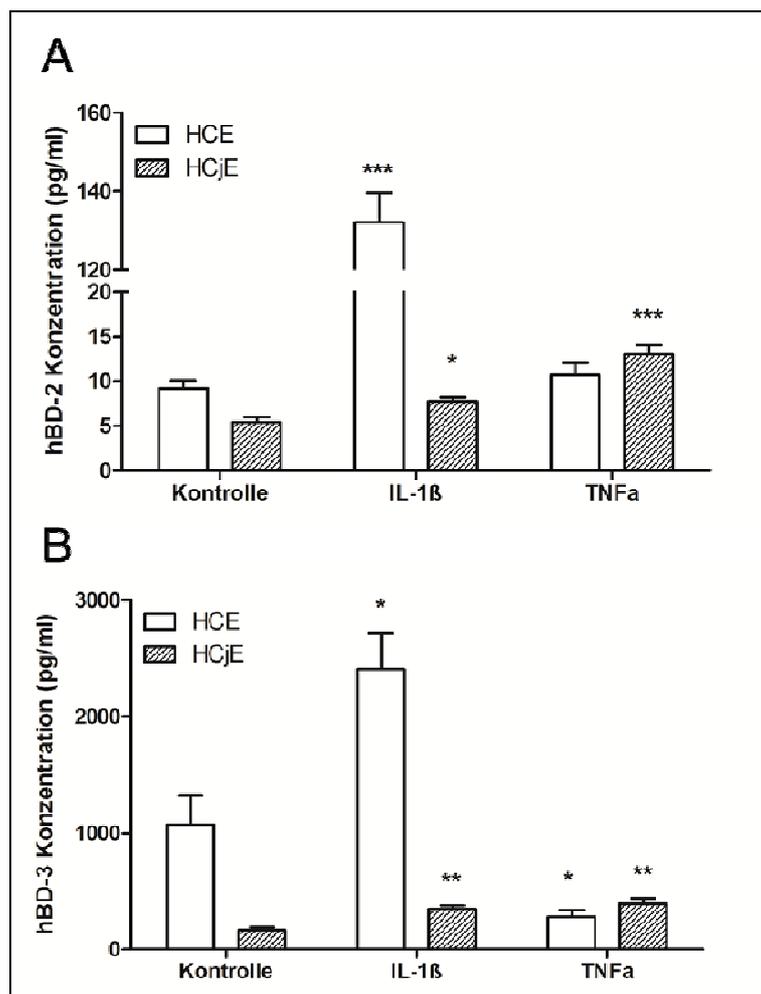


Abbildung 3-6: Quantifizierung der hBD-2 (A) und hBD-3 (B) Konzentrationen in kultivierten HCE und HCjE Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen. Stimulation der Zellen mit 50 ng/ml IL-1 β oder 50 ng/ml TNF α für 24 Stunden. Bestimmung der hBD-2 und -3 Peptidkonzentrationen im Zellkulturüberstand mittels ELISA. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Durch die Behandlung mit 50 ng/ml IL-1 β wird die hBD-2 Sekretion in beiden Zelllinien erhöht: um das über 14-fache in HCE Zellen und um das 1,5-fache in HCjE Zellen im Vergleich zur hBD-2 Sekretion in unbehandelten Zellen. Die hBD-3

Sekretion wird in beiden Zelllinien um das 2-fache nach Stimulation mit 50 ng/ml IL-1 β erhöht. Stimulation der HCE-Zellen mit 50 ng/ml TNF α hat keinen Effekt auf die hBD-2 Sekretion in den Medienüberstand. Im Gegensatz dazu sinkt die hBD-3 Konzentration sogar um das 1,7-fache. In HCjE Zellen kommt es nach Stimulation mit 50 ng/ml TNF α zu einer Verdopplung der hBD-2 und hBD-3 Sekretion in den Medienüberstand der behandelten Zellen.

3.2.2 Einfluss bakterieller Bestandteile auf die hBD Expression

Aus der Literatur sind verschiedene pathogene Bakterien und/oder deren Bestandteile, PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster wie Peptidoglykane, Lipopolysaccharide (LPS), Teichonsäuren, und bakteriellen Lipoproteinen), bekannt, die einen Einfluss auf die Expression der hBDs ausüben können (McDermott, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der hBD-2 und -3 Expression in kultivierten HCE und HCjE Zellen nach Stimulation mit inaktiven Überständen von *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Bei den Überständen handelte es sich um doppelt steril-filtrierte Bakterienkulturen mit den Bakterien-typischen PAMPs (Kap. 2.2.1).

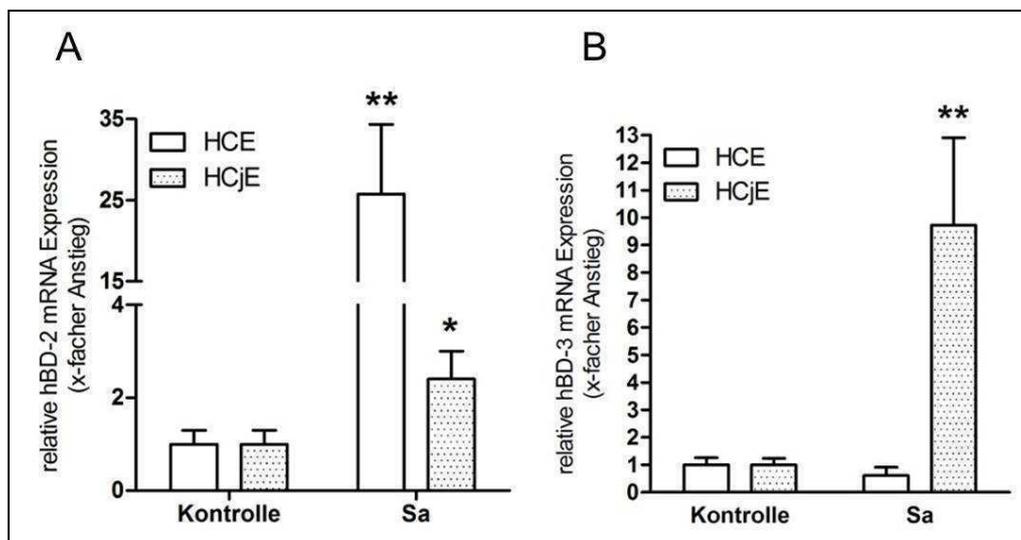


Abbildung 3-7: HBD-2 (A) und -3 (B) Genexpression nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* (Sa) Überstand in kultivierten HCE und HCjE Zellen. Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen hBD-2 und -3 mRNA-Expressionen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten (n = 3). Sternchen (zweiseitiger T-Test): *p < 0,05, **p < 0,01,

Zunächst wurde die Induzierbarkeit der hBD-2 und -3 Genexpression in den verwendeten Zelllinien nach Behandlung mit inaktiviertem Überstand von *Staphylococcus aureus* untersucht (Abb. 3-7). Mittels Realtime RT-PCR Analyse kann gezeigt werden, dass das basale hBD-2 mRNA-Level um das $25,8 \pm 8,6$ -fache in HCE Zellen und um $2,4 \pm 0,6$ -fache in HCjE Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ansteigt. Die Realtime RT-PCR Ergebnisse zeigen auch eine Induktion des hBD-3 Gens um das $9,7 \pm 3,2$ -fache in kultivierten HCjE nach 16h Stimulation mit inaktiviertem *Staphylococcus aureus* Überstand. In HCE Zellen lässt sich keine signifikante Regulation der hBD-3 Genexpression feststellen.

Um die Sekretion von hBD-2 und -3 auch auf Proteinebene nachzuweisen und um sie zu quantifizieren, wurden ELISA Experimente mit den Medienüberständen der Stimulationsexperimente durchgeführt. Zusätzlich zu den mit *Staphylococcus aureus* Überständen durchgeführten Experimenten, wurden die Zelllinien auch mit inaktiven Überständen von *Burkholderia cenocepacia*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert.

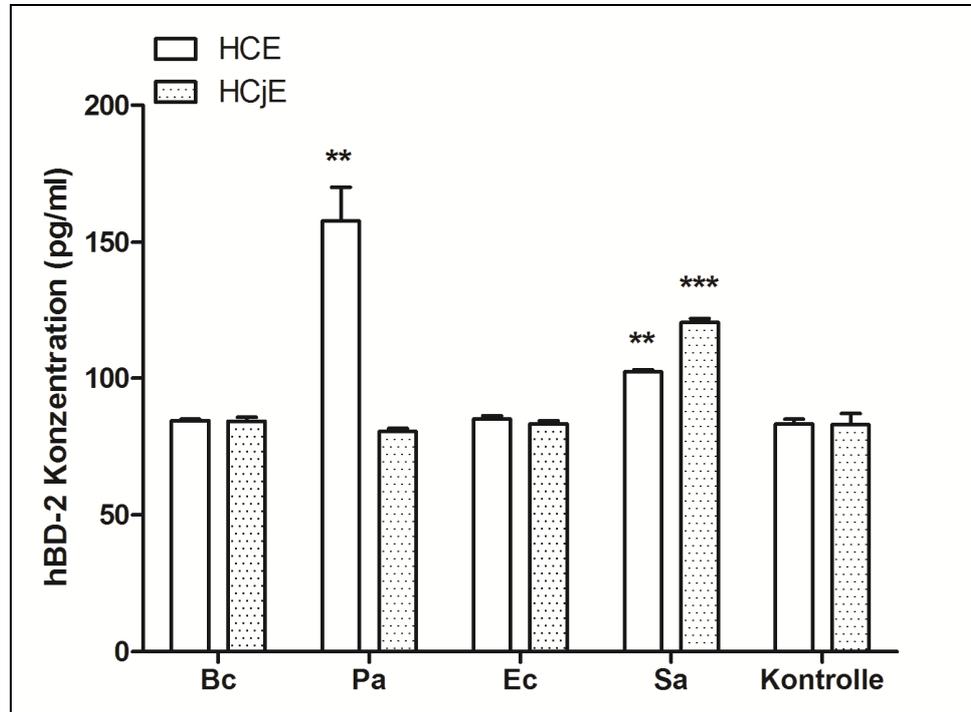


Abbildung 3-8: Quantifizierung der hBD-2 Konzentration in kultivierten HCE und HCjE Zellen nach Applikation verschiedener bakterieller Überstände. Stimulation der Zellen mit Überständen (1:100 Verdünnung) von *Burkholderia cenocepacia* (Bc), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Escherichia coli* (Ec) und *Staphylococcus aureus* (Sa) für 16 Stunden. Bestimmung der hBD-2 Peptidkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Ein signifikanter Anstieg der hBD-2 Sekretion wird nach 16 stündiger Inkubation mit Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (1,9-fach) und *Staphylococcus aureus* (1,2-fach) in HCE Zellen gemessen. In HCjE Zellen ist ein Anstieg der hBD-2 Sekretion um das 1,5-fache nur nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Überstand im Vergleich zur basalen hBD-2 Sekretion (unbehandelte Zellen) messbar. Nach Stimulation mit *Burkholderia cenocepacia* oder *Escherichia coli* ist kein Anstieg der hBD-2 Konzentration in den untersuchten Zellkulturüberständen nachweisbar (Abb. 3-8).

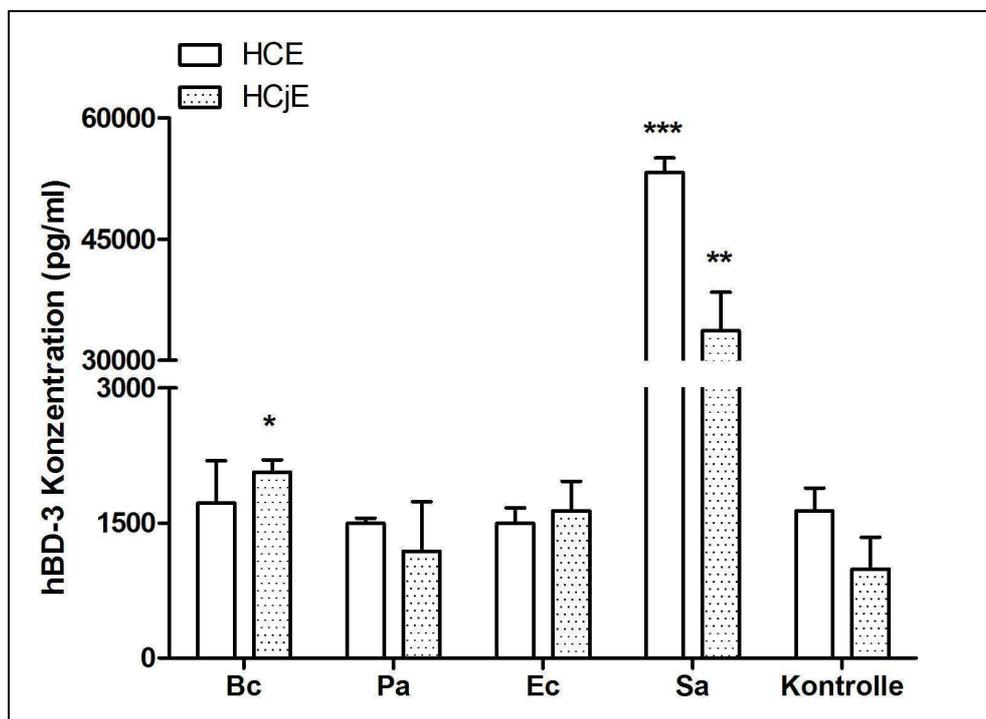


Abbildung 3-9: Quantifizierung der hBD-3 Konzentration in kultivierten HCE und HCjE Zellen nach Applikation verschiedener bakterieller Überstände. Stimulation der Zellen mit Überständen (1:100 Verdünnung) von *Burkholderia cenocepacia* (Bc), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Escherichia coli* (Ec) und *Staphylococcus aureus* (Sa) für 16 Stunden. Bestimmung der hBD-3 Peptidkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die basale Sekretion von hBD-3 steigt um das bis zu 32-fache in HCE Zellen und um das 34-fache in HCjE Zellen nach Stimulation mit dem *Staphylococcus aureus* Überstand an (Abb. 3-9). Keine Induktion der hBD-3 Sekretion ist nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* Überständen in den Zelllinien detektierbar. Im Gegensatz zur hBD-2 Expression kommt es nach Behandlung von HCjE Zellen mit Überständen von *Burkholderia cenocepacia* zu einer leichten Erhöhung der hBD-3 Peptid-Expression. Nach Inkubation mit *Escherichia coli* Überständen sind in den

Medienüberständen der kultivierten HCE und HCjE Zellen keine hBD-3 Konzentrationsunterschiede messbar.

Zur genaueren Analyse des zeitlichen Ablaufs der hBD-3 Sekretion wurden kultivierte HCE Zellen über verschiedene Zeiträume (5 Minuten bis zu 24 Stunden) mit *Staphylococcus aureus* Überstand inkubiert und die hBD-3 Konzentration im Medienüberstand mittels ELISA Experimenten gemessen (Abb. 3-10).

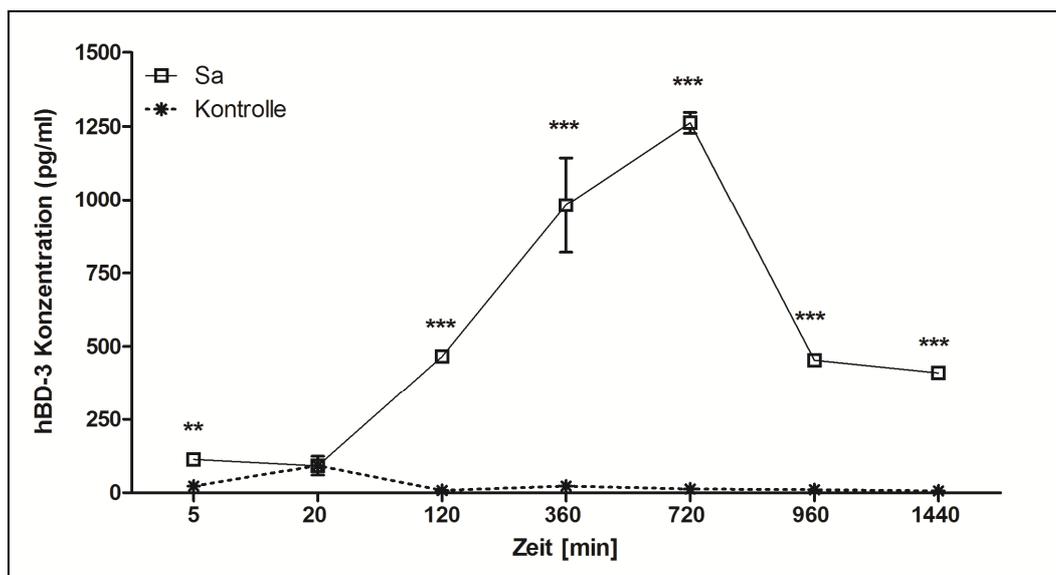


Abbildung 3-10: Einfluss unterschiedlicher Stimulationszeiten mit *Staphylococcus aureus* (Sa) Überstand auf die hBD-3 Peptidproduktion und -sekretion in HCE Zellen. Bestimmung der hBD-3 Peptidkonzentration im Zellkulturüberstand von stimulierten und nicht-stimulierten Zellen über 5 – 1440 Minuten mittels ELISA. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle

Nach 5 minütiger Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Überstand kommt es zu einem signifikanten Anstieg der hBD-3 Sekretion ($5,1 \pm 0,3$ -fach) über die basale hBD-3 Sekretion in nicht-stimulierten HCE Zellen. Nach 2h Inkubation liegt die hBD-3 Konzentration mit 62 ± 8 -fach deutlich über dem Normallevel mit einem Maximum nach 12h (99 ± 8 -fach). Nach 24h ist die hBD-3 Sekretion mit 62 ± 9 -fach weiterhin signifikant erhöht. Auch für hBD-2 ist im Zeitraum von 12 bis 24 Stunden eine signifikante Erhöhung nach der vorhergehenden Stimulation mit inaktiviertem *Staphylococcus aureus* Überstand nachweisbar. Im Gegensatz zur hBD-3 Sekretion kann vor dem Zeitpunkt 12 Stunden keine Induktion der hBD-2 Expression festgestellt werden (Daten nicht abgebildet).

3.3 Induktion von Maus β -Defensinen (mBD) in einem Maus Korneadefekt-Modell

Die Expression und Induktion der Maus β -Defensine (mBD2, -3 und -4) *in vivo* wurde in einem Korneadefekt („Scratch“)-Modell bei BALB/c Mäusen (n = 24) untersucht. Dazu wurden folgende Versuchsgruppen analysiert: (1) Applikation von inaktiviertem *Staphylococcus aureus* Überstand in den Bindehautsack der Mäuse (Abb. 3-11a-f), (2) Applikation von *Staphylococcus aureus* Überstand in Kombination mit einer oberflächlichen Verletzung/Reizung der zentralen Kornea (Abb. 3-11g-l) sowie (3) alleinige oberflächliche Verletzung der zentralen Kornea (Abb. 3-11m-r). Nach Beendigung des Versuches wurden die Korneae und Konjunktivae der Mäuse entnommen, in Paraffin eingebettet und immunhistochemisch mit spezifischen mBD2, -3 und -4 Antikörpern untersucht.

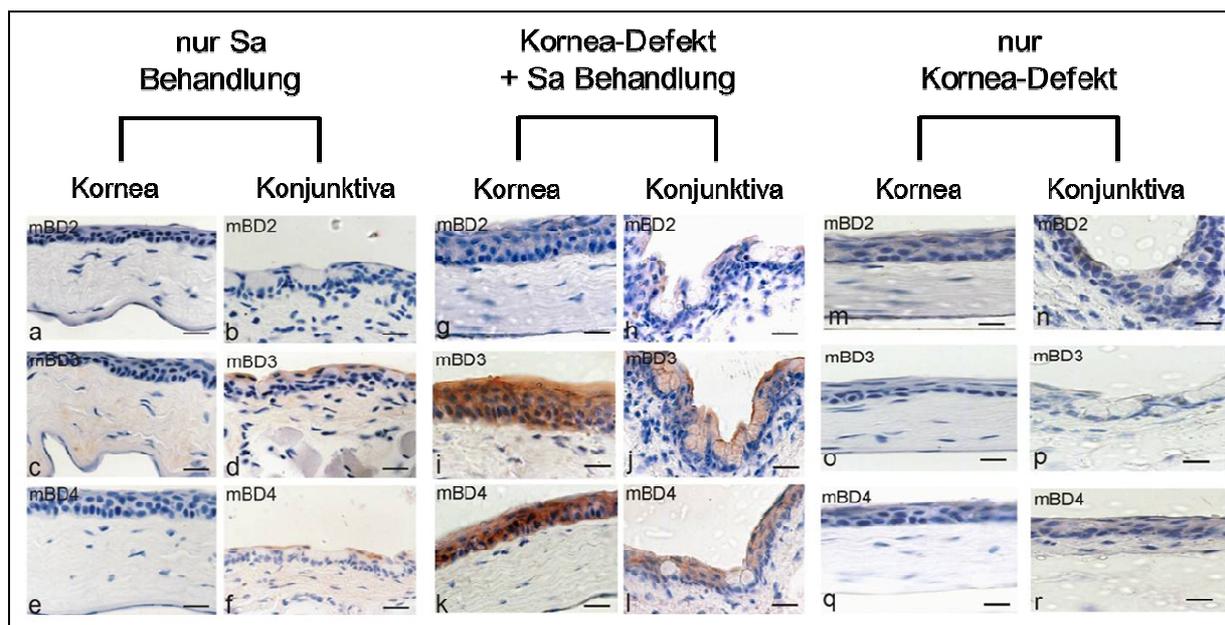


Abbildung 3-11: Immunhistochemische Lokalisation der Maus β -Defensine-2, -3 und -4 (mBD2 - 4) im Korneadefekt-Modell mit und ohne Applikation von *Staphylococcus aureus* (Sa) Überstand. Die mBD2, -3 und -4 Immunreaktionen der Maus Kornea und Konjunktiva sind repräsentativ für die einzelnen Versuchsgruppen (n = 8). (a-f) Augenoberfläche nach Applikation von Sa-Überstand in den Bindehautsack. (g-l) Augenoberfläche nach oberflächlicher Kornea-Verletzung und Applikation von Sa-Überstand in den Bindehautsack. (m-r) Augenoberfläche nach alleiniger Kornea-Verletzung. Die immunhistochemischen Untersuchungen werden mit polyklonalen mBD2, -3 und -4 Antikörpern durchgeführt. Eine positive Immunreaktivität ist durch eine Rotfärbung gekennzeichnet. Die Paraffinschnitte (6 μ m) sind mit Hämatoxylin (blaue Zellkernfärbung) gegengefärbt. Balken = 82,5 μ m

Die immunhistochemische Auswertung der untersuchten Maus Korneae und Konjunktivae der drei Versuchsgruppen zeigt, dass die alleinige oberflächliche

Verletzung des Korneaepithels keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten mBDs, weder in der Kornea noch in der Konjunktiva hat (Abb. 3-11m-r). Die Applikation von *Staphylococcus aureus* Überstand in den Bindehautsack der Mäuse führt zu einer schwachen Induktion der mBD3 und -4 Expression in den oberflächlichen Konjunktivaepithelzellen. Immunhistochemisch ist kein Effekt in den untersuchten Korneae sichtbar. Der Antikörper gegen mBD2 zeigt weder in der Konjunktiva noch in der Kornea eine Immunreaktion (Abb. 3-11a-f). Die Kombination aus kornealer Verletzung und Applikation von *Staphylococcus aureus* Überstand in den Bindehautsack der Mäuse führt zu einer starken Induktion der mBD3 und -4 Expression in allen Schichten der Kornea und auch in der nicht-verletzten Konjunktiva (Abb. 3-11g-l). Auch das Sekretionsprodukt der konjunktivalen Becherzellen zeigt für mBD3 eine Immunreaktion. MBD2 und -4 Antikörper reagieren in den Becherzellen nicht. Darüber hinaus lässt sich auch in der Konjunktiva eine schwache Reaktivität mit dem Antikörper gegen mBD2 in den oberflächlichen Epithelzellen der Konjunktiva, nicht aber in der Kornea, beobachten.

3.4 hBD Expression in pathologisch veränderten Hornhäuten

Mit den verwendeten Antikörpern gegen hBD-2 und -3 (Kap. 2.1.5) war nur eine schwache Immunreaktivität in den oberflächlichen Superfizialzellen der gesunden Kornea nachweisbar (Abb. 3-2). Um die Expression von hBD-2 und -3 in pathologisch veränderten Hornhäuten zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte verschiedener Kornea-Pathologien immunhistochemisch analysiert.

Im Vergleich zur Immunreaktivität der hBD-2 und -3 Antikörper in der gesunden Kornea kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Immunreaktivität in den untersuchten Kornea-Pathologien (Abb. 3-12). Die Kornea-spezifische Expression von hBD-2 und -3 ist wie folgt lokalisiert: *Bullöse Keratopathie*: In dieser nicht entzündlichen Erkrankung der Kornea kann die hBD-2 und -3 Expression intrazytoplasmatisch in allen Epithelzellen der Kornea nachgewiesen werden (Abb. 3-12A und B). Die epithelialen Basalzellen der Kornea zeigen dabei eine stärkere Immunreaktivität mit dem eingesetzten hBD-2 Antikörper als die Epithelzellen der weiter apikal gelegenen Schichten. Die positive Reaktion mit dem hBD-3 Antikörper zeigt keine immunhistochemischen Unterschiede im Korneaepithel. Ferner ist eine schwache Expression von hBD-3 (nicht aber von hBD-2) im kornealen Stroma

nachweisbar. Die hBD-2 und -3 Antikörper führen zu keiner Reaktivität in den Endothelzellen der Kornea.

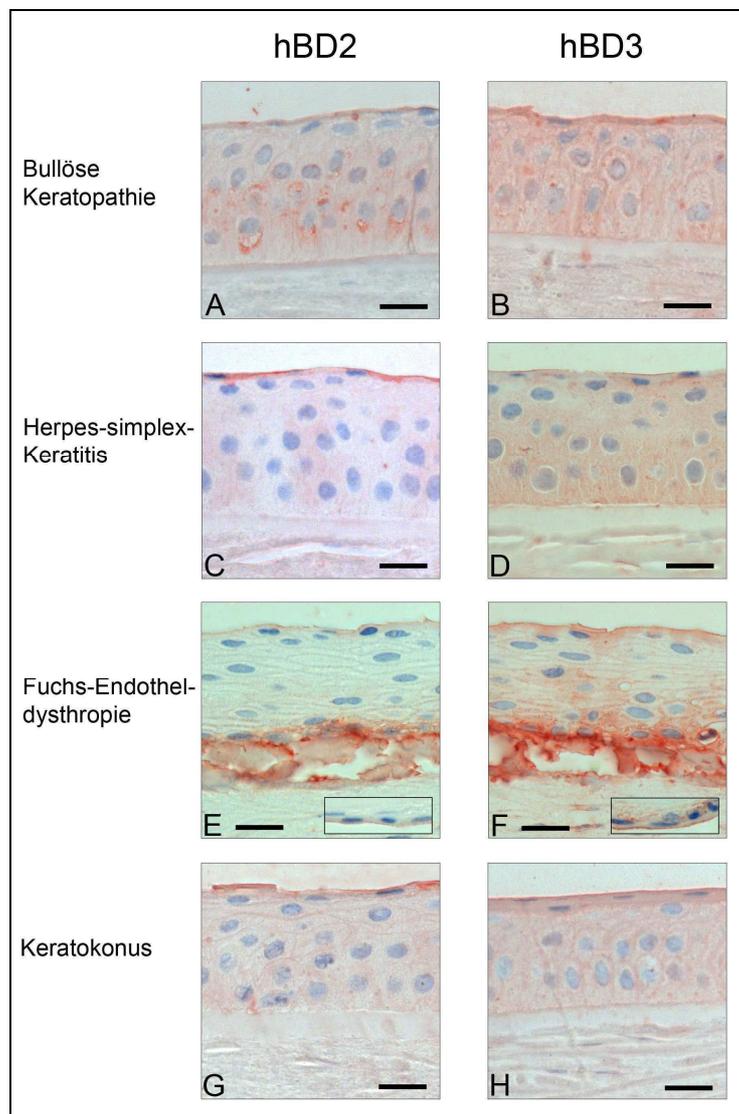


Abbildung 3-12: Immunhistochemische Lokalisation von hBD-2 und -3 in der Kornea von Patienten mit bullöser Keratopathie (A und B), Herpes-simplex-Keratitis (C und D), Fuchs-Endotheldystrophie (E und F) und Keratokonus (G und H). Die Abbildungen sind repräsentativ für die Lokalisation von hBD-2 und -3 im Korneaepithel der analysierten Kornea-Pathologien. Eine positive Immunreaktivität der Antikörper ist durch die Rotfärbung im Gewebe gekennzeichnet. Inserts in E und F zeigen das einschichtige Korneaendothel. Die Paraffinschnitte sind mit Hämatoxylin (blaue Zellkernfärbung) gegengefärbt. Balken-32 µm

Herpes-simplex-Keratitis: Alle epithelialen Schichten sowie auch verschiedene Zellen im Stroma der Kornea zeigen positive Immunreaktivität für die eingesetzten hBD-2 und -3 Antikörper in den Kornea-Präparaten von Patienten mit akuter Herpes-simplex Infektion (Abb. 3-12 C und D). Keine Immunreaktivität ist in der zellfreien Bowman-Membran und der Descemet-Membran sowie im einschichtigen Korneaendothel

detektierbar. *Fuchs-Endotheldystrophie*: In den Kornea-Präparaten der Patienten mit Fuchs-Endotheldystrophie ist die hBD-2 und -3 Expression intrazytoplasmatisch im gesamten Korneaepithel sowie auch im einschichtigen Korneaendothel detektierbar (Abb. E und F mit Inserts). Die stärkste Immunreaktion der eingesetzten hBD-2 und -3 Antikörper befindet sich in den apikalen Epithelzellen und in der Umgebung von subepithelialen Rissen im Korneaepithel. Einige Zellen im Stroma zeigen eine schwache Reaktion mit dem hBD-3 Antikörper. *Keratokonus*: Alle untersuchten Kornea-Präparate der Keratokonus-Patienten weisen eine positive immunhistochemische Reaktion mit den verwendeten hBD-2 und -3 Antikörpern auf (Abb. 3-12 G und H). hBD-2 und -3 sind intrazytoplasmatisch in den Korneaepithelzellen lokalisiert; hBD-2 ist in den anderen Schichten der Kornea (Bowman-Membran, Descemet-Membran, Stroma und Endothel) nicht nachweisbar.

3.5 Psoriasis (S100A7c) Expression im Tränenapparat

Die Expression von Psoriasisin wurde in Körperspendergewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates mittels RT-PCR und Western Blot Analyse untersucht. Mittels Immunhistochemie wurde Psoriasisin zusätzlich histologisch lokalisiert. Ferner wurde die Psoriasisin Konzentration in Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates von Körperspendern durch einen Sandwich-ELISA quantifiziert.

3.5.1 Nachweis der Expression des Psoriasisin-Gens mittels RT-PCR

Psoriasisin-spezifische cDNA Amplifikate sind in der Tränendrüse, in den ableitenden Tränenwegen, in Konjunktiva und in Kornea (n = 18 für jedes Gewebe) nachweisbar (Abb. 3-13). Das Psoriasisin cDNA-Fragment wird auch in den für die weiteren Genexpressionsstudien verwendeten HCE- und HCjE Zelllinien exprimiert. Die β -Aktin Kontrolle (275 bp) ist in allen untersuchten Proben positiv und von gleicher Signalintensität. Zur Spezifikation der verwendeten Psoriasisinprimer und um falsch-positive PCR Ergebnisse (genomische Verunreinigung) auszuschließen, wurden Kontrollansätze (cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase) mit aufgetragen. Bei jeder PCR-Reaktion wurde cDNA von der Epidermis des Oberarms mitgeführt und als Positivkontrolle (PK) eingesetzt. Das Psoriasisin cDNA-Fragment (178 bp) entspricht der erwarteten Größe und wurde durch DNA-Sequenzierung und nachfolgenden Abgleich mit der NCBI-Nukleinsäure Datenbank bestätigt.

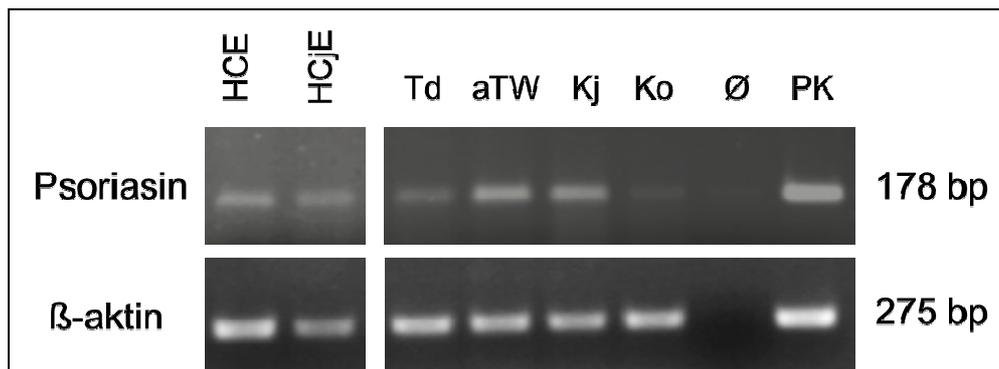


Abbildung 3-13: RT-PCR Analyse der Psoriasin (S100A7c) mRNA-Expression in immortalisierten Zellen der Augenoberfläche und in Geweben des Tränenapparates. Repräsentative Ergebnisse (n = 18 für jedes Gewebe) der Psoriasin RT-PCR im Ethidiumbromid gefärbten 1,5% Agarosegel. Kultivierte HCE und HCjE Zellen, TD-Tränendrüse, aTW-ableitende Tränenwege, Kj-Konjunktiva, Ko-Kornea, Ø-PCR-Negativkontrolle (ohne Reverse Transkriptase bei cDNA-Synthese), PK-Positivkontrolle (cDNA Haut), β-Aktin RT-PCR als Referenzgen (Ladungskontrolle), DNA-Banden für Psoriasin (178 bp) und β-Aktin (275 bp) stimmen mit den erwarteten Größen überein.

3.5.2 Nachweis von Psoriasin mittels Western Blot Analyse

Die in der RT-PCR erhobenen Psoriasin Genexpressionsdaten wurden auf Proteinebene verifiziert. Dazu wurden Proteine aus humaner Kornea, Konjunktiva, Tränendrüse und ableitenden Tränenwegen von vier verschiedenen Körperspendern (n = 4) isoliert. Der Proteinextrakt wurde unter reduzierenden Bedingungen in einem SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse ausgewertet. Für die Detektion wurde ein monoklonaler Psoriasin Antikörper (Kap. 2.1.5) verwendet. Abbildung 3-14 zeigt eine spezifische Bande für Psoriasin bei der erwarteten molekularen Größe von 11 kDa. Psoriasin ist in allen untersuchten Geweben und in den kultivierten Zelllinien nachweisbar. Als Ladungskontrolle wird ein β-Aktin (42 kDa) Western Blot durchgeführt. Als Positivgewebe dient Epidermis des Oberarms (Glaser et al., 2005)

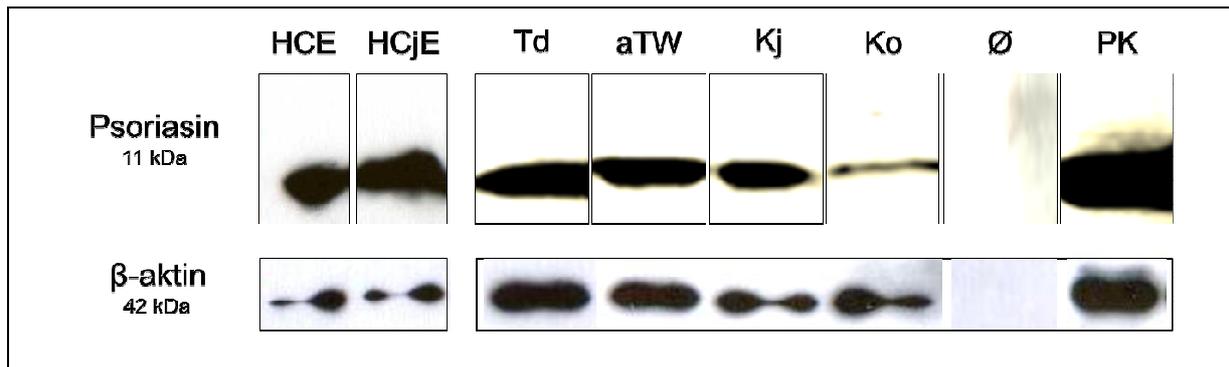


Abbildung 3-14: Western Blot Analyse der Psoriasin Expression in immortalisierten Zellen der Augenoberfläche (HCE und HCjE) und in Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates. Repräsentative Ergebnisse von kultivierten HCE und HCjE Zellen (n = 3) und von Tränendrüse (TD), ableitendem Tränenweg (aTW), Konjunktiva (Kj) und Kornea (Ko) (n = 4 für jedes Gewebe). Nicht-immunisierte IgG als Negativkontrolle (Ø), Positivkontrolle (PK) mit Epidermis des Oberarms. Auftrennung des Proteinextrakts unter reduzierenden Bedingungen in einem 12% SDS-PAGE. Der Nachweis mit einem monoklonalen Psoriasin Antikörper zeigt eine deutliche Bande bei 11 kDa. β -Aktin (42 kDa) Western Blot als Ladungskontrolle der eingesetzten Proben.

3.5.3 Quantifizierung der Psoriasin Konzentration in Bindehaut, Geweben des Tränenapparates und in Tränenflüssigkeit

Zur Bestimmung und Quantifizierung der Psoriasin Konzentration wurden spezifische ELISA Experimente mit Proteinextrakten aus der Konjunktiva (n = 4), der Tränendrüse (n = 7) und den ableitenden Tränenwegen (n = 4) von Körperspendern durchgeführt. Da Korneae zum Untersuchungszeitpunkt nicht zur Verfügung standen, wurde auf eine Konzentrationbestimmung in diesem Gewebe verzichtet. Ferner wurde die Tränenflüssigkeit von gesunden Probanden (n = 4) auf die Psoriasin Konzentration *in vivo* hin untersucht. Der Psoriasin ELISA wurde auf Spezifität, Kreuzreaktivität und Sensitivität getestet und ist im Detail bei Gläser et al. (2005) beschrieben.

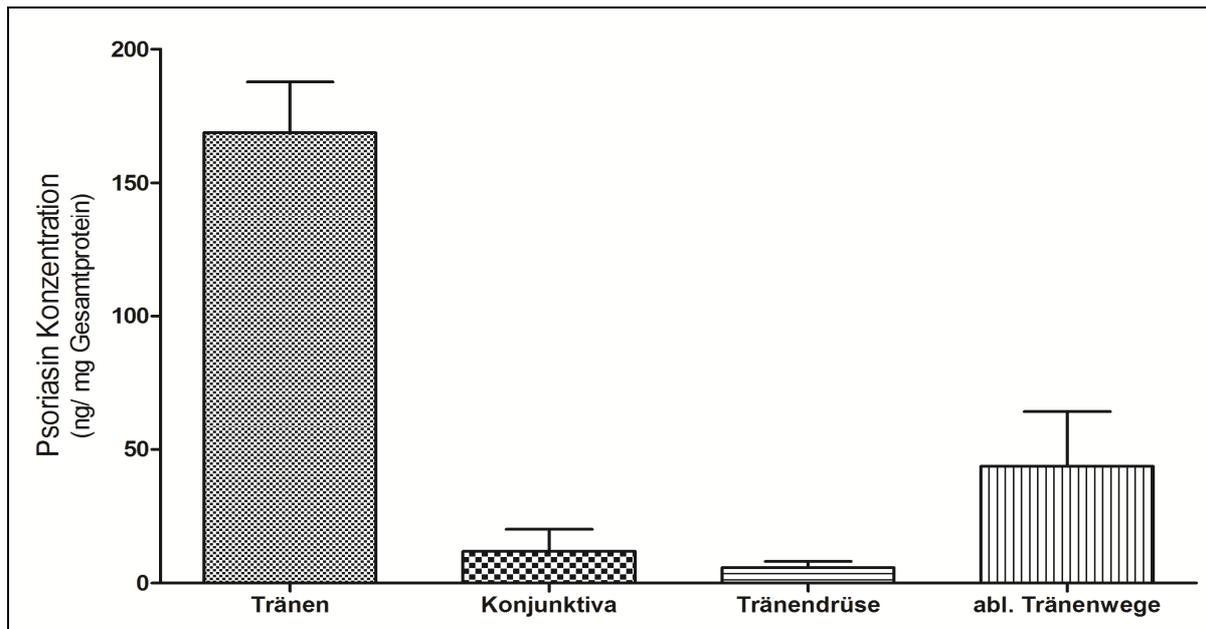


Abbildung 3-15: Psoriasis Konzentration in Körperspendergeweben und in der Tränenflüssigkeit von gesunden Probanden. Quantifizierung der Psoriasis Konzentration (ng Psoriasis/ mg Gesamtprotein) in Tränenflüssigkeit gesunder Probanden (Tränen, n = 4), Konjunktiva (n = 4), Tränendrüse (n = 7) und ableitendem Tränenweg (n = 4) mittels ELISA. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler der Psoriasis Konzentration in den untersuchten Proben.

Nach Auswertung der ELISA Experimente (Abb. 3-15) zeigt sich, dass in allen untersuchten Geweben und in der Tränenflüssigkeit Psoriasis nachweisbar ist. In der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden ist die höchste Psoriasis Konzentration mit 169 ± 19 ng Psoriasis/ mg Gesamtprotein detektierbar. Deutlich niedrigere Psoriasis Konzentrationen findet man in den untersuchten Körperspendergeweben: Konjunktiva ($11,9 \pm 8,3$ ng Psoriasis/ mg Gesamtprotein), ableitender Tränenweg ($43,7 \pm 20,7$ ng Psoriasis/ mg Gesamtprotein) und Tränendrüse ($5,7 \pm 2,4$ ng Psoriasis/ mg Gesamtprotein).

3.5.4 Lokalisation von Psoriasis in Geweben der Augenoberfläche und im Tränenapparat

Insgesamt wurden Präparate von 18 verschiedenen Körperspendern (n = 18) immunhistochemisch untersucht und ausgewertet. In Abbildung 3-16 ist exemplarisch die Immunreaktion des monoklonalen Psoriasis Antikörpers in den untersuchten Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates dargestellt. Zur Kontrolle der Antikörper-Spezifität wurden immunhistochemische Untersuchungen mit nicht-immunisierten IgG durchgeführt. Dabei wurde keine Immunreaktivität des Antikörpers

in den untersuchten Geweben festgestellt (nicht dargestellt). Als Positivkontrolle diente das mehrschichtig, verhornte Plattenepithel des Augenlides.

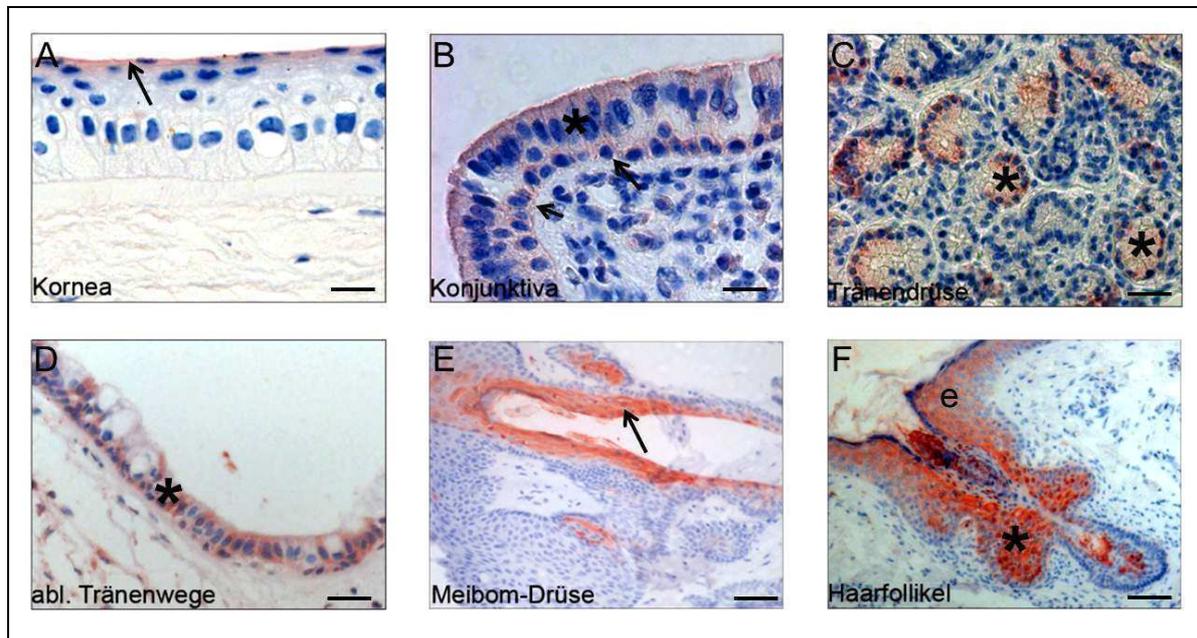


Abbildung 3-16: Immunhistochemische Lokalisation von Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat. Nachweis der Psoriasin Expression in repräsentativen Immunreaktionen (rote Farbreaktion). Immunreaktion in den Superfizialzellen (Pfeil) der Kornea (A); in den hochprismatischen Zylinder- (*) und Basalzellen (Pfeile) der Konjunktiva (B); Azinuszellen (*) der Tränendrüse (C) und in den hochprismatischen Zylinderepithelzellen (*) der ableitenden Tränenwege (D); in den Epithelzellen der Ausführungsgänge (Pfeil) einer Meibom Drüse (E); in der Epidermis (e) und einem Haarfollikel (*) des Augenlids (F). Zellkernfärbung (blau) mit Hämatoxylin. Balken: A-C 10 µm, D 40 µm, E und F 80 µm

Die Immunreaktivität des verwendeten Psoriasin Antikörpers war sehr schwach im Korneaepithel und etwas stärker in der Konjunktiva, Tränendrüse und den ableitenden Tränenwegen. In der Epidermis, den holokrinen Meibom-Drüsen und in Haarfollikeln des Augenlids war im Gegensatz dazu eine sehr starke Immunreaktion des Psoriasin Antikörpers detektierbar. Mit Ausnahme der Tränendrüsen (11 positive und 7 negative Reaktionen) zeigten alle untersuchten Gewebeschnitte ein identisches Reaktionsmuster. Im Detail ist folgende Lokalisation von Psoriasin in den einzelnen Präparaten sichtbar: *Kornea*: Alle analysierten Schnitte zeigen eine schwache Immunreaktivität. Nur in den oberflächlichen Superfizialzellen der Kornea ist die Expression von Psoriasin lokalisierbar, alle anderen Schichten der Kornea sowie die Stromazellen und die Endothelzellen zeigen keine positive Immunreaktion (Abb. 3-16A). *Konjunktiva*: Alle untersuchten Konjunktivaschnitte reagieren positiv mit dem monoklonalen Psoriasin Antikörper. Dabei ist Psoriasin intrazytoplasmatisch in

den hochprismatischen Epithelzellen und in den Basalzellen des unverhornten, mehrschichtigen Konjunktivaepithels lokalisiert (Abb. 3-16B). Intraepitheliale Becherzellen sowie deren Sekretionsprodukt zeigen keine immunhistochemische Reaktion. *Tränendrüse*: In 11 von 18 untersuchten Tränendrüsen lässt sich Psoriasin mittels Immunhistochemie nachweisen. Psoriasin ist in diesen Präparaten intrazellulär in den Azinuszellen detektierbar (Abb. 3-16C). Gewebeschnitte von 7 Tränendrüsen reagieren nicht mit dem Antikörper (nicht dargestellt). Diese Schnitte zeigen keine histologischen Besonderheiten und der Befund steht auch in keinem Zusammenhang mit dem Geschlecht oder dem Alter der Körperspender. *Ableitende Tränenwege*: Positive Immunreaktivität ist intrazytoplasmatisch in den hochprismatischen Zylinderepithelzellen des Tränensacks und des Tränennasengangs sowie in den epithelialen Basalzellen nachweisbar (Abb. 3-16D). Ferner reagieren auch einige Zellen in der Lamina propria positiv. Becherzellen und deren Sekretionsprodukte zeigen keine positive Reaktivität. *Augenlid*: In den untersuchten Augenlidern ist Psoriasin in verschiedenen Strukturen immunhistochemisch nachweisbar. Das verhornte, mehrschichtige Plattenepithel der Augenlider weist eine besonders kräftige Immunreaktivität auf. Insbesondere reagieren die Keratinozyten des Stratum granulosum und des Stratum corneum stark positiv. Auch im Haarschaft und in den Haarfollikeln der Wimpern kommt es zu einer deutlichen Bildung des roten Reaktionsproduktes (Abb. 3-16F). Darüber hinaus zeigen auch die Meibom Drüsen und deren Sekretionsprodukt eine sehr starke Immunreaktivität (Abb. 3-16F). Hier ist die Psoriasin Expression in den Meibozysten sowie in den Epithelzellen des mehrschichtigen Ausführungsgangsepithels lokalisiert. Im Gegensatz reagieren die apokrinen Moll-Drüsen nicht mit dem Psoriasin Antikörper.

3.6 Regulation der Psoriasin Genexpression im Zellkulturmodell

Zur Untersuchung der Psoriasin Regulation unter entzündlichen Bedingungen oder bei bakterieller Besiedlung wurde die Expression von Psoriasin in kultivierten HCE Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen proinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren sowie bakteriellen Bestandteilen untersucht. Nach Beendigung der Stimulationsexperimente wurde die Genexpression von Psoriasin mit Hilfe der quantitativen Realtime RT-PCR bestimmt. Ein Nachweis der Psoriasin Sekretion auf Proteinebene war nicht möglich, da die Psoriasin Konzentration in den Zellkulturüberständen unterhalb der Nachweisgrenze (0,6 ng/ml) des entwickelten

Psoriasis-spezifischen ELISAs lag (siehe Diskussion 4.2). In allen Zellkulturexperimenten wurden nicht-stimulierte HCE Zellen, die mit dem Lösungsmittel der entsprechenden Stimulanz behandelt wurden, als Kontrolle mitgeführt. Die eingesetzten Stimulanzen und deren Konzentrationen wurden vorab in einem BrdU-Assay auf ihre mögliche Zell-Toxizität getestet und danach in nicht-toxischen Konzentrationen eingesetzt.

3.6.1 Psoriasis Genexpression in HCE Zellen

In einem Initialexperiment wurden konfluente HCE Monolayer-Kulturen (> 95%) über 24 Stunden mit 20 ng/ml IL-1 β , TNF α , Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder 100 ng/ml Lipopolysacchariden (LPS) und Peptidoglykan (PG) sowie steril-filtrierte Bakterienüberständen (Kap. 2.2.1) von *Staphylococcus aureus* (Sa), *Haemophilus influenzae* (Hi) und *Escherichia coli* (Ec) inkubiert.

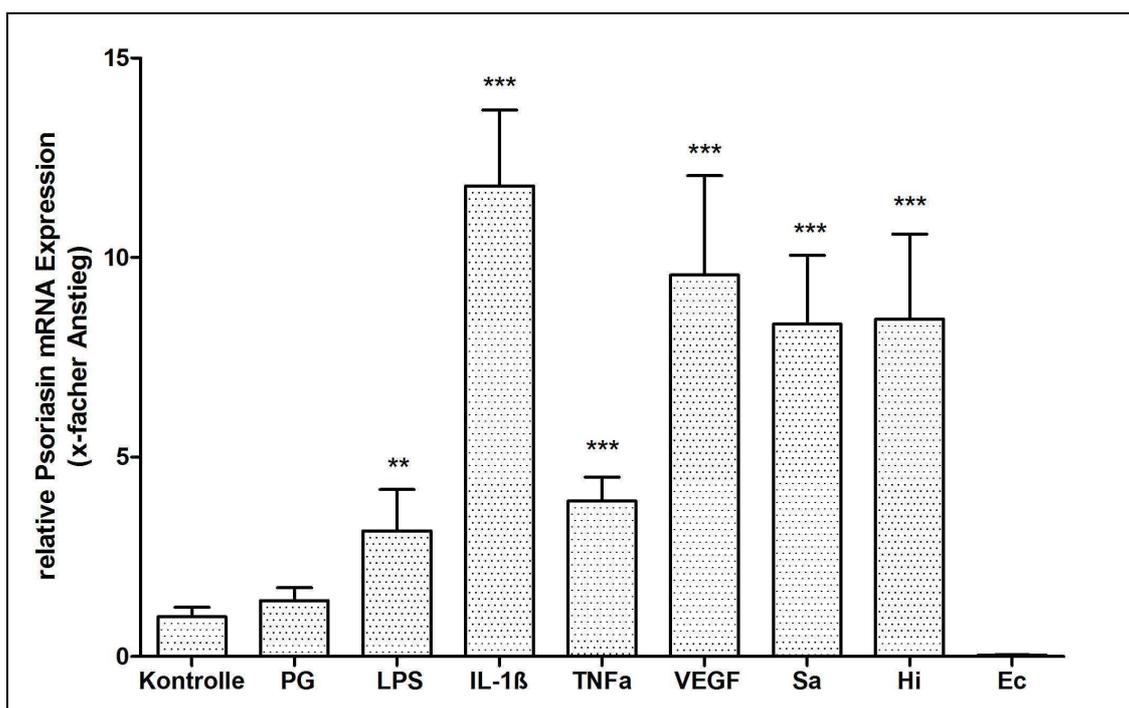


Abbildung 3-17: Regulation der Psoriasis mRNA-Expression in humanen Korneaepithelzellen (HCE) nach Stimulation mit Zytokinen und bakteriellen Überständen. Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen Psoriasis mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). HCE Zellen werden mit 100 ng/ml Peptidoglykan (PG), Lipopolysacchariden (LPS), 20 ng/ml IL-1 β , TNF α , VEGF und mit Überständen (1:100 Verdünnung) von *Staphylococcus aureus* (Sa), *Haemophilus influenzae* (Hi) und *Escherichia coli* (Ec) über 24 h inkubiert. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten (n = 4). Sternchen (zweiseitiger T-Test): **p < 0,01, ***p < 0,001

Das Psoriasin mRNA-Transkript wird in den unbehandelten und den behandelten HCE Zellen exprimiert und ist somit detektierbar. Die Ergebnisse der quantitativen Realtime RT-PCR (Abb. 3-17) zeigen eine Induktion der Psoriasin Genexpression nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml), IL-1 β , TNF α , VEGF (alle 20 ng/ml), Überständen von *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* (jeweils 1:100 verdünnt). Die stärkste Induktion der Psoriasin mRNA-Expression mit einem Anstieg um das $11,8 \pm 1,9$ -fache ist nach Applikation von IL-1 β messbar. Die basale Psoriasin mRNA-Expression wird um das $9,6 \pm 2,5$ -fache und $3,9 \pm 0,6$ -fache nach Behandlung mit VEGF bzw. TNF α im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen heraufreguliert. Auch die Applikation von Pathogen-assoziierten Molekularen Mustern (PAMPs) wie LPS ($3,2 \pm 1,0$ -fach) und Überständen von *Staphylococcus aureus* ($8,3 \pm 1,7$ -fach) und *Haemophilus influenzae* ($8,4 \pm 2,1$ -fach) führen zu einem signifikanten Anstieg der Psoriasin Genexpression. Keine signifikante Regulation der Psoriasin Genexpression ist nach Behandlung mit 100 ng/ml Peptidoglykan oder Überständen von *Escherichia coli* in kultivierten HCE Zellen nachweisbar.

3.6.2 Einfluss von VEGF auf die Psoriasin Genexpression

In weiteren Stimulationsexperimenten wurde die Regulation der Psoriasin Genexpression in Abhängigkeit von verschiedenen VEGF Konzentrationen näher bestimmt. Die Applikation verschiedener VEGF Konzentrationen führt zu einer Dosis-abhängigen Induktion der Psoriasin Genexpression in HCE Zellen (Abb. 3-18). Zur Heraufregulation kommt es nach Applikation von 5 ng/ml ($4,2 \pm 1,2$ -fach), 10 ng/ml ($6,3 \pm 0,4$ -fach), 20 ng/ml ($9,6 \pm 2,5$ -fach) und 50 ng/ml ($29,7 \pm 4,8$ -fach) rekombinanten humanen VEGF verglichen mit dem Psoriasin Genexpressionslevel unbehandelter HCE Zellen.

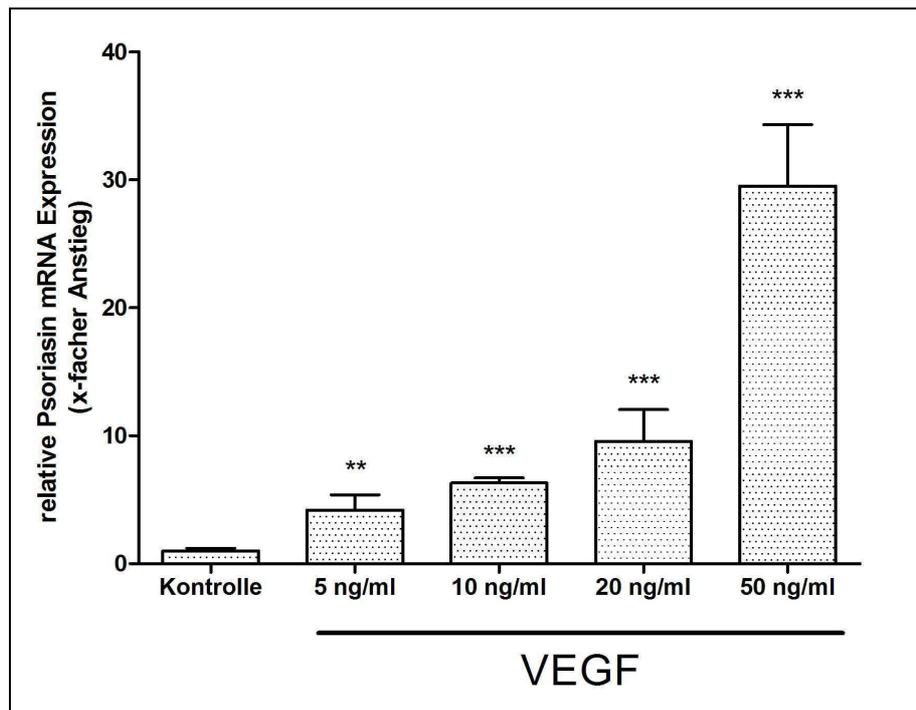


Abbildung 3-18: Regulation der Psoriasis mRNA-Expression humaner Korneaepithelzellen (HCE) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Vascular Endothelial Growth factor (VEGF). Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen Psoriasis mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). HCE Zellen werden mit 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml VEGF über 24 Stunden behandelt. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.6.3 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Psoriasis Genexpression

In weiteren Expressionsstudien wurde der Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α auf die Psoriasis Genexpression studiert. Dazu wurden HCE Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Zytokine (5, 20 und 50 ng/ml) über verschiedene Zeiträume (6, 12 und 24 Stunden) behandelt. Die anschließende Realtime RT-PCR Analyse zeigt eine Heraufregulation des Psoriasis-Gens nach Stimulation mit beiden Zytokinen. IL-1 β führt zu einer starken Induktion der Psoriasis Genexpression wogegen ein etwas moderaterer Anstieg der Psoriasis mRNA-Menge nach Stimulation mit TNF α gemessen wird (Abb. 3-19).

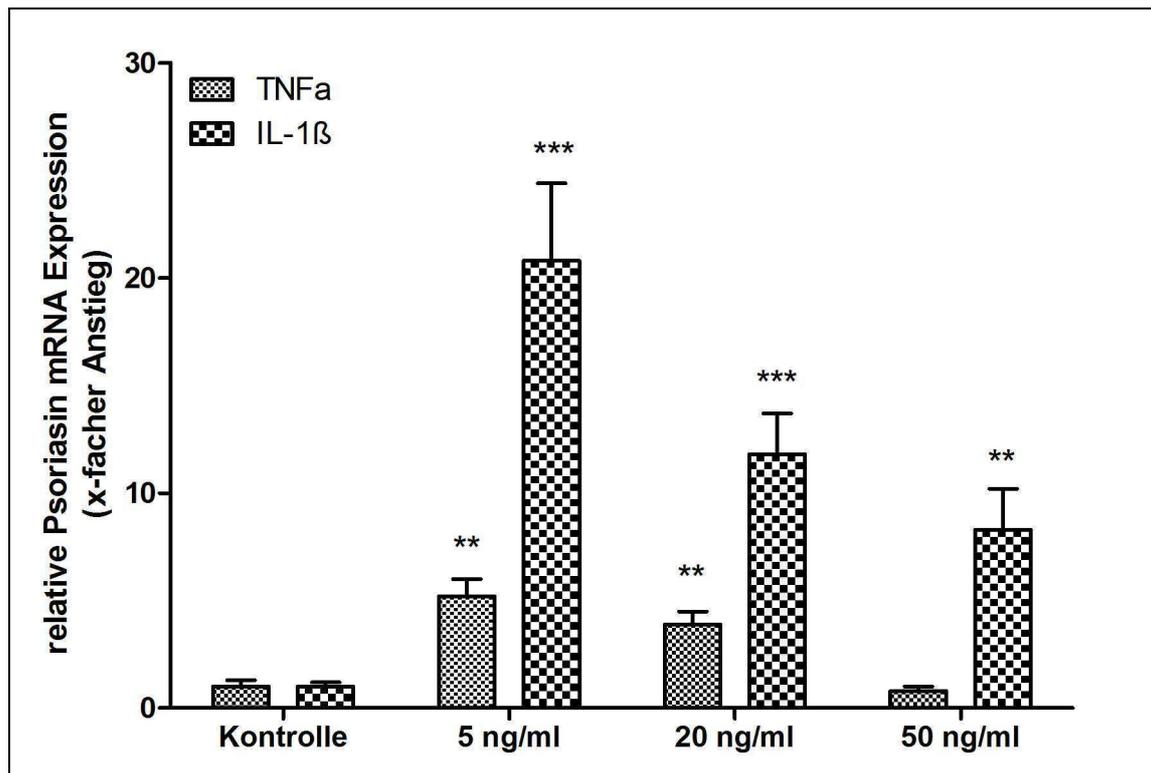


Abbildung 3-19: Regulation der Psoriasis mRNA-Expression in humanen Korneaepithelzellen (HCE) nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen. Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen Psoriasis mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). HCE Zellen werden über 24 Stunden mit 5 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml IL-1 β und 5 ng/ml, 20 ng/ml oder 50 ng/ml TNF α behandelt. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten (n = 4). Sternchen (zweiseitiger T-Test): **p < 0,01, ***p < 0,001

Die Psoriasis Genexpression steigt nach 24h Stimulation mit 5 ng/ml ($20,8 \pm 3,6$ -fach), 20 ng/ml ($11,8 \pm 1,9$ -fach) und 50 ng/ml IL-1 β ($8,3 \pm 1,9$ -fach) im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant an. Auch mit TNF α führt die Stimulation bei 5 ng/ml ($4,2 \pm 1,2$ -fach) und 20 ng/ml ($11,8 \pm 1,9$ -fach), nicht aber bei 50 ng/ml TNF α ($8,3 \pm 1,9$ -fach) zu einer signifikanten Induktion der Psoriasis Genexpression. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass die Regulation der Psoriasis Expression ein zeitabhängiger Prozess ist. Exemplarisch ist dies für die Induktion der Psoriasis Expression nach Applikation von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert (Abb. 3-20). Hier kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Psoriasis mRNA-Transkriptes über die gesamte Versuchsdauer mit einem maximalen Anstieg nach 12 Stunden. Auch nach 24 Stunden ist die Psoriasis Genexpression noch signifikant erhöht und liegt im Vergleich zu der basalen Psoriasis Genexpression unbehandelter Zellen auf einem sehr hohen Level.

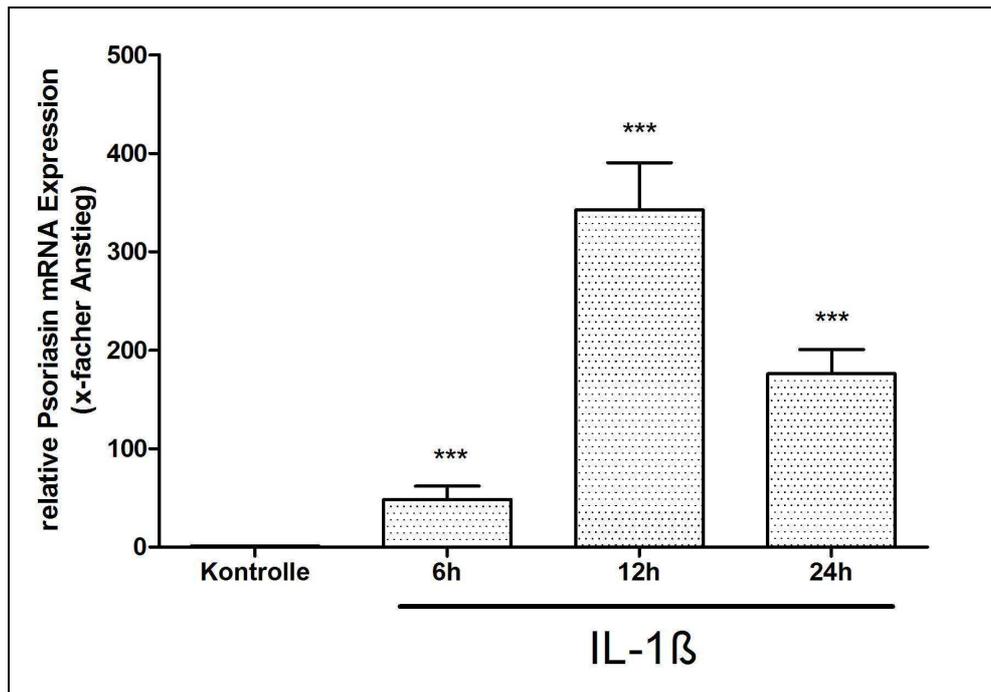


Abbildung 3-20: Regulation der Psoriasis mRNA-Expression in humanen Korneaepithelzellen (HCE) nach Stimulation mit IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten. Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen Psoriasis mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). HCE Zellen werden mit IL-1 β über 6, 12 und 24 Stunden behandelt. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.6.4 Einfluss bakterieller Bestandteile (PAMPs) auf die Psoriasis Genexpression

In weiteren Stimulationsexperimenten wurde die Induktion und Regulation der Psoriasis Genexpression in kultivierten HCE und HCjE Zellen nach Applikation verschiedener inaktiver Bakterienüberstände (Kap. 2.2.1), die bei Infektionen der Augenoberfläche häufig auftreten, studiert. Nach Stimulation mit einem inaktivierten Überstand von *Haemophilus influenzae* erhöht sich die Psoriasis Genexpression um das 1,6-fache in den kultivierten HCE Zellen und um das 2,2-fache in HCjE Zellen im Verhältnis zur basalen Psoriasis Genexpression. Nach Applikation von *Staphylococcus aureus* kommt es zu einer Steigerung der Psoriasis Genexpression um das 3-fache in HCE Zellen. In kultivierten HCjE Zellen ist keine Regulation feststellbar (Abb. 3-21).

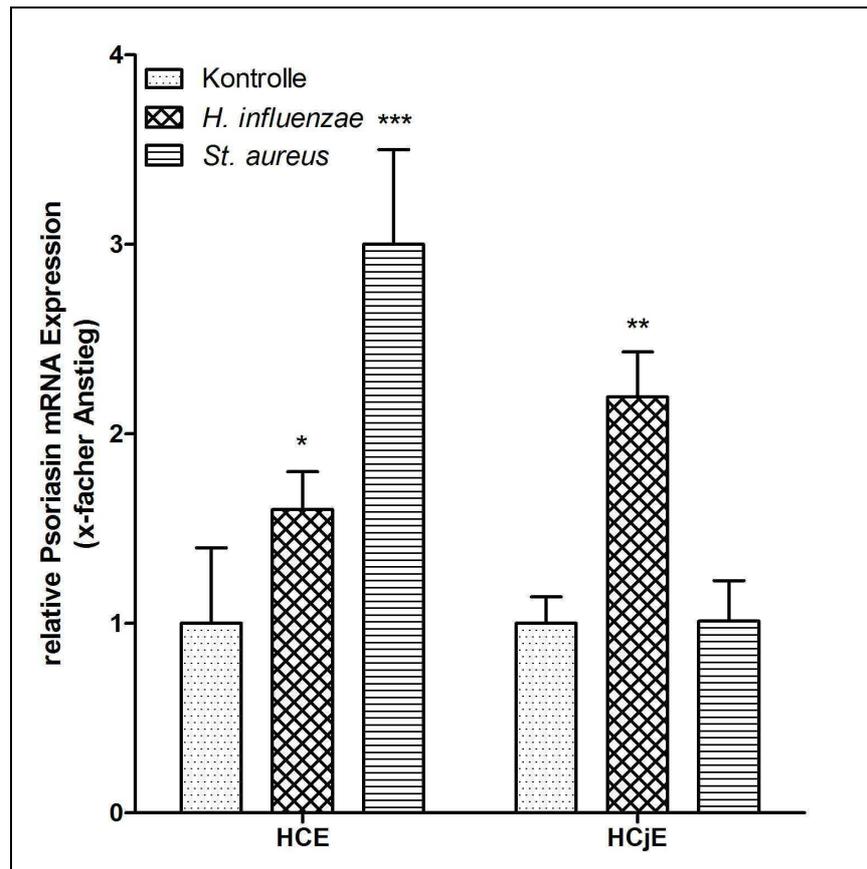


Abbildung 3-21: Regulation der Psoriasis mRNA-Expression in humanen Kornea- (HCE) und Konjunktivaepithelzellen (HCjE) nach Stimulation mit inaktiven Bakterienüberständen. Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen Psoriasis mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). HCE und HCjE Zellen werden für 24 Stunden mit *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* Überständen behandelt. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Abschließend wurde der Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten (4 – 48h) auf die Psoriasis Genexpression in HCE Zellen nach Stimulation mit Überständen von *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* untersucht und ausgewertet (Abb. 3-22). Realtime RT-PCR Daten zeigen eine Induktion der Psoriasis Genexpression bereits nach 4h. Die Psoriasis Genexpression bleibt bis zu 24h auf einem signifikant erhöhten Expressionslevel nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Überständen. Die maximale Psoriasis mRNA-Gehalt ist nach 16h ($4,4 \pm 1,2$ -fach) erreicht. Nach einer Behandlungsdauer von 48h sinkt der Psoriasis mRNA-Gehalt wieder auf das basale Ausgangsniveau. Bei Stimulation mit *Haemophilus influenzae* Überständen ist die Psoriasis Genexpression erst nach 16h (2,5-fach) signifikant erhöht. Dieses Expressionslevel ist auch nach 24h (~2-fach) und 48h (3,2-fach) Stimulationsdauer auf einem signifikant erhöhten Niveau. Zu früheren

Zeitpunkten (4, 6 und 12h) ist keine Induktion der Psoriasis Genexpression feststellbar.

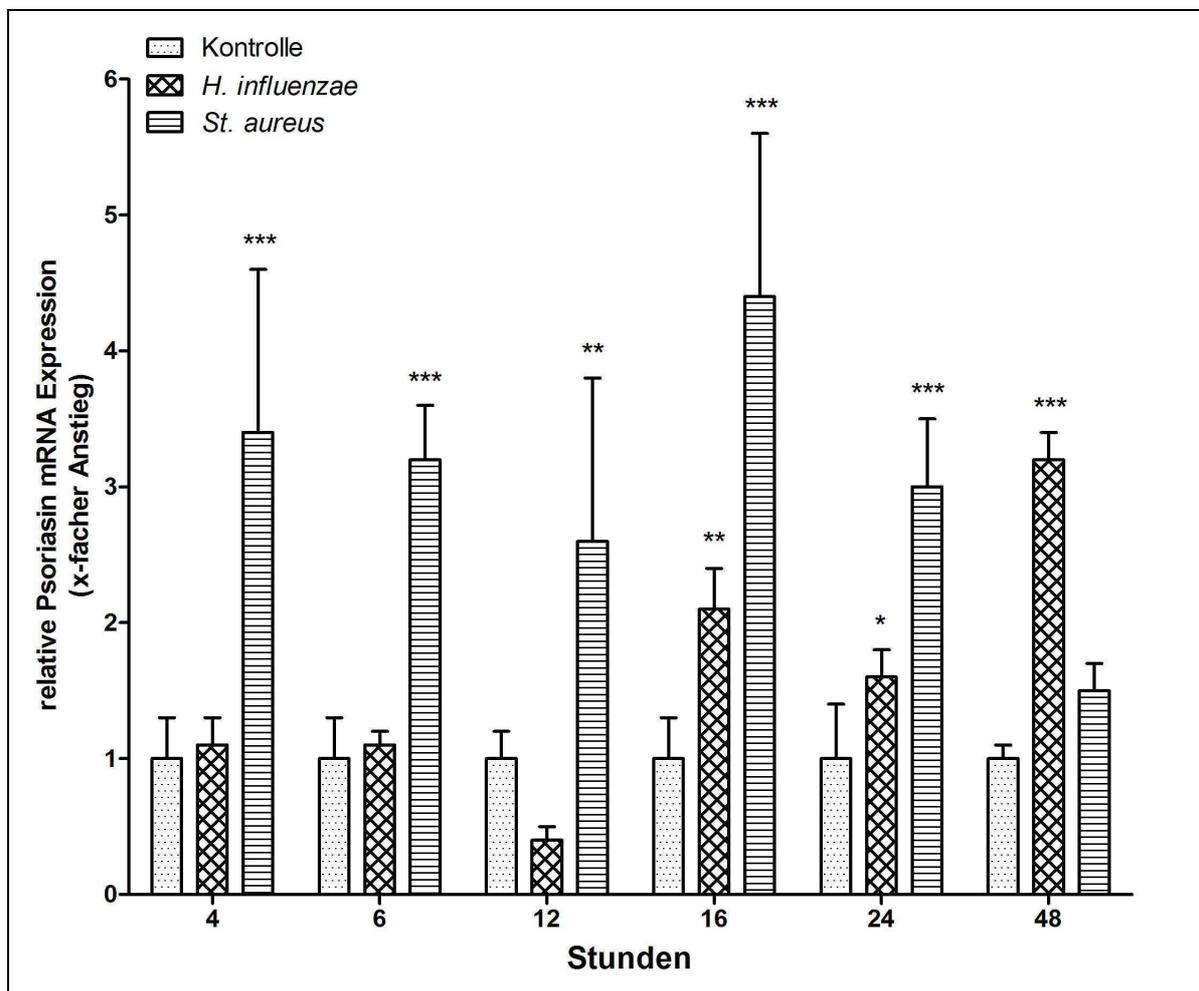


Abbildung 3-22: Einfluss unterschiedlicher Stimulationszeiträume auf die Psoriasis Genexpression nach Applikation von *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* Überständen. Realtime RT-PCR Ergebnisse der relativen Psoriasis mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) zu den jeweiligen Zeitpunkten. HCE Zellen werden über 4, 6, 12, 16, 24 und 48 Stunden mit *H. influenzae* und *St. aureus* Überstand inkubiert. Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). Sternchen (zweiseitiger T-Test): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.7 Expression und Regulation der S100 Fused-Type Proteine Hornerin und Filaggrin-2

Die Expression der an der Augenoberfläche und im Tränenapparat unbekanntenen S100 fused-type Proteine Hornerin (HRNR) und Filaggrin-2 (FLG2) wurde an okulärem Körperspendergewebe mittels RT-PCR und Immunhistochemie untersucht. Im *in vitro* Zellkulturmodell mit kultivierten HCE und HCjE Zellen wurde die

Regulation der HRNR- und FLG2-Expression unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht.

3.7.1 Nachweis von Hornerin und Filaggrin-2 mittels RT-PCR

Auf mRNA-Ebene wurde die Genexpression von Hornerin und Filaggrin-2 in Körperspendergewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates mittels RT-PCR analysiert. Für die Untersuchungen standen 4 Korneae, 5 Konjunktivae, 10 Tränendrüsen und 9 ableitende Tränenwege zur Verfügung. Das RT-PCR Amplifikat von Hornerin (674 bp) ist in Kornea, Konjunktiva, Tränendrüse und in den ableitenden Tränenwegen nachweisbar (Abb. 3-23). In den analysierten Körperspendergeweben ist die HRNR mRNA in allen untersuchten Korneae (4/4) nachweisbar, kommt aber nur in 4 von 5 Konjunktivae, 9 von 10 Tränendrüsen und 6 von 9 ableitenden Tränenwegen vor. Die Expression von Filaggrin-2 ist nur in 2 von 9 Proben der ableitenden Tränenwege mittels RT-PCR detektierbar. Dabei zeigt eine Probe eines ableitenden Tränenweges ein positives PCR-Signal für FLG-2 und HRNR (nicht dargestellt). In den analysierten Korneae, Konjunktivae und Tränendrüsen der Körperspender kann das FLG2-Amplifikat nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-23).

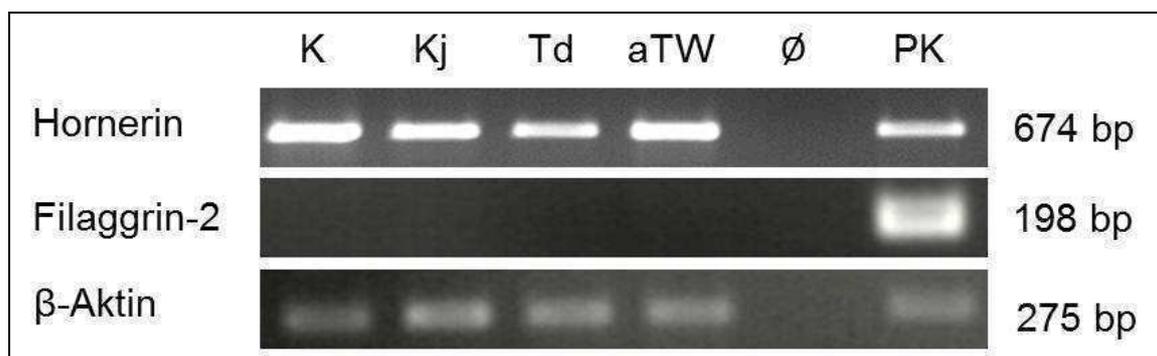


Abbildung 3-23: RT-PCR Analyse der Hornerin und Filaggrin-2 Genexpression in Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates. Repräsentatives Ergebnis der HRNR (674 bp) und FLG2 (198 bp) mRNA-Expression in Kornea (K), Konjunktiva (Kj), Tränendrüse (TD) und ableitendem Tränenweg (aTW). Ø Negativkontrolle (ohne Reverse Transkriptase bei cDNA.-Synthese), PK Positivkontrolle (cDNA Epidermis), β-Aktin RT-PCR als Referenzgen (Ladungskontrolle).

Zum Nachweis der funktionellen Nutzung der in der Arbeitsgruppe etablierten okulären Epithelzelllinien als *in vitro* Modell für die Untersuchung der Regulation und Expression von FLG2 und HRNR, wurden unbehandelte HCE und HCjE Zellen mittels RT-PCR auf die mRNA-Expression von HRNR und FLG2 getestet. Die

Expression der HRNR-mRNA in kultivierten HCE und HCjE Zellen ist nachweisbar, nicht aber die FLG-2 Genexpression in den untersuchten Epithel-Zelllinien (Abb. 3-24).

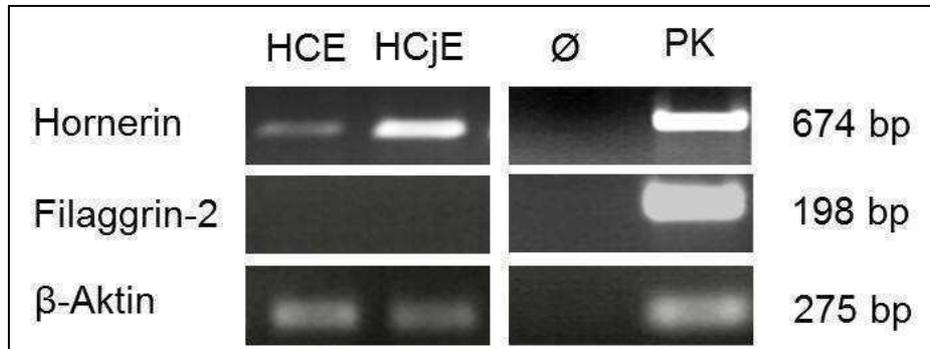


Abbildung 3-24: RT-PCR Analyse der Hornerin und Filaggrin-2 Genexpression in kultivierten Kornea-(HCE) und Konjunktivaepithelzellen (HCjE). HRNR Transkript (674 bp) wird in kultivierten HCE und HCjE Zellen exprimiert. Ein FLG2 Transkript (198 bp) ist nicht nachweisbar. Ø Negativkontrolle (ohne Reverse Transkriptase bei cDNA.-Synthese), PK Positivkontrolle (cDNA Epidermis), β-Aktin RT-PCR als Referenzgen (Ladungskontrolle).

Als interne Kontrolle der cDNA-Stabilität und Integrität diente ein β-Aktin Amplifikat. Proben epidermaler cDNA wurden als Positivkontrolle (PK) eingesetzt und waren in allen Untersuchungen positiv. Als Negativkontrolle (Ø) wurden RNA-Proben ohne Reverse Transkriptase bei der cDNA-Synthese eingesetzt, so dass eventuelle PCR-Signale im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel auf Fehlbindungen der verwendeten Primer mit genomischer DNA zurückgeführt werden können. Die PCR-Fragmente für HRNR und FLG2 stimmten mit den erwarteten Fragmentgrößen überein und ließen sich mittels Sequenzierung in der der NCBI-Nukleinsäure-Datenbank bestätigen.

3.7.2 Lokalisation von Hornerin und Filaggrin-2 an der Augenoberfläche und im Tränenapparat

Zur Verifizierung der RT-PCR-Ergebnisse wurde die HRNR und FLG2 Expression auf Proteinebene mittels Immunhistochemie untersucht. Die Lokalisationsstudien erfolgten mit verschiedenen polyklonalen anti-HRNR Antikörpern (H2, H3 und H4) und polyklonalen anti-FLG2 Antikörpern (αIFPS-2 und αIFPS-4). In Vorversuchen wurden die verschiedenen Antikörper an Augenlid-Präparaten und an Epidermis des Oberarms getestet. Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden die anti-HRNR Antikörpern H2 und H4 eingesetzt, da sie eine deutlich Immunreaktion im

mehrschichtig verhornten Plattenepithel der Epidermis zeigten (nicht dargestellt). Für die FLG2-Expressionsstudien wurde der α IFPS-2 Antikörper verwendet, da auch er ein deutlicheres Immunsignal in der Epidermis aufwies als der α IFPS-4 Antikörper.

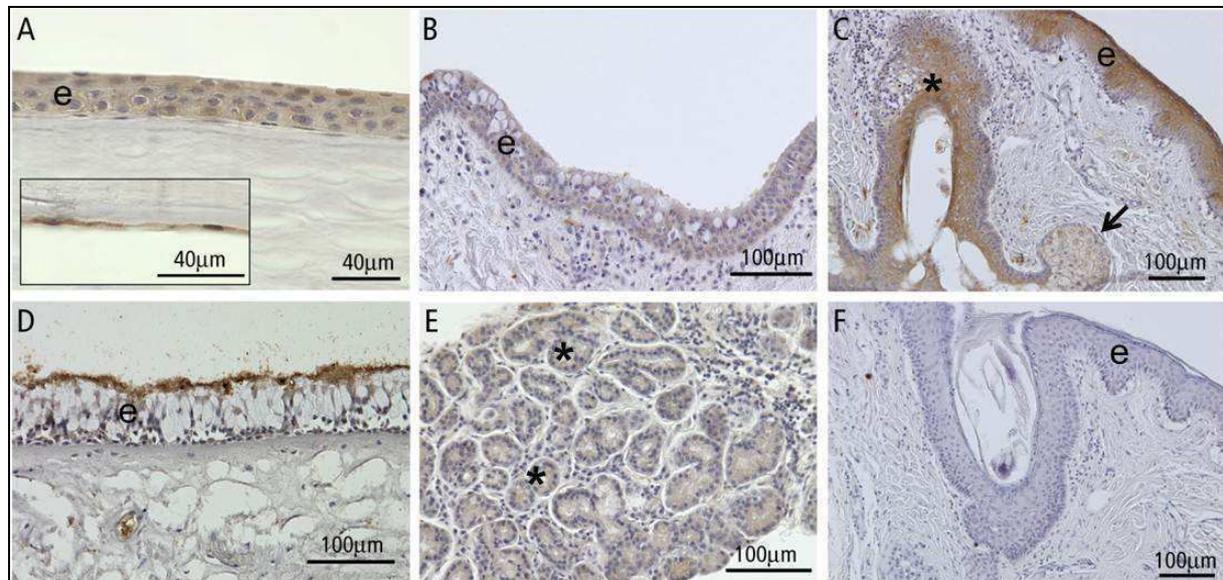


Abbildung 3-25: Immunhistochemische Lokalisation von Hornerin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat. Nachweis der Hornerin Expression in repräsentativen Immunreaktionen der untersuchten Gewebe. Immunreaktion im Epithel (e) und Endothel (Insert) der Kornea (A); Epithel (e) der Konjunktiva (B); Augenlid-Epidermis (e) mit Haarfollikel (*) und einer Haar-assoziierten Zeis-Drüse (Pfeil) (C); Epithelzellen (e) der ableitenden Tränenwege (D); Azinuszellen (*) der Tränendrüse (E); Negativkontrolle (F) mit nicht-immunisierten IgG-Antikörpern zeigt keine Immunreaktion. Das braune Reaktionsprodukt spiegelt die Immunreaktion der eingesetzten Antikörper wider. Paraffinschnitte (7 μ m) sind mit Hämatoxylin (blaue Zellkernfärbung) gegengefärbt.

Durch die Immunreaktion der verwendeten anti-HRNR Antikörper (braunes Reaktionsprodukt) wird die gewebespezifische Lokalisation von HRNR an der Augenoberfläche und im Tränenapparat wie folgt lokalisiert: *Kornea*: Die HRNR Expression ist intrazytoplasmatisch im gesamten mehrschichtig unverhornten Korneaepithel sowie auch im einschichtigen Korneaendothel nachweisbar (Abb. 3-25 A). Das Stroma sowie fibroblastische Stromazellen zeigen keine Immunreaktion mit den verwendeten HRNR-Antikörpern. *Konjunktiva*: Alle untersuchten Konjunktivapräparate der Conjunctiva palpebrae weisen eine intrazytoplasmatische Immunreaktion im gesamten Epithel auf (Abb. 3-25B). In den intraepithelialen Becherzellen sowie deren Muzin-haltigen Sekretionsprodukten ist keine Immunreaktivität detektierbar. *Ableitende Tränenwege*: Die HRNR-Expression lässt sich in 7 von 10 Präparaten der ableitenden Tränenwege nachweisen. Eine schwache Immunreaktion ist intrazytoplasmatisch in den hochprismatischen

Zylinderepithelzellen sowie in den Basalzellen detektierbar. Eine stärkere Immunreaktion ist an der apikalen Oberfläche des ableitenden Tränenwegsepithels beobachtbar (Abb. 3-25D). *Tränendrüse*: 6 von 10 Tränendrüsen zeigen eine Immunreaktion intrazytoplasmatisch in den Azinuszellen (Abb. 3-25E). In 4 der 6 positiven Präparate waren deutliche regionale Unterschiede der Antikörperreaktion sichtbar. In den Präparaten, in denen die HRNR Expression immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden konnte, waren nachträglich keine kausalen Zusammenhänge zu Alter, Geschlecht oder Vorerkrankungen (soweit bekannt) der Körperspender feststellbar.

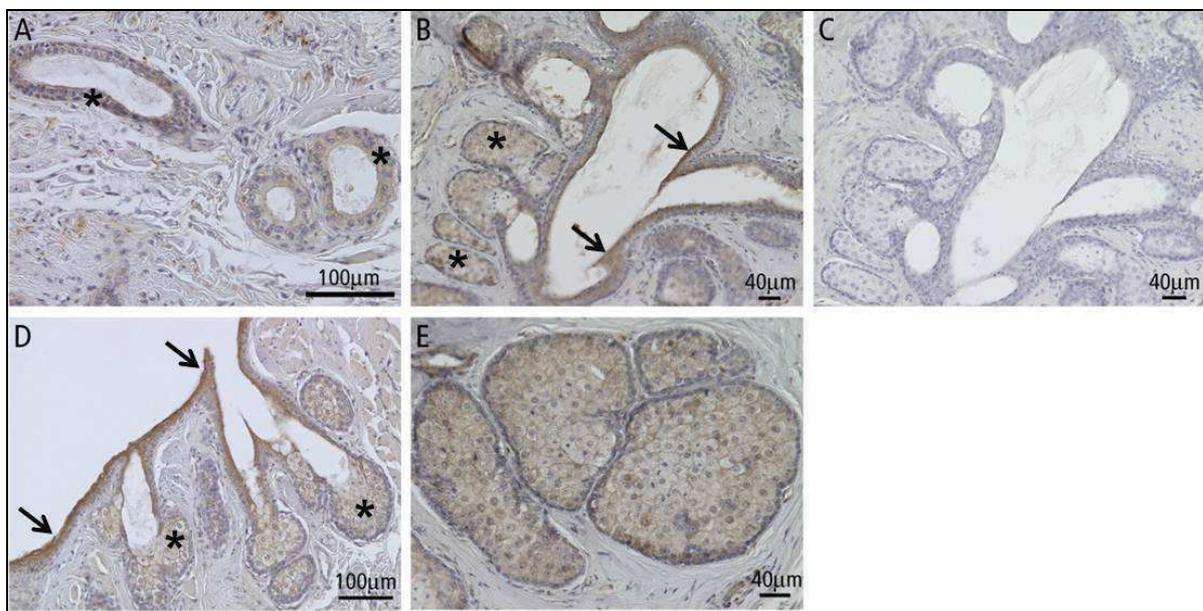


Abbildung 3-26: Immunhistochemische Lokalisation von Hornerin in Moll-Drüsen (A) sowie in Meibom-Drüsen (B, D und E). Nachweis der Hornerin Expression in repräsentativen Immunreaktionen der Lid-assoziierten Drüsen. Drüsenzellen (*) der Moll-Drüsen (A) sowie Meibozyten (*) und das mehrschichtige Epithel der Ausführungsgänge (Pfeil) der Meibom-Drüsen (B,C und D) zeigen eine deutliche Immunreaktion (braunes Reaktionsprodukt) mit den eingesetzten H2 HRNR Antikörpern. Negativkontrolle (C) mit nicht-immunisierten IgG-Antikörpern zeigt keine Immunreaktion. Paraffinschnitte (7 µm) sind mit Hämatoxylin (blaue Zellkernfärbung) gegengefärbt.

Augenlid und Augenlid-Drüsen: In den untersuchten Augenlidern ist eine intensive HRNR Antikörper-Reaktion im mehrschichtig verhornten Plattenepithel, den assoziierten Haarfollikeln der Wimpern sowie in Meibom Drüsen und Haar-assoziierten Talgdrüsen (Zeis-Drüsen) detektierbar. In der Epidermis sieht man die HRNR-Expression in Keratinozyten des Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (Abb. 3-25C). Dabei nimmt die Immunreaktivität (Braunfärbung) von basal nach apikal in den Keratinozyten zu. Die Keratinozyten des Stratum basale weisen nur eine sehr schwache Immunreaktivität auf. In den Haarfollikeln der

Wimpern, in den Wimpern-assoziierten Zeis-Drüsen, in den Drüsenzellen der Moll-Drüsen und in den Meibom Drüsen sieht man eine deutliche Immunreaktion (Abb. 3-26). In den Meibom Drüsen ist die HRNR Expression in den Meibozysten sowie auch in den isoprismatischen Zellen des mehrschichtigen Ausführungsgangsepithels lokalisiert (Abb. 3-26B und E).

Filaggrin-2 war immunhistochemisch mit den verwendeten anti-FLG2 Antikörpern (α IFPS-2 und α IFPS-4) in den untersuchten Paraffinschnitten von Kornea, Konjunktiva, Tränendrüse und ableitenden Tränenwegen nicht nachweisbar.

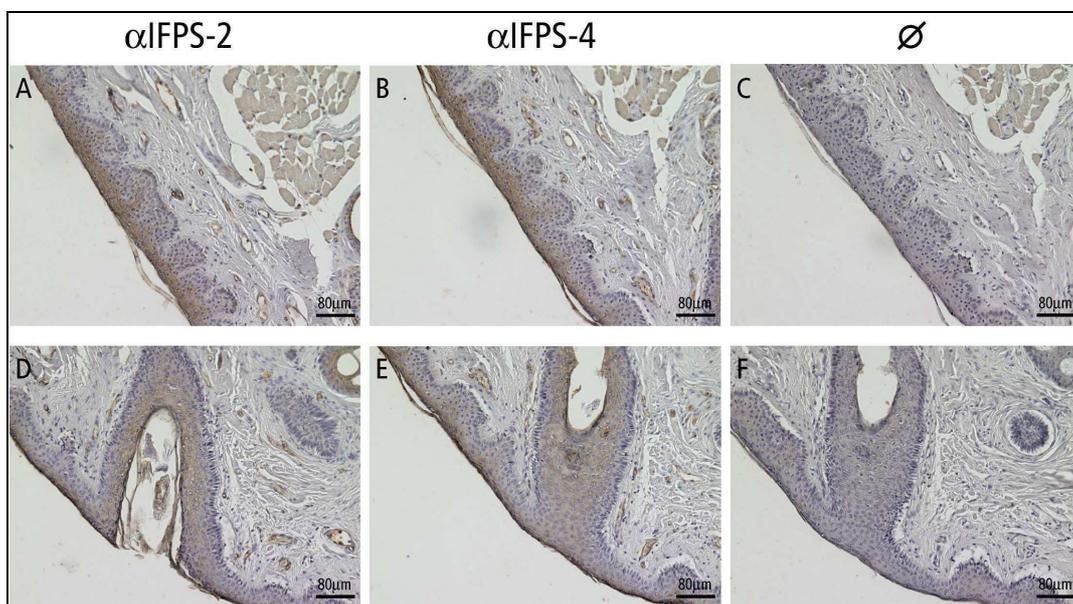


Abbildung 3-27: Immunhistochemischer Nachweis von Filaggrin-2 in der Epidermis des Augenlides und im Haarfollikel. Nachweis des α IFPS-2 (A und D) und α IFPS-4 (B und E) Epitops in repräsentativen Immunreaktionen des Augenlids. Keratinozyten im Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum zeigen eine deutliche Immunreaktivität (braunes Reaktionsprodukt) mit den eingesetzten FLG2-Antikörpern. Negativkontrolle (C und F) mit nicht-immunisierten IgG-Antikörpern reagieren nicht. Die Paraffinschnitte (7 μ m) sind mit Hämatoxylin (blaue Zellkernfärbung) gegengefärbt. Balken 80 μ m

Als Positivkontrollen eingesetzte Sagittalschnitte des Augenlides der verschiedenen Körperspender zeigen eine positive Immunreaktivität in der Epidermis und in den Haarfollikeln der Wimpern (Abb. 3-27). FLG2 ist mit beiden Antikörpern in den Keratinozyten des Stratum spinosum, Stratum granulosum und des Stratum corneum lokalisierbar. Sämtliche Drüsen der Augenlider (Meibom-, Moll-, Zeis- und akzessorische Tränendrüsen) zeigen keine Immunreaktion mit den verwendeten FLG2-Antikörpern.

3.7.3 Regulation von Hornerin und Filaggrin-2 in kultivierten HCjE- und HCE-Zellen

Zur Untersuchung der Regulation der S100 fused-type Proteine Hornerin und Filaggrin-2 wurden Stimulationsexperimente mit verschiedenen Stressinduzierenden Faktoren durchgeführt. Auf mRNA-Ebene wurde die HRNR und FLG2 Expression mittels semi-quantitativer Endpunkt-RT-PCR analysiert. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die stressinduzierte HRNR Expression auf Proteinebene mittels Immunhistochemie untersucht.

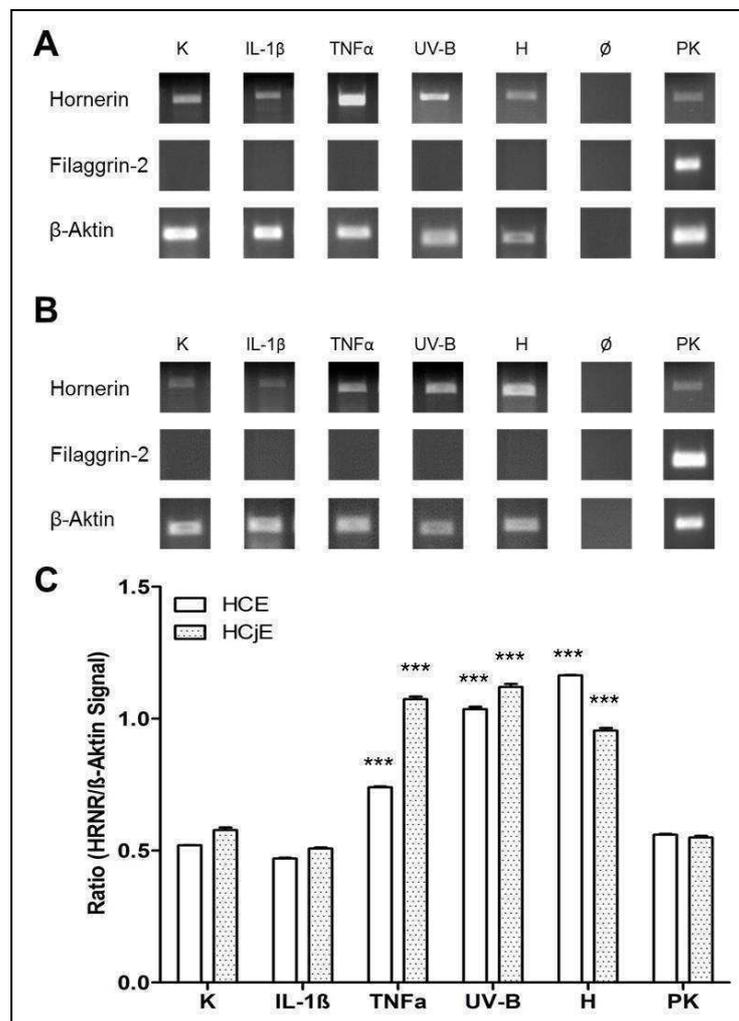


Abbildung 3-28: Expression von Hornerin und Filaggrin-2 in kultivierten HCjE (A) und HCE (B) Zellen nach Stimulation mit stressinduzierenden Faktoren. Semi-quantitative RT-PCR Analyse der HRNR und FLG2 Expression nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF α , 30 mJ/cm² UV-B-Bestrahlung und nach Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (H). (K) nicht-stimulierte Zellen, (\emptyset) Negativkontrolle, (PK) Positivkontrolle (cDNA Augenlid), β -Aktin RT-PCR als Referenzgen (Ladungskontrolle). (C) Statistische Auswertung der semi-quantitativen Endpunkt-RT-PCR (Ratio HRNR-Signal gegen β -Aktin-Signal). Säulendiagramme repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen RT-PCR Experimenten (n = 3). Sternchen (zweiseitiger T-Test): ***p < 0,001

Im *in vitro* Zellkulturmodell ist das HRNR Amplifikationsprodukt sowohl in nicht-stimulierten als auch in stimulierten HCE und HCjE Zellen mittels RT-PCR detektierbar. Das FLG2 Amplifikat ist weder in nicht-stimulierten noch in stimulierten Zellen nachweisbar. In HCjE Zellen kommt es (nach Auswertung der semi-quantitativen Endpunkt-RT-PCR) zur Induktion der HRNR Genexpression nach Stimulation mit 50 ng/ml TNF α , nach Bestrahlung mit 30 mJ/cm² UV-B sowie Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (P_{O₂} = 5%). Die Behandlung mit 10 ng/ml IL-1 β zeigen keinen Einfluss auf die HRNR Genexpression (Abb. 3-28A). In kultivierten HCE Zellen kommt es auch nach Stimulation mit 50 ng/ml TNF α , 30 mJ/cm² UV-B-Bestrahlung sowie unter hypoxischen Bedingungen zur Induktion der HRNR Genexpression. Die Behandlung mit 10 ng/ml IL-1 β zeigt auch hier keinen Effekt auf die HRNR Genexpression (Abb. 3-28B).

Auf Proteinebene ist nach der 24h Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF α , UV-B-Bestrahlung (30 mJ/cm²) und der Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen die Expression von HRNR in kultivierten HCjE-Zellen immunhistochemisch nachweisbar (Abb. 3-29).

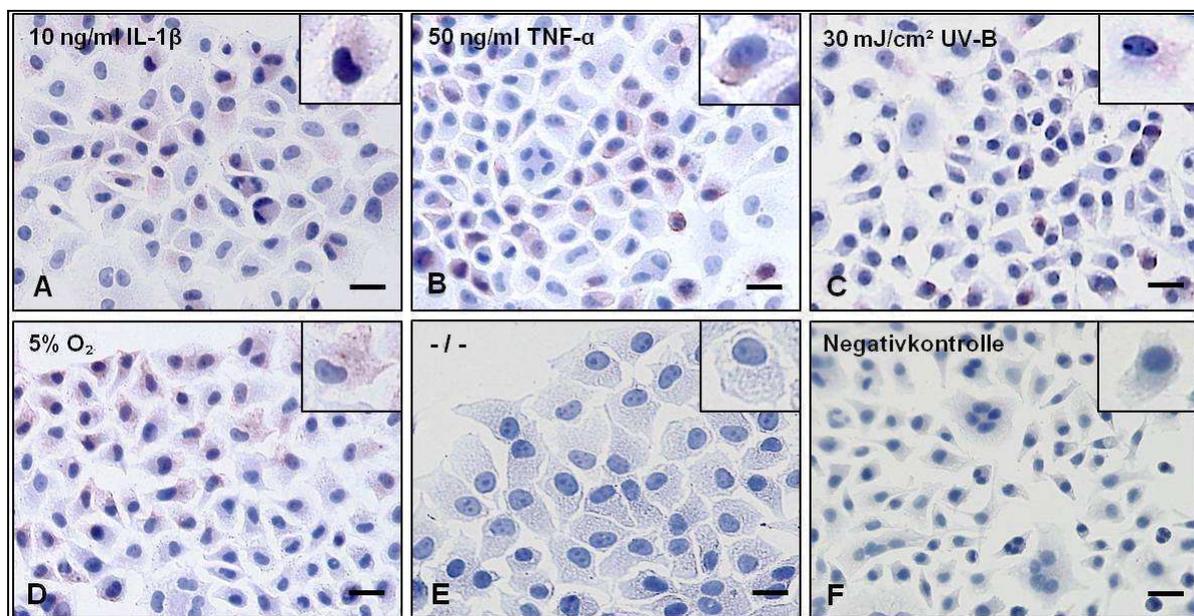


Abbildung 3-29: Immunhistochemischer Nachweis von Hornerin (HRNR) in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (HCjE). HRNR Expression nach 24 h Stimulation mit 10 ng/ml Interleukin-1 β (A), 50 ng/ml Tumornekrosefaktor- α (B), 30 mJ/cm² UV-B Strahlung (C) und Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (5% Sauerstoffpartialdruck) (D). Keine Immunreaktion (rotes Reaktionsprodukt) in nicht-stimulierten HCjE Zellen (E) und in der Kontrolle (nicht-immunisierte IgG) (F). Zellkernfärbung (blau) mit Hämatoxylin. Der Balken entspricht in (A), (B), (C), (D), (F) 30 μ m und in (E) 22 μ m.

Die Immunreaktion ist intrazytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 3-29 Inserts). In nicht-stimulierten HCjE-Zellen sowie in der Negativkontrolle (nicht-immunisierte IgG) ist keine Immunreaktivität detektierbar.

In nicht-stimulierten HCE Zellen ist keine HRNR Expression immunhistochemisch nachweisbar. Nach UV-B-Bestrahlung und Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen kommt es zur Induktion der HRNR Expression, so dass eine Immunreaktion nachweisbar ist (Abb. 3-30).

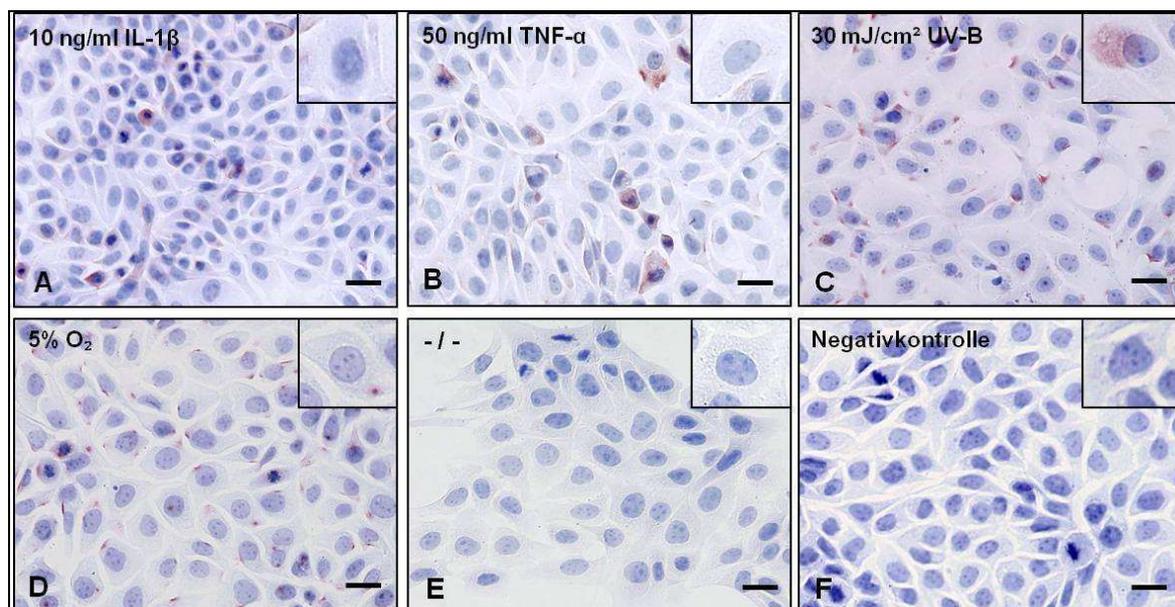


Abbildung 3-30: Immunhistochemischer Nachweis von Hornerin (HRNR) in der humanen Korneaepithelzelllinie (HCE). HRNR Expression nach Bestrahlung mit 30 mJ/cm² UV-B (C) und 24 h Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (5% Sauerstoffpartialdruck) (D). Keine positive Immunreaktion ist nach 24 h Stimulation mit 10 ng/ml Interleukin-1 β (A) und 50 ng/ml Tumornekrosefaktor-α (B) sowie in nicht-stimulierten HCE Zellen (E) und in der Kontrolle (nicht-immunisierte IgG) (F) detektierbar. Pfeile zeigen HCE Zellen in der Mitose. Der Balken entspricht in (A) 40 μm, in (B), (C) und (D) 30 μm, in (E) und (F) 22 μm.

Der HRNR Nachweis ist auf einen randständigen, lokal begrenzten intrazellulären Bereich der Zelle beschränkt (Abb. 3-30 C und D Inserts). Nach Stimulation mit IL-1β oder TNFα ist eine HRNR Immunreaktivität nur in Zellen nachweisbar, die sich in einem Mitose-Stadium befinden. Dabei handelt es sich um falsch-positive Immunreaktionen.

Die Expression von FLG2 ließ sich immunhistochemisch weder in nicht-stimulierten noch in stimulierten HCE oder HCjE Zellen nachweisen (nicht dargestellt).

4 Diskussion

Die angeborene Immunabwehr an der Augenoberfläche ist in der Lage die Besiedlung der Epithelien durch pathogene Mikroorganismen effektiv zu verhindern. Sie trägt somit maßgeblich zur Aufrechterhaltung der visuellen Wahrnehmung bei. Ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr sind dabei stark kationisch geladene antimikrobielle Peptide (AMPs) sowie komplexere Proteine mit ähnlicher antimikrobieller Aktivität. Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass AMPs bei vielen wichtigen zellulären Prozessen, im Rahmen pathophysiologischer Veränderungen sowie bei chronischen Entzündungsprozessen eine Rolle spielen (Beisswenger und Bals, 2005; Wiesner und Vilcinskas, 2010). Ferner stellen sie ein wichtiges Bindeglied zur erworbenen, zellulären Immunabwehr dar (McDermott, 2009). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression und Regulation der an der Augenoberfläche und im Tränenapparat partiell beschriebenen humanen β -Defensine (hBDs) detaillierter zu betrachten und ihre Regulation unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen näher zu charakterisieren. In Zeiten zunehmender Antibiotika-resistenter Bakterien nimmt die Bedeutung der Erforschung neuer antimikrobiell wirksamer Substanzen zu. Dazu wurden die an der Augenoberfläche und im Tränenapparat bislang unbekanntes antimikrobiell wirksamen Proteine Psoriasin (S100A7c), Filaggrin-2 (FLG2) und Hornerin (HRNR) erstmalig beschrieben und funktionell analysiert.

4.1 Bedeutung der humanen β -Defensine im Rahmen der angeborenen Immunabwehr an der Augenoberfläche

Die humanen β -Defensine sind neben dem humanen Cathelicidin LL-37 die wichtigsten bislang bekannten antimikrobiellen Peptide an der Augenoberfläche des Menschen und somit Hauptbestandteil der chemischen Barriere *in vivo*. In der vorliegenden Arbeit wurden die Syntheseorte der hBDs erstmalig und vollständig für die Augenoberfläche und den Tränenapparat unter physiologischen (Abb. 3-1 und 3-2) sowie pathologischen Bedingungen (Abb. 3-12) lokalisiert. Ferner konnte erstmalig die hBD-2 und -3 Konzentration direkt in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden nachgewiesen und quantifiziert werden (Abb.3-3).

HBD-1, -2, -3 und -4 werden konstitutiv in der Konjunktiva aber nur teilweise in der Kornea exprimiert.

In den vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Azinuszellen der Tränendrüse, die Kornea- und Konjunktivaepithelzellen der Augenoberfläche, die direkt an der Bildung der Tränenflüssigkeit beteiligt sind, sowie die Epithelzellen der ableitenden Tränenwege β -Defensine exprimieren (Abb. 3-1 und 3-2). HBD-1 wird in den Epithelzellen der Augenoberfläche, den ableitenden Tränenwegen sowie in den Azinuszellen der Tränendrüse auf mRNA- und Proteinebene konstitutiv exprimiert. Dieser Befund bestätigt Untersuchungen in anderen Epithelien des Menschen (McCray und Bentley, 1997; Singh et al., 1998; Valore et al., 1998). In einer aktuellen Arbeit wurde gezeigt, dass es im Darm, unter reduzierenden, hypoxischen Bedingungen, zur Konformationsänderung von hBD-1 kommt. Dadurch erhöht sich die antimikrobielle Aktivität von hBD-1 um ein Vielfaches, wodurch die Regulation der physiologischen Darmflora beeinflusst wird (Schroeder et al., 2011). Über eine ähnliche Funktion an der Augenoberfläche kann nur spekuliert werden, da dazu keine eigenen Versuche durchgeführt wurden und auch keine entsprechenden Befunde an der Augenoberfläche vorliegen. Ebenfalls konnte die konstitutive Expression von hBD-2 in allen untersuchten Kornea- und Konjunktivapräparaten von Körperspendern mittels RT-PCR und immunhistochemisch nachgewiesen werden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Befunden anderer Arbeitsgruppen, die hBD-2 nicht oder nur nach Stimulation in den Epithelien der Augenoberfläche detektieren konnten (Bals und Wilson, 2003; Hattenbach et al., 1998; Haynes et al., 1998; Lehmann et al., 2000; McDermott et al., 2001). Eigene ELISA Experimente zur Quantifizierung der hBD-2 Konzentration verifizieren die in dieser Arbeit erhobenen RT-PCR und die immunhistochemischen Ergebnisse (Abb. 3-3). Auf mRNA-Ebene ließ sich das hBD-3 mRNA-Transkript nur in Konjunktiva, nicht aber in Kornea, Tränendrüse oder ableitenden Tränenwegen detektieren. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse auf Proteinebene, dass das hBD-3 Peptid in allen 4 Geweben unter „Ruhebedingungen“ ohne entsprechende Stimuli nachweisbar ist (Abb. 3-2 und 3-3). Dies steht auch im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen basalen Expression von hBD-3 in Kornea- und Konjunktivaepithelzellen (McDermott et al., 2003; McIntosh et al., 2005; Narayanan et al., 2003). HBD-4 konnte bislang in Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates mit Ausnahme der Expression in kultivierten Kornea- und Konjunktivaepithelzellen nicht nachgewiesen

werden (Huang et al., 2007a; McIntosh et al., 2005). Die hier erhobenen *in vivo* Befunde zeigen eine konstitutive hBD-4 Expression in der Kornea und Konjunktiva auf mRNA-Ebene (Abb. 3-1). Diese mRNA-Ergebnisse ließen sich nur teilweise auf Proteinebene in Form einer schwachen Reaktivität in der Superfizialschicht der Konjunktivaepithelzellen und in den Epithelzellen der ableitenden Tränenwege bestätigen (Abb. 3-2). Insgesamt war die Immunreaktivität des kommerziell erworbenen hBD-4 Antikörpers nicht zufriedenstellend. Die Diskrepanzen in der hBD Expression zwischen den einzelnen Nachweismethoden lassen mehrere Schlussfolgerungen zu. Die Unterschiede in der Intensität der Immunreaktion in der Immunhistochemie und der gemessenen hBD-2 und -3 Konzentration in den ELISA-Experimenten lassen sich auf die unterschiedlichen verwendeten Antikörper, die verschiedene Epitope erkennen, zurückführen. Unterschiede im Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene können einerseits auf die Qualität des verwendeten post-mortalen Gewebes (Autolyse) sowie die unterschiedliche Stabilität der mRNA bzw. der untersuchten Peptide zurückgeführt werden. Andererseits wurde auch über die Regulationen auf (post)transkriptioneller und (post)translationaler Ebene sowie die Speicherung der hBDs in speziellen Membranvesikeln diskutiert. Diese Fragen konnten aber nicht abschließend geklärt werden. Insbesondere im Interesse der pharmazeutischen Anwendung der hBDs ist die weitere Untersuchung der strukturellen Stabilität der Peptide unter physiologischen Bedingungen von besonderem Interesse.

Tränenflüssigkeit von gesunden Probanden enthält hBD-2 und -3

Erstmalig erfolgte mit den im Rahmen dieser Arbeit selbst entwickelten hBD-2 und -3 ELISAs der Nachweis und die Quantifizierung der hBD-2 und -3 Peptidkonzentration in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden. Im Gegensatz zu den α -Defensinen war bisher nicht bekannt, dass β -Defensine in die Tränenflüssigkeit abgegeben werden (Huang et al., 2007a; Zhou et al., 2004). Die Konzentration der hBD-2 und -3 Peptide liegt allerdings nur im Picogramm-Bereich (Abb. 3-3), mit höchster Konzentration in den analysierten Kornea-Proben (hBD-2 = 1595 pg / mg Gesamtprotein, hBD-3 = 1793 pg/mg Gesamtprotein). Die hBD-2 Konzentration in der Tränenflüssigkeit ist mit 367 pg/ mg Gesamtprotein ist mit der in der Konjunktiva (310 pg/mg), Tränendrüse (226 pg/mg) und den ableitenden Tränenwegen (305

pg/mg) vergleichbar. Kolar et al. (2011) fanden ähnliche hBD-2 Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden (329 ± 154 pg/ml) und konnten die in der vorliegenden Arbeit gemessene hBD-2 Konzentrationen somit bestätigen. Die Konzentration von hBD-3 in der Tränenflüssigkeit ist mit 142 pg/ mg Gesamtprotein sogar noch niedriger als in den untersuchten Gewebeproben der Konjunktiva (690 pg/mg), Tränendrüse (457 pg/mg) und ableitenden Tränenwegen (558 pg/mg). Die relativ niedrigen Konzentrationen beider hBD-Peptide in der Tränenflüssigkeit im Vergleich zur Gewebekonzentration könnten darauf zurückzuführen sein, dass aus methodischen Gründen (zu geringes Probenvolumen für ELISA Experimente) nur wasser-/elektrolytreiche Reflextränen und nicht die basale, proteinreiche Tränenproduktion untersucht werden konnte. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die stark positiv geladenen hBD-Peptide (Wiesner und Vilcinskas, 2010) mit der negativ geladenen Glykokalyx der Kornea assoziiert sind. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die hohe hBD-2 und -3 Konzentration in den untersuchten Kornea-Proben.

Die gemessene hBD-2 und -3 Konzentration im Tränenfilm ist für eine effektive antimikrobielle Aktivität *in vitro* zu niedrig (Kolar und McDermott, 2011). Huang et al. (2007) zeigten, dass die mittlere Hemmkonzentration (EC_{50} -Wert) der hBD-1 bis -3 Peptide im niedrigen Mikrogramm-Bereich pro Milliliter liegen (Huang et al., 2007a). Die gemessene niedrige hBD-2 und -3 Konzentration kann aber durch synergistische Effekte ausgeglichen werden. So wird das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* auf der Haut durch synergistische und additive Effekte der hBDs, LL-37 und Lysozym effektiv verhindert (Chen et al., 2005). Eigene Ergebnisse zeigen auch, dass es zu einer gesteigerten hBD Expression mit anschließender Sekretion der hBD Peptide in die Tränenflüssigkeit bei Verletzung, entzündlichen Prozessen und mikrobieller Infektion der Augenoberfläche kommt (Garreis et al., 2010). Ferner wird auch die Speicherung der hBDs in noch nicht identifizierten zellulären Kompartimenten der Epithelzellen diskutiert (s.u.), was die lokale hBD Konzentration erhöhen sowie die antimikrobielle Aktivität an der Augenoberfläche erklären würde.

Proinflammatorische Zytokine induzieren die hBD Expression in HCE und HCjE Zellen

Zur funktionellen Charakterisierung der humanen β -Defensine wurde untersucht, ob deren Expression nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β und TNF α) und inaktivierten, nicht-lebenden Bakterienüberständen (Pathogen-assoziierte Molekulare Muster, PAMPs) auf mRNA- und Proteinebene reguliert wird. Dabei zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass IL-1 β die hBD-2 Genexpression in kultivierten HCE Zellen unerwartet stark bis auf das 1.800-fache hochreguliert (Abb. 3-4). Auf Proteinebene konnte ein Anstieg der hBD-2 Sekretion in den Medienüberstand um das 14-fache gemessen werden (Abb. 3-6). Diese Ergebnisse decken sich mit Befunden anderer Arbeitsgruppen (McDermott et al., 2003; Narayanan et al., 2003; Shin et al., 2004). IL-1 β steigert auch die hBD-3 Genexpression und Sekretion in HCE Zellen, allerdings nur um das 2,5-fache. Auch in den untersuchten HCjE Zellen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der hBD-2 und der hBD-3 Sekretion nach Stimulation mit IL-1 β (Abb. 3-6). Jedoch sind die Effekte hier wesentlich geringer im Vergleich zu den HCE Zellen. Im Hinblick auf diese Ergebnisse werden weitere Untersuchungen von Interesse sein, da vor kurzem gezeigt wurde, dass T_H17-Zellen außer IL-6 und IL-17 hauptsächlich IL-1 β produzieren. T_H17-Zellen fördern und initiieren Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen wie Rheuma, Arthritis und Morbus Crohn (Wilke et al., 2011). Auch bei der Ausbildung und Manifestierung eines Trockenen Auges wurde eine Beteiligung von T_H17-Zellen demonstriert. Hier nimmt ihre Anzahl mit dem Krankheitsverlauf zu (Chauhan und Dana, 2009). Interessanterweise nimmt auch beim Trockenen Auge, sowie bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen, die Konzentration der hBDs zu (Guani-Guerra et al., 2010; Kawasaki et al., 2003; Narayanan et al., 2003). Außer IL-1 β induziert auch das proinflammatorische Zytokin TNF α die Expression von hBD-2 und -3 in kultivierten HCE und HCjE Zellen wie die vorliegenden Ergebnisse auf mRNA- (Abb. 3-5) und Proteinebene (Abb. 3-6) zeigen. Dieses Ergebnis steht in einem deutlichen Widerspruch zu den Ergebnissen von Narayanan et al. (2003), die in kultivierten Konjunktivaepithelzellen keine Induktion der hBD-3 Expression nach Stimulation mit IL-1 β und TNF α beobachten konnten. Andererseits zeigen verschiedene andere Studien in nicht-okulären Epithelien, dass die Expression von hBD-3 durch TNF α induziert werden kann (Garcia et al., 2001; Harder et al., 2001; Nomura et al., 2003) und stehen damit mit den hier erhobenen

Befunden im Einklang. Dabei scheint die Induktion der hBD-2 und -3 Expression durch proinflammatorische Zytokine zeit-, dosis- sowie zelltypabhängig zu sein. Auch sind die Regulationsmechanismen auf transkriptioneller und/oder translationaler Ebene noch nicht abschließend geklärt, was auch die aufgetretenen Unterschiede auf mRNA- und Proteinebene erklären würde.

Überstände von *Staphylococcus aureus* induzieren die hBD-2 und -3 Expression in HCE und HCjE Zellen

Die hBDs zeigen *in vitro* eine breite antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl pathogener Erreger, auch solche, die häufig Infektionen an der Augenoberfläche auslösen. *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* sind zwei der häufigsten Erreger für eine bakterielle Keratitis, wobei *Pseudomonas aeruginosa* der häufigste Erreger bei Kontaktlinsen-Trägern ist (Green et al., 2008; Pachigolla et al., 2007). In den vorliegenden Stimulationsergebnissen konnte gezeigt werden, dass inaktivierte Überstände von *Staphylococcus aureus* in HCE und HCjE Zellen zu einem signifikanten Anstieg der hBD-2 und der hBD-3 Expression auf mRNA- (Abb. 3-7) und Proteinebene (Abb. 3-8 und 3-9) führen. Auch mit inaktivierten Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* konnte ein Anstieg der hBD-2 Sekretion in kultivierten HCE nicht aber in HCjE Zellen beobachtet werden. Die hBD-3 Expression wird durch die Stimulation mit Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* nicht beeinflusst (Abb. 3-9). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass außer hBD-2 auch hBD-3 durch PAMPs induzierbar ist und dass beide Peptide maßgeblich zur Verhinderung bakterieller Infektionen wie z. B. gegen *Staphylococcus aureus* an der Augenoberfläche beitragen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die hBD-2 und -3 Expression auch in anderen Epithelien durch die Applikation Gram-negativer oder Gram-positiver Bakterien oder deren Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) induziert wird und die Peptide maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Epithelbarriere beitragen (Hazlett und Wu, 2011; Schroder und Harder, 2006; Wiesner und Vilcinskas, 2010)

McDermott et al. (2009) konnten nachweisen, dass die antimikrobielle Aktivität der humanen β -Defensine durch Lyse von Bakterien ein sehr schneller Prozess (15-90

Minuten) ist. Interessanterweise konnten in den vorliegenden Untersuchungen signifikant erhöhte hBD-3 Peptidkonzentrationen bereits 5 Minuten nach Inkubation mit *Staphylococcus aureus* Überständen nachgewiesen werden (Abb. 3-10). Dies könnte entweder bedeuten, dass die hBD-3 Peptidproduktion in den Epithelzellen sehr schnell erfolgt, oder dass zuvor kontinuierlich gebildetes hBD-3 zunächst gespeichert und bei Kontakt mit Bakterien oder deren PAMPs unmittelbar freigesetzt werden kann. Auch eine Kombination aus beiden Prozessen ist denkbar. Hinsichtlich der Speicherung zeigen Studien, dass hBD-2 in der Haut an Lamellarkörper gebunden wird. Lamellarkörper (*lamellar bodies*) sind Lipid-reiche Vesikel, die zur Aufrechterhaltung der Diffusionsbarriere der äußeren Epidermisschichten beitragen und so die lokale Konzentration der antimikrobiellen Peptide erhöhen können (Oren et al., 2003). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass auch LL-37 in den Lamellarkörpern der Keratinozyten gespeichert wird (Braff et al., 2005). Auch ist bekannt, dass α -Defensine, insbesondere die humanen Neutrophilen Peptide (HNP) 1-4 in sehr hoher Konzentration in den azidophilen Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert und nach Kontakt mit pathogenen Erregern freigesetzt werden (Faurischou et al., 2002; Ganz, 1987). Für die hBD-2 Expression konnte eine Induktion erst nach 12 Stunden gezeigt werden. Hier könnte entweder ein anderer Induktionsmechanismus eine Rolle spielen oder eine Erreger-spezifische Sekretion der hBDs vorliegen. Die hBD-2 und -3 Sekretion ist nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* für beide Peptide nach 12 Stunden maximal erhöht und bleibt bis 24 Stunden auf einem signifikant erhöhten Niveau. Dies deutet darauf hin, dass außer einem schnellen hBD-Freisetzungmechanismus auch ein langsamerer aber kontinuierlicher Prozess der Neubildung und Sekretion der hBD-Peptide nach antimikrobiellem Kontakt in Gang gesetzt wird.

Maus β -Defensine-3 und -4 werden im Korneaepithel nur nach Verletzung bei gleichzeitiger Applikation von PAMPs induziert

Um die Regulation der β -Defensine *in vivo* besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Korneadefekt (Scratch) Modell in Mäusen genutzt, denen zusätzlich inaktivierte Überstände (PAMPs) von *Staphylococcus aureus* in den Bindehautsack appliziert wurde (Abb. 3-11). Die Induktion der mBD3 und -4 erfolgt nur bei einer oberflächlichen Schädigung des Korneaepithels zusammen mit

gleichzeitiger Applikation bakterieller Bestandteile (PAMPs) in den Bindehautsack. Alleinige Schädigung des Korneaepithels oder alleinige Applikation von *Staphylococcus aureus* Überständen in den Bindehautsack führt zu keiner oder nur geringen Induktion der mBD3 und mBD4 Peptide. Anscheinend ist die chemische Barriere der im Tränenfilm enthaltenen antimikrobiell wirksamen Substanzen wie z.B. sekretorischer Phospholipase A2, die eine hohe Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* zeigt (Qu und Lehrer, 1998) sowie zahlreicher anderer antimikrobieller Substanzen unter physiologischen Bedingungen in der Lage, das Eindringen und die Besiedlung der Augenoberfläche mit pathogenen Mikroorganismen effektiv zu verhindern. Eine direkte Beteiligung der induzierbaren β -Defensine (mBDs) scheint dabei nicht nötig zu sein. Kommt es aber zu einer Verletzung und/oder Reizung der Epithelzellen an der Augenoberfläche wird zusätzlich die Expression der murinen β -Defensine als weiterer Schutzmechanismus induziert. Diese These steht im Einklang mit der Verteilung der für die Erkennung der PAMPs benötigten Toll-like Rezeptoren (TLR). In mehreren funktionellen Studien wurde gezeigt, dass TLR4 und -5 vermehrt in den basalen, nicht oder schwach in superfizialen bzw. medialen Epithelzellen der Kornea exprimiert werden und dass es erst nach einer Schädigung des Epithels zu einer Aktivierung der TLR4/5-vermittelten Entzündungsantwort kommt (Blais et al., 2005; Hozono et al., 2006; Zhang et al., 2003). Es ist bekannt, dass es dabei auch zur Aktivierung der angeborenen, epithelialen Immunabwehr an der Augenoberfläche inklusive der Induktion der β -Defensine in der Maus und im Menschen kommt (Redfern und McDermott, 2010). Ferner kommt es auch zur Induktion der hBDs bei entzündlichen sowie nicht-entzündlichen Veränderungen der Augenoberfläche wie eigene Untersuchungen (s.u.) und verschiedene klinische Studien zeigen (Kawasaki et al., 2003; McDermott et al., 2001; Narayanan et al., 2003). Untersuchungen von Wu et al., zeigen, dass die Maus β -Defensine-3 und -4 maßgeblich an der Immunabwehr von *Pseudomonas aeruginosa* an der Maus-Augenoberfläche beteiligt sind (Wu et al., 2009a; Wu et al., 2009b).

Ferner zeigt das Ergebnis des Korneadefekt Modells in den BALB/c Mäusen, dass es nicht nur in der geschädigten Kornea zur Induktion der mBDs kommt, sondern auch in der nicht verletzten benachbarten Konjunktiva. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Tight junctions der intakten Kornea möglicherweise das Eindringen von

Staphylococcus aureus Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) effektiv verhindern. Die „undichten“ Tight junctions der Konjunktiva können dies nicht. Auch die unterschiedliche Verteilung von TLR-Rezeptoren im Kornea- und Konjunktivaepithel, die in der Lage sind PAMPs von *Staphylococcus aureus* zu erkennen und für die Induktion der β -Defensine verantwortlich sind, könnten dabei eine Rolle spielen (Redfern und McDermott, 2010). Hier wird deutlich, dass die einzelnen Gewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates, einschließlich des Tränenfilms, aus immunologischer Sicht nicht getrennt sondern als Einheit verstanden werden müssen. In weiteren Experimenten muss aber noch untersucht werden, ob die Induktion der konjunktivalen β -Defensine bei der Kornealäsion über den Tränenfilm oder über eine neuronale Verschaltung oder sogar über beide Wege verlaufen kann. Es muss ferner erwähnt werden, dass bei der Durchführung des Mausexperiments das Maushomolog von hBD-3 noch unbekannt war. Deshalb wurden im Rahmen des *in vivo* Experiments die mBD2, -3 und -4 untersucht. MBD3 und mBD4 sind die Maushomologe von hBD-2 (Burd et al., 2002; Semple et al., 2006). MBD14 ist das Maushomologe von hBD-3, wie sich 2008 herausstellte (Hinrichsen et al., 2008).

Induktion der hBD-Expression im Rahmen verschiedener Kornea-Pathologien

Eigene immunhistochemische Untersuchungen an Korneae von „gesunden“ Körperspendern zeigen eine nur sehr schwache Expression von hBD-2 und -3 in den apikalen Korneaepithelzellen (Abb. 3-2). Die in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch untersuchten Kornea-Pathologien (bullöse Keratopathie, Herpes-simplex-Keratitis, Fuchs-Endotheldystrophie und Keratokonus) führen zu einem deutlichen Anstieg der Immunreaktivität mit den verwendeten hBD-2 und -3 Antikörpern im gesamten Korneaepithel im Vergleich mit nicht-pathologisch veränderten Kornea-Präparaten (Abb. 3-12). Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigen, dass die hBD-2 und -3-Expression in allen Epithelschichten der Kornea induziert wird unabhängig von der Art und Weise der kornealen Erkrankung. Aus der Literatur ist bekannt, dass es zur Induktion der hBD Expression in den Epithelzellen der Augenoberfläche bei Verletzung und bei entzündlichen Prozessen wie z.B. dem Trockenem Auge oder dem Sjögren Syndrom kommt (Kawasaki et al., 2003; McDermott et al., 2001; Narayanan et al., 2003). Eine entzündliche Erkrankung der

Augenoberfläche ist die Herpes-Keratitis. Sie ist auch eine der häufigsten Ursachen für den Verlust der Sehfähigkeit und wird durch eine Infektion mit dem Herpes-simplex-Virus 1 (HSV1), in seltenen Fällen auch durch HSV2 Infektion verursacht (Kaye und Choudhary, 2006). In einigen Fällen ist davon auch die Konjunktiva betroffen. In der Kornea kann das Virus eine epitheliale und stromale Keratitis mit Geschwürbildung, Ödemen und stromaler Narbenbildung auslösen (Kaufmann et al., 1989). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine starke Induktion der hBD-2 und -3-Expression in allen Epithelschichten der Kornea sowie im Stroma um die Herpesläsionen. Die Induktion von hBD-2 und -3 ist von Vorteil, da für beide Peptide gezeigt wurde, dass sie mehrere Schritte der Herpes-simplex-Infektion blockieren können (Hazrati et al., 2006). Interessanterweise kommt es auch bei nicht-entzündlichen Erkrankungen der Kornea wie bullöser Keratopathie, Fuchs-Endotheldystrophie und Keratokonus zur Induktion der hBD-2 und -3 Expression auf Proteinebene. Die genaue funktionelle Bedeutung der hBD-2 und -3 Induktion im Rahmen der verschiedenen Kornea-Pathologien, insbesondere der nicht-entzündlichen, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine mögliche Erklärung ist die Störung der epithelialen Barrierefunktion der Kornea durch strukturelle Schäden (Bläschen, Vesikel) und eine damit einhergehenden Aktivierung der angeborenen Immunabwehr einschließlich Induktion der hBDs. Wie die zuvor beschriebenen Versuche in der Maus Kornea zeigen, führt eine Störung der epithelialen Strukturen zur Aktivierung der hBDs (Garreis et al., 2010). In verschiedenen nicht-entzündlichen Erkrankungen der Haut wie der Psoriasis, atopischer Dermatitis sowie auch bei Verletzungen der Haut kommt es unter anderem zu einer Induktion von hBD-2 sowie anderer AMPs wie z.B. Psoriasin (s.u.), RNase-7 und der humanen Neutrophilen Peptide (HNP) 1-3. Auf diese Weise wird eine mikrobielle Besiedlung der geschädigten Hautareale verhindert (Glaser et al., 2009a; Harder et al., 2010; Schroder und Harder, 2006). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für die Augenoberfläche denkbar.

4.2 Expression und Regulation von Psoriasin im Tränenapparat

Wie zuvor bereits beschrieben und in der Literatur gut belegt, exprimieren die Epithelien der Augenoberfläche und des Tränenapparates eine Vielzahl unterschiedlicher antimikrobieller Peptide, die einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr darstellen (Kolar und McDermott, 2011). In der

vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Expression von Psoriasin (S100A7c), einem an der Haut beschriebenen, *Escherichia coli* abtötenden antimikrobiellen Peptid (Glaser et al., 2005), in den untersuchten Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates nachgewiesen und charakterisiert werden. Der Psoriasin-Nachweis erweitert somit das bekannte Repertoire antimikrobiell wirksamer Substanzen an der Augenoberfläche und in der Tränenflüssigkeit.

Psoriasin wird ubiquitär an der Augenoberfläche und im Tränenapparat exprimiert

Die vorliegenden Ergebnisse der Psoriasin Expression auf mRNA- und Proteinebene zeigen eine konstitutive Expression in den untersuchten Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates (Abb. 3-13 und 3-14). In anderen Arbeitsgruppen wurde die Psoriasin Expression in verschiedenen Mukosa-assoziierten Epithelien wie der Zungenschleimhaut oder im weiblichen Urogenitaltrakt lokalisiert (Meyer et al., 2008; Mildner et al., 2010). Immunhistochemisch ist Psoriasin unter anderem im mehrschichtig verhornten Plattenepithel des Augenlides und in den Haarfollikeln, nicht aber in den Moll Drüsen lokalisiert (Abb. 3-16). Dieses Bild stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster in der Epidermis und in den Haarfollikeln überein (Glaser et al., 2005; Reithmayer et al., 2009). Psoriasin konnte auch im Epithel der ableitenden Tränenwege (Tränensack und Tränennasengang) nachgewiesen werden und ist somit potentiell ein Bestandteil der mukosalen Immunabwehr. Paulsen et al. konnten zeigen, dass das Epithel der ableitenden Tränenwege eine Vielzahl verschiedener antimikrobiell wirksamer Substanzen bildet und in engem Kontakt mit dem Mukosa-assoziierten lymphatischen System steht (Paulsen, 2008; Paulsen et al., 2000; Paulsen et al., 2001). So konnte Psoriasin bereits im menschlichen Nasensekret nachgewiesen werden (Bryborn et al., 2005). Ferner konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die Expression von Psoriasin bei Patienten mit einer chronischen Entzündung der Nasenschleimhaut und der Nasennebenhöhlen (Rhinosinusitis) signifikant reduziert ist (Tieu et al., 2010). Über die funktionelle Bedeutung von Psoriasin in der Pathogenese der chronischen Rhinosinusitis oder anderen Entzündungsprozessen z.B. in den ableitenden Tränenwegen und in den oberen Atemwegen liegen noch keine weiteren Erkenntnisse vor. Der

immunhistochemische Nachweis von Psoriasin in der Tränendrüse, die den Großteil der wässrigen Komponente der Tränenflüssigkeit produziert, gelang nur in 11 von 18 Tränendrüsensproben, wobei es auch hier zu lokalen Unterschieden in der Immunreaktivität kam. Bei dem verwendeten Gewebe handelt es sich um postmortal gewonnenes Körperspendergewebe, so dass postmortale Veränderungen (Autolyse) für den fehlenden Nachweis verantwortlich sein könnten. Der ophthalmologische Status der untersuchten Gewebeproben der Körperspender war unbekannt, so dass eine Induktion der Psoriasin Expression in der Tränendrüse durch mögliche Erkrankungen und/oder medikamentöse Behandlung nicht ausgeschlossen werden kann. Der Befund deckt sich mit Untersuchungen von Gläser et al., die in der Epidermis verschiedener lebender Probanden eine breite Spendervariabilität in der Psoriasin Expression feststellen konnten (Glaser et al., 2005).

Anders als die hBD-2 und -3 Konzentration sowie die Konzentration anderer AMPs, die nur im Picogramm-Bereich im Tränenfilm nachweisbar sind (Garreis et al., 2010; Kolar und McDermott, 2011), wird Psoriasin unter physiologischen Bedingungen in wesentlich höheren Konzentrationen durch die Zellen der Augenoberfläche und des Tränenapparates gebildet und in den Tränenfilm abgegeben (Abb. 3-15). Die höchste Psoriasin Konzentration kommt in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden mit bis zu 169 ng/mg Gesamtprotein vor. Die untersuchten Gewebe von Körperspendern weisen eine deutlich geringere Psoriasin-Konzentration auf: Konjunktiva (11,9 ng/mg), ableitende Tränenwege (43,7 ng/mg) und Tränendrüse (5,7 ng/mg). Die in der Tränenflüssigkeit gemessene Psoriasin-Konzentration ist deutlich höher als in der Haut, wo die durchschnittliche Konzentration 5 - 20 ng/cm² beträgt. In Arealen, die stark mit Bakterien besiedelt sind und zusätzlich viele Talgdrüsen besitzen, werden maximale Werte von 100 ng Psoriasin pro Quadratzentimeter erreicht (Glaser et al., 2005). Auch in anderen Körpersekreten konnte Psoriasin nachgewiesen werden, so z.B. im Fruchtwasser von Schwangeren. Hier wird eine protektive immunologische Funktion während der Embryonalentwicklung diskutiert (Porre et al., 2005). Diese immunprotektive Funktion bestätigen Befunde aus Untersuchungen von Hauterkrankungen wie Psoriasis und Neurodermitis. In den betroffenen Hautarealen wird vermehrt Psoriasin gebildet und gleichzeitig weisen diese Hautareale eine höhere Resistenz gegen *Escherichia coli* Infektionen auf (Algermissen et al., 1996; de Jongh et al., 2005; Henseler und Christophers, 1995). An der Augenoberfläche

kommt es, genauso wie in der Haut, nur in sehr seltenen Fällen zu einer *E. coli* Infektion (Green et al., 2008). So dass auch für die Augenoberfläche ein Psoriasin-spezifischer Abwehrmechanismus insbesondere gegen dieses kommensale Darmbakterium angenommen werden kann.

Psoriasin hat (patho)physiologische Bedeutung im Rahmen der Meibom-Drüsen Dysfunktion (MGD)

Die vorliegenden immunhistochemischen Ergebnisse der Psoriasin Expression zeigen eine starke Immunreaktion in den Meibozyten und im Ausführungsgangepithel der Meibom-Drüsen (Abb. 3-16E). Lui et al. konnten mittels Expressionsanalyse (mRNA Gene-Arrays) zeigen, dass verschiedene S100 Proteine bei Patienten mit einer Meibom-Drüsen-Dysfunktion (*meibomian gland dysfunction* MGD), einer Hauptursache des Trockenen Auges, signifikant erhöht sind. Darunter auch Psoriasin (S100A7) das am drittstärksten hochregulierte Gen (um das 7,3-fache erhöht) in der Meibom-Drüse bei MGD-Patienten (Liu et al., 2011). Weitere Studien belegen, dass andere Calcium-bindende S100 Proteine im Rahmen bestimmter Augenoberflächenerkrankungen, wie z.B. Pterygium oder Sjögren-Syndrom heraufreguliert werden (Kawasaki et al., 2003; Zhou et al., 2009a). Experimentelle Studien haben gezeigt, dass S100 Proteine als Biomarker für das Trockene Auge verwendet werden können (Grus et al., 2005; Zhou et al., 2009b). Besonders S100A8 (Calgranulin A) und S100A9 (Calgranulin B), die als multifunktionelle Proteine der Entzündungsantwort (*inflammatory response proteins*) gelten, sind bei Patienten mit MGD, hochreguliert (Tong et al., 2011). Es kann diskutiert werden, ob die gesteigerte Psoriasin Expression in Verbindung mit der Heraufregulation verschiedener kleiner Prolin-reicher Proteine (SPRR), für die Hyperkeratinisierung des Gangepithels der Meibom-Drüsen als dem Initialprozess der MGD verantwortlich sein könnte. Oder aber ob die gesteigerte Expression von Psoriasin und anderer antibakteriell wirksamer S100 Proteine (Kap 4.3) durch die Manifestierung der MGD induziert wird. So findet man bei MGD-Patienten selten bakterielle Infektionen der betroffenen Augenlider, was möglicherweise auf die antimikrobiellen Eigenschaften der S100 Proteine schließen lässt (Knop et al., 2009a).

Induktion der Psoriasin Expression in Epithelzellen der Augenoberfläche

Außer in Gewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates ließ sich Psoriasin auch in den als Modell für die Epithelien der Augenoberfläche verwendeten Kornea- (HCE) und Konjunktivaepithelzellen (HCjE) nachweisen und so für weitergehende Regulationsstudien nutzen. Die eigenen Ergebnisse zur Regulation der hBDs (Kap. 4.1) und verschiedene andere Studien zeigen, dass Bakterien und deren Bestandteile die angeborene Immunabwehr aktivieren. Dabei kommt es auch zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokine. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Genexpression von Psoriasin in HCE Zellen durch IL-1 β und in geringerem Maße auch durch TNF α induziert werden kann (Abb. 3-19 und 3-20). Quantitative Realtime RT-PCR-Befunde zeigen eine Heraufregulierung der Psoriasin mRNA in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration der Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Stimulationsexperimenten mit primären Keratinozyten erhoben (Glaser et al., 2005; Niyonsaba et al., 2008).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen signifikanten Anstieg der Psoriasin mRNA um das bis zu 30-fache nach Stimulation mit dem Vascular Endothelial Growth Factor (Abb. 3-18). VEGF nimmt im Rahmen der Angiogenese eine Schlüsselrolle ein und wird auch bei entzündlichen Prozessen sowie bei der Tumorgenese induziert (Sung et al., 2010). Die Induktion der Psoriasin Expression auf mRNA-Ebene zeigt, dass VEGF einen Einfluss auf die Psoriasin Expression hat und stützt die Annahme das Psoriasin bei Entzündungsprozessen an der Augenoberfläche beteiligt ist. Ferner ist aber auch eine anti-angiogene oder additiv-angiogene Wirkung von Psoriasin bei der Angiogenese vorstellbar. So konnte gezeigt werden, dass das humane Cathelicidin LL-37 eine angiogene Wirkung im Tiermodell hat (Koczulla et al., 2003). In einer Mammakarzinom-Zelllinie (MDA-MB-468) wurde demonstriert, dass die Senkung der Psoriasin Expression zu einem deutlichen Anstieg der VEGF-Expression führt, dadurch wird die Angiogenese gesteigert, was letztendlich eine schlechtere klinische Prognose bei invasiven Brusttumoren mit sich bringt (Krop et al., 2005). Andererseits konnten Shubbar et al. (2011) zeigen, dass es bei einem Knockdown von Psoriasin mittels *short hairpin*-RNA (shRNA) zu einer verminderten VEGF-Expression und einer Wachstumsinhibierung von Tumorzellen kommt. So dass auch eine anti-

angiogene Funktion von Psoriasin denkbar wäre (Shubbar et al., 2011). Hierbei wirkt die Induktion von Psoriasin bei VEGF-Erhöpfung im Tränenfilm einer Vaskularisation der gefäßfreien Kornea entgegen, indem VEGF über einen bislang unbekanntem Mechanismus gehemmt wird. Für α -Defensine ist eine solche hemmende Wirkung in Endothelzellen und in der Retina nachgewiesen worden (Chavakis et al., 2004; Economopoulou et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist dieser Fragestellung nicht weiter nachgegangen worden, da eine ausreichende Menge an nativem Psoriasin nicht zur Verfügung stand und rekombinantes Psoriasin aus *E. coli* Überexpressionskulturen nicht über die funktionelle Potenz verfügte.

PAMPs induzieren die Psoriasin Expression im Zellkulturmodell

Die Ergebnisse der Realtime RT-PCR Experimente zeigen, dass es durch aufgereinigte PAMPs und auch inaktivierte Überstände verschiedener Bakterien zur Induktion der Psoriasin Genexpression in den untersuchten HCE und HCjE Zellen kommt (Abb. 3-17). LPS, eine Hauptkomponente der äußeren Bakterienzellwand Gram-negativer Bakterien, die durch Toll-like Rezeptor (TLR)-4 erkannt wird, induziert die Psoriasin Expression in HCE Zellen. Auch andere aufgereinigte Zellwandkomponenten wie Flagellin, Hauptbestandteil des Bewegungsapparates der Bakterien, induzieren die Psoriasin Expression (Abtin et al., 2008). Das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* und das Gram-negative Bakterium *Haemophilus influenzae* sind typische Augen-pathogene Erreger, die häufig eine bakterielle Keratitis und/oder Konjunktivitis verursachen (Epling, 2007; Leibovitch et al., 2005). In kultivierten HCE Zellen führt die Applikation inaktiverter, nicht-lebender Überstände von *St. aureus* und *H. influenzae* zu einer Induktion der Psoriasin Genexpression, wohingegen in kultivierten HCjE Zellen nur die Behandlung mit *H. influenzae* Überständen einen Anstieg der Psoriasin Genexpression hervorruft (Abb. 3-21). Ferner zeigen die Stimulationsversuche mit diesen Bakterienüberständen in HCE Zellen, dass die Induktion der Psoriasin Genexpression zeitlich versetzt stattfindet. So ist die Psoriasin Genexpression nach Applikation von *St. aureus* bereits nach 4h, bei Applikation von *H. influenzae* aber erst nach 16h heraufreguliert (Abb. 3-22). Die unterschiedlichen Induktionszeiten der Psoriasin Expression könnten möglicherweise auf unterschiedliche Regulationskaskaden zurückgeführt werden. So ist bekannt, dass die für die Erkennung der PAMPs notwendigen Toll-like Rezeptoren

unterschiedliche Affinitäten zu den bakteriellen Komponenten besitzen (Redfern und McDermott, 2010; Redfern et al., 2011).

In beiden für die vorliegende Studie verwendeten okulären Epithelzelllinien kommt es zu keiner Induktion der Psoriasin Genexpression nach Stimulation mit *E. coli*-Überständen (Abb. 3-17). Dies ist überraschend, da in primären kultivierten Keratinozyten eine starke Induktion der Psoriasin Expression nach Behandlung mit Überständen verschiedener *E. coli*-Stämme beschrieben wurde, die in der Epidermis einer Besiedlung und Infektion durch *E. coli* effektiv vorbeugen (Glaser et al., 2005; Li et al., 2005). Eine mögliche Erklärung ist die Verwendung eines nicht-pathogenen *E. coli* Stammes (ATCC 8739) im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen bzw. dass die bei der Aufreinigung des *E. coli* Überstandes isolierten bakteriellen Bestandteile nicht zur Aktivierung der Psoriasin-Kaskade an der Augenoberfläche in der Lage waren. Eine andere Erklärung wäre, dass die molekulare Abwehr von *E. coli* an der Augenoberfläche von anderen antimikrobiellen Substanzen in der Tränenflüssigkeit übernommen wird. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass einige humane β -Defensine und das humane Cathelicidin LL-37 gute antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* zeigen (McDermott, 2009). Darüber hinaus sind synergistische Interaktionen zwischen verschiedenen AMPs und anderen antimikrobiellen Molekülen wie Lysozym aus anderen Epithelien bereits bekannt und können auch an der Augenoberfläche eine Rolle spielen (Chen et al., 2005; Nagaoka et al., 2000; Singh et al., 2000).

4.3 Expression der S100 fused-type Proteine Hornerin und Filaggrin-2

Um den Kenntnisstand über die Zusammensetzung der chemischen Barriere an der Augenoberfläche zu erweitern, wurden in der vorliegenden Arbeit erste Lokalisationsstudien zu den bis dahin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat unbekanntem S100 fused-type Proteinen Hornerin (HRNR) und Filaggrin-2 (FLG2) durchgeführt. Ferner wurde die Regulation der HRNR und FLG2 Expression in kultivierten Epithelzellen der Augenoberfläche unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht. Epidermis und Augenoberflächenepithelien gehen aus dem ektodermalen Keimblatt hervor und stellen eine wichtige physikalische Barriere zur

Umwelt dar. Darüber hinaus erfüllen sie wichtige physiologische Funktionen im Rahmen der Sinneswahrnehmung und des Stoffaustausches. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von primär in der Epidermis beschriebenen antimikrobiell wirksamen Peptiden, wie die humanen β -Defensine und Psoriasin, gleichermaßen auch an der Augenoberfläche und im Tränenapparat funktionell exprimiert werden und hier wesentlicher Bestandteil der angeborenen, epithelialen Immunabwehr sind (Garreis et al., 2011; Garreis et al., 2010). Die S100 fused-type Proteine HRNR und FLG2 die, wie Psoriasin, zur Familie der Calcium-bindenden EF-Hand Proteine zählen und im epidermalen Differenzierungskomplex (epidermal differentiation complex EDC) codiert werden (Marenholz et al., 2001), wurden von Wu et al. in der Epidermis beschrieben (Wu et al., 2009c; Wu et al., 2009d). Bei beiden Proteinen wird eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der normalen Hautflora und damit verbunden auch eine antimikrobielle Aktivität angenommen, deren Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist (Dissertation Zhihong Wu Kiel 2005; Vortrag „Molecular Mechanisms of Epithelial Defense“ Jens-M. Schröder Collaborative Research Center (SFB) 617, Ettal 2010).

Hornerin wird an der Augenoberfläche exprimiert, Filaggrin-2 hingegen nicht.

Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden kann die Expression von Filaggrin-2 weder an der Augenoberfläche noch im Tränenapparat nachgewiesen werden. Auf mRNA-Ebene ist der Nachweis von FLG2 nur in zwei von 9 Gewebeproben der ableitenden Tränenwege möglich. Möglicherweise kommt es in diesen Proben zur Induktion der FLG2 Expression durch eine unentdeckte Infektion oder andere Erkrankung der ableitenden Tränenwege. Ferner ist FLG2 weder in nicht-stimulierten noch in stress-induzierten kultivierten HCE und HCjE Zellen detektierbar (Abb. 3-28). Immunhistochemisch konnte FLG2 nur in der Epidermis der Augenlider nachgewiesen werden (Abb. 3-27). Diese Befunde bestätigen die Arbeiten von Wu et al. (2009). Ferner wurde FLG2 in einer anderen Studie auch in der Reinigungslösung von getragenen Kontaktlinsen mittels hochauflösender Massenspektrometrie gekoppelt mit chromatischer Auftrennung identifiziert (Emch und Nichols, 2009). Eine Verunreinigung der Proben mit Korneozyten der Epidermis kann hierbei nicht ausgeschlossen werden. Die funktionelle Bedeutung von FLG2 an der Augenoberfläche wurde nicht weiter untersucht. In der Haut wird FLG2, aufgrund

des hohen Anteiles an Histidin- und Glutaminresten, eine Bedeutung als natürlicher Feuchthaltefaktor (*Natural moisturizing factor*) der Hornschicht postuliert (Wu et al., 2009c).

Anders als FLG2 ist HRNR ubiquitär in der Kornea, Konjunktiva, Tränendrüse und in den ableitenden Tränenwegen von Körperspendern auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar (Abb. 3-23 und 3-25). Das Expressionsmuster in der Epidermis des Augenlides und in den Haarfollikeln stimmt mit der von Wu et al. beschriebenen HRNR Lokalisation in der Haut überein (Wu et al., 2009d). HRNR wurde zunächst in Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis lokalisiert und beschrieben. Die Psoriasis ist eine chronische Erkrankung der Haut, die durch immunologisch entzündliche Prozesse hervorgerufen wird und sich durch eine Hyperproliferation der Keratinozyten äußert (Anderson 2009). Sie ist mit Erkrankungen des Auges wie der psoriatischen Uveitis (Entzündung der mittleren Augenhaut) (Rehal et al., 2011) sowie einem erhöhten Risiko der Manifestierung eines Trockenen Auges assoziiert (Dissertation Andreas Posa MLU Halle-Wittenberg; unveröffentlichte Daten). Harder et al. zeigten, dass eine gesteigerte Expression diverser antimikrobieller Peptide, darunter das in der vorliegenden Arbeit untersuchte hBD-2 und Psoriasin, bei verschiedenen Erkrankungen und bei Verletzung der Epidermis einer Infektion der Haut vorbeugen (Harder et al., 2010). Die vorliegenden Ergebnisse zur HRNR Expression zeigen ein ähnliches Expressionsmuster wie das von Psoriasin (s.o.). So konnte HRNR auch in den Meibozysten sowie dem Epithel der Ausführungsgänge der Meibom-Drüsen (Abb. 3-26) nachgewiesen werden. Neben den strukturellen Gemeinsamkeiten wie der S100 Domäne, scheint es auch funktionelle Übereinstimmungen zu geben. Vergleichbar der immunhistochemischen Untersuchung der Psoriasin Expression gibt es auch bei der HRNR Immunreaktion lokale und Körperspender-abhängige Unterschiede im Expressionsmuster. Auch hier sind kausale Zusammenhänge zu Alter, Geschlecht und/oder Vorerkrankungen der Körperspender nicht feststellbar.

Um die Regulation der HRNR Expression eingehender zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Epithelzellen der Augenoberfläche in einem *in vitro* Stimulationsmodell auf die Regulation der HRNR Expression hin untersucht. Eigene

und in der Literatur beschriebene Ergebnisse zeigen, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α potente Entzündungsmediatoren sind und die Expression von antimikrobiellen Peptiden induzieren können (Garreis et al., 2011; Garreis et al., 2010; Kolar und McDermott, 2011). Auf mRNA-Ebene ist eine Induktion der HRNR Genexpression in HCE und HCjE Zellen nach Stimulation mit TNF α detektierbar, nicht aber nach Stimulation mit IL-1 β (Abb. 3-28). Auf Proteinebene ließ sich dieser Befund nur in der HCjE Zelllinie bestätigen (Abb.3-29). Differenzierungsversuche in kultivierten Keratinozyten mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen zeigen, dass die S100 fused-type Proteine Filaggrin und Repetin sehr wahrscheinlich durch unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden (Huber et al., 2005). Unterschiedliche Signaltransduktionswege könnten auch bei der Induktion von HRNR durch verschiedene proinflammatorische Zytokine eine Rolle spielen. Die endogenen Faktoren die zur Induktion der HRNR Expression sowie die dafür verantwortliche Signalkaskade sind unbekannt. Weitere Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die HRNR Expression nach UV-B Bestrahlung in kultivierten HCE und HCjE Zellen induziert wird (Abb. 3-28, 3-29 und 3.30). Hong et al. zeigten, dass niedrige Dosen UV-B Bestrahlung einen Einfluss auf die epidermale Differenzierung haben und dass die S100 fused-type Proteine Filaggrin und Involucrin mit steigender UV-B-Bestrahlung induziert werden (Hong et al., 2008). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von AMPs wie Psoriasin, hBD-2 und -3 in Keratinozyten durch die UV-B Bestrahlung *in vitro* und *in vivo* induziert werden kann (Glaser et al., 2009b). Die Kultivierung der HCE und HCjE Zellen unter hypoxischen Bedingungen (5% Sauerstoffpartialdruck) zeigen eine Induktion der HRNR Expression auf mRNA- und Proteinebene (Abb. 3-28, 3-29 und 3-30). Das Tragen von Kontaktlinsen bzw. die damit bedingte Verminderung der Sauerstoffversorgung der Kornea kann eine Ursache für die Ausbildung eines Trockenen Auges sein (Lemp, 2008). Allein in Deutschland gibt es rund 40 Millionen Menschen die eine Brille oder Kontaktlinsen tragen; in den USA sind es ungefähr 160 Millionen (Walker und Miller, 2001; Brillenstudie 2005 des Instituts für Demoskopie Allensbach).

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass Psoriasin und Hornerin außer den bekannten strukturellen Gemeinsamkeiten auch an der Augenoberfläche und im Tränenapparat unter physiologischen Bedingungen funktionell exprimiert werden. Wie bereits für Psoriasin beschrieben, so ist auch für

Hornerin eine deutliche Immunreaktion in der Meibom-Drüse nachweisbar. Die genaue Zusammensetzung und Funktion der Nicht-Lipid-Komponenten des Meibom-Sekrets ist noch nicht genau bekannt und Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (Knop et al., 2009b). Weiterhin kann diskutiert werden, ob Psoriasin und HRNR (gegebenenfalls weitere Proteine aus der S100-Familie) ein zusätzliches Reservoir an AMPs in der Lipidkomponente des Tränenfilms darstellen. So konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass Psoriasin mit E/FABP (*epidermal fatty acid-binding protein*), einem Fettsäure-bindenden Protein der Epidermis das bei Transport, Speicherung und Metabolismus von Fettsäuren beteiligt ist, interagiert (Hagens et al., 1999a; Hagens et al., 1999b; Ruse et al., 2003). Ferner wurde gezeigt, dass E/FABP und Psoriasin im Wundschorf und in den Wundrändern hochreguliert werden und ko-lokalisiert sind (Lee und Eckert, 2007). Für HRNR und andere S100 fused-type Proteine gibt es noch keine Befunde zu einer funktionellen Rolle bei der Wundheilung oder inflammatorischen Prozessen. Wie bereits für Psoriasin aufgeführt, kann auch für HRNR eine (patho)physiologische Beteiligung im Rahmen der Meibom-Drüsen-Dysfunktion (MGD) diskutiert werden. Es ist bekannt, dass Hauterkrankungen mit einem erhöhten epithelialen Zellumsatz und einer verstärkten Verhornung oft mit einer MGD assoziiert sind (McCulley und Sciallis, 1977).

4.4 Therapeutische Nutzung der multifunktionellen antimikrobiellen Peptide

Die zunehmende Entwicklung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen pathogener Mikroorganismen stellen in der Medizin ein immer größer werdendes Problem dar. Ein weiteres Problem der letzten Jahre ist die fehlende Weiterentwicklung der klassischen Antibiotika-Klassen in der dritten bzw. vierten Generation. Das breite Wirkspektrum, der schnelle Wirkmechanismus, die geringe Tendenz zur Ausbildung von Resistenzen sowie die große Vielfalt an natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden ist für einen therapeutischen Einsatz von großem Interesse und Ansatzpunkt für die Entwicklung einer neuen Klasse von Antibiotika. Ausgehend von den natürlich vorkommenden AMPs wurden synthetische Abkömmlinge weiterentwickelt und befinden sich teilweise in verschiedenen Phasen der klinischen Testung bzw. werden als Medikamente bereits eingesetzt (Guani-

Guerra et al., 2010; Yeung et al., 2011). Zurzeit werden zwei Gruppen von Peptidantibiotika zur topischen Anwendung eingesetzt, es handelt sich dabei um ursprünglich aus *Bacillus*-Stämmen isolierte, nicht Gen-kodierte Metaboliten. So werden die kationischen, zyklischen Dekapeptide der Polymyxine (*Polymyxin-B*) in Form von Augentropfen und Ohrentropfen zur Behandlung von Infektionskrankheiten verwendet. Auch im therapeutischen Einsatz im Bereich der Augen, Ohren, Nase und der Haut kommen Gramizidine (*Gramicidin D* und *-S*), deren bakterizide Wirkung durch die Einlagerung des lipophilen Moleküls in die Zellmembran der Bakterien zustande kommt. Für die definitionsgemäßen, Gen-kodierten antimikrobiellen Peptide dienen eukaryotische Organismen wie Pflanzen, Pilze, Insekten sowie Vertebraten als Primärquelle. Dabei handelt es sich in der Regel um AMPs aus der Gruppe der Defensine oder Cathelicidine. Ausgehend von ihrer Struktur wurden synthetische Derivate hergestellt und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Nebenwirkungen optimiert. Plectasin ein zu der Gruppe der Defensine gehörendes AMP aus dem Pilz *Pseudoplectania nigrella* zeigt eine hohe Wirksamkeit gegenüber Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämmen. Dabei bindet Plectasin NZ2114 (Plectasinvariante der Firma Novozymes) den Zellwand-Bestandteil Lipid II und verhindert somit die Neusynthese der Bakterienzellwand (Schneider et al., 2010). Mitglieder der Cathelicidin-Familie wie die Indolicidin-Analoga der Firma Migenix befinden sich in der Klinischen Phase II/III, sie sollen bei der Behandlung Katheter-verursachter Blutvergiftungen (*MBI-226*) sowie bei der topischen Behandlung der Akne (*MX-594AN*) eingesetzt werden (Zaiou, 2007). Ein weiteres Cathelicidin-Derivat ist das Protegrin-1 (*PG-1*), das in Schweine-Leukozyten entdeckt wurde und effektiv gegenüber *P. aeruginosa* und *St. aureus* Infektionen wirkt. Eine abschließende Klärung der Eignung der beschriebenen AMP-Therapeutika und deren Zulassung durch die Behörden stehen noch aus (Yeung et al., 2011). In vorklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der Defensine und Cathelicidine effektiv auch gegen Viren, Pilze und Protozoen eingesetzt werden können sowie die Eigenschaft besitzen bakterielle Endotoxine (LPS) zu neutralisieren (Kolar und McDermott, 2011). Abseits ihrer antimikrobiellen Aktivität, scheint auch ein therapeutischer Einsatz der AMPs als Immunmodulatoren denkbar. Eine Vielzahl von Studien, darunter auch Klinische Phase I- und II-Studien, zeigen positive Ergebnisse bei der Wundheilung, Angiogenese sowie bei der Aktivierung der adaptiven Immunabwehr (Yeung et al., 2011).

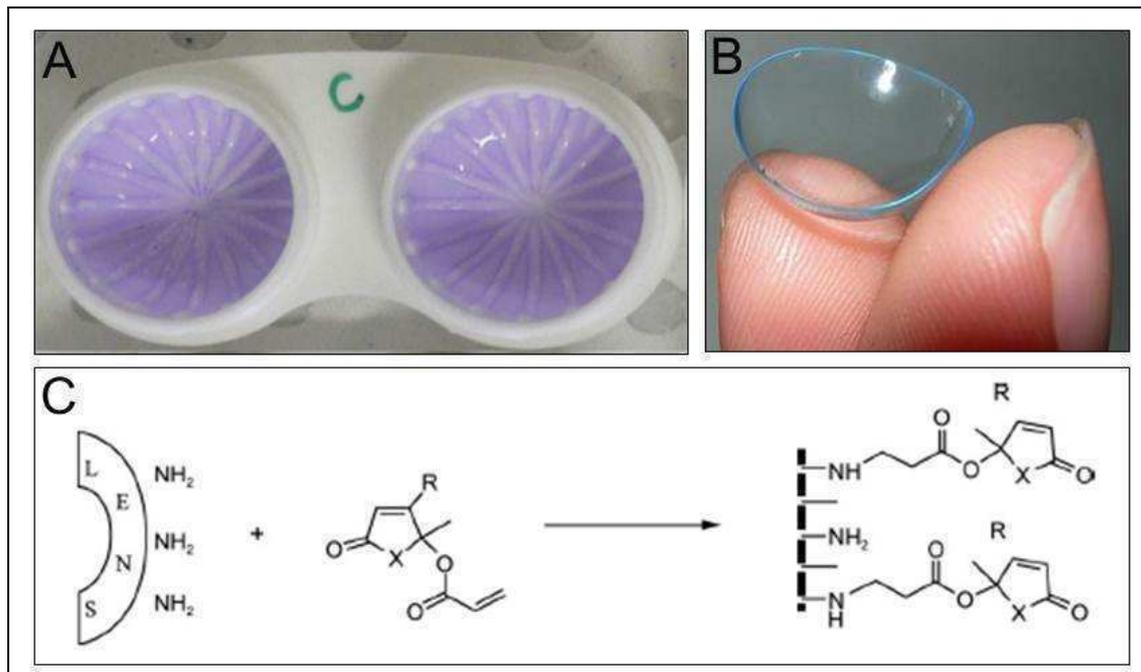


Abbildung 4-1: Beschichtung von Kontaktlinsenbehälter und Kontaktlinsen mit rekombinant hergestellten und modifizierten antimikrobiell wirksamen Peptiden. (A) Kristallviolett angefärbter bakterieller Biofilm in einem Kontaktlinsenbehälter (OPTI-FREE, Alcon; aus Wu et al., 2010). **(B)** Kontaktlinse und **(C)** schematische Darstellung der chemischen Kopplung von *Fimbroliid*, einem modifizierten Furanon, an der Oberfläche von Kontaktlinsen. *Fimbroliid* hemmt die Kommunikation (Quorum sensing) zwischen Bakterien und verhindert somit eine Besiedlung der Kontaktlinsen (aus Zhu et al., 2008).

Eine andere Anwendungsmöglichkeit der AMPs ist der Einsatz als „Nano“partikel zur Beschichtung von antimikrobiellen Oberflächen (Abb. 4-1). In einigen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung von Kontaktlinsen mit rekombinant hergestellten AMPs (Cole et al., 2010; Willcox et al., 2008; Zhu et al., 2008) sowie die Zugabe von AMPs in die Desinfektionslösung für Kontaktlinsen die Besiedlung der Augenoberfläche mit Mikroorganismen stark reduziert und die Entstehung von Entzündungsreaktionen sowie Epitheldefekten signifikant reduziert wird (Schwab et al., 1992; Sousa et al., 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen β -Defensine zeigen, ab einer Konzentration von mehreren Mikrogramm pro Milliliter, eine effektive antimikrobielle Aktivität *in vitro*. HBD-1 wirkt schwach gegen Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* (EC_{50} -Wert 21 $\mu\text{g/ml}$), zeigt aber keine Aktivität gegen

Gram-positive *Staphylococcus aureus* Stämme an der Augenoberfläche. HBD-2 wirkt hauptsächlich gegen *Pseudomonas aeruginosa* (EC_{50} -Werte 1,2 $\mu\text{g/ml}$) aber nur schwach gegen *Staphylococcus aureus*. HBD-3 weist hingegen gute antimikrobielle Wirksamkeit sowohl gegen Gram-positive als auch gegen Gram-negative Bakterien (EC_{50} -Werte 0,9 – 5,3 $\mu\text{g/ml}$) auf (Huang et al., 2007a). Psoriasin zeigt eine hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber *E. coli* (letale Dosis LD_{90} 0,5 μM), bei höheren Konzentrationen ($LD_{90} > 30 \mu\text{M}$) auch gegen *Pseudomonas*- und *Staphylokokkus*-Stämme (Glaser et al., 2005). Dabei scheint der antimikrobielle Wirkmechanismus pH- und Erreger-abhängig zu sein. Beim Gram-positiven Bakterium *Bacillus megaterium* kommt es bei niedrigen pH-Werten ($< \text{pH } 6$) zur Ausbildung von klassischen Poren in der äußeren Bakterienzellwand (Michalek et al., 2009), wohingegen die antimikrobielle Aktivität bei *E. coli* und neutralen pH-Wert über Zink-Entzug funktioniert (Glaser et al., 2005). Über die physiologische Aktivität von Psoriasin und der in der vorliegenden Arbeit untersuchten S-100 fused type-Proteine (HRNR und FLG2) an der Augenoberfläche liegen noch keine Befunde vor. Die *in vivo* Aktivität der humanen β -Defensine unter physiologischen Bedingungen an der Augenoberfläche und im Tränenfilm ist noch nicht abschließend geklärt (McDermott, 2009). So konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität der hBDs bei physiologischer Salzkonzentration oder bei Einsatz von menschlichen Tränen stark eingeschränkt ist. So ist die *in vitro* Aktivität von hBD1 und -2 auch bei hohen Peptidkonzentrationen nahezu aufgehoben. Dies trifft allerdings nicht auf hBD-3 zu, das weiterhin eine hohe Aktivität zeigt (Huang et al., 2005; Huang et al., 2007a; Huang et al., 2007b). Die eigenen Ergebnisse zeigen aber auch, dass es nach Verletzung, bei entzündlichen Prozessen und mikrobieller Infektion der Augenoberfläche zu einer gesteigerten Expression der untersuchten AMPs in den (Epithel)Zellen der Augenoberfläche und des Tränenapparates kommt (Garreis et al., 2011; Garreis et al., 2010). In weiteren Experimenten müsste die AMP-Konzentration in der Tränenflüssigkeit unter pathologischen Bedingungen und deren antimikrobielle Aktivität unter physiologischen Bedingungen untersucht werden. In naher Zukunft ist mit einem therapeutischen Einsatz der hier untersuchten AMPs als Peptidantibiotika an der Augenoberfläche nicht zu rechnen. Dafür müssten im Vorfeld noch weitere Fragen zu den molekularen Regulationsmechanismen, der Aktivität unter physiologischen Bedingungen, der Halbwertszeit der Peptide, der Zelltoxizität sowie der Interaktion mit anderen Tränenfilmbestandteilen geklärt werden.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern das Wissen über die angeborene Immunabwehr an der Augenoberfläche und im Tränenapparat, einschließlich des Tränenfilms. Die humanen β -Defensine (hBD-1 bis -3) werden auf niedrigem Niveau konstitutiv im Epithel der Augenoberfläche exprimiert und durch verschiedene endogene und exogene Faktoren sowie im Rahmen verschiedener pathophysiologischer Veränderungen induziert. In weiterführenden Untersuchungen wäre es von Interesse, die Regulation der hBDs untereinander sowie ihren Einfluss auf andere Tränenfilmbestandteile zu untersuchen. Es ist bekannt, dass die hBD-Gene Bindungsstellen für NF- κ B und andere Transkriptionsfaktoren wie Activator Protein-1 (AP-1) sowie NF-IL-6 enthalten (Diamond et al., 2000; Harder et al., 2000; Liu et al., 1998). Diese Transkriptionsfaktoren sind zentrale Bestandteile in der Entstehung von Entzündungen und bei der Regulation der Immunantwort. Die Regulationsmechanismen der hBDs sowie anderer antimikrobieller Moleküle an der Augenoberfläche sind im Detail noch unbekannt und müssen in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Der zelluläre Transport der für die Biosynthese der hBDs benötigten kationischen Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin wird beim Menschen hauptsächlich durch den γ^+ -Transporter gewährleistet. Deren Bestandteile, die hCAT-Proteine (*cationic amino acid transporter proteins*), werden an der Augenoberfläche exprimiert (Jager et al., 2009). In zukünftigen Untersuchungen wäre es von Interesse, die Regulation der hCAT Proteine im Zusammenhang mit der hBD-Produktion zu analysieren.

Die hohe Konzentration von Psoriasin in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden und die Induzierbarkeit durch verschiedene proinflammatorische Zytokine sowie bakterielle Bestandteile sollten Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen der Psoriasin Regulation bei entzündlichen Prozessen wie bakterieller Keratitis oder Konjunktivitis sein. Zellkulturexperimente zeigen das VEGF die Expression von Psoriasin induziert. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit der Frage, ob Psoriasin eine regulierende Funktion bei der (Anti-) Angiogenese an der Augenoberfläche haben könnte. Dazu wird der Einfluss von rekombinantem und aus psoriatischer Haut isoliertem Psoriasin auf eine potentiell angiogene oder anti-angiogene Wirkung hin untersucht. Auch der Einfluss von Psoriasin und Hornerin auf strukturelle

Bestandteile des Tränenfilms wie den Muzinen, TFF-Peptiden (Paulsen und Berry, 2006; Paulsen et al., 2008; Tiffany, 2008) oder Surfactant-Proteinen (Brauer et al., 2007a; Brauer et al., 2007b) wäre von Interesse. Immunhistochemische Lokalisationsstudien zeigen eine regional unterschiedliche und Körperspender-abhängige Expression von Psoriasin und Hornerin in der Tränendrüse. Es wäre interessant zu klären, ob die Tränendrüse wirklich induzierbare antimikrobiell wirksame Proteine bildet und in signifikanten Konzentrationen in die wässrige Komponente des Tränenfilms abgibt und somit zur chemischen Barriere an der Augenoberfläche beitragen kann. Ferner sind die Regulationsmechanismen zwischen den Epithelien der Augenoberfläche und den dazugehörigen Strukturen des Tränenapparates (Tränendrüse, ableitende Tränenwege, Meibom-Drüsen) bei mikrobieller Invasion oder Verletzung von Interesse. Die Mehrzahl der Patienten mit einem hyperevaporativem Trockenem Auge (75% aller Sicca-Patienten) leiden unter einer Meibom-Drüsen-Dysfunktion (MGD) (Knop et al., 2011). Im Hinblick auf die bei der MGD auftretende und fortschreitende Verhornung der Ausführungsgänge der Meibom-Drüsen könnten Psoriasin und Hornerin, die hier exprimiert werden, am Pathomechanismus beteiligt sein. Aus diesem Grund wären weitere Untersuchungen von großem Interesse. In weiterführenden Untersuchungen sollen die Perspektiven für einen möglichen therapeutischen Einsatz der in dieser Arbeit beschriebenen antimikrobiellen Peptide und Proteine für die Prävention und Behandlung bestimmter Augenoberflächenerkrankungen wie z.B. des Trockenen Auges im Fokus stehen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Augenoberfläche und der Tränenapparat eine Vielzahl verschiedener antimikrobiell wirksamer Substanzen bildet, die einen effektiven Schutz vor Infektionen bieten und komplexe Prozesse wie Wundheilung oder Aktivierung der adaptiven Immunabwehr positiv beeinflussen können. Ferner zeigen die erzielten Ergebnisse, dass die beschriebenen Peptide/Proteine bei verschiedenen entzündlichen Prozessen sowie im Rahmen pathophysiologischer Veränderungen an der Augenoberfläche und im Tränenapparat eine Rolle spielen. Außer die anatomische Barriere bilden die Epithelzellen der Augenoberfläche, unterstützt durch sekretorische Zellen des Tränenapparates (Acinzellen der Tränendrüse und der Meibomdrüsen), auch eine effektive chemische Barriere. Dabei werden verschiedene antimikrobiell wirksame Substanzen in die

Tränenflüssigkeit sezerniert, die sich in ihrer Wirkungsweise überlappen, ergänzen und offenbar auch modulieren. Die Bedeutung dieser antimikrobiell wirksamen Peptide/Proteine insbesondere bei verschiedenen Erkrankungen der Augenoberfläche muss allerdings in weiterführenden Untersuchungen noch detaillierter charakterisiert werden.

5 Zusammenfassung

Kornea und Konjunktiva sind charakteristische Epitheloberflächen die ständig mit Bakterien sowie deren Bestandteilen (PAMPs) in Kontakt kommen. Die Epithelien schützen sich vor einer mikrobiellen Invasion durch die Produktion eines ganzen Arsenalts konstitutiv gebildeter und induzierbarer antimikrobieller Peptide (AMPs). Die stark kationischen humanen β -Defensine (hBDs) sind eine Gruppe von antimikrobiellen Peptiden, die insbesondere an epithelialen Oberflächen exprimiert werden und dort einen wesentlichen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression und Regulation der hBDs an der Augenoberfläche und im Tränenapparat *in vitro* und *in vivo* untersucht. Ferner wurden die Lokalisation und funktionelle Expression der an der Augenoberfläche und im Tränenapparat bislang unbekanntem antimikrobiell wirksamen Proteine Psoriasin (S100A7c), Filaggrin-2 (FLG2) und Hornerin (HRNR) analysiert.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass hBD-1, -2, -3 und -4 konstitutiv in der Konjunktiva, aber nur teilweise in der Kornea exprimiert werden. Erstmals konnte mit den in dieser Arbeit entwickelten ELISAs die Produktion von hBD-2 und -3 in der Tränenflüssigkeit und in Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates quantifiziert werden. Die Konzentrationen der hBD-Peptide liegen im Picogramm bis Nanogramm Bereich, mit höchster Konzentration in den analysierten Korneaprobe (hBD-2 1595 pg/mg, hBD-3 1793 pg/mg) und geringeren Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit (hBD-2 367 pg/mg, hBD-3 142 pg/mg) gesunder Probanden. Stimulationsversuche mit proinflammatorischen Zytokinen und verschiedenen Bakterienüberständen haben ergeben, dass IL-1 β eine starke Induktion der hBD-2 Expression induziert und *Staphylococcus aureus* die Sekretion von hBD-2 und -3 in humanen Kornea- und Konjunktivaepithelzellen signifikant steigert. In einem *in vivo* Korneadefekt-Modell in der Maus konnte gezeigt werden, dass die Maus β -Defensine-3 und -4 (mBD3 und mBD4) nur nach oberflächiger Schädigung des Korneaepithels bei gleichzeitiger Applikation von bakteriellen Bestandteilen induziert werden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass die hBD-2 und -3

Expression im gesamten Korneaepithel im Rahmen verschiedener entzündlicher und nicht-entzündlicher Kornea-Pathologien induziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression von Psoriasin und Hornerin, zwei bereits auf der Haut identifizierten antimikrobiell wirksamen Proteinen, an der Augenoberfläche und im Tränenapparat beschrieben. Psoriasin und Hornerin werden konstitutiv im Körperspendergewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates exprimiert. Die höchste Psoriasin-Konzentration (169 ng/mg) konnte in der Tränenflüssigkeit von gesunden Probanden nachgewiesen werden. In kultivierten HCE und HCjE Zellen wird die Psoriasin Genexpression durch proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und Überstände von *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* induziert. Ferner scheint Psoriasin eine regulierende Funktion, die noch nicht abschließend geklärt ist, hinsichtlich der (Anti-) Angiogenese an der Augenoberfläche zu haben. Eine Induktion der HRNR Expression in den untersuchten Epithelzellen konnte nach Stimulation mit UV-B-Strahlung und unter hypoxischen Bedingungen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Expression von FLG2 war an der Augenoberfläche und im Tränenapparat von Körperspendern nicht nachweisbar.

Ein wichtiger Aspekt für die weitere Erforschung der funktionellen Aktivität von Psoriasin und HRNR an der Augenoberfläche und im Tränenapparat ist die Lokalisation von Psoriasin und HRNR in den Meibozyten und den Epithelzellen der Ausführungsgänge der Meibom-Drüsen. Die (patho-)physiologische Bedeutung der Proteine im Rahmen der Meibom-Drüsen-Dysfunktion (MGD) sowie der angeborenen epithelialen Immunabwehr muss in weiterführenden Untersuchungen noch charakterisiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse erweitern das bekannte Repertoire antimikrobieller Substanzen sowie das Verständnis über die Expression und die Regulation der untersuchten Proteine an der Augenoberfläche und im Tränenapparat.

6 Literaturverzeichnis

Aarbiou J, Ertmann M, van Wetering S, van Noort P, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JH, de Boer WI, Hiemstra PS (2002) Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *Journal of leukocyte biology* 72:167-174

Aarbiou J, Verhoosel RM, Van Wetering S, De Boer WI, Van Krieken JH, Litvinov SV, Rabe KF, Hiemstra PS (2004) Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30:193-201

Abedin A, Mohammed I, Hopkinson A, Dua HS (2008) A novel antimicrobial peptide on the ocular surface shows decreased expression in inflammation and infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:28-33

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

Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jornvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96:3086-3093

Algermissen B, Sitzmann J, LeMotte P, Czarnetzki B (1996) Differential expression of CRABP II, psoriasin and cytokeratin 1 mRNA in human skin diseases. *Arch Dermatol Res* 288:426-430

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H (1995) An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:614-621

Bals R (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 1:141-150

Bals R, Wilson JM (2003) Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 60:711-720

Beisswenger C, Bals R (2005) Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr Protein Pept Sci* 6:255-264

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS letters* 368:331-335

Blais DR, Vascotto SG, Griffith M, Altosaar I (2005) LBP and CD14 secreted in tears by the lacrimal glands modulate the LPS response of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:4235-4244

Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL (2005) Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125:9-13

Brauer L, Johl M, Borgermann J, Pleyer U, Tsokos M, Paulsen FP (2007a) Detection and localization of the hydrophobic surfactant proteins B and C in human tear fluid and the human lacrimal system. *Curr Eye Res* 32:931-938

Brauer L, Kindler C, Jager K, Sel S, Nolle B, Pleyer U, Ochs M, Paulsen FP (2007b) Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human lacrimal system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3945-3953

Broome AM, Ryan D, Eckert RL (2003) S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem* 51:675-685

- Bryborn M, Adner M, Cardell LO (2005) Psoriasin, one of several new proteins identified in nasal lavage fluid from allergic and non-allergic individuals using 2-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Respiratory research* 6:118
- Bulet P, Stocklin R, Menin L (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198:169-184
- Burd RS, Furrer JL, Sullivan J, Smith AL (2002) Murine beta-defensin-3 is an inducible peptide with limited tissue expression and broad-spectrum antimicrobial activity. *Shock* 18:461-464
- Candille SI, Kaelin CB, Cattanach BM, Yu B, Thompson DA, Nix MA, Kerns JA, Schmutz SM, Millhauser GL, Barsh GS (2007) A β -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science* 318:1418-1423
- Chang TL, Klotman ME (2004) Defensins: natural anti-HIV peptides. *AIDS Rev* 6:161-168
- Chauhan SK, Dana R (2009) Role of Th17 cells in the immunopathogenesis of dry eye disease. *Mucosal Immunol* 2:375-376
- Chavakis T, Cines DB, Rhee JS, Liang OD, Schubert U, Hammes HP, Higazi AA, Nawroth PP, Preissner KT, Bdeir K (2004) Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB J* 18:1306-1308
- Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Okuda D, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H (2005) Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci* 40:123-132
- Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, Strieter RM (2001) Cutting edge: IFN-inducible ELR-CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 167:623-627
- Cole N, Hume EB, Vijay AK, Sankaridurg P, Kumar N, Willcox MD (2010) In vivo performance of melimine as an antimicrobial coating for contact lenses in models of CLARE and CLPU. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:390-395
- de Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk PG, Blokx W, Dogan A, Hiemstra PS, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J (2005) High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* 125:1163-1173
- Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russell JP, Bevins CL (2000) Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 68:113-119
- Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Saez V, Siemasko KF, Stern ME (2003) Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4263-4274
- Donato R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60:540-551
- Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K (2004) S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* 123:23-33
- Eckmann L (2005) Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 21:147-151
- Economopoulou M, Bdeir K, Cines DB, Fogt F, Bdeir Y, Lubkowski J, Lu W, Preissner KT, Hammes HP, Chavakis T (2005) Inhibition of pathologic retinal neovascularization by alpha-defensins. *Blood* 106:3831-3838
- Emch AJ, Nichols JJ (2009) Proteins identified from care solution extractions of silicone hydrogels. *Optom Vis Sci* 86:E123-131
- Epling J (2007) Bacterial conjunctivitis. *Clin Evid (Online)* 2007

- Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N (2002) Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta* 1591:29-35
- Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M (2002) Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 110:823-831
- Ganz T (1987) Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 55:568-571
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720
- Ganz T, Lehrer RI (1999) Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* 5:292-297
- Ganz T, Liu L, Valore EV, Oren A (1993) Posttranslational processing and targeting of transgenic human defensin in murine granulocyte, macrophage, fibroblast, and pituitary adenoma cell lines. *Blood* 82:641-650
- Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG (2001) Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:1819-1821
- Garreis F, Gottschalt M, Schlorf T, Glaser R, Harder J, Worlitzsch D, Paulsen FP (2011) Expression and regulation of antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) at the ocular surface and in the lacrimal apparatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*
- Garreis F, Schlorf T, Worlitzsch D, Steven P, Brauer L, Jager K, Paulsen FP (2010) Roles of human beta-defensins in innate immune defense at the ocular surface: arming and alarming corneal and conjunctival epithelial cells. *Histochemistry and cell biology* 134:59-73
- Glaser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2005) Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 6:57-64
- Glaser R, Meyer-Hoffert U, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Kobliakova J, Folster-Holst R, Proksch E, Schroder JM, Schwarz T (2009a) The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J Invest Dermatol* 129:641-649
- Glaser R, Navid F, Schuller W, Jantschitsch C, Harder J, Schroder JM, Schwarz A, Schwarz T (2009b) UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 123:1117-1123
- Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM (2005) Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res* 30:385-394
- Green M, Apel A, Stapleton F (2008) Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea* 27:22-27
- Grus FH, Podust VN, Bruns K, Lackner K, Fu S, Dalmaso EA, Wirthlin A, Pfeiffer N (2005) SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:863-876
- Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Teran LM (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135:1-11
- Hagens G, Masouye I, Augsburg E, Hotz R, Saurat JH, Siegenthaler G (1999a) Calcium-binding protein S100A7 and epidermal-type fatty acid-binding protein are associated in the cytosol of human keratinocytes. *The Biochemical journal* 339 (Pt 2):419-427

- Hagens G, Roulin K, Hotz R, Saurat JH, Hellman U, Siegenthaler G (1999b) Probable interaction between S100A7 and E-FABP in the cytosol of human keratinocytes from psoriatic scales. *Molecular and cellular biochemistry* 192:123-128
- Hancock RE (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* 349:418-422
- Hansmann B, Ahrens K, Wu Z, Proksch E, Meyer-Hoffert U, Schroder JM (2012) Murine filaggrin-2 is involved in epithelial barrier function and down-regulated in metabolically induced skin barrier dysfunction. *Exp Dermatol* 21:271-276
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The Journal of biological chemistry* 276:5707-5713
- Harder J, Dressel S, Wittersheim M, Cordes J, Meyer-Hoffert U, Mrowietz U, Folster-Holst R, Proksch E, Schroder JM, Schwarz T, Glaser R (2010) Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *J Invest Dermatol* 130:1355-1364
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schroder JM (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22:714-721
- Harder J, Siebert R, Zhang Y, Matthiesen P, Christophers E, Schlegelberger B, Schroder JM (1997) Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* 46:472-475
- Hattenbach LO, Gumbel H, Kippenberger S (1998) Identification of beta-defensins in human conjunctiva. *Antimicrob Agents Chemother* 42:3332
- Haynes RJ, Tighe PJ, Dua HS (1998) Innate defence of the eye by antimicrobial defensin peptides. *Lancet* 352:451-452
- Hazlett L, Wu M (2011) Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res* 343:175-188
- Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, Lehrer RI, Herold BC (2006) Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol* 177:8658-8666
- Heizmann CW (2002) The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol* 172:69-80
- Henseler T, Christophers E (1995) Disease concomitance in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 32:982-986
- Hinrichsen K, Podschun R, Schubert S, Schroder JM, Harder J, Proksch E (2008) Mouse beta-defensin-14, an antimicrobial ortholog of human beta-defensin-3. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1876-1879
- Hoffmann HJ, Olsen E, Etzerodt M, Madsen P, Thogersen HC, Kruse T, Celis JE (1994) Psoriasin binds calcium and is upregulated by calcium to levels that resemble those observed in normal skin. *J Invest Dermatol* 103:370-375
- Hong SP, Kim MJ, Jung MY, Jeon H, Goo J, Ahn SK, Lee SH, Elias PM, Choi EH (2008) Biopositive effects of low-dose UVB on epidermis: coordinate upregulation of antimicrobial peptides and permeability barrier reinforcement. *J Invest Dermatol* 128:2880-2887
- Hoover DM, Boulegue C, Yang D, Oppenheim JJ, Tucker K, Lu W, Lubkowski J (2002) The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J Biol Chem* 277:37647-37654
- Hozono Y, Ueta M, Hamuro J, Kojima K, Kawasaki S, Yamazaki K, Kinoshita S (2006) Human corneal epithelial cells respond to ocular-pathogenic, but not to nonpathogenic-flagellin. *Biochem Biophys Res Commun* 347:238-247

- Huang LC, Jean D, McDermott AM (2005) Effect of preservative-free artificial tears on the antimicrobial activity of human beta-defensin-2 and cathelicidin LL-37 in vitro. *Eye Contact Lens* 31:34-38
- Huang LC, Jean D, Proske RJ, Reins RY, McDermott AM (2007a) Ocular surface expression and in vitro activity of antimicrobial peptides. *Curr Eye Res* 32:595-609
- Huang LC, Petkova TD, Reins RY, Proske RJ, McDermott AM (2006) Multifunctional roles of human cathelicidin (LL-37) at the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:2369-2380
- Huang LC, Redfern RL, Narayanan S, Reins RY, McDermott AM (2007b) In vitro activity of human beta-defensin 2 against *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of tear fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3853-3860
- Huber M, Siegenthaler G, Mirancea N, Marenholz I, Nizetic D, Breitzkreutz D, Mischke D, Hohl D (2005) Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *J Invest Dermatol* 124:998-1007
- Jager K, Bonisch U, Risch M, Worlitzsch D, Paulsen F (2009) Detection and regulation of cationic amino acid transporters in healthy and diseased ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:1112-1121
- Jinquan T, Vorum H, Larsen CG, Madsen P, Rasmussen HH, Gesser B, Etzerodt M, Honore B, Celis JE, Thestrup-Pedersen K (1996) Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J Invest Dermatol* 107:5-10
- Jones DE, Bevins CL (1992) Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267:23216-23225
- Jones DE, Bevins CL (1993) Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* 315:187-192
- Kavanagh K, Dowd S (2004) Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol* 56:285-289
- Kawasaki S, Kawamoto S, Yokoi N, Connon C, Minesaki Y, Kinoshita S, Okubo K (2003) Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjogren's syndrome. *Experimental eye research* 77:17-26
- Kaye S, Choudhary A (2006) Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* 25:355-380
- Knop E, Knop N (2003) [Eye-associated lymphoid tissue (EALT) is continuously spread throughout the ocular surface from the lacrimal gland to the lacrimal drainage system]. *Ophthalmologe* 100:929-942
- Knop E, Knop N, Brewitt H, Pleyer U, Rieck P, Seitz B, Schirra F (2009a) [Meibomian glands : part III. Dysfunction - argument for a discrete disease entity and as an important cause of dry eye]. *Ophthalmologe* 106:966-979
- Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA (2011) The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:1938-1978
- Knop E, Knop N, Schirra F (2009b) [Meibomian glands. Part II: physiology, characteristics, distribution and function of meibomian oil]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 106:884-892
- Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R (2003) An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 111:1665-1672
- Kolar SS, McDermott AM (2011) Role of host-defence peptides in eye diseases. *Cell Mol Life Sci*

- Krop I, Marz A, Carlsson H, Li X, Bloushtain-Qimron N, Hu M, Gelman R, Sabel MS, Schnitt S, Ramaswamy S, Kleer CG, Enerback C, Polyak K (2005) A putative role for psoriasin in breast tumor progression. *Cancer research* 65:11326-11334
- Lee KC, Eckert RL (2007a) S100A7 (Psoriasin)--mechanism of antibacterial action in wounds. *The Journal of investigative dermatology* 127:945-957
- Lee KC, Eckert RL (2007b) S100A7 (Psoriasin)--mechanism of antibacterial action in wounds. *J Invest Dermatol* 127:945-957
- Lehmann OJ, Hussain IR, Watt PJ (2000) Investigation of beta defensin gene expression in the ocular anterior segment by semiquantitative RT-PCR. *Br J Ophthalmol* 84:523-526
- Lehrer RI, Ganz T (2002) Defensins of vertebrate animals. *Current opinion in immunology* 14:96-102
- Leibovitch I, Lai TF, Senarath L, Hsuan J, Selva D (2005) Infectious keratitis in South Australia: emerging resistance to cephazolin. *Eur J Ophthalmol* 15:23-26
- Lemp MA (2008) Advances in understanding and managing dry eye disease. *Am J Ophthalmol* 146:350-356
- Li J, Raghunath M, Tan D, Lareu RR, Chen Z, Beuerman RW (2006) Defensins HNP1 and HBD2 stimulation of wound-associated responses in human conjunctival fibroblasts. *Investigative ophthalmology & visual science* 47:3811-3819
- Li X, de Leeuw E, Lu W (2005) Total chemical synthesis of human psoriasin by native chemical ligation. *Biochemistry* 44:14688-14694
- Linzmeier R, Ho CH, Hoang BV, Ganz T (1999) A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* 233:205-211
- Linzmeier R, Michaelson D, Liu L, Ganz T (1993) The structure of neutrophil defensin genes. *FEBS Lett* 321:267-273
- Liu L, Wang L, Jia HP, Zhao C, Heng HH, Schutte BC, McCray PB, Jr., Ganz T (1998) Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 222:237-244
- Liu L, Zhao C, Heng HH, Ganz T (1997) The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics* 43:316-320
- Liu S, Richards SM, Lo K, Hatton M, Fay A, Sullivan DA (2011) Changes in gene expression in human meibomian gland dysfunction. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:2727-2740
- Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honore B, Dejgaard K, Olsen E, Kiil J, Walbum E, Andersen AH, Basse B, et al. (1991) Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 97:701-712
- Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh NH (2001) Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J Biol Chem* 276:47445-47452
- Marenholz I, Zirra M, Fischer DF, Backendorf C, Ziegler A, Mischke D (2001) Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library. *Genome Res* 11:341-355
- McCray PB, Jr., Bentley L (1997) Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:343-349
- McCulley JP, Sciallis GF (1977) Meibomian keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 84:788-793
- McCulley JP, Shine WE (2003) Meibomian gland function and the tear lipid layer. *Ocul Surf* 1:97-106

- McDermott AM (2009) The role of antimicrobial peptides at the ocular surface. *Ophthalmic Res* 41:60-75
- McDermott AM, Redfern RL, Zhang B (2001) Human beta-defensin 2 is up-regulated during re-epithelialization of the cornea. *Curr Eye Res* 22:64-67
- McDermott AM, Redfern RL, Zhang B, Pei Y, Huang L, Proske RJ (2003) Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1beta stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1859-1865
- McIntosh RS, Cade JE, Al-Abed M, Shanmuganathan V, Gupta R, Bhan A, Tighe PJ, Dua HS (2005) The Spectrum of Antimicrobial Peptide Expression at the Ocular Surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1379-1385
- Meyer JE, Harder J, Sipos B, Maune S, Kloppel G, Bartels J, Schroder JM, Glaser R (2008) Psoriasin (S100A7) is a principal antimicrobial peptide of the human tongue. *Mucosal immunology* 1:239-243
- Michalek M, Gelhaus C, Hecht O, Podschun R, Schroder JM, Leippe M, Grotzinger J (2009) The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes. *Dev Comp Immunol* 33:740-746
- Mildner M, Stichenwirth M, Abtin A, Eckhart L, Sam C, Glaser R, Schroder JM, Gmeiner R, Mlitz V, Pammer J, Geusau A, Tschachler E (2010) Psoriasin (S100A7) is a major Escherichia coli-cidal factor of the female genital tract. *Mucosal immunology* 3:602-609
- Milz S, Neufang J, Higashiyama I, Putz R, Benjamin M (2005) An immunohistochemical study of the extracellular matrix of the tarsal plate in the upper eyelid in human beings. *J Anat* 206:37-45
- Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A (1996) Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *The Journal of investigative dermatology* 106:989-992
- Miyasaki KT, Bodeau AL, Murthy AR, Lehrer RI (1993) In vitro antimicrobial activity of the human neutrophil cytosolic S-100 protein complex, calprotectin, against *Capnocytophaga sputigena*. *J Dent Res* 72:517-523
- Mohammed I, Suleman H, Otri AM, Kulkarni BB, Chen P, Hopkinson A, Dua HS (2010) Localization and gene expression of human beta-defensin 9 at the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4677-4682
- Mohammed I, Yeung A, Abedin A, Hopkinson A, Dua HS (2011) Signalling pathways involved in ribonuclease-7 expression. *Cell Mol Life Sci* 68:1941-1952
- Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW (1993) Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 155:408-413
- Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M (2000) Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res* 49:73-79
- Nakamura T, Hayashi M, Kato A, Sawazaki T, Yasue H, Nakano T, Tanaka T (1998) A unique exon-intron organization of a porcine S100C gene: close evolutionary relationship to calmodulin genes. *Biochem Biophys Res Commun* 243:647-652
- Narayanan S, Miller WL, McDermott AM (2003) Expression of human beta-defensins in conjunctival epithelium: relevance to dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3795-3801
- Nguyen TX, Cole AM, Lehrer RI (2003) Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides* 24:1647-1654
- Nisapakultorn K, Ross KF, Herzberg MC (2001) Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 69:4242-4247

- Niyonsaba F, Hattori F, Maeyama K, Ogawa H, Okamoto K (2008) Induction of a microbicidal protein psoriasin (S100A7), and its stimulatory effects on normal human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 52:216-219
- Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I (2004) Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 111:273-281
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H (2007) Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127:594-604
- Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY (2003) Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 171:3262-3269
- Oono T, Shirafuji Y, Huh WK, Akiyama H, Iwatsuki K (2002) Effects of human neutrophil peptide-1 on the expression of interstitial collagenase and type I collagen in human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 294:185-189
- Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T (2003) In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 74:180-182
- Pachigolla G, Blomquist P, Cavanagh HD (2007) Microbial keratitis pathogens and antibiotic susceptibilities: a 5-year review of cases at an urban county hospital in north Texas. *Eye Contact Lens* 33:45-49
- Patil AA, Cai Y, Sang Y, Blecha F, Zhang G (2005) Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiol Genomics* 23:5-17
- Paulsen F (2008) Functional anatomy and immunological interactions of ocular surface and adnexa. *Dev Ophthalmol* 41:21-35
- Paulsen F, Steven P, Pufe T (2005) Antimicrobial peptides at the ocular surface. In: Zierhut M, Sullivan DA (ed) *Immunology of Lacrimal Gland and Tear Film*. Taylor & Francis, London, pp 97-104
- Paulsen FP, Berry MS (2006) Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus. *Prog Histochem Cytochem* 41:1-53
- Paulsen FP, Foge M, Thale AB, Tillmann BN, Mentlein R (2002a) Animal model for the absorption of lipophilic substances from tear fluid by the epithelium of the nasolacrimal ducts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3137-3143
- Paulsen FP, Paulsen JI, Thale AB, Tillmann BN (2000) Mucosa-associated lymphoid tissue in human efferent tear ducts. *Virchows Arch* 437:185-189
- Paulsen FP, Paulsen JL, Thale AB, Schaudig U, Tillmann BN (2002b) Organized mucosa-associated lymphoid tissue in human nasolacrimal ducts. *Adv Exp Med Biol* 506:873-876
- Paulsen FP, Pufe T, Schaudig U, Held-Feindt J, Lehmann J, Schroder JM, Tillmann BN (2001) Detection of natural peptide antibiotics in human nasolacrimal ducts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2157-2163
- Paulsen FP, Woon CW, Varoga D, Jansen A, Garreis F, Jager K, Amm M, Podolsky DK, Steven P, Barker NP, Sel S (2008) Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. *J Biol Chem* 283:13418-13427
- Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J (2006) Human beta-defensins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63:1294-1313

- Pereira HA, Ruan X, Gonzalez ML, Tsyshevskaya-Hoover I, Chodosh J (2004) Modulation of corneal epithelial cell functions by the neutrophil-derived inflammatory mediator CAP37. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:4284-4292
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
- Pietas A, Schluns K, Marenholz I, Schafer BW, Heizmann CW, Petersen I (2002) Molecular cloning and characterization of the human S100A14 gene encoding a novel member of the S100 family. *Genomics* 79:513-522
- Porre S, Heinonen S, Mantyjarvi R, Rytkonen-Nissinen M, Perola O, Rautiainen J, Virtanen T (2005) Psoriasin, a calcium-binding protein with chemotactic properties is present in the third trimester amniotic fluid. *Molecular human reproduction* 11:87-92
- Qu XD, Lehrer RI (1998) Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* 66:2791-2797
- Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC (1998) Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 152:1247-1258
- Redfern RL, McDermott AM (2010) Toll-like receptors in ocular surface disease. *Exp Eye Res* 90:679-687
- Redfern RL, Reins RY, McDermott AM (2011) Toll-like receptor activation modulates antimicrobial peptide expression by ocular surface cells. *Exp Eye Res* 92:209-220
- Rehal B, Modjtahedi BS, Morse LS, Schwab IR, Maibach HI (2011) Ocular psoriasis. *J Am Acad Dermatol*
- Reithmayer K, Meyer KC, Kleditzsch P, Tiede S, Uppalapati SK, Glaser R, Harder J, Schroder JM, Paus R (2009) Human hair follicle epithelium has an antimicrobial defence system that includes the inducible antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) and RNase 7. *The British journal of dermatology* 161:78-89
- Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y (2006) Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem* 281:1636-1643
- Ruan X, Chodosh J, Callegan MC, Booth MC, Lee TD, Kumar P, Gilmore MS, Pereira HA (2002) Corneal expression of the inflammatory mediator CAP37. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1414-1421
- Ruse M, Broome AM, Eckert RL (2003) S100A7 (psoriasin) interacts with epidermal fatty acid binding protein and localizes in focal adhesion-like structures in cultured keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 121:132-141
- Sack RA, Conradi L, Krumholz D, Beaton A, Sathe S, Morris C (2005) Membrane array characterization of 80 chemokines, cytokines, and growth factors in open- and closed-eye tears: angiogenin and other defense system constituents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1228-1238
- Sack RA, Nunes I, Beaton A, Morris C (2001) Host-defense mechanism of the ocular surfaces. *Biosci Rep* 21:463-480
- Schafer BW, Heizmann CW (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21:134-140
- Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wienczek JM, McCray PB, Jr., Tack BF, Vogel HJ (2002) 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* 277:8279-8289

- Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2:1133-1137
- Schroder JM (2004) [Epithelial antimicrobial peptides: local innate defense effector molecules]. *Ann Dermatol Venereol* 131:411-416
- Schroder JM, Harder J (2006) Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* 63:469-486
- Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, Beisner J, Buchner J, Schaller M, Stange EF, Wehkamp J (2011) Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* 469:419-423
- Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB, Jr. (2002) Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2129-2133
- Schwab IR, Dries D, Cullor J, Smith W, Mannis M, Reid T, Murphy CJ (1992) Corneal storage medium preservation with defensins. *Cornea* 11:370-375
- Segre JA (2006) Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 116:1150-1158
- Semple CA, Gautier P, Taylor K, Dorin JR (2006) The changing of the guard: Molecular diversity and rapid evolution of beta-defensins. *Mol Divers* 10:575-584
- Shai Y (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66:236-248
- Shin JS, Kim CW, Kwon YS, Kim JC (2004) Human beta-defensin 2 is induced by interleukin-1beta in the corneal epithelial cells. *Exp Mol Med* 36:204-210
- Shubbar E, Vegfors J, Carlstrom M, Petersson S, Enerback C (2011) Psoriasis (S100A7) increases the expression of ROS and VEGF and acts through RAGE to promote endothelial cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat*
- 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. (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14961-14966
- Singh PK, Tack BF, McCray PB, Jr., Welsh MJ (2000) Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L799-805
- Soruri A, Grigat J, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J (2007) beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *European journal of immunology* 37:2474-2486
- Sousa LB, Mannis MJ, Schwab IR, Cullor J, Hosotani H, Smith W, Jaynes J (1996) The use of synthetic Cecropin (D5C) in disinfecting contact lens solutions. *CLAO J* 22:114-117
- Spandau UH, Toksoy A, Verhaart S, Gillitzer R, Kruse FE (2003) High expression of chemokines Gro-alpha (CXCL-1), IL-8 (CXCL-8), and MCP-1 (CCL-2) in inflamed human corneas in vivo. *Arch Ophthalmol* 121:825-831
- Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK (1990) Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 336:763-765
- Steven P, Gebert A (2009) Conjunctiva-associated lymphoid tissue - current knowledge, animal models and experimental prospects. *Ophthalmic Res* 42:2-8
- Sung HK, Michael IP, Nagy A (2010) Multifaceted role of vascular endothelial growth factor signaling in adult tissue physiology: an emerging concept with clinical implications. *Curr Opin Hematol* 17:206-212

- Takaishi M, Makino T, Morohashi M, Huh NH (2005) Identification of human hornerin and its expression in regenerating and psoriatic skin. *J Biol Chem* 280:4696-4703
- Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 286:498-502
- Tieu DD, Peters AT, Carter RG, Suh L, Conley DB, Chandra R, Norton J, Grammer LC, Harris KE, Kato A, Kern RC, Schleimer RP (2010) Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125:667-675
- Tiffany JM (2008) The normal tear film. *Dev Ophthalmol* 41:1-20
- Tong L, Zhou L, Beuerman RW, Zhao SZ, Li XR (2011) Association of tear proteins with Meibomian gland disease and dry eye symptoms. *The British journal of ophthalmology* 95:848-852
- Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Jr., Ganz T (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633-1642
- Varoga D, Pufe T, Harder J, Schroder JM, Mentlein R, Meyer-Hoffert U, Goldring MB, Tillmann B, Hassenpflug J, Paulsen F (2005) Human beta-defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. *Arthritis and rheumatism* 52:1736-1745
- Volz A, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM, Mischke D (1993) Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics* 18:92-99
- Wang G, Li X, Wang Z (2009) APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 37:D933-937
- Wang Z, Wang G (2004) APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res* 32:D590-592
- White SH, Wimley WC, Selsted ME (1995) Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* 5:521-527
- Wiesner J, Vilcinskas A (2010) Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1:440-464
- Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W (2011) Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol* 32:603-611
- Willcox MD, Hume EB, Aliwarga Y, Kumar N, Cole N (2008) A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. *J Appl Microbiol* 105:1817-1825
- Wu M, McClellan SA, Barrett RP, Hazlett LD (2009a) Beta-defensin-2 promotes resistance against infection with *P. aeruginosa*. *J Immunol* 182:1609-1616
- Wu M, McClellan SA, Barrett RP, Zhang Y, Hazlett LD (2009b) Beta-defensins 2 and 3 together promote resistance to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *J Immunol* 183:8054-8060
- Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Glaser R, Schroder JM (2009c) Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PloS one* 4:e5227
- Wu Z, Meyer-Hoffert U, Reithmayer K, Paus R, Hansmann B, He Y, Bartels J, Glaser R, Harder J, Schroder JM (2009d) Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin. *The Journal of investigative dermatology* 129:1446-1458
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y (2002) Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *Journal of immunology* 169:2516-2523
- Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23:291-296

- Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 68:9-14
- Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ (2003) Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 74:448-455
- Yeung AT, Gellatly SL, Hancock RE (2011) Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci* 68:2161-2176
- Zaiou M (2007) Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med* 85:317-329
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395
- Zhang J, Xu K, Ambati B, Yu FS (2003) Toll-like receptor 5-mediated corneal epithelial inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4247-4254
- Zheng Y, Niyonsaba F, Ushio H, Ikeda S, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H (2008) Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. *Immunology* 124:357-367
- Zhou L, Beuerman RW, Ang LP, Chan CM, Li SF, Chew FT, Tan DT (2009a) Elevation of human alpha-defensins and S100 calcium-binding proteins A8 and A9 in tear fluid of patients with pterygium. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:2077-2086
- Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, Zhao SZ, Li XR, Yang H, Tong L, Liu S, Stern ME, Tan D (2009b) Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *Journal of proteome research* 8:4889-4905
- Zhou L, Huang LQ, Beuerman RW, Grigg ME, Li SF, Chew FT, Ang L, Stern ME, Tan D (2004) Proteomic analysis of human tears: defensin expression after ocular surface surgery. *J Proteome Res* 3:410-416
- Zhu H, Kumar A, Ozkan J, Bandara R, Ding A, Perera I, Steinberg P, Kumar N, Lao W, Griesser SS, Britcher L, Griesser HJ, Willcox MD (2008) Fimbricide-coated antimicrobial lenses: their in vitro and in vivo effects. *Optom Vis Sci* 85:292-300
- Zimmer DB, Chessher J, Song W (1996) Nucleotide homologies in genes encoding members of the S100 protein family. *Biochim Biophys Acta* 1313:229-238

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen, für die stets engagierte, fachkundige und freundschaftliche Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Ausdrücklich möchte ich mich für die gewährte akademische Freiheit meiner Forschung und die allgegenwärtige positive Motivation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Werner Roos vom Institut für Pharmazie, Abteilung Molekulare Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich für die investierte Zeit bei der Übernahme des Referates und die Unterstützung bei der Eröffnung des Promotionsverfahrens in der Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften danken. Frau Prof. Dr. med. Regine Gläser und Herrn Prof. Dr. Michael Schröder sei herzlichst für die Bereitstellung der Psoriasin, Hornerin und Filaggrin-2 Antikörper sowie für die wissenschaftliche Diskussion gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Susann Möschter und Ute Beyer für ihre kompetente Unterstützung und das freundschaftliche Arbeitsklima im Labor; Maria Gottschalt und Janine Jahn für die tatkräftige Beteiligung bei der praktischen Durchführung und den daraus resultierenden neuen Ideen; Ulrike Hampel und Michael Scholz bei der wiederholten Korrektur und Motivation bei der Anfertigung meiner Arbeit. Danken möchte ich auch meinen ehemaligen Büro-Mitbewohnern Ute Schulze, Nicole Ramin und René Thieme für die laufende freundschaftliche Unterstützung, Motivation und den ständigen wissenschaftlichen Austausch.

Namentlich Herrn Prof. Dr. med. Bernd Fischer und allen Kollegen und Kolleginnen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie meinen Kollegen und Kolleginnen des Lehrstuhl für Anatomie 2 der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Sylvia Dyczek, insbesondere für das fleißige Korrekturlesen meiner Arbeit, die entgegengebrachte Geduld und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Laufbahn. Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, Ines und Manfred Garreis, sowie bei meiner gesamten Familie für das was ich war, bin und sein werde danken. Habt ihr gut gemacht!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Fabian Garreis
Geburtsdatum/-ort: 15.06.1979 in Beckendorf-Neindorf
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Lebensgemeinschaft (2 Kinder)

Schulische Ausbildung:

1986 – 1990 Grundschole Völpke
1990 – 1998 Allertal-Gymnasium Eilsleben/Völpke
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

09/1998 – 06/1999 PzGren Btl. 323 Schwanewede

Akademische Ausbildung:

10/1999 - 03/2005 Biologie-Studium an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig
04/2004 - 01/2005 Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Zell- und Molekularbiologie;
Thema: „Charakterisierung der mutanten Mauslinien A008A01^{GT} und Ataxin-2^{GT}“
03/2005 Abschluss: Diplom Biologe
05/2006 – 04/2010 Doktorand bei Prof. Friedrich Paulsen am Institut für Anatomie & Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (DFG-Projekt PA 738/9-2 “Antimikrobielle Peptide an der Augenoberfläche“)
ab 05/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie 2 der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Direktor Prof. Friedrich Paulsen)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit "Expression und Regulation antimikrobieller Peptide an der Augenoberfläche und im Tränenapparat des Menschen" selbstständig, nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe und die den benutzten Literaturquellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ferner habe ich bisher in keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Erlangen, den

Fabian Garreis