

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Fischer)

Maria Gottschalt
In der Gabel 1
69123 Heidelberg

**Expression und Regulation des antimikrobiellen Peptids Psoriasin an der
Augenoberfläche und im Tränenapparat**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

von Maria Gottschalt
geboren am 21.08.1982 in Halle/Saale
Betreuer: Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 17.07.2012
Datum der Verteidigung: 11.03.2013

Gutachter: Prof. Dr. med. Regine Gläser
PD. Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch

Referat

Im Rahmen dieser Arbeit soll das antimikrobielle Peptid Psoriasin hinsichtlich seines Vorkommens und seiner Induzierbarkeit an der menschlichen Augenoberfläche und im Tränenapparat untersucht werden. Das S100 Peptid Psoriasin (S100A7) ist eine antimikrobiell wirksame Substanz, die insbesondere gegen das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* wirkt. Sie wurde erstmals in der Haut von Patienten mit Psoriasis beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung und Funktion von Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat zu charakterisieren. Zu diesem Zweck werden Versuche an verschiedenen Gewebetypen der Augenoberfläche und des Tränenapparates, sowie an Tränenflüssigkeit von gesunden Probanden durchgeführt. Für die Analyse werden reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), Real-time PCR, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western Blot und Immunhistochemie eingesetzt. An kultivierten immortalisierten Kornea (HCE)-, Konjunktiva (HCjE)- und Sebozytenepithelzelllinien wird die Psoriasinregulation nach Stimulation mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Bakterienüberständen mittels der Real Time PCR analysiert. Die Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein von Psoriasin im Plattenepithel und in Haarfollikeln, sowie in den Meibomdrüsen der Augenlider. Auch in Kornea, Konjunktiva und Epithel der ableitenden Tränenwege kann Psoriasin detektiert werden. In der Tränendrüse kommt Psoriasin nur in geringen Mengen vor. Eine sehr hohe Psoriasinkonzentration kann mittels ELISA in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden nachgewiesen werden. Stimulation mit Überständen von *E. coli* induziert die Psoriasinexpression in der Sebozytenepithelzelllinie dezent herauf. Im Gegensatz dazu bewirken *Staphylokokkus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* eine Steigerung der Psoriasinexpression in der HCjE-Zelllinie. Besonders nach Stimulation mit VEGF und $IL-1\beta$ kann eine hohe Psoriasinexpression beobachtet werden; $TNF\alpha$ und TFF3 regulieren die Psoriasinexpression leicht herauf. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Psoriasin ein breiteres antibakterielles Spektrum besitzt als bisher angenommen wurde. Eine angiogene oder eine antiangiogene Potenz für Psoriasin ist ebenfalls denkbar. Dies könnte auf eine wichtige Rolle von Psoriasin im Rahmen von Infektionen und als Immunmodulator an der Augenoberfläche und im Tränenapparat hinweisen.

Gottschalt, Maria: Expression und Regulation des antimikrobiellen Peptids Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat, Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2011

Inhaltsverzeichnis

Referat	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einführung	
1.1. Die Augenoberfläche und Tränenapparat	S. 1
1.2. Psoriasin	S. 5
2. Zielstellung	S. 10
3. Material und Methoden	
3.1. Geräte	S. 11
3.1. Chemikalien	S. 12
3.3. Sterilisation von Lösungen und Geräten	S. 14
3.4. Molekulargewichtsstandards	S. 14
3.5. Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials	S. 15
3.5.1. Gewebeproben	S. 15
3.5.2. Zelllinien	S. 15
3.5.3. Medien und Kultivierung	S. 16
3.5.4. Aussaat der Zelllinien	S. 17
3.5.5. Stimulation der Zelllinien	S. 17
3.6. RNA-Isolierung	S. 19
3.7. RNA-Isolierung aus Gewebe	S. 20
3.8. Messung der RNA-Konzentration	S. 20
3.9. Reverse Transkription	S. 20
3.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S. 21
3.11. Real Time PCR	S. 22
3.12. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	S. 24
3.13. Immunhistochemische Reaktion nach der ABC Methode	S. 24
3.14. Proteinisolierung aus Gewebe	S. 26
3.15. Bestimmung der Proteinkonzentration	S. 26
3.16. Western Blot	S. 26
3.17. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) nach dem Sandwich-Prinzip	S. 28
3.18. Statistik	S. 29
4. Ergebnisse	
4.1. Expression von Psoriasin an der Augenoberfläche und	

im Tränenapparat	S. 30
4.1.1. Psoriasinnachweis auf mRNA Ebene	S. 30
4.1.2. Psoriasinnachweis auf Proteinebene mittels Western Blot	S. 31
4.1.3. Immunhistochemischer Nachweis	S. 31
4.1.4. Psoriasinnachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	S. 35
4.2. Immunnachweis von Psoriasin in humaner Tränenflüssigkeit mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	S.36
4.3. Regulation der Psoriasinexpression im Zellkulturmodell nach Stimulation mit verschiedenen Bakterienüberständen	S. 36
4.3.1. Quantitativer Nachweis von Psoriasin auf RNA-Ebene	S. 37
4.3.2. Quantitativer Nachweis von Psoriasin mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	S. 38
4.4. Regulation der Psoriasinexpression in der Korneaepithelzelllinie nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren	S. 40
4.4.1. Interleukin-1 β	S. 40
4.4.2. Vascular Endothelial Growth Factor	S. 41
4.4.3. Tumornekrosefaktor α	S. 42
4.4.4. Trefoil Factor Family Peptid 3	S. 43
5. Diskussion	
5.1. Nachweis von Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat	S. 44
5.2. Untersuchung der Tränenflüssigkeit des Menschen	S. 48
5.3. Stimulation und Regulation von Psoriasin	S. 50
5.3.1. Induktion der Psoriasinexpression durch Bakterien im Zellkulturmodell	S. 50
5.3.2. Beeinflussung der Psoriasinkonzentration durch Zytokine und Wachstumsfaktoren	S. 52
6. Ausblick	S. 59
7. Zusammenfassung	S. 60
8. Literaturverzeichnis	S. 62
9. Thesen	S. 78
Lebenslauf	VIII
Selbständigkeitserklärung	IX

Erklärung über Promotionsversuche
Danksagung

IX
X

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AG	Antigen
AK	Antikörper
AMP	Antimikrobielle Peptide
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ÄWS	Äußere Wurzelscheide
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
B. cepacia	Burkholderia cepacia
°C	Grad Celsius
DN	Ductus nasolacrimalis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cj	Konjunktiva
Cr	Kornea
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
E/FABP	Epidermal fatty acid-binding Protein
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HCE	Humane Korneaepithelzelllinie
HCjE	Humane Konjunktivaepithelzelllinie
HBD	Humanes beta Defensin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish Peroxidase
HW	Haarwurzel
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 Receptor-Associated Kinase

IWS	Innere Wurzelscheide
kDa	Kilodalton
GL	Glandula lacrimalis
Mb	Meibomdrüse
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
MGD	Meibomian Gland Dysfunction
min	Minute
ml	Milliliter
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMP-13	Matrix-Metalloproteinase 13
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natronlauge
NF-kB	Nuklearer Transkriptionsfaktor kB
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Saline
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pso	Psoriasis
TLR	Toll-like Receptor
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
SZ	Sebozytenzelllinie
TAE	Trisaminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TAK-1	TGFbeta Activated Kinase 1
TBS	Trisgepufferte Saline
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha

TFF3	Trefoil Factor Family Peptid 3
TRAF6	Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Units
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZD	Zeiss-Drüse

1. Einführung

1. Einführung

1.1. Die Augenoberfläche und Tränenapparat

In der vorliegenden Arbeit werden die Augenoberfläche und der Tränenapparat hinsichtlich des Vorhandenseins und der Funktion von Psoriasin untersucht. Hierzu werden Kornea (Hornhaut), Konjunktiva (Bindehaut), Glandula lacrimalis (Tränendrüse), Ductus nasolacrimalis (Tränennasengang), Meibomdrüsen (spezielle Talgdrüsen, die im Tarsus des Augenlides liegen), Tränenflüssigkeit und Augenlider untersucht. Gläser *et al.* (2005) konnten Psoriasin in Keratinozyten, Haarfollikeln und in Talgdrüsen nachweisen. Auf Grundlage dieser Befunde war ebenfalls eine Psoriasinexpression in den Keratinozyten des Augenlides, den Follikeln der Wimpern und in den Meibomdrüsen zu erwarten.

Das Augenlid schützt die Augenoberfläche vor Verletzungen und verteilt den Tränenfilm mit jedem Lidschlag auf der Kornea und der Konjunktiva. Der Aufbau von Ober- und Unterlid ist prinzipiell gleich. An der Außenseite ist das Augenlid von einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel bedeckt. Unter der Kutis liegt der Musculus orbicularis oculi, der für den Lidschluss verantwortlich ist. Er wird vom N. facialis innerviert. In der Tiefe befindet sich der Tarsus, eine Platte aus straffem Bindegewebe, die dem Augenlid seine gewölbte Form verleiht. Die Lidinnenseite wird von der Konjunktiva palpebrae bedeckt. Sie ist unverschieblich mit dem Tarsus verwachsen und reicht bis zum Fornix conjunctivae, einer Reservefalte für die Beweglichkeit des Bulbus. Hier schlägt die Konjunktiva palpebrae in die Konjunktiva bulbi um und besteht nun aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, in das solitäre Becherzellen oder Becherzellen in Form intraepithelialer Drüsen eingelagert sind.

Das Augenlid enthält verschiedene Drüsen, die an der Bildung des Tränenfilms beteiligt sind. Die Wimpern-assoziierten Zeiss-Drüsen (Talgdrüsen) sowie die Moll-Drüsen (apokrine Schweißdrüsen) sind an die Follikel der Wimpern angeschlossen und münden an der Vorderkante des Lidrandes. Kleine akzessorische Tränendrüsen (Krause- und Wolfring-Drüsen) kommen im Oberlid in der Nähe der Fornix vor.

Die Meibomdrüsen sind große spezialisierte Talgdrüsen des Augenlides, die ihren Namen dem Arzt und Anatom Heinrich Meibom (1638-1700) verdanken. Im Gegensatz zu anderen Talgdrüsen sind sie nicht mit einem Haarfollikel assoziiert. Sie liegen in paralleler Anordnung mit zahlreichen separaten Drüsengängen innerhalb des Bindegewebes des Tarsus. Eine einzelne Meibomdrüse besteht aus einem

1. Einführung

mehrteiligen Gangsystem von dem seitlich radiär angeordnete Azini abgehen (Knop und Knop, 2009). Die Azini bestehen aus den Meibozyten, die an der Produktion des Meibum beteiligt sind (Nicolaidis *et al.*, 1981). Das ölige Sekret (Meibum) der Meibomdrüsen entsteht durch einen holokrinen Sekretionsmechanismus. Die sekretorischen Meibozyten bilden und lagern dafür reichlich Lipide ein und werden anschließend komplett in das Sekret umgewandelt (Sirigu *et al.*, 1992; Olami *et al.*, 2001). Meibum-Öl besteht vor allem aus einer komplexen Mischung von Lipiden und Proteinen, sowie aus weiteren Bestandteilen der Meibomdrüsen. Über die exakte Zusammensetzung gibt es zahlreiche Untersuchungen (Nicolaidis *et al.*, 1981). Die Abgabe von Meibum erfolgt durch die Öffnung des zentralen Drüsenausführungsganges auf den freien Lidrand nahe der inneren Lidkante. Hier befindet sich der Rand des Tränensees auf dem die Lipide gleiten und von dort durch den Lidschlag ausgebreitet werden. Sie bilden die äußere Schicht des Tränenfilms und ihre wesentliche Funktion ist es, die Verdunstung der wässrigen Komponente des Tränenfilms zu vermindern (Mishima und Maurice, 1961). Meibomdrüsen werden ähnlich wie andere Talgdrüsen durch Geschlechtshormone reguliert. Androgene fördern die Drüsenfunktion (Schirra *et al.*, 2006; Yamagami *et al.*, 2002), wobei Östrogene einen antagonistischen Effekt haben (Krenzer *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu anderen Talgdrüsen besitzen die Meibomdrüsen eine ausgeprägte nervale Innervation durch sympathische, sensorische und vor allem parasympathische Fasern (Perra *et al.*, 1996; Hartschuh, 1983; Seifert und Spitznas; 1996). In zahlreichen Studien werden Funktionsstörungen der Meibomdrüsen als ein häufiger Grund für ein trockenes Auge beschrieben. Funktionsstörungen der Meibomdrüsen führen dabei zu einer erhöhten Verdunstung des wässrigen Tränenfilms mit evaporativem Tränenmangel (Mathers, 1993; Mishima und Maurice, 1961; Sullivan *et al.*, 2002), was zu degenerativen Veränderungen innerhalb der Drüsen führen kann (Knop *et al.*, 2011; Korb und Blackie, 2008; Korb und Henriquez, 1980; Norn, 1987; Robin *et al.*, 1985).

Die Kornea (Hornhaut) ist der transparente Teil des vorderen Augenabschnittes und an ihrem Rand, dem Limbus corneae uhrglasförmig in die Sklera eingefalzt. Sie besteht aus Epithel, Stroma, Endothel und ist frei von Blut- und Lymphgefäßen. An der Außenseite wird die Kornea von einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel bedeckt, das an der Regulation des Wassergehalts des Stromas beteiligt ist und das Eindringen von Keimen verhindert. Die Zellen der Kornea sind durch Desmosomen, Adhärens-Kontakte und Gap-junctions miteinander verbunden. Die Zellen der Oberfläche tragen Mikroplicae und bilden mittels Tight-junctions eine Diffusionsbarriere

1. Einführung

gegenüber dem Tränenfilm. Die Oberfläche des Korneaepithels wird ständig vom Tränenfilm benetzt. Über das Kammerwasser, die konjunktivalen Gefäßschlingen und die Tränenflüssigkeit erfolgt die Ernährung der Kornea via Diffusion von der vorderen Augenkammer. Das Stroma enthält Kollagenfibrillen, Proteoglykane, Wasser und Fibroblasten. Diese sind für den Auf- und Abbau der Kornea-spezifischen Extrazellulärmatrix verantwortlich. Im kranialen zellfreien Stroma befindet sich die epitheliale Basalmembran (Bowman-Membran). Sie besteht aus durchflochtenen dünnen Kollagenfibrillen und stellt die Lamina fibroreticularis der epithelialen Basalmembran dar. Im überwiegenden Teil des Stromas sind die Kollagenfibrillen zu Lamellen gepackt zwischen denen die Keratinozyten liegen. Innerhalb dieser Lamellen sind die Fibrillen parallel angeordnet und in den Lamellenzwischenräumen befinden sich wasseranziehende Proteoglykane. Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel der Kornearückseite, das an einer dicken, ungewöhnlich zusammengesetzten Basalmembran haftet (Descemet-Membran). Die Endothelzellen sind durch Tight-junctions verbunden und bilden eine Diffusionsbarriere gegenüber der mit Kammerwasser gefüllten Vorderkammer. Durch den Ionentransport aus dem Stroma schafft das Endothel einen osmotischen Gradienten für Aquaporine in Richtung Vorderkammer und hält dadurch den Wassergehalt im Stroma unter Kontrolle. Das Endothel ist hauptverantwortlich für die Transparenz der Kornea, da diese vom Wassergehalt der Extrazellulärmatrix abhängt.

Die Konjunktiva ist die Fortsetzung des Korneaepithels, die den Augapfel an der Vorderseite bedeckt und sich bis an die Innenseite der Augenlider fortsetzt. Sie besteht aus einem mehrschichtigen, unverhornten, kubischen bis hochprismatischen Plattenepithel, das reich an Becherzellen ist. Die Tela subconjunctivalis enthält lockeres Bindegewebe, Abwehrzellen und reichlich Blutgefäße, die am Limbus corneae ein Randschlingennetz bilden. Die Konjunktiva ermöglicht dem Augapfel reibungsfreie Bewegungen in alle Blickrichtungen.

Die Tränendrüse ist eine verzweigte tubuloalveoläre Drüse mit serösen Endstücken, die sich unter dem temporalen oberen Rand der knöchernen Orbita befindet. Die Drüse ist in Läppchen gegliedert und mündet mit ca. 10 Ausführungsgängen in den Fornix conjunctivae superior. Das Gangsystem der Tränendrüse besitzt einen einfachen Aufbau (keine Schalt- und Streifenstücke). Die Tränendrüse wird sympathisch und parasympathisch innerviert. Die sympathische Innervation stammt aus dem Plexus caroticus internus, der den Nervus petrosus profundus abgibt, und die parasympathische Innervation entstammt dem Intermediusanteil des Nervus facialis. Die Zellen der Endstücke produzieren die isotone Tränenflüssigkeit und sezernieren

1. Einführung

Muzine (Paulsen, 2006; Paulsen und Berry, 2006), sowie verschiedene antimikrobielle Substanzen wie z.B. Lysozym, Lactoferrin und Defensine. Weiterhin können sie durch Transzytose Immunglobulin A aus Plasmazellen in das Endstücklumen schleusen. Eine relevante Erkrankung der Tränendrüse ist die Dakryoadenitis, bei der es zur akuten Schwellung, Rötung und Druckschmerz im Bereich des Augenlides kommt.

Die ableitenden Tränenwege setzen sich aus Canaliculi superior und inferior, Saccus lacrimalis und Ductus nasolacrimalis zusammen. Letzterer verläuft im Canalis nasolacrimalis. Er mündet schräg in den unteren Nasengang. Die Aufgabe der ableitenden Tränenwege ist der Transport der verbrauchten Tränenflüssigkeit in die Nase. Das Lumen wird von mehrreihigem, zilienfreiem Zylinderepithel mit Becherzellen ausgekleidet. Die Lamina propria enthält einen Schwellkörper, der den Gang als dicke Manschette umgibt und mit den Schwellkörpern der Nasenschleimhaut in Verbindung steht (Paulsen *et al.*, 2003).

Der Tränenfilm verhindert die Austrocknung der Hornhaut und ermöglicht das reibungsfreie Gleiten der Lider. Er (Abb. 1.1.) besteht aus einer isotonen Elektrolytlösung, in der antimikrobielle Stoffe und Muzine enthalten sind. Hochmolekulare gelbildende Muzine (MUC5AC) werden von den Becherzellen der Konjunktiva produziert (Göke *et al.*, 2004); kleinere Muzine (MUC7, MUC5B) stammen aus der Tränendrüse (Jumblatt *et al.*, 2003; Paulsen *et al.*, 2004). An der Luft/Wassergrenze liegt eine Schicht aus verschiedenen Lipiden wie z.B. Cholesterin und Triglyceriden. Diese Schicht verhindert die rasche Verdunstung des Tränenfilms und wird zum größten Teil von den Meibomdrüsen gebildet. Die Fixierung des Tränenfilms erfolgt an der Plasmamembran der oberflächlichen Epithelzellen durch membrangebundene Muzine die auf den Epithelzellen befestigt sind.

Eine verminderte Tränensekretion führt zur Austrocknung der Augenoberfläche wodurch der Gleit- und Spüleffekt, sowie die Wirkung der antimikrobiellen Substanzen des Tränenfilms fehlen. Diese Auswirkungen führen zur Schädigung der oberen Epithelschicht und einer begleitenden Entzündung (Keratoconjunctivitis sicca). Im weiteren Verlauf kann es zu tieferen Epitheldefekten mit Keimbesiedlung und Stromadefekten bis hinunter zur Descemet-Membran kommen.

1. Einführung

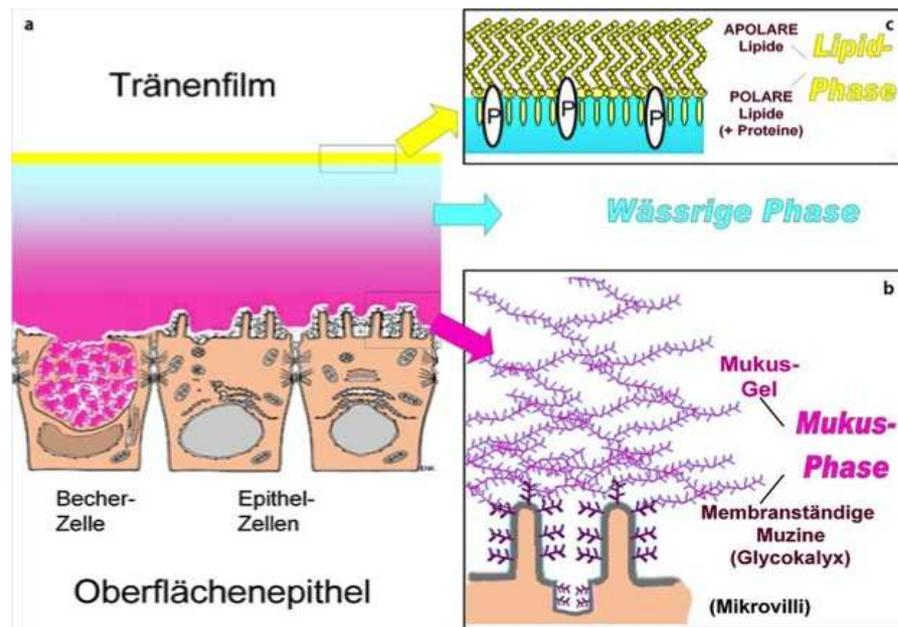


Abb. 1.1. Aufbau des Tränenfilms. In (a) sind die einzelnen Schichten des Tränenfilms dargestellt. Die untere Schicht besteht aus membranständigen Muzinen (b), mit deren Hilfe der Tränenfilm an der Augenoberfläche fixiert wird. Darauf folgt eine wässrige Schicht. Die oberste Schicht an der Luft/Wassergrenze besteht aus verschiedenen Lipiden (c).

1.2. Psoriasis

Ein funktionierendes Immunsystem spielt für den Körper des Menschen eine essentielle Rolle. Ein kontinuierlicher Schutz vor pathogenen Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten muss gewährleistet werden. Das Immunsystem wird in eine unspezifisch angeborene Abwehr und eine spezifisch erworbene Abwehr unterteilt. Beide Abwehrmechanismen besitzen eine humorale und zelluläre Komponente. Die zelluläre Komponente bei der erworbenen Immunabwehr basiert auf der Aktivierung, Vermehrung und Reaktion antigenspezifischer T- und B-Lymphozyten. Zur humoralen Komponente der erworbenen Immunabwehr gehören die Immunglobuline, die auf der Oberfläche von B-Lymphozyten exprimiert werden und in der Lage sind, spezifische Antigene zu erkennen und zu binden. Die wichtigsten Komponenten der zellulären angeborenen Abwehr sind Abwehrzellen wie z.B. natürliche Killerzellen und Phagozyten. Zur humoralen angeborenen Immunabwehr zählen das Komplementsystem, Interferone, Zytokine, akute Phase Proteine sowie antimikrobielle Substanzen.

Antimikrobielle Substanzen sind wichtige Elemente des angeborenen Immunsystems. Sie besitzen Antibiotika vergleichbare Eigenschaften und wurden in beinahe jedem Organismus studiert. Zasloff (1987) beschrieb in Studien an *Xenopus laevis* die

1. Einführung

Schlüsselrolle von antimikrobiellen Substanzen bei der chemischen Abwehr auf epithelialen Oberflächen (Haut, Schleimhaut, Organkapseln). Antimikrobielle Substanzen entfalten ihre antibiotische Wirkung durch drei verschiedene Mechanismen. Defensine (Ganz *et al.*, 2003) oder Cathelicine (Zanetti *et al.*, 2004) beispielsweise wirken durch destruktive Zerstörung von Bakterienmembranen. Einen zweiten Mechanismus stellt die enzymatische Aktivität dar, die sich direkt gegen die Zellwand richtet oder gegen die Phospholipidstruktur der Pathogene. Enzyme wie Lysozym oder Phospholipase A₂ besitzen beispielsweise diese Eigenschaft. Der dritte Mechanismus besteht aus dem Entzug wichtiger lebensnotwendiger Nährstoffe. So ist Lactoferrin beispielsweise ein antimikrobielles Protein, das die Fähigkeit besitzt, das Bakterienwachstum durch Eisenentzug zu behindern (Zasloff *et al.*, 2002; Boman *et al.*, 2003; Lehrer und Ganz, 2002).

Antimikrobielle Substanzen werden auf Schleimhautoberflächen des menschlichen Körpers und von Phagozyten produziert. Einige antimikrobielle Substanzen werden konstitutiv gebildet, wie z.B. RNase-7 und Dermcidin. Andere, wie z.B. β -Defensine oder Cathelicidine, werden nur bei Verletzungen oder direktem Kontakt mit Keimen produziert. Die Expression der antimikrobiellen Substanzen wird durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst und reguliert. In ihrem Zusammenspiel haben sie einen starken Einfluss auf Abwehrprozesse des Immunsystems (McDermott *et al.*, 2009; Kolar *et al.*, 2011).

Gläser *et al.* (2005) machten in diesem Zusammenhang eine interessante Entdeckung. Von der Hautoberfläche und aus dem Sekret von Epithelzellen gelang der Arbeitsgruppe die Isolierung des 11 kDa großen Peptids Psoriasin, das bakterizide Aktivität insbesondere gegen *Escherichia coli* aufweist. Dabei wird das Absterben von *E. coli* wahrscheinlich durch den Entzug von lebenswichtigen Zinkionen bewirkt. Immunhistochemisch kann Psoriasin in Keratinozyten, Talgdrüsenzellen und an Haarfollikeln der menschlichen Haut lokalisiert werden, allerdings nicht in ekkrinen Schweißdrüsenzellen. Besonders hohe Konzentrationen findet man dabei auf der Kopfhaut, auf den Handinnenflächen, in den Achselhöhlen und im Gesicht. Geringere Mengen kommen auf der Rückseite der Beine und Arme vor (siehe Abb. 1.2.). Die Expression von Psoriasin kann in der Epidermis und in kultivierten Keratinozyten durch proinflammatorische Mediatoren, Bakterienbestandteile, UV-Bestrahlung und steigende intrazelluläre Calciumkonzentrationen gesteigert werden (Gläser *et al.*, 2005; Gläser *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 1994; Niyonsaba *et al.*, 2008).

Psoriasin, dessen Name sich von der chronisch entzündlichen Hauterkrankung Psoriasis (Schuppenflechte) ableitet, wird hier in hohem Maße induziert (Madsen *et al.*,

1. Einführung

1991, Burgisser *et al.*, 1995). Auch andere Hauterkrankungen wie atopische Dermatitis (Gläser *et al.*, 2009), Lichen sklerosus (Gambichler *et al.*, 2009) oder Akne inversa (Schlapbach *et al.*, 2009) weisen ebenfalls eine erhöhte Psoriasinexpression der untersuchten Keratinozyten auf. In aktuellen Arbeiten gelang der Nachweis von Psoriasin auf der Zungenschleimhaut (Meyer *et al.*, 2008) und im weiblichen Urogenitaltrakt (Mildner *et al.*, 2010).

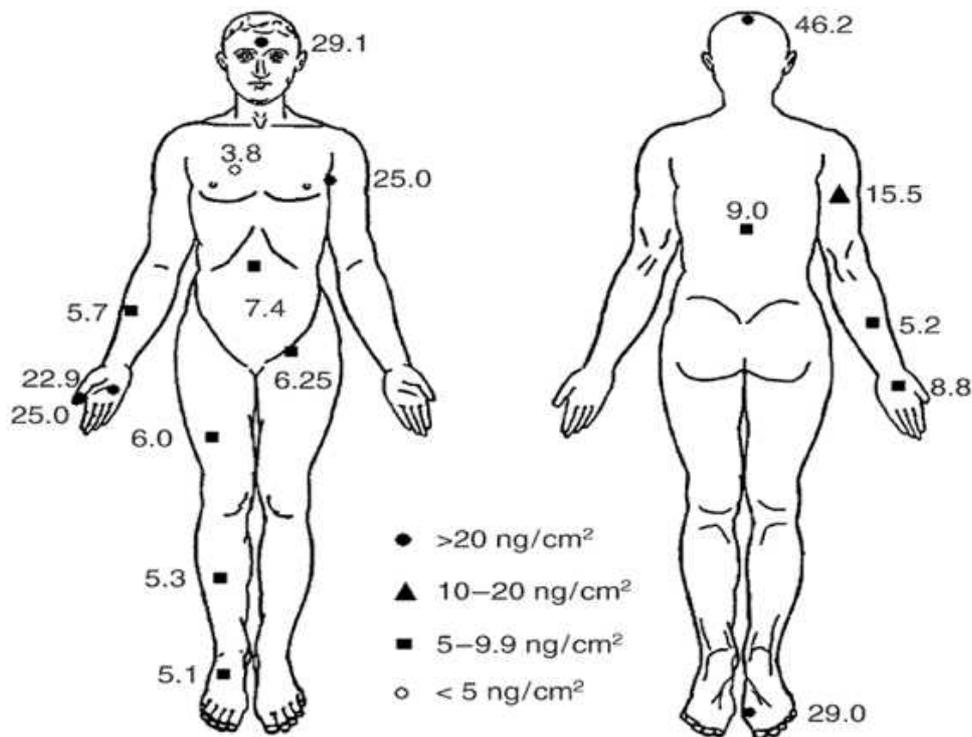


Abb. 1.2. Psoriasinexpression *in vivo* auf der Haut des Menschen. Die Abbildung zeigt die Psoriasinproduktion und deren Verteilung auf der Haut gesunder Probanden. Die Psoriasinkonzentration auf der Hautoberfläche wurde mittels ELISA ermittelt. Die Psoriasinkonzentration auf der Hautoberfläche wurde mittels ELISA ermittelt. Die Kopfhaut, die Handflächen, die Achseln und das Gesicht weisen die höchsten Psoriasinkonzentrationen auf. Die Konzentration ist in ng Psoriasin/ pro cm² angegeben. Das Schema stammt aus Gläser *et al.*, 2005.

Vergleichbare Studien belegen, dass Psoriasin im Fruchtwasser vorkommt und wahrscheinlich während der fetalen Entwicklung und während der Geburt eine wichtige immunologische Funktionen hat (Porre *et al.*, 2005). Weiterhin wird Psoriasin in abnorm differenzierten Keratinozyten einiger Karzinome vermehrt exprimiert und findet dadurch als Tumormarker Verwendung (Enerbeck *et al.*, 2002). Besonders bekannt ist Psoriasin als Tumormarker beim Mammakarzinom geworden (Haddad *et al.*, 2004). Eine erhöhte Psoriasinkonzentration konnte im Urin von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden (Celis *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe von Alowami *et al.* (2003) schrieben Psoriasin eine wichtige Rolle in der Tumorgenese bei Hautkrebs zu.

1. Einführung

Psoriasin gehört zur Familie der niedermolekularen Kalzium-bindenden S100 Proteine, die aus zwei Helix-Loop-Helix Kalzium-bindenden Domänen (EF-hands), aus verschiedenen α -helikalen Domänen und einer zentralen flexiblen Domäne (Donato, 2001) bestehen. Innerhalb der Zellen existieren die S100 Proteine als antiparallele Homo- und Heterodimere, die durch nicht molekulare Wechselwirkung zusammengehalten werden (Brodersen *et al.*, 1998; Sastry *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 2000, Moroz *et al.*, 2000). Die Kalziumbindung mit der EF-Hand führt zu einer Konformationsänderung im Psoriasinhomodimer und ermöglicht so die Bindung an Zielproteine (Brodersen *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2005).

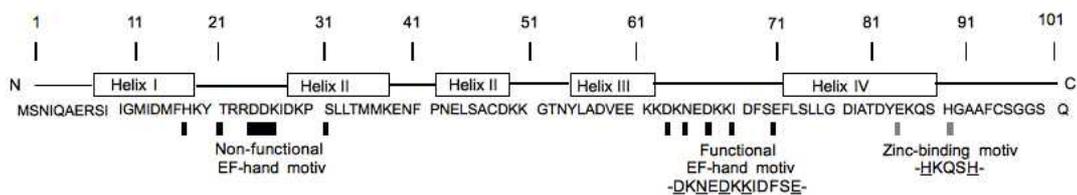


Abb. 1.3. Strukturmodell von Psoriasin. Bei der Abbildung handelt es sich um eine schematische Darstellung von Psoriasin (S100A7). Dargestellt ist die Aminosäure-Sequenz, Sekundärstrukturen (Helix 1-5) und zusätzlich funktionelle Domänen mit EF-Motiv (Lee und Eckert *et al.*, 2007).

Die Bindung von Zink am C-terminalen Ende bewirkt ebenfalls eine Konformationsänderung (Brodersen *et al.*, 1998, 1999). Das menschliche Gen für Psoriasin wurde auf den chromosomalen Banden 1q21-q22 lokalisiert (Hardas *et al.*, 1996), wobei diese Region von einer Reihe von Genen, die von differenzierten Epidermiszellen exprimiert werden, kodiert werden (Mischke *et al.*, 1996; South *et al.*, 1999). Die Sequenzierung der menschlichen S100 Gene identifizierte 5 Kopien des S100A7-Gens (S100A7a- S100 A7e) im menschlichen Genom (Kulski *et al.*, 2003). Das molekularbiologische Modell und Strukturmodell von Psoriasin ist in Abb. 1.3. und 1.4. dargestellt. Gläser *et al.*, (2005) zeigen in ihrer Arbeit, dass nur S100A7c *in vivo* und *in vitro* exprimiert wird, währenddessen die anderen noch nicht charakterisierten Psoriasinvarianten ebenfalls in Hautproben detektiert werden können.

S100-Proteine wirken in vielen verschiedenen biologischen Prozessen mit und sind an der Signaltransduktion beteiligt. Weiterhin übernehmen sie wichtige Funktion des Zytoskeletts. Sie wirken bei parakrinen Signalübertragungen sowie bei Proliferationsvorgängen, Differenzierung und Entzündungsreaktionen mit (Schäfer *et al.*, 1996).

Es ist bekannt, dass die Tränenflüssigkeit verschiedene, antibakteriell wirkende Substanzen enthält. Die Substanzen werden von unterschiedlichen Zellen der Tränendrüse, der akzessorischen Tränendrüsen, der Konjunktiva und der Kornea

1. Einführung

synthetisiert. Am besten beschrieben und untersucht ist die antimikrobielle Substanz Lysozym (Fleming, 1922), die hauptsächlich gegen gram-positive Bakterien wirksam ist. Weitere Substanzen sind das Enzym Lysin, das die Zellmembran von Bakterien zerstört und mit Lysozym synergistisch wirkt (Pleyer und Baatz, 1997), das eisenbindende Protein Lactoferrin, das *Bacillus subtilis*, *Staphylokokkus aureus*, *Staphylokokkus epidermidis* und *Pseudomonas aeruginosa* im Wachstum inhibiert (Oram und Reiter, 1979; Kijlstra, 1990), sowie Komplementfaktoren des alternativen Weges, die direkt durch mikrobielle Produkte wie beispielsweise Endotoxin aktiviert werden (Fearson und Austen, 1980).

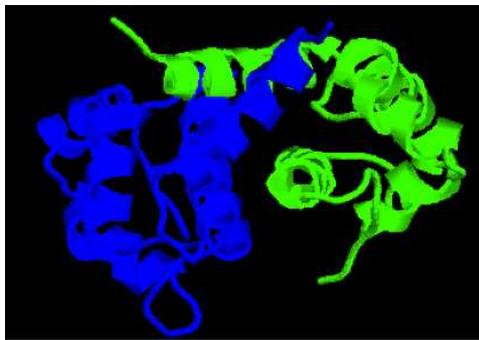


Abb. 1.4. Molekularbiochemisches Modell von Psoriasin. Grün und Blau stellen jeweils ein typisches Monomer des S100-Proteins dar, das wiederum aus zwei kalziumbindenden EF-hand Motiven besteht (Donato, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grundlage der bekannten Daten untersucht, ob Psoriasin von okulären Geweben exprimiert und in die Tränenflüssigkeit abgegeben wird. Welche Rolle Psoriasin in diesem komplexen System spielt, ob es andere antimikrobielle Peptide beeinflusst und durch verschiedene Metabolismen induzierbar ist, kann im Hinblick auf die Behandlung verschiedener Augenerkrankungen von größtem Interesse sein.

2. Zielstellung

2. Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Produktion, Regulation und Funktion von Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat zu untersuchen. Dabei wird das Hauptaugenmerk der Versuchsreihen auf folgenden Punkte gelegt:

1. Eine Schlüsselregion ist das okuläre Gewebe als Hauptproduktionsort. Hier sollen die Konzentration und das Expressionsmuster von Psoriasin analysiert werden.
2. Das Ergebnis von Gläser *et al.* (2005), dass Psoriasin besonders in den Talgdrüsen der menschlichen Haut gebildet wird, macht die Meibomdrüsen der Augenlider zu einem weiteren Forschungsziel dieser Arbeit. Analog sollen auch hier die Konzentration und das Expressionsmuster von Psoriasin bestimmt werden.
3. Ein drittes Ziel ist die Bestimmung von Psoriasin in der menschlichen Tränenflüssigkeit mittels ELISA. Im Tränenfilm wurden bereits zahlreiche AMP in hoher Konzentration nachgewiesen (Schlorf, 2005), weshalb das Vorkommen von Psoriasin anzunehmen ist.
4. Experimentell konnte bereits gezeigt werden, dass Psoriasin an der Haut besonders effektiv gegen *E. coli* wirksam ist. Eine geringere Sensitivität wurde dagegen für *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* festgestellt (Gläser *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit soll mittels Zellkulturexperimenten an einer Kornea-, einer Konjunktiva- und einer Sebozytenzelllinie (Talgdrüsenzelllinie) geklärt werden, inwiefern Psoriasin an der Augenoberfläche von Bakterienbestandteilen reguliert wird. Die genannten Zellkulturen sollen dabei mit Bakterienüberständen von *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* stimuliert und mittels Real Time PCR ausgewertet werden.
5. Erste vielversprechende Stimulationsversuche mit Zytokinen (HBD 1-4, VEGF, EGF, IL-1 β , TNF α , INF γ), die im Rahmen einer Diplomarbeit von Schlorf (2005) durchgeführt wurden, weisen auf ein unterschiedliches Expressionsmuster von Psoriasin in der Kornea- und Konjunktivaepithelzelllinie hin. Ein letztes Ziel soll die Überprüfung und Erweiterung der von Schlorf erbrachten Ergebnisse sein. Dieser erhielt nach Stimulation mit Zytokinen ein unterschiedliches Expressionsmuster von Psoriasin in kultivierten Korneaepithelzellen. Aus diesem Grund sollen Korneaepithelzelllinien mit IL-1 β , VEGF, TNF α und TFF3 Peptiden stimuliert und die relative Psoriasinexpression mittels Real Time PCR untersucht werden.

3. Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

Brutschrank	Forma Series II Water Jacketed Co2- Incubatio Hepa Class 100
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapierscheibchen	Whatman Filterpapier Nr. 1450 070
Gelkassetten	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gelkammer	Agagel Maxi, Biometra
Microtom	Microm GmbH Type HM400R
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Germany
Nitrocellulose Membran	Kodak BioMax MS-1 Film
PCR-Geräte	PTC-200 Peltier Thermal Cycler Mastercycler gradient Eppendorf
PCR Softtubes	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Petrischalen	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Photomikroskop	Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland
Pipette 5, 10, 50 ml	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen, kristall	0,5-10 µl Biozym, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen, gelb 5-100 µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen, blau 100-1000 µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Real Time PCR	PTC-200 DNA Engine Cycler CFD-3200 Opticon 2 Detector MJ Research
Real Time PCR-Software	Opticon Monitor 2 MJ Research
Röntgenkassette	Typ G 24 x 30 cm Rego
SpeedVac	Genevac SF50, Biometra

3. Material und Methoden

Spektrometer	Ultrospec 3300 pro Amersham Bioscience, NJ, USA
Sterilbank	Thermo electron corporation Holton Lamin Air
Western Blot	ChemiDoc-It Imaging System, UVP
Zellkulturflaschen (50 ml, 25 cm)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5415C Eppendorf
Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland

3.2 Chemikalien

Acrylamid Solution	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
AEC Substratlösung	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Anti-Psoriasis/HID5	Imgenix, San Diego, USA
Anti-Psoriasis IgG (Klon HL15-4)	Gläser <i>et al.</i> , 2005
Anti-Psoriasis IgG (Klon HL44-8)	Gläser <i>et al.</i> , 2005
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Biotinylierte Zweitantikörper	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Bradford-Reagenz	Bio-RAD Laboratories GmbH
Bromphenol Blau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
10 mM dNTP's	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol	(99,8%) Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Entwickler-6 Fixierlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (GBX)

3. Material und Methoden

Fetales Kälberserum (FCS)	Developer & Fixer Twin Pack), Taufkirchen, Deutschland
Hybond-ECL	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, NJ, USA
Milchpulver (Sucofin)	Amersham Biosciences, NJ, USA
Medium: DMEM/HAM's F12	TSI Trade Service Int., Zeven, Deutschland
Medium: Sebomed basal (complete)	Biochrom, Berlin, Deutschland
50 mM MgCl ₂	Biochrom, Berlin, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
0,9% NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Normalserum	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Kaninchenserum DAKO	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
10 x PCR Buffer (-MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Platinum SYBR-Green qPCR SuperMix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phosphataseinhibitor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Oligo (dT) 18-Primer	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
RNase-Free Water	Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
RLT-Buffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RQ 1 DNase 10 x Reaktion-Buffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RQ 1 DNase Stop-Solution	Promega, Mannheim, Deutschland
	Promega, Mannheim, Deutschland

3. Material und Methoden

RQ 1 Rnase-Free Dnase (1 Units/ μ l)	Promega, Mannheim, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfat)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Strept ABComplex/HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG und Kaninchen anti-Maus IgG)	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland (biotinylierter Zweitantikörper)
Super Script II RNase H (200Units/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA Polymerase (5 Units/ μ l) Kit TEMED	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Bio- RAD Laboratories GmbH
Tris` (Tris` (hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	Reagent Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
30% Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

3.3. Sterilisation von Lösungen und Geräten

Hitzeunempfindliche Lösungen und Verbrauchsmaterialien werden für 20 min bei 120°C und 1 bar Überdruck im Autoklaven behandelt. Hitzeempfindliche Lösungen werden über einem Filter mit 0.2 μ m Porengröße steril filtriert.

3.4. Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandard	DNA Molecular Weight Marker VIII (0.019-1.11 kbp), Roche Diagnostics
--------------------	---

3. Material und Methoden

	GmbH, Penzberg, Deutschland
MassRuler™ DNA Ladder, Low Range	(80-1031 bp), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Protein-Längenstandards	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (11-170 kDa), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

3.5. Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

3.5.1. Gewebeproben

Für histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen werden Gewebeproben aus Konjunktiva, Kornea, Glandula lacrimalis, Ductus nasolacrimalis und Augenlid von 3 männlichen und 18 weiblichen Körperspendern im Alter von 22-92 Jahren entnommen, die sich am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg testamentarisch für Wissenschaft und Lehre verfügt haben. Die Körperspender sind frei von Traumen, Augen- und Naseninfektionen oder Erkrankungen/Verletzungen, die die Augenoberfläche und den Tränenapparat beeinflussen könnten. Die Gewebeproben werden in einem Zeitraum von 4 bis 24 Stunden post mortem entnommen und werden bis zur Untersuchung bei -80 °C gelagert oder in Paraffin eingebettet.

Zum Nachweis von Psoriasin in Tränenflüssigkeit wird diese von 2 gesunden weiblichen Probanden im Alter von 23 und 39 Jahren und 2 gesunden männlichen Probanden im Alter von 26 und 42 Jahren mittels Schirmerteststreifen gewonnen.

3.5.2. Zelllinien

Humane Konjunktivaepithelzelllinie (HCjE)

Die spontan immortalisierte HCjE-Zelllinie repräsentiert weitgehend die menschliche Konjunktiva hinsichtlich morphologischer und funktioneller Eigenschaften. Eine Chromosomenanalyse hat die humane Herkunft der HCjE-Zelllinie bestätigt (Diebold *et al.*, 2003). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Yolanda Diebold, Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid, Spanien, zur Verfügung gestellt.

3. Material und Methoden

Humane Korneaepithelzelllinie (HCE)

Die HCE-Zelllinie wird generiert, indem primär kultivierte humane korneale Epithelzellen (entnommen von einer Spenderhornhaut) mit einem rekombinanten SV-40 Adenovirus immortalisiert werden. Sie sind mit humanen kornealen Epithelzellen vergleichbar (Araki-Sasaki *et al.*, 1995). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Kaoru Araki-Sasaki, Tane Memorial Eye Hospital, Osaka, Japan, zur Verfügung gestellt.

Sebozytenzelllinie (SZ)

Die SZ-Zelllinie ist eine immortalisierte Zelllinie, die den menschlichen Talgdrüsen morphologisch, phenotypisch und funktional entspricht. Sie wird mit Hilfe eines SV-40 large-T Antigen generiert und zeigt auch nach 25-40 Passagen noch eine Lipidsynthese, bei der die Produktion von Squalen, Wachsesteren, freien Fettsäuren und Triglyceriden nachgewiesen werden kann. Zusätzlich werden die für Sebozyten typischen Keratine 7, 13 und 19 exprimiert (Zouboulis *et al.*, 1999). Die SZ-Zelllinien werden in dieser Arbeit verwendet, weil sie dem Aufbau humaner Meibomdrüsenzellen morphologisch und funktional ähneln und so zum weiteren Erkenntnisgewinn der Psoriasinexpression in humanen Meibomdrüsen beitragen. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Christos C. Zouboulis, Klinik für Dermatologie, Städtisches Klinikum Dessau, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

3.5.3. Medien und Kultivierung

Medien der HCE- und der HCE-Zelllinien

- DMEM/HAM's F-12 (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Zusatz: 10% fetales Kälberserum
- phosphatgepufferte Saline (PBS)
- 0,25%-ige Trypsin/EDTA-Lösung
- Insulin
- Hydrocortisol

Sebozytenzellmedium

- Sebomed basal medium (with stable glutamine w/o phenol red, cat.No.F8205) (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Zusatz: 10% fetales Kälberserum
- 5 ng/ml rh EGF (recombinant human epidermal growth factor)

3. Material und Methoden

- Penicillin/ Streptomycin (1000 U/1000 µg/ml)
- 1mM CaHCl₂

Kultivierung

Die HCjE- und HCE-Zelllinie werden in sterilen Gewebekulturflaschen als Monolayer kultiviert. Das Medium, DMEM/HAM's F12 im Verhältnis 1:1, wird mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Zusätzlich wird das Medium der Konjunktivaepithelzellen mit 1 µg/ml Insulin und 5 µg/ml Hydrocortisol angereichert. Die Sebozyten werden in Sebomed Basal Medium kultiviert und bei einem Konfluenzgrad von 50-70% im Verhältnis 1:3 verbreitet. Der Mediumwechsel erfolgt bei allen drei Zelllinien alle 2-3 Tage; auf weitere Zusätze wie Antibiotika wird verzichtet. Die Zellkulturen wachsen in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 21% Sauerstoff. Die Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt.

3.5.4. Aussaat der Zelllinien

Um in einem späteren Arbeitsschritt die Zellen zu stimulieren, werden sie auf mehreren Glasschalen ausgesät. Zum Ablösen der Zellen von den Kulturflaschenböden werden diese erst mit PBS gespült und anschließend mit 1 ml Trypsin behandelt. Nach Ablösung wird 1 ml Medium hinzu pipettiert und bei 1000 U für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das entstandene Pellet in 2-5 ml Medium resuspendiert. Um in allen Glasschalen eine bestimmte Zellanzahl aussäen zu können, wird die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt und die errechnete Zellmenge kann im letzten Schritt auf 3 ml Medium in die Glasschalen pipettiert werden.

3.5.5. Stimulation der Zelllinien

Um die Psoriasinkonzentration nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Bakterienüberständen (Tabelle 1 und 2) zu untersuchen, werden die Zellen zunächst 2 h in serumfreiem Medium kultiviert. Nach Zugabe des jeweiligen Stimulanz in FKS-freiem Medium werden die Zellen über den Versuchszeitraum weiter im CO₂-Brutschrank kultiviert (Tab. 3.1. und 3.2.). Nach Beendigung der Stimulationsversuche wird der Medienüberstand in sterile Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -90°C gelagert. Die Zellen werden für die RNA-Isolierung mit Trizol abgelöst und bis zur weiteren

3. Material und Methoden

Aufarbeitung bei -90°C gelagert.

Tab. 3.1. Stimulation der Zelllinien mit Bakterienüberständen. Die HCjE-, HCE- und die SZ-Zelllinien werden jeweils mit Bakterienüberständen von *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* 16 h stimuliert. Zur Kontrolle werden alle 3 Zelllinien mit TSB inkubiert und den gesamten Versuch unter gleichen Bedingungen mitgeführt.

Zelllinie	Stimulanz	Verdünnung Bakterienüberstände: Medium
SZ	<i>E. coli</i>	1:3
HCjE	<i>S. aureus</i>	1:15
HCE	<i>P. aeruginosa</i>	1:100
	<i>C. cepacia</i>	1:100
	Kontrolle (TSB)	1:100

Tab. 3.2. Stimulation der HCE-Zelllinie mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Die HCE-Zellen werden jeweils mit IL-1 β , VEGF, TNF α oder TFF3 in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Die Stimulationsdauer beträgt 24 h. Zusätzlich wird mit 5 ng/ml IL-1 β für 6, 12 und 24 h stimuliert. Die in BSA-Lösung inkubierten Kontrollen werden den gesamten Versuch unter gleichen Bedingungen mitgeführt.

Zelllinien	Verdünnung	Verdünnung x ng oder μ g Stimulanz/Medium in ml	Zeit in h
HCE	IL-1 β	5 ng/ml	24
HCE	IL-1 β	10 ng/ml	24
HCE	IL-1 β	20 ng/ml	24
HCE	IL-1 β	50 ng/ml	24
HCE	IL-1 β	5 ng/ml	6
HCE	IL-1 β	5 ng/ml	12
HCE	IL-1 β	5 ng/ml	24
HCE	VEGF	5 ng/ml	24
HCE	VEGF	10 ng/ml	24
HCE	VEGF	20 ng/ml	24
HCE	VEGF	50 ng/ml	24
HCE	TNF α	20 ng/ml	24
HCE	TNF α	50 ng/ml	24
HCE	TFF3	0.01 μ g/ml	24
HCE	TFF3	0.1 μ g/ml	24
HCE	TFF3	1 μ g/ml	24
HCE	TFF3	10 μ g/ml	24
HCE	Kontrolle (BSA)	1 μ g/ml	24

Herstellung der Bakterienüberstände

Die Bakterien werden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln in je 10 ml TSB gezüchtet. In einem Aliquot wird die bakterielle Keimzahl pro ml bestimmt. Zu diesem Zweck werden bakterielle Aliquots jedes Stammes in Zehnerreihen verdünnt (10^0 bis 10^{-9}) und anschließend auf Blutagar (Columbia-Agar mit 10% Schafsblut, Heipha, Eppelheim)

3. Material und Methoden

ausplattiert und die Kolonien ausgezählt. Die Bakterien werden abzentrifugiert (6000 rpm für 30 min), die Überstände aufgehoben und zweimal steril filtriert (Millipor-Sterilfilter 0.2 µm Porengrösse). Von jedem Überstand wird ein Aliquot auf Blutagar ausplattiert und für 2 Tage bebrütet um die Keimfreiheit zu belegen. 1 ml des sterilen Filtrats wird abgefüllt und bei -20 °C eingefroren.

Zusätzlich wird 1 Aliquot TSB (= Medium, in dem die Bakterienüberstände hergestellt werden) als Leerwertkontrolle verwendet. Die Bakterienüberstände wurden freundlicherweise von Dr. Dieter Worlitzsch, Institut für Hygiene der MLU Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt.

3.6. RNA-Isolierung

Zur Extraktion der RNA aus Zellen werden diese mit 1 ml Trizol pro Petrischale abgelöst. Trizol zersetzt die Zellbestandteile, erhält jedoch die Integrität der RNA. Nach Zugabe von 0.2 ml Chloroform wird die Suspension gevortext. Anschließend wird für einen Zeitraum von 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 10.000 U und 4 °C zentrifugiert. Die RNA befindet sich nun in der oberen wässrigen Schicht und kann vorsichtig in vorgekühlte 1.5 ml Eppendorftubes überführt werden. Zur Fällung der RNA wird das identische Volumen Isopropanol zugegeben, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird nochmals gevortext und 10 min bei 10.000 U zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 µl DEPC Wasser resuspendiert und anschließend ein DNase-Verdau (30 min, 37 °C) durchgeführt (Tab. 3.3.).

Tab. 3.3. DNase-Verdau. In der abgebildeten Tabelle sind die verwendeten Reagenzien für den DNase-Verdau dargestellt. Verwendete DNase: RNase-Free DNase (Promega).

	Volumen
1 U DNase	1 µl
RNA-Lösungen aus Extraktion	1 µl
10 x DNase Buffer	6 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
DEPC-Wasser	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Die Inaktivierung der DNase erfolgt bei 65 °C für 10 min im Heizblock, nach Zugabe von 6 µl der Stop Solution. Die RNA wird mit 6 µl 3M Natriumacetat und 200 µl Isopropanol bei -20 °C ausgefällt und anschließend für 30 min bei 10.000 U zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 1 ml 75% ETOH/DEPC gewaschen und 5 min bei 10.000 U zentrifugiert. Die Proben werden in der SpeedVac getrocknet und in 30-

3. Material und Methoden

50 µl DEPC Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.7. RNA-Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung und Aufreinigung der RNA aus menschlichem Gewebe erfolgt mittels RNeasy-Mini-Kit-Protokoll des Herstellers Qiagen. Dazu werden zunächst die zu verarbeitenden Proben in flüssigen Stickstoff aufgenommen und in einem vorgekühlten Mörser mit einem Stößel zerkleinert. Das Gewebepulver wird in vorgekühlte 2 ml Eppendorftubes verteilt und RLT-Puffer, dem 10 µl Mercaptoethanol/1ml RLT zugesetzt wird, hinzu pipettiert. Dabei werden 350 µl RLT-Puffer bei weniger als 30 mg Gewebe und 600 µl RLT-Puffer bei mehr als 30 mg Gewebe verwendet. Daraufhin erfolgt die Homogenisierung des Gewebes mittels Ultra-Turrax und anschließend die Zentrifugation des Gewebslysates bei 20 °C (3 min bei 13.000 U). Im letzten Schritt werden auf die Proben 50 µl RNase-freies Wasser pipettiert und 1 min bei 10.000 U zentrifugiert. Die erhaltene RNA muss sofort auf Eis gestellt werden.

3.8. Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wird durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience) bestimmt. Aufgrund der Spektralcharakteristika ihrer Basen, die ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen, absorbieren Nukleinsäuren Licht bei einer Wellenlänge von 250-270 nm. Bei Verdünnung der RNA in Wasser entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 42.1 µg/ml Gesamt-RNA (Sambrook *et al.*, 1989). Vor der Messung wird die RNA Lösung mit DEPC-Wasser 1:100 verdünnt und das Spektrophotometer mit 100 µl DEPC-Wasser auf Null geeicht. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} erlaubt einen Rückschluss auf die Reinheit der isolierten RNA. Für sehr reine RNA gilt dann: $OD_{260}/OD_{280} = 1.9 - 2.1$. Diese RNA wird für die weiteren Experimente verwendet.

3.9. Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Kogan *et al.*, 1987). Da die RNA nur in geringer Konzentration in den Zellen vorhanden ist, wird, um bestimmte Sequenzen in dem RNA-Gemisch

3. Material und Methoden

nachzuweisen, die selektive Amplifikation der Sequenzen durchgeführt. Die mRNA muss zunächst durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Das Enzym benötigt als Startpunkt ein kurzes Stück einer Doppelstrang-Nukleinsäure. Als Primer werden p(dt)-Oligomere eingesetzt, die mit den Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren und den Startpunkt für die Transkription liefern. Zur Durchführung der Reversen Transkription wird das Superscript™ II-RT-Kit von Invitrogen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach folgendem Standardprotokoll verwendet:

Tab. 3.4. Reverse Transkription. Ansatz 1

	Volumen
RNA	1 µl/2 µl
Oligo (dt) Primer	1 µl
RNase freies Wasser	Variable Menge in µl
Gesamtvolumen	11 µl

Der Reaktionsansatz wird bei 70 °C für 5 min inkubiert. Im Anschluss werden die Eppendorftubes wieder auf Eis gestellt und folgende Reagenzien zugefügt:

Tab. 3.5. Reverse Transkription. Ansatz 2

	Volumen
5 x Buffer	4 µl
10 mM dNTP's	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
RNase freies Wasser	1 µl
Gesamtvolumen	19 µl

Der Ansatz wird 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend werden zu jeder Probe 1 µl RevertAid-Reverse-Transkriptase pipettiert. Die Inkubation erfolgt bei 42 °C für 60 min und bei 70 °C für 10 min.

3.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann (Saiki, 1985). Durch eine hitzestabile Polymerase können mehrere Zyklen aus Aufschmelzen (Denaturierung) des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung (Annealing) sequenzspezifischer Oligonukleotide mit einem freien 3'-OH Ende (Primer) an die Ausgangs-DNA (Template, Matrix) und Synthese des komplementären Strangs

3. Material und Methoden

(Elongation) nacheinander ablaufen. Somit wird das Ausgangsprodukt in einem Zyklus verdoppelt. Geringe DNA-Mengen können so amplifiziert werden, dass sie anschließend durch die Agarosegel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden können. Der PCR-Reaktionsansatz ist in Tab. 3.6. aufgelistet. Für die PCR-Reaktionen werden jeweils 1 bis 2 µl cDNA eingesetzt und ein Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Bio-Rad Laboratories Inc.) genutzt. Das Standardreaktionsprogramm ist in Tab. 1.7. beschrieben. Als interne Kontrolle der Integrität und Stabilität der synthetisierten cDNA Proben wird zunächst eine β -Aktin PCR durchgeführt und diese elektrophoretisch ausgewertet.

Tab. 3.6. PCR. Darstellung der PCR Ansätze für β -Aktin und Psoriasisin.

	Volumen Aktin	Volumen Psoriasisin
Primer Mix	0.6 µl	0.6 µl
10 mM dNTP's	0.6 µl	0.6 µl
10 x Buffer (-MgCl ₂)	3 µl	3 µl
50 mM MgCl ₂	0.9 µl	0.9 µl
PCR-Wasser	23.72 µl	22.72 µl
Tag-Polymerase	0.18 µl	0.18 µl
Gesamtvolumen	29 µl	29 µl
c-DNA	1 µl	2 µl
Gesamtvolumen + c-DNA	30 µl	30 µl

Tab. 3.7. PCR- Programme für β -Aktin und Psoriasisin.

	Schritt	Aktin		Psoriasisin	
		Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
1.	Denaturierung	95 °C	120 s	95 °C	120 s
2.	Denaturierung	95 °C	20 s	95 °C	20 s
3.	Annealing	57 °C	30 s	62 °C	30 s
	Elongation	72 °C	40 s	72 °C	40 s
	Zyklen: Schritt 2-4	27		40	

3.11. Real Time 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 Proben wird das DNA Engine Opticon® 2 System (MJ Research) verwendet. Für die Realtime RT-PCR Reaktionen wird ein SYBR Green

3. Material und Methoden

Master Mix von Applied Biosystems genutzt. Der Real Time PCR Ansatz ist in Tab. 3.8. dargestellt. Das Standardprogramm für die Realtime RT-PCR ist in Tab. 3.10. und die für die einzelnen Gene verwendeten PCR-Primer und Annealingtemperaturen sind in Tabelle 3.9. aufgelistet.

Tab. 3.8. Real Time PCR-Ansatz.

	Volumen
SYBR-Green qPCR Supermix	10 µl
PCR-Wasser	5.2 µl
Primer-Mix	12.8 µl
c-DNA	4 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 3.9. PCR-Primer. Darstellung der verwendeten PCR-Primer mit zugehöriger Sequenz, Größe und Schmelztemperatur, die für Aktin und Psoriasis angegeben sind.

Primer		Sequenz	Produktgröße	Schmelztemperatur
Aktin	Sense	5'-CAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'	275 bp	87 °C
	Antisense	5'-TCCTCCTGCATCCTGTCGGCA-3'		
Psoriasis	Sense	5'-CACACATCTCACTCATCCTTCTACTCG-3'	160 bp	81 °C
	Antisense	5'-GTTCTCCTTCATCATCGTCAGCAG-3'		

Zur Berechnung der Realtime RT-PCR Effizienz für die einzelnen Gene wird 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) lässt sich die Effizienz für die einzelnen Realtime RT-PCR Reaktionen bestimmen. Für die relative Quantifizierung wird 18s rRNA als Referenzgen benutzt. Das Referenzgen wird im Stimulationsmodell konstant exprimiert und bietet damit die Möglichkeit zur Normalisierung der Expressionsanalysen. Die Auswertung erfolgt nach der delta delta ct-Methode. Die Realtime RT-PCR findet in Doppelbestimmung an jeder einzelnen Probe statt und wird, um falsch-positive Fluoreszenzsignale durch Primer-Dimere auszuschließen, nach jedem Lauf mittels Schmelzkurvenanalyse (55 °C bis 95 °C) überprüft und ausgewertet.

3. Material und Methoden

Tab. 3.10. Real Time PCR. PCR-Zyklen für Psoriasisin mit Angabe von Zeit und Temperatur.

	Schritte	Temperatur	Zeit
1.	Enzymaktivierung	50 °C	120 s
2.	Denaturierung	95 °C	600 s
3.	Denaturierung	95 °C	20 s
4.	Annealing	62 °C	60 s
5.	Elongation	72 °C	30 s
6.	Messung		
	40 Zyklen Schritt 3-6		
7.	Schmelzkurve	60 °C-90 °C	1 s jeweils 0.5 °C

3.12. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wandern aufgrund der negativen Nettoladung ihrer Phosphatgruppen im elektrischen Feld zur Anode. Bei Wanderung durch die Maschenstruktur des Agarosegels erfolgt eine Auftrennung nach Größe und Form der Nukleinsäuren. Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wird Agarose in TAE Puffer (40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 8) aufgekocht, auf etwa 55° C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt und in entsprechende Gelkammern aus Plexiglas gegossen. Die DNA-Proben werden mit Ladepuffer gemischt, in die Geltaschen pipettiert und mit einer Spannung von 80-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Ein niedermolekularer Farbstoff wie Bromphenolblau dient als Farbmaler um den Fortschritt der Elektrophorese abschätzen zu können. Die Größe der DNA-Fragmente wird durch einen Größenstandard bestimmt. Als Längenstandard wird der DNA Molecular Weight Marker 2 von Roche (0.019 bis 1.11 kbp) verwendet. Durch das Ethidiumbromid, das in doppelsträngige DNA interkaliert, können die DNA-Fragmente im Transluminator mit UV-Licht durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

3.13. Immunhistochemische Reaktion nach der ABC Methode

Die ABC Methode dient der Untersuchung der Psoriasisin Expression in Paraffinschnitten des untersuchten Gewebes. Für immunhistochemische Untersuchungen werden die Präparate wie folgt aufbereitet. Zunächst werden die Gewebeproben in 4% Paraformaldehyd für 24 h fixiert, anschließend wird die Fixierlösung 24 h unter fließendem Wasser ausgewaschen. In einem weiteren Schritt werden die Präparate mit Xylol in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-100%) entwässert und in Paraplast eingebettet.

Mit dem Grundschlittenmikrotom der Fa. Leitz werden Paraffinschnitte von 7 µm

3. Material und Methoden

Schnittdicke angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Für jede Probe wird eine Negativkontrolle mitgeführt, die statt des Primärantikörpers mit TBS-Puffer inkubiert wird. Als Positivkontrolle dient für Psoriasin das Plattenepithel des Augenlides. Die Schnitte werden auf Objektträger aufgebracht und bei 60 °C im Wärmeschrank über Nacht getrocknet. Danach erfolgt die Entparaffinierung der Schnitte in einem Xylol-Bad für zweimal 10 min und anschließend Hydratation in einer absteigenden Alkoholreihe in Aqua-dest. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität werden die Schnitte 30 min in 3% Wasserstoffperoxid getaucht und anschließend dreimal mit Sera-dest. gespült. Zur Antisensedemaskierung werden die Schnitte in frisch hergestelltem Citratpuffer (pH: 6) in der Mikrowelle 15 min bei 400 W gekocht.

Das Gewebe wird 20 min mit Kaninchen-Normalserum (entspricht dem Wirtstier des Zweitantikörpers) und jeweils 10 min mit einem Avidin-Biotin-Blocking-Kit behandelt, um eine übermäßig starke, unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern. Nach Spülen mit TBS werden die Gewebeschnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Anti-Psoriasin/HID5, Imagenex, Psoriasin aus der Maus 1:100) inkubiert. Am nächsten Tag wird nicht gebundener Primärantikörper durch Spülen mit TBS entfernt und der biotinylierte Sekundärantikörper (DAKO, Kaninchen Anti-Maus 1:200 mit TBS) 60 min auf die Schnitte aufgetragen. Nach Abspülen des nichtgebundenen Sekundärantikörpers wird Strept ABComplex/HRP Lösung auf die Objektträger aufgetragen. Es handelt sich um einen löslichen Komplex, der aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase besteht. In der vorliegenden Arbeit wird 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet. AEC bildet unter Oxidation ein rotes Endprodukt, das alkohollöslich ist. Die Färbezeit (15 s bis 1 min) richtet sich nach der Intensität der rötlichen Färbung, die auf dem Gewebe auftritt. Es folgt das Abschlagen der Substanzen von den Schnitten und anschließend Gegenfärbung für 2 min in Hämalaun nach Meyer. Abschließend werden die Schnitte mit Aquadex eingedeckt und bis zur Auswertung an einem Mikroskop (Axiophot, Zeiss) bei Raumtemperatur gelagert.

3.14. Proteinisolierung aus Gewebe

Die zu untersuchenden Gewebeproben werden in flüssigem Stickstoff aufgenommen und mechanisch in einem Mörser zerkleinert. Anschließend werden 200 µl in ein 2 ml Eppendorf tube gegeben. Nach Zugabe von 300 µl Triton Puffer wird das Gewebe mit dem Ultra Turrax homogenisiert. In einem weiteren Schritt werden jeweils 10 µl Phosphatase Inhibitor (1 ml/100 ml) und Proteaseninhibitor (2 µl/1 ml) zugegeben und

3. Material und Methoden

die Proben 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird zentrifugiert (bei 4 °C, 13.000 U für 30 min). Der Überstand wird in 1.5 ml Eppendorftubes pipettiert und die Proteinkonzentration wird mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt.

3.15. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bradford-Methode ist eine gebräuchliche Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. 200 µl des Bradford-Reagenz werden mit 800 µl Reinstwasser und 1 µl des Proteingemisches in ein 1.5 ml Eppendorftube gegeben. Mittels Photometer wird bei einer Wellenlänge von 595 nm die Absorption bestimmt. Als Standard dient eine entsprechende Leerprobe. Der Wert vom Photometer wird anschließend durch den Korrelationsfaktor 0.0781, der aus einer vorher ermittelten Eichkurve bestimmt wird, geteilt und der so erhaltene Wert entspricht der Proteinkonzentration in µg/µl. Die Proteine werden abschließend wieder bei -80 °C gelagert.

3.16. Western Blot

Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, wodurch die Proteine anschließend durch immunologische Reaktionen nachgewiesen werden können.

Zur Analyse von Proteingemischen werden die Proteine zunächst nach der Laemmli-Methode unter denaturierenden Bedingungen in der SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. 40 µg der Proteine eines Zellextraktes werden mit 15 µl RSB- Puffer versetzt. Nach diesem Schritt werden die Proben bei 9000 U/min kurz anzentrifugiert und im Heizblock bei 90 °C für 5 min aufgeköcht. Im Anschluss erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Proben in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel (Tab. 3.11.).

3. Material und Methoden

Tab. 3.11. Western Blot. Darstellung der Reagenzien zur Herstellung der Gele für die Western Blot Analyse. Die Gelkammer wird mit dem unteren Trenngel (12%) und einem oberen Sammelgel gefüllt, durch das die Proteine schnell wandern können.

	Trenngel 12 %		Sammelgel 4 %	
Unteres Gel	Acrylamid (30%)	4 µl	Acrylamid (30 %)	1 µl
	Solution 1	2.5 µl	Solution 2	2.5 µl
	Reinstwasser	3.5 µl	Reinstwasser	6.5 µl
Konstanter Teil	Temed	20 µl	Temed	20 µl
	APS	100 µl	APS	100 µl

Dazu wird die Gelkammer mit einem unteren Trenngel gefüllt. Nachdem das untere Trenngel ausgehärtet ist, wird das obere Sammelgel darauf gegossen. Das obere Gel ist niedriger konzentriert und die Proteine können es schnell durchwandern. Die gesamte Probenmenge wird in die vorgesehenen Taschen pipettiert, wobei 5 µl des Markers (SeeBlue Prestain Protein) aufgetragen werden. In die leeren Taschen werden 10 µl des Probenpuffers gefüllt, um einen gleichmäßigen Lauf zu gewährleisten. Bei 125 V ist nach einer Laufzeit von 90-120 min eine ausreichende Auftrennung der Proteine erreicht. Nach Ende des Programms wird das Gel vorsichtig aus der Kammer genommen, in eine neue Kammer gelegt und mit 125 mA 90 min geblottet. Nach Transfer der Proteine in die Membran wird diese 5 min mit Ponceau angefärbt und anschließend mit Reinstwasser wieder entfärbt. So wird die Effizienz des Western Blot Transfers überprüft. Die sichtbar werdenden Proteinbanden auf der Membran werden in eine Folie gelegt und kopiert. Zu Beginn der Antikörperreaktion wird die Membran mit 5% BSA für 60 min bei Raumtemperatur geblockt und anschließend mit dem Primärantikörper (Anti-Psoriasin/HID5, Imagenex, Psoriasis aus der Maus, 1:500 in 2 ml BSA verdünnt) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt dreimal eine 10-minütige Spülung mit TBS-T, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wird mit dem Sekundärantikörper (DakoCytomation, Ziege anti Maus, 1:8000 in Milchpulver verdünnt) 2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 15 min mit TBS-T und 1 x 5 min mit TBS) erfolgt die Detektion mit Hilfe des zwei Komponenten-Chemilumineszenz-Verstärkersystems (ECL-Mix). Lösung A und B werden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die am Sekundärantikörper haftende Meerrettich-Peroxidase oxidiert unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid in das zyklische Diacylhydrazid Luminol und regt es dadurch an. Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Energieniveau wird Licht emittiert, das durch Phenol verlängert und um das 1000-fache verstärkt wird. Der Blot wird anschließend zum Schutz des Films vor Feuchtigkeit in Folie gelegt. Durch Auflegen eines speziellen hochempfindlichen Films in der Dunkelkammer erfolgt die Lokalisation der Chemilumineszenz auf dem Blot. Die

3. Material und Methoden

Dauer des Auflegens variiert je nach Menge des zu detektierenden Proteins oder der Qualität der Antikörpersysteme zwischen 5-60 min. Die Auswertung erfolgt, nachdem die Membran getrocknet ist.

3.17. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nach dem Sandwich-Prinzip

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf der Messung von enzymatischen Farbreaktionen basiert. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine, Viren und niedermolekulare Verbindungen (z.B. Hormone) nachgewiesen werden.

Ein mit einem Enzym markierter Antikörper bindet hierbei an das Antigen. Das Enzym spaltet zugegebenes TMB katalytisch auf und es erfolgt ein Farbumschlag der mit Fluoreszenz oder Chemilumineszenz gemessen werden kann. Die Signalstärke ist ein Maß für die Antigenkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit werden Sebozyen-, HCE- und HCJE Zelllinien mit Bakterienüberständen stimuliert und mit Hilfe einen spezifischen ELISA's auf die Psoriasinkonzentration untersucht. Ebenso wird Tränenflüssigkeit, die mit Schirmerteststreifen von gesunden Probanden gewonnen wurde, analysiert.

Für die Sandwich-ELISAs werden 100 µl des entsprechenden Capture-Antikörpers (0.6 µg/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 wird der Capture-Antikörper verworfen und die Mikrotiterplatte mit 200 µl Waschpuffer (1x PBS + 0.02% Tween20, 3 x 5 min) gewaschen. Nach 30 min Inkubation mit Blockierlösung (1% BSA im Waschpuffer) werden jeweils 100 µl der zu untersuchenden Proben, Standards und Hintergrundkontrollen (Waschpuffer mit 0.1% BSA) aufgetragen und bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit dem Waschpuffer werden die Ansätze mit 100 µl biotiniliertem Detektions-Antikörper (0.2 µg/ml in PBS + 0.1 BSA) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 100 µl Streptavidin-HRP (1:10000 in PBS + 0.1% Tween20) für 30 min dazugegeben. Für den enzymatischen Nachweis wird das Chromogen TMB (100 µl/Well, Sigma) verwendet. Die Nachweisreaktion wird 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.

Für die Standardkurve wird aus humaner Epidermis aufgereinigtes Psoriasin (0.6 bis 40 ng/ml) eingesetzt (Gläser *et al.*, 2005). Alle Proben werden grundsätzlich doppelt aufgetragen und aus diesen Werten der Mittelwert für die weitere Auswertung gebildet. Verdünnungsfaktoren werden immer in die Konzentrationsberechnung einbezogen.

3. Material und Methoden

3.18 Statistik

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 antimikrobiellen Peptide bezogen auf die Gesamtproteinmenge. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mittels Microsoft Excel unter Verwendung des zweiseitigen Students T-Test. Ein p-Wert unter 0.05 wird als statistisch signifikant angesehen und entsprechend gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. Expression von Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat

4.1.1. Psoriasinnachweis auf mRNA Ebene

Psoriasin ist im Gewebe der Augenoberfläche und im Gewebe der ableitenden Tränenwege nachweisbar. Mittels RT-PCR werden in Geweben von Körperspendern Psoriasin in der Meibomdrüse, im Augenlid, in der Glandula lacrimalis, in der Konjunktiva und im Ductus nasolacrimalis nachgewiesen. Zusätzlich werden Korneae untersucht, die im Rahmen einer Keratoplastik operativ entfernt und durch eine gesunde Kornea eines Spenders ersetzt wurden. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 4.1. dargestellt.

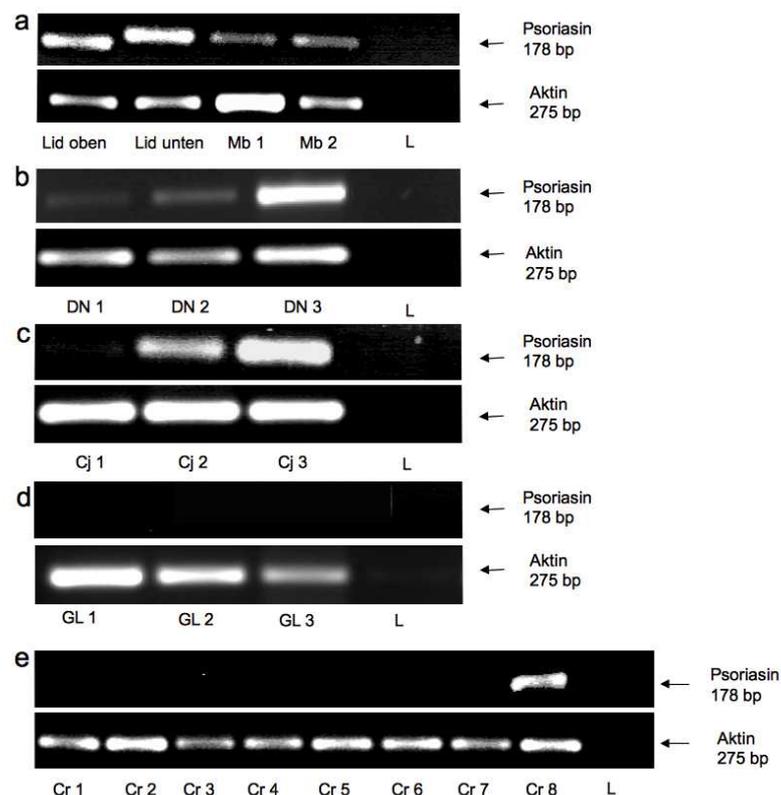


Abb. 4.1. Analyse der Psoriasinexpression mittels RT-PCR in verschiedenen Geweben der Augenoberfläche und ableitenden Tränenwegen. Im oberen Balken ist jeweils der Psoriasinnachweis in den jeweiligen Geweben **(a)** Augenlid (Lid oben und Lid unten), Meibomdrüse (Mb 1 und 2), **(b)** Ductus nasolacrimalis (DN 1, 2 und 3), **(c)** Konjunktiva (Cj 1, 2 und 3), **(d)** Glandula lacrimalis (GL 1, 2 und 3), **(e)** Kornea (Cr 1-8), Leerprobe (L) dargestellt (Basenpaarlänge Psoriasin = 178 bp). Im unteren Balken ist das Housekeeping- Gen β -Aktin dargestellt, das zur Kontrolle bei jeder Versuchsreihe mitgeführt wird (Basenpaarlänge β -Aktin = 275 bp).

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der cDNA konnte Psoriasin in 2 von 2 Augenlidern und 2 von 2 Meibomdrüsen nachgewiesen werden (Abb. 4.1. a). Weiterhin zeigt die RT-PCR ein positives Signal für 3 von 3 Ductus nasolacrimales und 2 von 3

4. Ergebnisse

Konjunktivae (Abb. 4.1. b und c). In den untersuchten Glandulae lacrimales ist Psoriasin nicht nachweisbar (Abb. 4.1. d). Nur in 1 von 8 Korneae Proben ist eine positive Psoriasinbande auf dem Gel sichtbar (Abb. 4.1. e). Diese Korneaprobe stammt von einem Patienten mit einer Herpesvirusinfektion.

4.1.2. Psoriasinnachweis auf Proteinebene mittels Western Blot

Die Ergebnisse der RT-PCR Analyse können in dieser Untersuchung auch proteinbiochemisch in einem Immunblotverfahren bestätigt werden. Verwendet werden die gleichen Präparate wie unter 4.1.1. beschrieben und die Ergebnisse sind in Abb. 4.2. dargestellt. Das Plattenepithel des Augenlides dient bei diesem Versuch als Positivkontrolle (Gläser *et al.*, 2005).

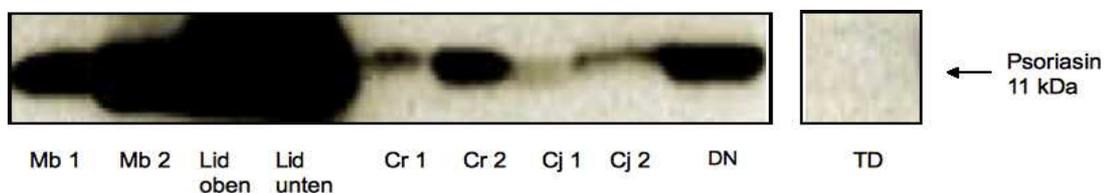


Abb. 4.2. Western Blot Analyse von Psoriasin aus Gewebe der Augenoberfläche und des ableitenden Tränensystems. In der Abb. ist eine Western Blot Membran dargestellt. Die Augenlidproben (Lid oben, Lid unten) werden als Kontrolle mitgeführt. Die Detektion von Psoriasin erfolgt bei 11 kDa durch einen monoklonalen Antikörper (Psoriasin Anti Maus). Augenlid (Lid oben, Lid unten), Meibomdrüse (Mb), Kornea (Cr), Konjunktiva (Cj), Ductus nasolacrimalis (DN) und Glandula lacrimalis (TD).

Das theoretische Molekulargewicht von Psoriasin beträgt 11 kDa und kann in der Kornea, Konjunktiva und Ductus nasolacrimalis detektiert werden. Eine besonders starke Psoriasinbande wird in der Meibomdrüse beobachtet. Wie erwartet ist bei der Positivkontrolle Augenlid eine starke Bande sichtbar. Der Psoriasinnachweis gelingt nicht in der Glandula lacrimalis.

4.1.3. Immunhistochemischer Nachweis

Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse werden jeweils 10 Paraffinschnitte von den in 4.1.1. und 4.1.2. verwendeten Gewebearten angefertigt und immunhistochemisch untersucht. Die Präparate werden mit der zugehörigen Negativkontrolle verglichen und als Positivkontrolle dient das Plattenepithel des Augenlides (Gläser *et al.*, 2005).

4. Ergebnisse

Augenlid

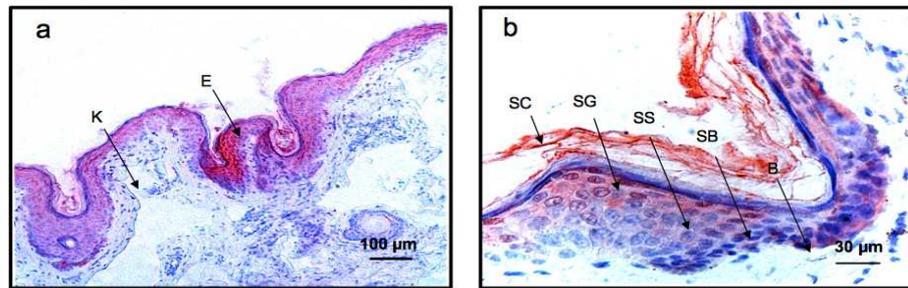


Abb. 4.3. Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasis im mehrschichtigen Plattenepithel des Augenlides. (a) und (b) zeigen einen Sagittalschnitt der Epidermis des Augenlides. (a) Von Außen nach Innen dargestellt: mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel (E), Kutis (K). (b) Vergrößerung der Epidermis mit: Stratum corneum (SC), Stratum granulosum (SG), Stratum spinosum (SS), Stratum basale (SB), Basalmembran (B). Psoriasis ist in (a) und (b) am roten Farbprodukt erkennbar.

Psoriasis wird, wie erwartet, im mehrschichtigen Plattenepithel in 10 von 10 Paraffinschnitten des Augenlides nachgewiesen. Abb. 4.3. zeigt eine positive Immunreaktion im Bereich des Stratum basale und Stratum spinosum, die sich im Bereich des Stratum granulosum und im Stratum corneum noch weiter intensiviert.

Haarfollikel des Augenlides

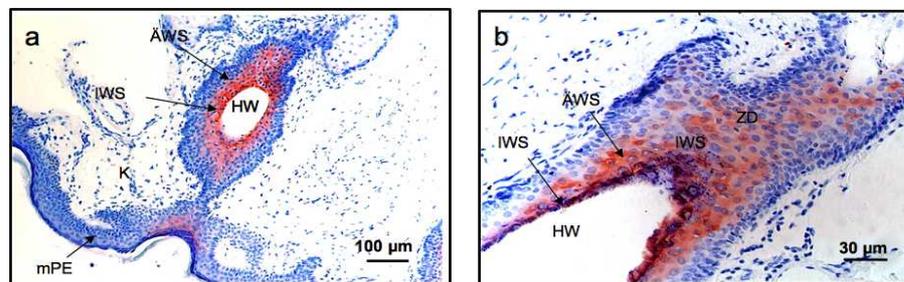


Abb. 4.4. Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasis in einem Haarfollikel des Augenlides. (a) und (b) zeigen einen Sagittalschnitt durch einen Haarfollikel. (a) mehrschichtiges Plattenepithel (mPE), Kutis (K), innere Wurzelscheide (IWS), Haarwurzel (HW), äußere Wurzelscheide (AWS). (b) Haarwurzel (HW), innere Wurzelscheide (IWS), äußere Wurzelscheide (AWS), Zeiss-Drüse (ZD). Nachweis der Psoriasisexpression in repräsentativen Immunreaktionen (rote Farbreaktion).

In 10 von 10 Präparaten ist Psoriasis in den Haarfollikeln des Augenlides ebenfalls immunhistochemisch nachweisbar. Die starke Farbreaktion ist im Bereich der inneren und äußeren Haarwurzelscheide detektierbar. In den polygonalen Zellen der Zeiss-Drüsen ist ebenfalls eine positive Immunreaktion, die von basal nach apikal verblasst, erkennbar (Abb. 4.4.).

4. Ergebnisse

Meibomdrüse

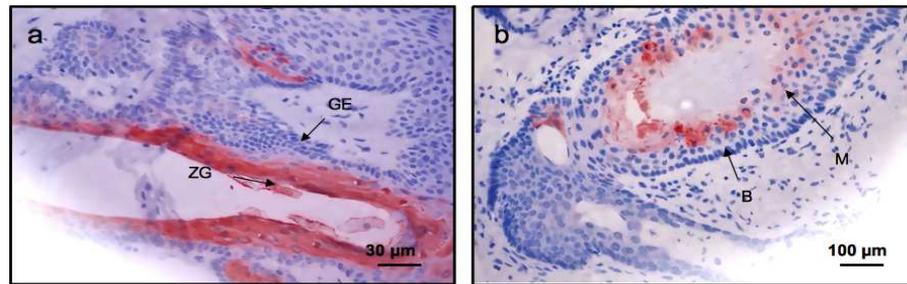


Abb. 4.5. Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin in der Meibomdrüse. (a) Hauptausführungsgang (ZG) der Meibomdrüse (längs angeschnitten), 3 bis 4-schichtiges Plattenepithel des zentralen Ganges (GE). Der Pfeil im Ganglumen zeigt die Flussrichtung des Meibumsekretes an. (b) zeigt einen Sagittalschnitt durch einen holokrinen Azinus der Meibomdrüse, Meibozyten (M), Basalmembran (B). Nachweis der Psoriasinexpression in repräsentativen Immunreaktionen (rote Farbreaktion).

In 10 von 10 untersuchten Paraffinschnitten der Augenlider ist Psoriasin in den enthaltenen Meibomdrüsen nachweisbar. Dabei zeigen die Meibozyten, die in den holokrinen Azini der Meibomdrüsen enthalten sind, eine positive Immunreaktion (Abb. 4.5. b). In dem 3- bis 4-schichtigen Plattenepithel des zentralen Ausführungsganges der Meibomdrüse kann ebenfalls eine positiv Immunreaktion beobachtet werden (Abb. 4.5. a und b).

Konjunktiva

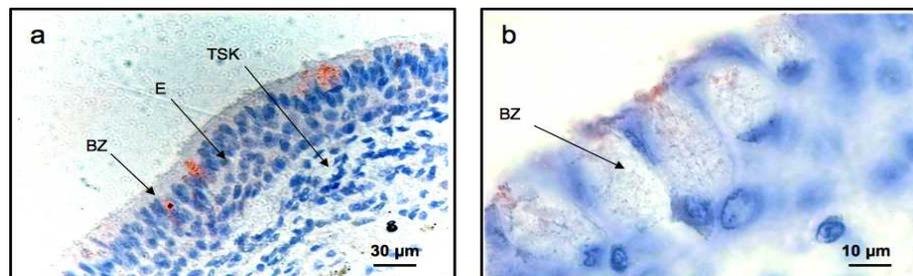


Abb. 4.6. Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin in der Konjunktiva. (a) und (b) zeigen einen Sagittalschnitt durch eine Konjunktiva an der Innenseite des Augenlides (a) Iso- bis hochprismatisches mehrschichtiges Epithel (E), Becherzelle (BZ), Tela subconjunctivalis (TSK). (b) Becherzelle üp(BZ) der Konjunktiva. Nachweis der Psoriasinexpression in repräsentativen Immunreaktionen (rote Farbreaktion).

Immunhistochemisch wird Psoriasin in 2 von 10 Paraffinschnitten in den Becherzellen der Konjunktiva nachgewiesen. In Abb. 4.6. sind deutlich rotgefärbte Zellgranula der Becherzellen zu sehen; die Färbung verstärkt sich am apikalen Pol der Zellen. Im iso- bis hochprismatischen Plattenepithel der Konjunktiva ist keine positive Immunreaktion beobachtbar.

4. Ergebnisse

Kornea

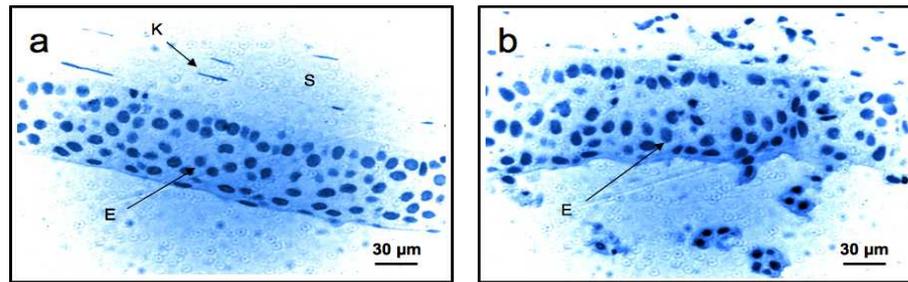


Abb. 4.7. Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin in der Kornea. (a) zeigt eine gesunde Kornea. Mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel (E), Stroma (S), Keratinozyten (K). (b) zeigt eine durch das Herpesvirus infizierte Kornea. Das Plattenepithel (E) hat sich von der Basalmembran gelöst (Stroma und Basalmembran nicht dargestellt). Die infizierten Zellen quellen auf und sterben ab, abgestorbene Epithelzellen (aZ).

Um die Psoriasinproduktion der Kornea zu untersuchen, werden Paraffinschnitte mit verschiedenen Erkrankungen der Kornea angefertigt. Folgende Erkrankungen der Kornea wurden untersucht: Keratokonus, Herpeskeratitis, Fuchs Epitheldystrophie, bullöse Keratopathie, Descementocèle der Kornea, Ulkus corneae. In keinem der Paraffinschnitte ist Psoriasin immunhistochemisch lokalisierbar (Abb. 4.7.).

Glandula lacrimalis

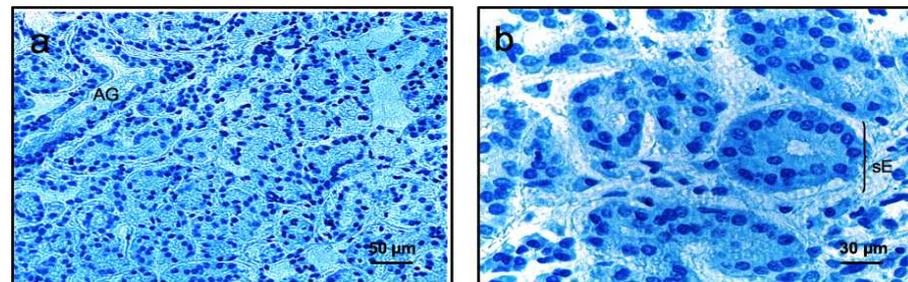


Abb. 4.8. Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin in einer Glandula lacrimalis. (a) zeigt einen Querschnitt durch die verzweigte tubuloalveoläre Glandula lacrimalis. Links oben ist ein Ausführungsgang (AG) angeschnitten. (b) zeigt seröse Endstücke (sE) der Glandula lacrimalis.

10 von 10 Paraffinschnitten der Glandula lacrimalis werden immunhistochemisch auf das Vorkommen von Psoriasin untersucht. Dabei wird in keinen Präparat weder in den Ausführungsgängen noch in den Drüsenkörpern der Glandula lacrimalis Psoriasin nachgewiesen (Abb. 4.8.).

4. Ergebnisse

Ductus nasolacrimalis

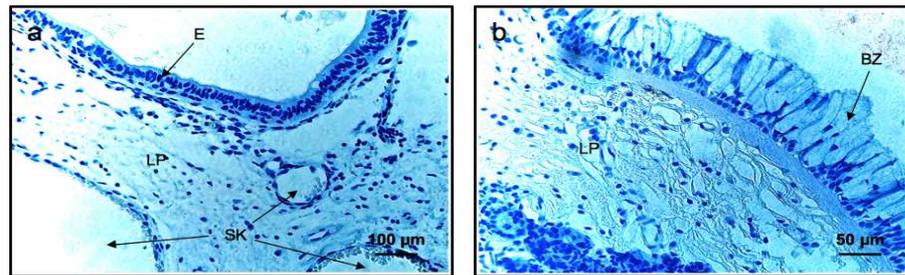


Abb. 4.9. Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin in einem Ductus nasolacrimalis. (a) und (b) zeigen einen Querschnitt durch einen Ductus nasolacrimalis. Zwei- bis mehrreihiges hochprismatisches Zylinderepithel (E), Becherzellen (BZ), Lamina propria (LP), Schwellkörper (SK).

In keinem der 10 verschiedenen Paraffinschnitten des Ductus nasolacrimalis kann eine positive Immunreaktion, die die Psoriasinproduktion immunhistochemisch nachweist, detektiert werden (Abb. 4.9.).

4.1.4. Psoriasinnachweis mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Psoriasin wird *in vivo* quantitativ aus okulärem Gewebe mittels Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachgewiesen. Dafür werden Gewebeproben von Körperspendern der Konjunktiva (n=4), des Ductus nasolacrimalis (n=4) und der Glandula lacrimalis (n=7) verwendet. In allen Proben kann Psoriasin nachgewiesen und quantifiziert werden. Die höchste Psoriasinkonzentration ist im Ductus nasolacrimalis nachweisbar (43.7 ± 41.3 ng/ml). In den Proben der Konjunktiva ist die gemessene Psoriasinkonzentration deutlich geringer (11.9 ± 14.3 ng/ml). Mittels ELISA kann Psoriasin in geringen Mengen aus Proben der Glandula lacrimalis nachgewiesen werden (5.7 ± 5.4 ng/ml).

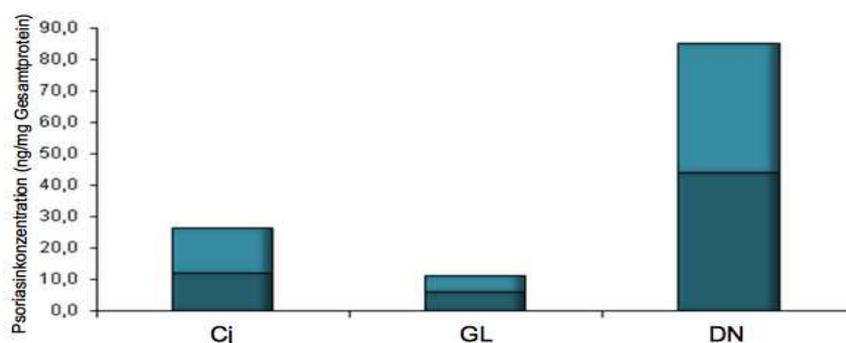


Abb. 4.10. Nachweis von Psoriasin in okulärem Gewebe mittels ELISA. Konjunktiva (Cj) n = 4, Glandula lacrimalis (GL) n = 7, Ductus nasolacrimalis (DN) n = 4. Die Psoriasinkonzentration ist in ng/mg Gesamtprotein angegeben. Der aufgesetzte hellblaue Balken gibt die Standardabweichung an.

4. Ergebnisse

4.2. Immunnachweis von Psoriasin in humaner Tränenflüssigkeit mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Psoriasin ist in humaner Tränenflüssigkeit enthalten. Zur Analyse dieser Ergebnisse wird Tränenflüssigkeit von 4 gesunden Probanden mit Schirmerteststreifen gewonnen. Unter sterilen Bedingungen wird die Tränenflüssigkeit aus den Schirmerteststreifen ausgedrückt und Psoriasin wird quantitativ mittels ELISA bestimmt.

Nach Auswertung zeigt sich, dass Psoriasin in hoher Konzentration in der menschlichen Tränenflüssigkeit vorkommt. Die höchste gemessene Psoriasinkonzentration in einer Probe beträgt 206 ng/ml (Abb. 4.11.).

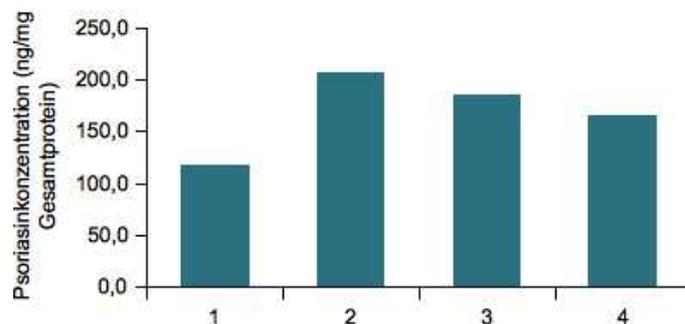


Abb. 4.11. Psoriasinnachweis in der Tränenflüssigkeit mittels ELISA. Die Proben der 4 Probanden sind mit 1, 2, 3 und 4 beschriftet. Die Psoriasinkonzentration ist in ng/mg Gesamtprotein angegeben.

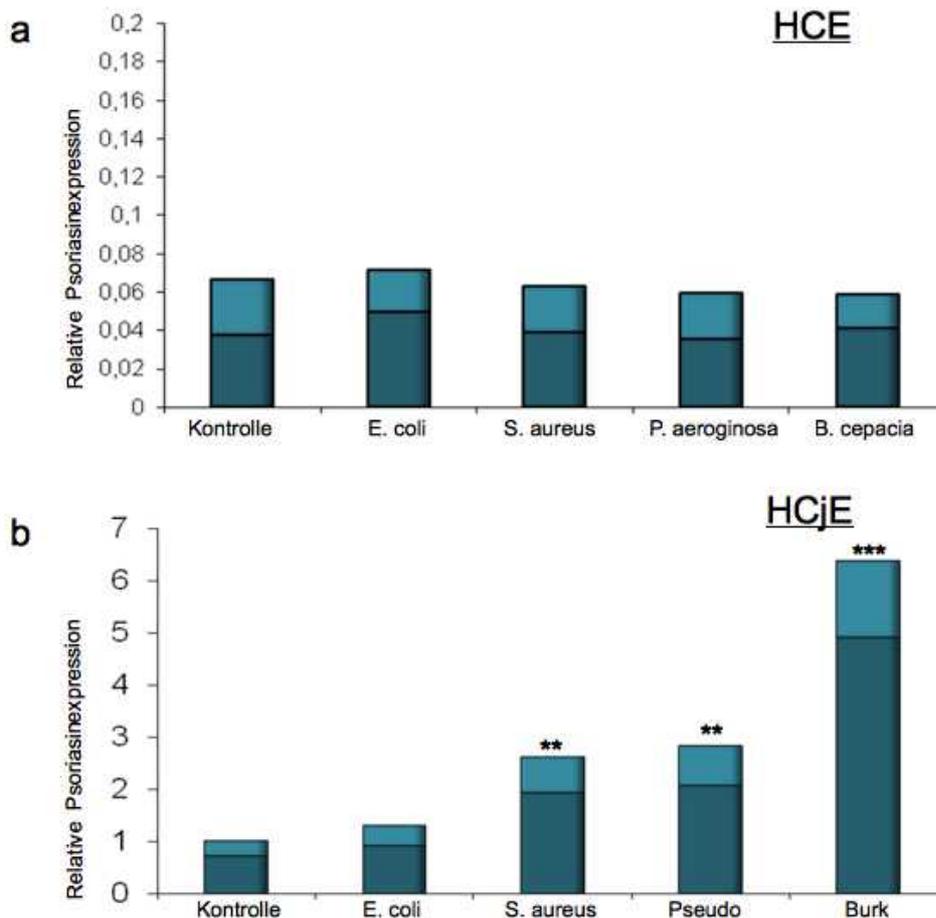
4.3. Regulation der Psoriasinexpression im Zellkulturmodell nach Stimulation mit verschiedenen Bakterienüberständen

Um zu zeigen, dass die Psoriasinexpression in Zelllinien durch Bakterien beeinflusst und induziert werden kann, werden Zellen aus drei verschiedenen Zelllinien kultiviert und mit Bakterienüberständen von *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* 16 h stimuliert. Für die Versuche werden eine Konjunktivaepithelzelllinie (HCjE), eine Korneaepithelzelllinie (HCE) und eine Sebozytenepithelzelllinie (SZ) verwendet. Nach Beendigung der Stimulationsexperimente wird die Genexpression von Psoriasin mit Hilfe der quantitativen Realtime PCR bestimmt und die Sekretion von Psoriasin in den Medienüberstand mittels ELISA ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.3.1. Quantitativer Nachweis von Psoriasin auf RNA-Ebene

Nach Stimulation der HCE-Zelllinie mit Bakterienüberständen von *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* kann keine signifikante Steigerung der Psoriasinexpression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 4.12. a). Die Stimulation der HCjE-Zelllinie mit *S. aureus* (1.95 ± 0.69-fach) und *P. aeruginosa* (2.05 ± 0.77-fach) führt zu einer Verdopplung der Psoriasinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle (0.73 ± 0.31-fach). Die Stimulation mit *B. cepacia* steigert die Psoriasinexpression auf Werte von 4.93 ± 1.48-fache, während die Stimulation mit *E. coli* Überstand zu keiner signifikanten Regulation der Psoriasinexpression führt (Abb. 4.12. b). Nur *E. coli* induziert eine leichte signifikante Steigerung der Psoriasinexpression nach Stimulation der SZ-Zelllinie (3.57 ± 0.31-fach). *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* führen im Vergleich zur Kontrolle zu keiner signifikanten Erhöhung der Psoriasinkonzentration (Abb. 4.12. c).



4. Ergebnisse

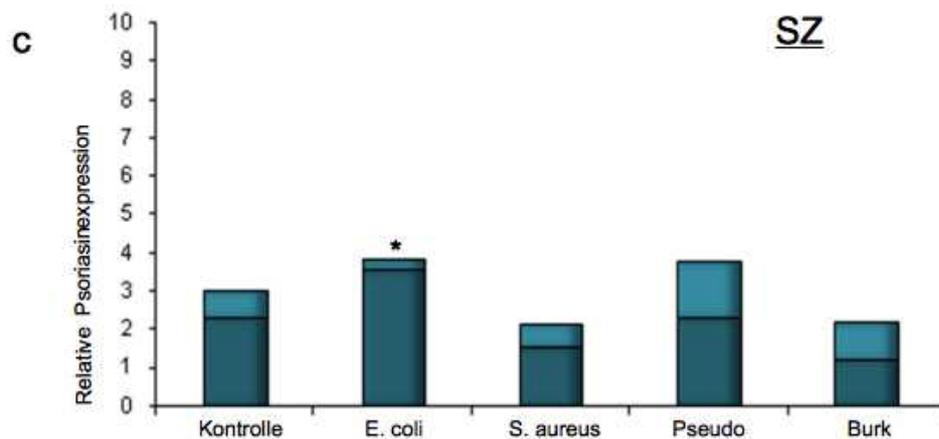


Abb. 4.12. Analyse der Psoriasinexpression mittels Realtime PCR nach Stimulation kultivierter Zellen mit verschiedenen Bakterienüberständen. Verwendete Zelllinien: (a) HCE-Zelllinie, (b) HCjE-Zelllinie, (c) SZ-Zelllinie. Stimulationsdauer: 16 h. Verwendete Bakterienüberstände: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia*. Der hellblaue Balken gibt die Standardabweichung an. Sternchen (zweiseitiger T-Test): * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

4.3.2. Quantitativer Nachweis von Psoriasin mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Psoriasinkonzentration in den Medienüberständen. Verwendet werden die Medienüberstände aus dem Vorversuch (4.3.1.).

Abb. 4.13. a zeigt, dass nach Stimulation der HCE-Zelllinie mit *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* keine signifikante Steigerung der Psoriasinexpression im Vergleich zur den unbehandelten Zellen nachweisbar ist. Auffällig ist jedoch, dass die mittels ELISA gemessene Psoriasingesamtkonzentration der HCE-Zelllinie höher ist (11.54 ± 1.56 ng/ml) als in der HCjE- (0.72 ± 0 ng/ml) und SZ-Zelllinie (1.5 ± 0.24 ng/ml).

S. aureus stimuliert die Psoriasinexpression in der HCjE-Zelllinie (1.2 ± 0 ng/ml) und in der SZ-Zelllinie (1.9 ± 0.15 ng/ml) leicht. In beiden Zelllinien kann nach Stimulation mit *E. coli*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* keine Erhöhung der Psoriasinkonzentration gemessen werden (Abb. 4.13. b und c).

4. Ergebnisse

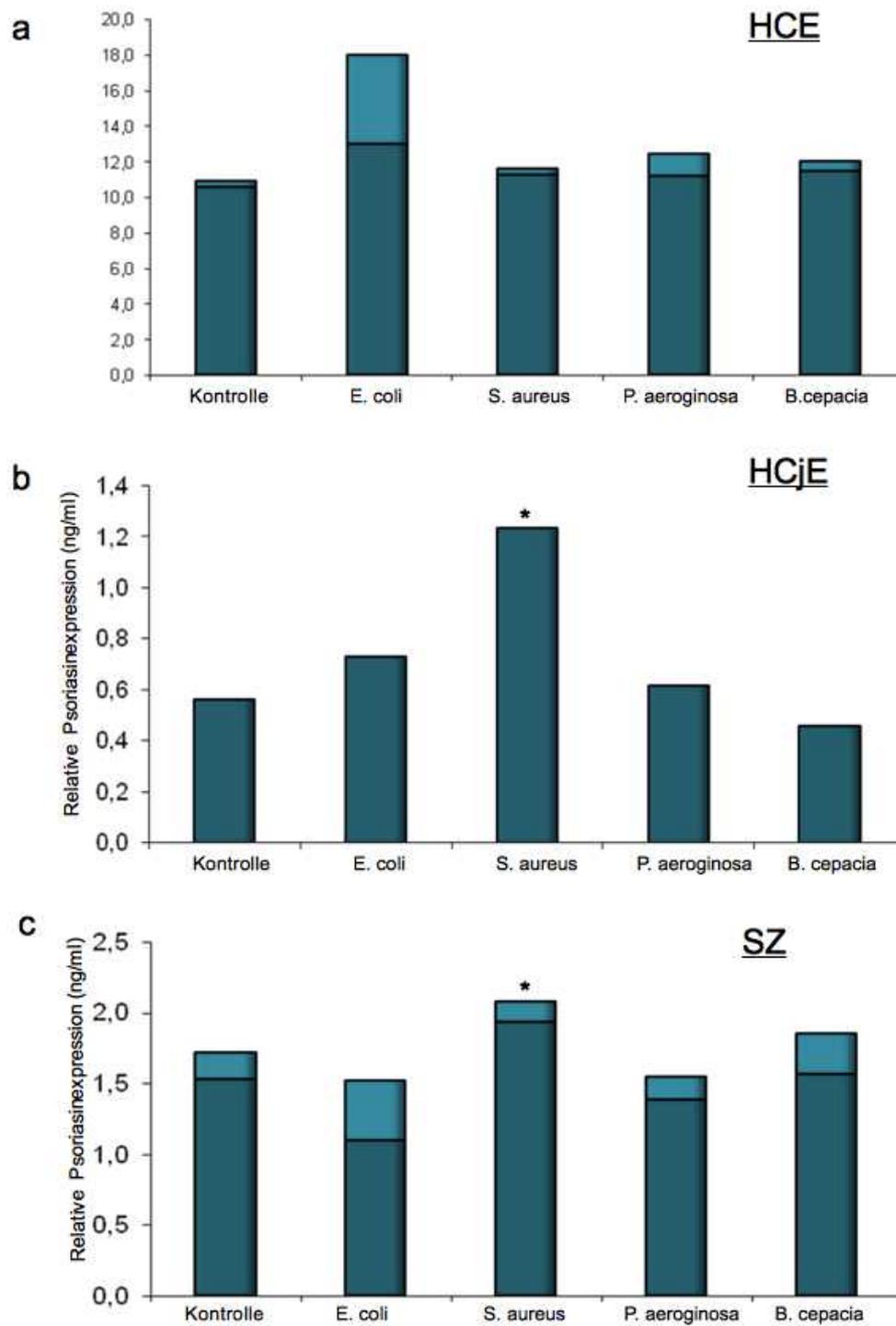


Abb. 4.13. Analyse der Psoriasinexpression mittels ELISA nach Stimulation kultivierter Zellen mit Bakterienüberständen. Zelllinien: (a) HCE-Zelllinie, (b) HCJE-Zelllinie, (c) SZ-Zelllinie. Stimulationsdauer: 16 h. Bakterienüberstände: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia*. Die relative Psoriasinexpression ist in ng/ml angegeben. Der hellblaue Balken gibt die Standardabweichung an. Sternchen (zweiseitiger T-Test): * = $p < 0.05$.

4. Ergebnisse

4.4. Regulation der Psoriasinexpression in der Korneaepithelzelllinie nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren

HCE-Zelllinien werden 24 h mit IL-1 β (5, 10, 20, 50 ng/ml und 5 ng/ml in verschiedenen Zeitintervallen), VEGF (5, 10, 20, 50 ng/ml), TNF α (5, 20 ng/ml) und TFF3 (0.01; 0.1; 1; 10 μ g/ml) stimuliert. Die Auswertung erfolgt mittels Realtime PCR.

4.4.1. Stimulation mit Interleukin-1 β (IL-1 β)

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β führt zu einer signifikanten Steigerung der Psoriasinexpression (Abb. 4.14. a). Schon 5 ng/ml IL-1 β haben einen nachweisbaren Effekt und steigern die Psoriasinexpression auf den 20-fachen Wert (19.33 ± 4.03 -fach) im Vergleich zur Kontrolle (1.06 ± 0.8 -fach). Die Erhöhung der IL-1 β Konzentration auf 10 ng/ml führt zu einer 60-fachen Steigerung der Psoriasinexpression (60.57 ± 12.23 -fach). Eine Stimulationskonzentration von 20 ng/ml IL-1 β verringert die Psoriasinproduktion jedoch wieder (23.37 ± 7.72 -fach) und nach Stimulation mit 50 ng/ml IL-1 β wird ein weiterer Abfall der Psoriasinexpression (16.06 ± 3.36 -fach) gemessen.

Um zu beweisen, dass die Stimulationsdauer einen Einfluss auf die Psoriasinexpression hat, werden HCE-Zelllinien mit 5 ng/ml IL-1 β für 6, 12 und 24 h stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.14. b dargestellt. Schon nach 6 h bewirkt IL-1 β einen signifikanten Anstieg der Psoriasinproduktion (2.69 ± 0.87 -fach) und nach 12 h erhöht sich die Psoriasinproduktion auf den 26-fachen Wert (26.78 ± 11.25 -fache) im Vergleich zur Kontrolle (1.06 ± 0.8 -fach). Die Stimulationsdauer von 24 h bewirkt wiederum einen leichten Abfall der Psoriasinkonzentration (19.33 ± 4.03 -fach).

4. Ergebnisse

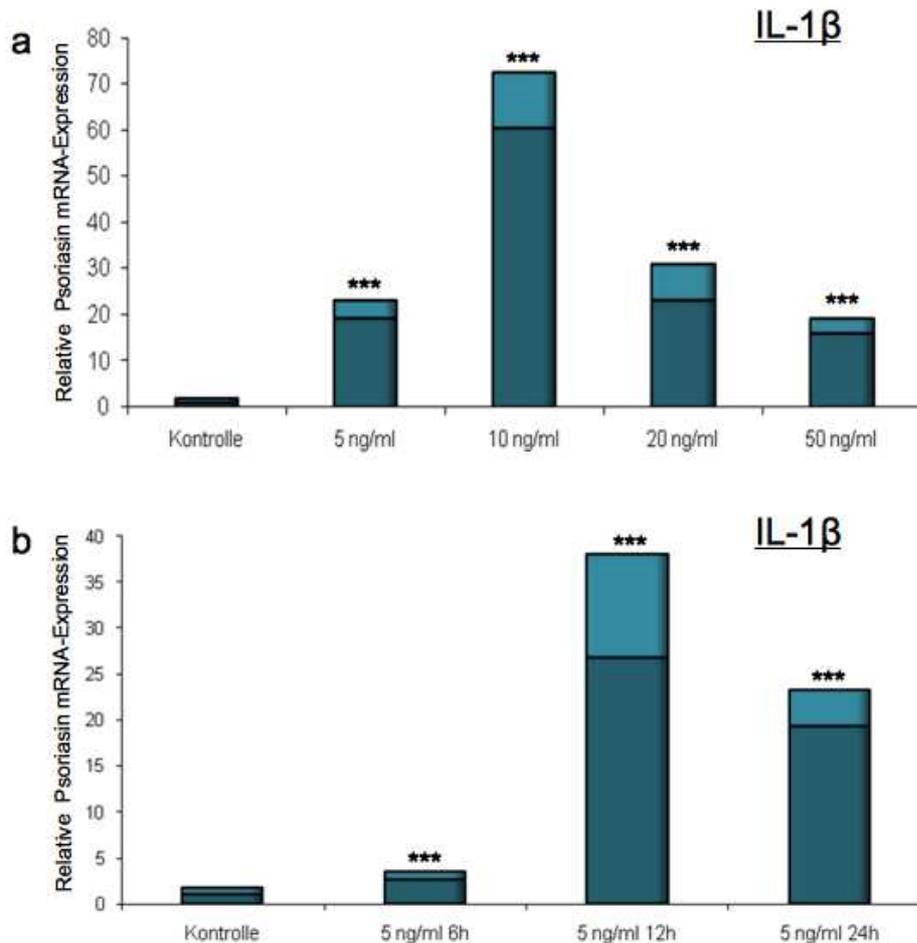


Abb. 4.14. Analyse der Psoriasinexpression mittels Realtime PCR nach Stimulation der HCE-Zelllinie mit IL-1 β (a) Stimulation für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL1 β (5, 10, 20 und 50 ng/ml). (b) Stimulation mit 5 ng/ml IL1 β in unterschiedlichen Zeitintervallen (6 h, 12 h und 24 h). Der hellblaue Balken gibt die Standardabweichung an. Sternchen (zweiseitiger T-Test): *** = $p < 0.001$.

4.4.2. Stimulation mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

In Abb. 4.15. sind die Stimulationsversuche der HCE- Zelllinien mit dem Gefäßwachstumsfaktor VEGF dargestellt. VEGF steigert die Psoriasinexpression signifikant und mit zunehmender Stimulationskonzentration von VEGF erhöht sich auch die Psoriasinkonzentration.

5 ng/ml VEGF bewirken eine 3-fache (2.92 ± 1.39 -fach) und 10 ng/ml VEGF eine 6-fache (6.37 ± 1.16 -fach) Steigerung der Psoriasinexpression im Vergleich zur Kontrolle (1.06 ± 0.8 -fach). Nach Stimulation mit 20 ng/ml VEGF erhöht sich die Psoriasinkonzentration weiter auf das 13-fache (13.11 ± 6.83 -fach) und bei einer Stimulationskonzentration von 50 ng/ml VEGF werden 27-fache Werte (27.33 ± 1 -fach) im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

4. Ergebnisse

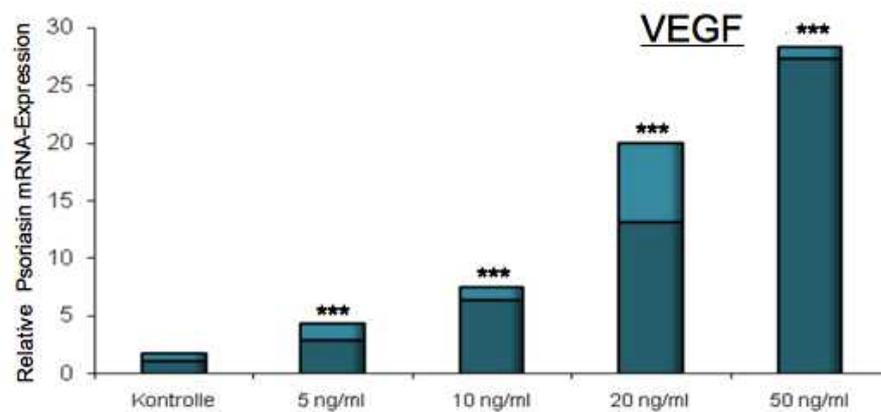


Abb. 4.15. Analyse der Psoriasinexpression mittels Realtime PCR nach Stimulation einer HCE-Zelllinie mit VEGF in unterschiedlichen Konzentrationen. Stimulationskonzentrationen: 5, 10, 20 und 50 ng/ml VEGF. Stimulationsdauer: 24 h. Der hellblaue Balken gibt die Standardabweichung an. Sternchen (zweiseitiger T-Test): *** = $p < 0.001$.

4.4.3. Stimulation mit Tumornekrosefaktor α (TNF α)

Das proinflammatorische Zytokin TNF α hat einen nachweisbaren Effekt auf die Psoriasinexpression. Nach Stimulation mit 5 ng/ml TNF α wird die Psoriasinproduktion auf den 4-fachen Wert (4 ± 0.96 -fach) im Vergleich zur Kontrolle (1.06 ± 0.8 -fach) gesteigert. 20 ng/ml TNF α haben keinen weiteren steigernden Effekt auf die Psoriasinexpression (4.7 ± 1.39 -fach). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.16. dargestellt.

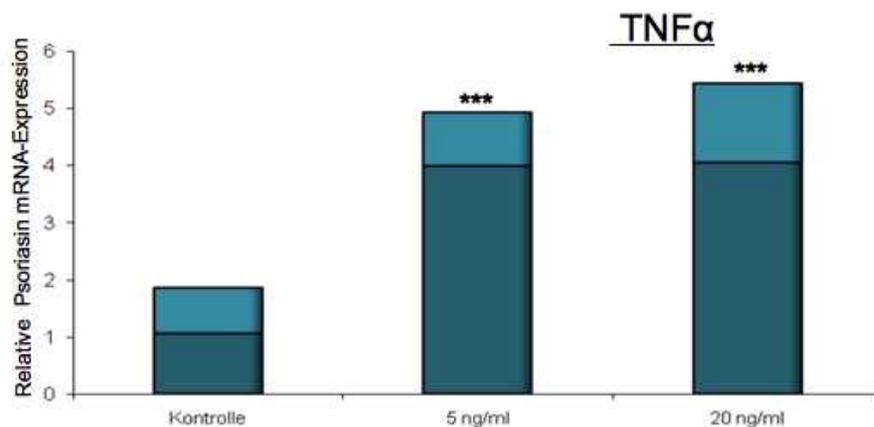


Abb. 4.16. Analyse der Psoriasinexpression mittels Realtime PCR nach Stimulation von HCE-Zelllinie mit TNF α in unterschiedlichen Konzentrationen. Stimulationskonzentrationen: 5 ng/ml und 20 ng/ml TNF α . Stimulationsdauer: 24 h. Der hellblaue Balken gibt die Standardabweichung an. Sternchen (zweiseitiger T-Test): *** = $p < 0.001$.

4. Ergebnisse

4.4.4. Stimulation mit Trefoil Factor Family Peptid 3 (TFF3)

Die Stimulation der HCE-Zelllinie mit dem Kleeblattpeptid TFF3 zeigt lediglich bei einer Stimulationskonzentration von 0.01 µg/ml einen signifikanten Anstieg, dabei kann eine 3-fache Erhöhung (3.2 ± 1.89 -fach) der Psoriasinexpression im Vergleich zur Kontrolle (1.06 ± 1.89 -fach) gemessen werden. Bei höheren Stimulationskonzentrationen von TFF3 kann keine signifikante Steigerung der Psoriasinexpression im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden (Abb. 4.17.).

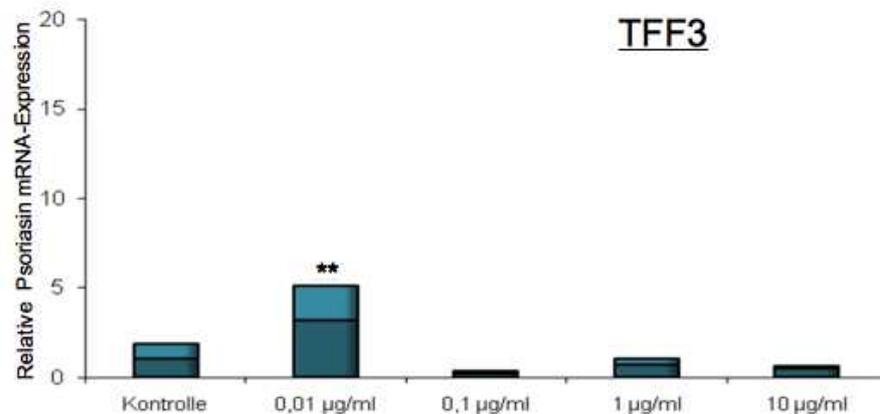


Abb. 4.17. Analyse der Psoriasinexpression mittels Realtime PCR nach Stimulation von HCE-Zellen mit TFF3 in unterschiedlichen Konzentrationen. Stimulationskonzentrationen: 0.01, 0.1, 1 und 10 µg/ml. Stimulationsdauer: 24 h. Der hellblaue Balken gibt die Standardabweichung an. Sternchen (zweiseitiger T-Test): ** = $p < 0.01$.

5. Diskussion

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird das Peptid Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat charakterisiert und analysiert. Psoriasin ist ein 11 kDa großes antimikrobielles Peptid, das auf der menschlichen Haut detektiert werden kann und durch Zinkentzug das Absterben von *Escherichia coli* fördert (Gläser *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass Psoriasin in verschiedenen Geweben der Augenoberfläche und in den ableitenden Tränenwegen unterschiedlich exprimiert wird und eine Regulation durch bestimmte Wachstumsfaktoren, Bakterienüberstände und Zytokine stattfindet. Die Ergebnisse geben Aufschluss über die Wirkung und Eigenschaften von Psoriasin und können helfen, dessen Funktion als Teil der angeborenen Immunabwehr an der Augenoberfläche besser zu verstehen.

5.1. Nachweis von Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat

Bei der Untersuchung von Psoriasin im menschlichen Auge zeigt sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster für Psoriasin in den verschiedenen Gewebeproben der Augenoberfläche und dem Tränenapparat.

Gläser *et al.* (2005) detektierten Psoriasin in den Keratinozyten der menschlichen Haut. In der vorliegenden Arbeit lässt sich Psoriasin im Plattenepithel des menschlichen Augenlides auf mRNA und Proteinebene, sowie immunhistochemisch nachweisen. Vermutlich bietet die Psoriasinexpression des Augenlides einen ersten effektiven Schutz vor Pathogenen, bevor diese mit der Augenoberfläche in Kontakt kommen. In der Literatur wird der protektive Schutz auf der menschlichen Haut durch das bakterizid wirkende Peptid Psoriasin beschrieben (Gläser *et al.*, 2005). Bei allen Experimenten der vorliegenden Arbeit wird eine Augenlidprobe mitgeführt, die ein konstant positives Signal zeigt. Psoriasin kann mittels Immunhistochemie in Haarfollikeln nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Gläser *et al.* (2005), die besonders hohe Konzentrationen von Psoriasin an behaarten Körperstellen, wie der Kopfhaut und der Achselhöhle nachweisen konnten. In der vorliegenden Arbeit wird Psoriasin stark an der inneren und teilweise an der äußeren Haarwurzelscheide detektiert. Möglicherweise wurden die Haarfollikel größtenteils im distalen Abschnitt der Haarwurzel angeschnitten. Der Nachweis von Psoriasin, RNasen und β -Defensinen aus Haarextrakten ist aus der Literatur bekannt (Arzumanyan *et al.*, 2010). Jüngere Studien wiesen Psoriasin immunhistochemisch im proximalen Teil der äußeren Haarwurzelscheide nach

5. Diskussion

(Reithmayer *et al.*, 2009). In der Literatur wird weiterhin beschrieben, dass eine hohe Psoriasinkonzentration von menschlichen Talgdrüsen exprimiert wird (Gläser *et al.*, 2005; Reithmayer *et al.*, 2009). Ein entsprechendes Resultat gilt für die Meibomdrüse. Hier ist Psoriasin auf mRNA und Proteinebene nachweisbar (Garreis *et al.*, 2011). Immunhistochemisch zeigt sich eine Immunreaktion in den Zellen der Meibozysten und im Ausführungsgangepithel der Meibomdrüsen. Es ist bekannt, dass das Sekret der Meibomdrüse (Meibum) nicht nur aus Lipiden und aus einer Vielzahl von Proteinen besteht (Green-Church *et al.*, 2008; Teraishi und Yoshioka, 2001), sondern sich aus allen Zellkomponenten zusammensetzt. Die genaue Zusammensetzung und die unterschiedlichen Funktionen der Nicht-Lipid-Komponenten im Meibum-Sekret sind bisher kaum bekannt (Green-Church *et al.*, 2011). Auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse ist es sehr interessant, dass Psoriasin, als Produkt der Meibomdrüse, in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden kann. In der Literatur wird beschrieben, dass eine Dysfunktion der Meibomdrüse, weitgehend synonym mit der hinteren Blepharitis, eine Ursache für das trockene Auge darstellt (Knop *et al.*, 2011). Kürzlich publizierte Studien zeigten, dass Small Prolin-Rich Proteins und Calcium-bindende S100 Proteine wie S100 A8 und S100 A9 bei einer Meibomdrüsendysfunktion (MGD) hochreguliert werden. Es wird vermutet, dass diese Substanzen eine Hyperkeratose des Gangepithels der Meibomdrüsen bewirken und deren Hochregulation eine mögliche Ursache für die Entstehung der hinteren Blepharitis darstellen (Liu *et al.*, 2011). Bekanntermaßen findet man bei der MGD seltener bakterielle Infektionen (Gutgesell *et al.*, 1982), was auf eine antibakterielle Eigenschaft von S100 A8 und S100 A9 schließen lässt. Psoriasin gehört ebenfalls zur Gruppe der Calcium-bindenden S100 Proteine, und eine ähnliche Eigenschaft und Funktion ist in diesem Zusammenhang auch für Psoriasin denkbar. Weiterhin wurde von Autoren diskutiert, dass die Psoriasinsekretion an die Lipidsekretion gekoppelt ist und Lipide ein zusätzliches Reservoir für lipophile AMP, wie Psoriasin, darstellen (Gläser *et al.*, 2005). Es ist bekannt, dass Psoriasin mit E/FABP (epidermal fatty acid-binding Protein) interagiert. E/FABP ist ein intrazelluläres Protein (Hagens *et al.*, 1999a, 1999b; Ruse *et al.*, 2003), das an Transport, Speicherung und Metabolismus von Fettsäuren beteiligt ist (Herzel und Bernlohr, 2000) und im Wundexudat und Wundrand nachgewiesen wurde (Lee und Eckert, 2007). Jüngste Studien belegen, dass eine MGD mit einem veränderten Aufbau der Meibomlipide einhergehen (Borchman *et al.*, 2010). Psoriasin wird in der vorliegenden Arbeit in den ekkrinen Moll Drüsen des Augenlides nicht detektiert, da diese im Gegensatz zu den Meibomdrüsen an der äußeren Lidkante lokalisiert sind. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Gläser *et al.*

5. Diskussion

(2005) überein, die Psoriasin ebenfalls nur in Talgdrüsen, nicht aber in Schweißdrüsen nachweisen konnten. Andere Studien belegten jedoch die Expression von AMP durch die Moll-Drüsen, wie humane β Defensine und Cathelicidin (Stoeckelhuber *et al.*, 2008). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse ist die Kopplung eines großen Teils der Psoriasinsekretion an die Lipidsekretion der Meibomdrüsen anzunehmen.

Psoriasin lässt sich auf mRNA und Proteinebene und in geringen Konzentrationen mittels ELISA in der Konjunktiva nachweisen. Immunhistochemisch zeigt sich eine Immunreaktion in den Becherzellen der Konjunktiva. Die erhobenen Daten lassen vermuten, dass Psoriasin im Rahmen der angeborenen immunologischen Abwehr an der Konjunktiva eine Rolle spielt und dem Risiko einer Konjunktivitis entgegenwirkt. In vergleichbaren Studien wird das Vorkommen anderer AMP, wie humanen β -Defensinen (HBD-2, HBD-3) in der Konjunktiva beschrieben (Narayanan *et al.*, 2003; Haynes *et al.*, 1998; Haynes *et al.*, 2000). Weiterhin können α -Defensine 1-3 in intraepithelialen Granulozyten infizierter Konjunktivae nachgewiesen werden (Cullor *et al.*, 1990, Haynes *et al.*, 1998, Gottsch *et al.*, 1998). Befunde von Knop und Knop (2001) zeigten, dass konjunktivale Krypten verschiedene Typen von sekretorischen Zellen enthalten und darüber hinaus eine Immunfunktion im Rahmen der Schleimhautimmunabwehr übernehmen. In aktuellen Arbeiten werden humane β -Defensine (HBD 1-4) in Kornea und Konjunktiva beschrieben (Garreis *et al.*, 2010; Schlorf, 2005; McDermott, 2009; Haynes *et al.*, 1999). Die Arbeitsgruppe von Mohammed *et al.* (2010) demonstrierten das Vorkommen von humanem β -Defensin 9 im Korneaepithel und im Korneastroma, sowie in der Konjunktiva. In der vorliegenden Arbeit wird das Vorkommen von Psoriasin auf Proteinebene nachgewiesen. Auf RNA-Ebene gelingt der Nachweis nur in 1 von 8 Proben. Möglicherweise ist nach RNA-Isolierung zu wenig messbare RNA in den Proben enthalten oder es liegt eine Verunreinigung der Proben vor. Dafür spricht, dass Psoriasin auf Proteinebene in allen vorhandenen Proben nachweisbar ist. Interessanterweise stammt die eine mittels PCR untersuchte positive Probe von einem Patienten mit kornealer Herpesvirusinfektion. Eine Hochregulierung der Psoriasinexpression wäre dadurch denkbar und es wäre interessant, in weiteren Experimenten herauszufinden, ob das Herpesvirus eine korneale Psoriasinexpression induzieren kann. Immunhistochemisch gelingt kein Psoriasinnachweis. Eine mögliche Ursache wäre eine Degeneration der Zellen und der damit verbundene Verlust ihrer Reaktivität. Allerdings könnte es möglich sein, dass die Epithelzellen das Psoriasin aus dem Tränenfilm aufnehmen oder binden, was erklären würde, dass die RT-PCR keine Reaktion zeigt, der Western Blot aber positiv ist. Das Fehlen der Immunreaktion bei der Immunhistochemie könnte darauf basieren, dass die

5. Diskussion

Psoriasinkonzentration für eine ausreichende Antikörpervisualisierung zu gering ist. Eine immunmodulatorische Funktion an der Kornea durch Psoriasin ist jedoch annehmbar und ein erhöhtes Infektionsrisiko bei Reduktion der Psoriasinkonzentration, wie z.B. beim trockenen Auge, ist denkbar. Eine ähnliche Studie demonstrierte eine Reduktion von β -Defensinen bei einer kornealen Infektion (Abedin *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite ist eine reaktive Hochregulation von Psoriasin bei Infektionen ebenfalls denkbar. In einer weiterführenden experimentellen Arbeit von Garreis *et al.* (2011) konnte Psoriasin in Konjunktiva und Kornea immunhistochemisch nachgewiesen werden, wobei eine Immunreaktion in den oberflächlichen kornealen Epithelzellen, nicht aber im Endothel oder Stroma, beobachtet wird. Es wird diskutiert, ob Psoriasin in diesen Schichten induzierbar ist. Ein vergleichbarer Mechanismus wird bei den Surfactantproteinen A und D nachgewiesen, die einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr an der menschlichen Augenoberfläche bilden und nur im Falle einer bakteriellen oder viralen Infektion in tiefer gelegenen kornealen Schichten produziert werden (Bräuer *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit kann Psoriasin mit drei experimentellen Methoden (RT-PCR, Western Blot, ELISA) im Schleimhautepithel des Ductus nasolacrimalis nachgewiesen werden. Dadurch wird Psoriasin eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr in den ableitenden Tränenwegen zugewiesen. Vergleichbare Arbeiten zeigen, dass die chronische Rhinosinusitis mit einer signifikanten Reduktion der Psoriasinexpression in der Nasenschleimhaut einhergeht (Tieu *et al.*, 2010). Weiterhin ist das Vorkommen von Psoriasin im menschlichen Nasensekret bekannt (Bryborn *et al.*, 2005). Die Ergebnisse geben Aufschluss über die Pathogenese der chronischen Rhinosinusitis und anderer Infektionskrankheiten der oberen Atemwege und ableitenden Tränenwege, bei denen Psoriasin vermutlich eine wichtige Rolle spielt.

Auf RNA und Proteinebene ist in der vorliegenden Arbeit Psoriasin in der Glandula lacrimalis nicht detektierbar und auch immunhistochemisch kann keine Immunreaktion mit dem verwendeten Psoriasinantikörper nachgewiesen werden. Mittels ELISA lassen sich geringe Psoriasinkonzentrationen in der Glandula lacrimalis nachweisen. Das Ausbleiben eines positiven Psoriasinnachweises könnte darauf hindeuten, dass Psoriasin als Vorstufe in der Glandula lacrimalis gebildet wird und diese Vorstufe erst im Tränenfilm in die aktive Form überführt wird. Eine weitere Ursache könnte sein, dass die Psoriasinkonzentration der Glandula lacrimalis so niedrig ist, dass die verwendeten Antikörper diese niedrige Konzentration nicht detektieren. Garreis *et al.* (2011) konnten jedoch Psoriasin auf RNA und Proteinebene, sowie immunhistochemisch in einigen Gewebeproben der Glandula lacrimalis nachweisen. Dies lässt

5. Diskussion

den Rückschluss zu, dass Psoriasin eventuell nicht in allen Teilen der Tränendrüse produziert wird und diese Areale nicht angeschnitten sind. Die Vermutung wirft die Frage auf, ob die Glandula lacrimalis wie ursprünglich erwartet den Hauptproduktionsort für Psoriasin darstellt. Gemeinsam mit den akzessorischen Tränendrüsen produziert die Glandula lacrimalis den Hauptteil der Tränenflüssigkeit. Das Vorkommen von AMP in der Glandula lacrimalis ist in einigen Arbeiten beschrieben. Beispielsweise werden im Auge die Expression von β -Defensin 1 (HBD-1) nach Stimulation im Glaskörper (Haynes *et al.*, 1998; Haynes *et al.*, 1999; Haynes *et al.*, 2000, McDermott *et al.*, 2001, 2003, Narayanan *et al.*, 2003) und von α -Defensinen 1-3 in neutrophilen Granulozyten der Tränendrüse beschrieben (Cullor *et al.*, 1990, Haynes *et al.*, 1998, Gottsch *et al.*, 1998). Die erhobenen Befunde weisen der Glandula lacrimalis eine wichtige Funktion bei der Produktion von AMP zu. In der vorliegenden Arbeit kann jedoch die Expression von Psoriasin von der Glandula lacrimalis nicht nachgewiesen werden.

5.2. Untersuchung der Tränenflüssigkeit des Menschen

In der Tränenflüssigkeit von gesunden Probanden wird mittels ELISA eine Psoriasinkonzentration von ca. 168.7 mg/cm² gemessen. Im Gegensatz dazu ist in den untersuchten Gewebeproben eine sehr viel geringere Psoriasinkonzentration nachweisbar. Gläser *et al.* (2005) konnten in menschlicher Haut Psoriasinmengen von 5-20 mg/cm² nachweisen. Psoriasinkonzentrationen bis zu 100 mg/cm² wurden in Hautarealen detektiert, die vor allem durch eine physiologisch erhöhte Dichte von Mikroorganismen und eine Epidermis mit einer hohen Anzahl Talgdrüsen charakterisiert sind. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Psoriasinkonzentrationen in der Tränenflüssigkeit könnten durch die Gesamtheit der sezernierten Psoriasinmenge aus Kornea und Konjunktiva sowie der Meibomdrüse erklärt werden. Es wäre auch möglich, dass ein größerer Anteil des Psoriasin als Vorstufe gebildet wird und erst im Tränenfilm in seine aktive Form überführt wird. Bekanntermaßen ist Psoriasin ein Transglutaminasesubstrat, das mit der epidermalen Transglutaminase und der Transglutaminase II reagiert (Robinson und Eckert *et al.*, 1998; Ruse *et al.*, 2001). Transglutaminasen sind Enzyme, die die Verknüpfung von kovalenten Bindungen zwischen Glutamin- und Lysinresten eines oder verschiedener Proteine katalysieren, was zu hochmolekularen Proteinpolymeren führen kann (Folk, 1980). *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass Psoriasin im Cornified Envelope durch Transglutaminase mit anderen Proteinen quervernetzt wird und dadurch hochmole-

5. Diskussion

kulare Heteropolymere bildet (Robinson *et al.*, 1997; Robinson und Eckert, 1998; Ruse *et al.*, 2001). Das Cornified envelope (CE) ist eine 15 nm dicke, dichte und sehr schwer lösliche Struktur an der inneren Seite der Zellmembran der Korneozyten, die eine protektive Barriere gegenüber der Umwelt darstellt (Hohl, 1990). Der Tränenfilm bildet ebenfalls eine protektive Schicht zum Schutz des Auges. Möglicherweise wird Psoriasin auch im Tränenfilm mit anderen Proteinen durch Transglutaminase quervernetzt und kann so aktiv wirksam werden. Die Tränenflüssigkeit verhindert die Austrocknung der Hornhaut und ermöglicht das reibungsfreie Gleiten der Lider. In zahlreichen Studien wurde Tränenflüssigkeit auf das Vorkommen verschiedener antibakteriell wirkender Substanzen untersucht. Am besten beschrieben und untersucht ist die antimikrobielle Substanz Lysozym (Fleming, 1922), die hauptsächlich gegen gram-positive Bakterien wirksam ist. Weitere Substanzen sind das Enzym β -Lysin, das die Zellmembran von Bakterien zerstört und mit Lysozym synergistisch wirkt (Pleyer und Baatz, 1997), das eisenbindende Protein Lactoferrin, das *Bacillus subtilis*, *Staphylokokkus aureus*, *Staphylokokkus epidermidis* und *Pseudomonas aeruginosa* im Wachstum inhibiert (Oram und Reiter, 1979; Kijlstra, 1990), sowie Komplementfaktoren des alternativen Weges, die direkt durch mikrobielle Produkte wie beispielsweise Endotoxin aktiviert werden (Fearson und Austen, 1980). Die Arbeitsgruppe um Bernhard Redl konnte nachweisen, dass Tränen-spezifisches Lipocalin, vergleichbar mit Psoriasin, durch Eisenentzug bakteriostatisch auf *E. coli* wirkt (Fluckinger *et al.*, 2004). Forschungsergebnisse zeigen ferner, dass die Tränenflüssigkeit sekretorische Phospholipase A₂ enthält, ein Enzym, das außer Lysozym und β -Lysin insbesondere gegen gram-positive Bakterien wirksam ist (Qu und Lehrer, 1998; Girgis *et al.*, 2003). Jüngere Studien zeigen, dass humane β -Defensine, die gut an der Augenoberfläche beschrieben sind, jedoch in wesentlich geringerer Konzentration als Psoriasin in der Tränenflüssigkeit vorkommen, z.B. hBD-2: 386.8 pg/mg oder hBD-3: 141.5 pg/mg (Garreis *et al.*, 2011).

Durch den Nachweis von Psoriasin wird das Spektrum der antimikrobiellen Substanzen im Tränenfilm erweitert. Weiterhin ist denkbar, dass die Psoriasinsekretion in den Tränenfilm von anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Frühere Studien konnten zeigen, dass Psoriasin eine chemotaktische (Wolf *et al.*, 2008) und antibakterielle Wirkung, insbesondere gegen *E. coli*, besitzt (Gläser *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe von Garreis *et al.* (2011) konnte nachweisen, dass Psoriasin speziell am menschlichen Auge gegen *S. aureus* und *H. influenza* wirksam ist, jedoch nicht gegen *E. coli*. Die hohe nachgewiesene Psoriasinkonzentration in menschlicher Tränenflüssigkeit von gesunden Probanden könnte die niedrige Infektionsrate der

5. Diskussion

Augenoberfläche mit verschiedenen Pathogenen erklären und könnte bedeuten, dass Psoriasin, ähnlich wie die oben genannten AMP, zum Schutz des Auges und der ableitenden Tränenwege dient.

5.3. Stimulation und Regulation von Psoriasin

5.3.1. Induktion der Psoriasinexpression durch Bakterien im Zellkulturmodell

In der vorliegenden Arbeit wird demonstriert, dass die Induzierbarkeit und Regulation von Psoriasin durch Stimulation mit Bakterienüberständen an der Augenoberfläche beeinflusst wird. Zur Analyse dieser Ergebnisse werden eine Konjunktivaepithelzelllinie (HCjE), eine Korneaepithelzelllinie (HCE) und eine Sebozytenepithelzelllinie (SZ) mit Bakterienüberständen von *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* stimuliert.

E. coli führt nur in der Sebozytenepithelzelllinie zu einem dreifachen Anstieg der Psoriasinexpression. Die Ergebnisse decken sich mit den Daten von Gläser *et al.* (2005), die in ihrer Arbeit zeigen konnten, dass Psoriasin *E. coli* auf der menschlichen Haut abtötet und besonders von Epithelzellen und Talgdrüsen gebildet wird. Der Nachweis von Psoriasin gelingt in der vorliegenden Arbeit nur auf RNA-Ebene, jedoch nicht mittels ELISA. Vielleicht reicht die vorhandene Psoriasinmenge in den untersuchten Medienüberständen nicht aus, um eine positive Reaktion zu erzielen. Weiterhin ist denkbar, dass innerhalb der Stimulationszeit von 24 h eine erhöhte Psoriasinexpression, jedoch noch keine Psoriasinsekretion stattfindet. Überraschenderweise führt die Stimulation von *E. coli* zu keiner Psoriasinexpression bei der HCE- und HCjE-Zelllinie. Es ist bekannt, dass primäre und kultivierte Keratinozyten Psoriasin nach Behandlung mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen induzieren. Ferner wurde die antibakterielle Aktivität von Psoriasin gegen verschiedene *E. coli*-Stämme nachgewiesen (Gläser *et al.*, 2005). Wahrscheinlich wurde bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ein *E. coli*-Stamm (AT CC 8739) verwendet, der ein zu geringes pathogenes Potential besitzt, um eine Induktion der Psoriasinexpression auszulösen. Alternativ könnten aber auch andere, noch nicht bekannte AMP an die Stelle von Psoriasin treten, so dass die Psoriasininduktion zur Immunabwehr an der Augenoberfläche unnötig wird. Aus der Literatur sind z.B. Lysozym, Lactoferrin oder Lipocalin bekannt, die wie Psoriasin bakteriostatisch wirken. Weiterhin besitzen humane β -Defensine und humanes Cathelicidin LL-37 eine hohe Aktivität gegen verschiedene gram-positive und gram-negative Bakterien, wie z.B. *S. aureus* und *E. coli* (McDermott, 2009). Der Mechanismus der antibakteriellen Wirkung von Psoriasin gegen *E. coli* unterscheidet sich darüber hinaus von anderen AMP

5. Diskussion

(Zasloff, 2002). Das S100 Protein Calprotectin führt durch Zinkentzug zum Absterben von *Candida albicans*. Durch Zinkzugabe kann die antibakterielle Wirkung inhibiert werden (Clohessy und Golden, 1995; Sohnle *et al.*, 2000). Gläser *et al.* (2005) zeigten, dass auch Psoriasin durch Entzug von lebensnotwendigen Zinkionen ein Absterben von *E. coli* auf der menschlichen Haut bewirkt. Die Zugabe von TPEN (*N,N,N,N'*-Tetrakis (2-pyridylmethyl)ethylendiamin), einem Zinkchelator, erhöht dabei signifikant die bakterizide Wirkung von Psoriasin. Im Gegensatz dazu kommt es durch Zugabe von Zinkionen zu einer Reduktion der antibakteriellen Aktivität. Lee und Eckert (2007) konnten in ihrer Arbeit ebenfalls einen starken antibakteriellen Effekt von Psoriasin gegen *E. coli* demonstrieren, allerdings beobachtete die Arbeitsgruppe keine inhibitorischen Effekt gegen *E. coli* nach Zinkzugabe. Der Arbeitsgruppe gelang der Nachweis von Psoriasin aus Wundsekret und von am Wundrand lokalisierten Keratinozyten. Dabei konnten sie zeigen, dass die Aminosäuren 35-80 in der zentralen Region von Psoriasin für die antibakterielle Eigenschaft verantwortlich sind.

S. aureus, *B. cepacia* und *P. aeruginosa* sind typische Pathogene, die eine bakterielle Keratitis auslösen können. In der vorliegenden Arbeit führen die Bakterienüberstände der 3 verwendeten Bakterienarten zu einer Steigerung der Psoriasinexpression in der HCjE- Zelllinie, wohingegen in den anderen beiden Zelllinien keine signifikante Psoriasinexpression beobachtet werden kann. Mittels ELISA lässt sich nur nach Stimulation mit *S. aureus* eine Erhöhung der Psoriasinexpression nachweisen. Gläser *et al.* (2005) konnten ebenfalls eine geringe antibakterielle Aktivität von Psoriasin gegen *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* beobachten, jedoch wurde die antimikrobielle Aktivität von Psoriasin gegen *B. cepacia* und *P. aeruginosa* bisher noch nicht untersucht. Durch die hier vorliegenden Ergebnisse lässt sich ein breiteres antibakterielles Spektrum für Psoriasin an der Augenoberfläche und Tränenapparat belegen, als bisher beschrieben wurde. Überraschend ist jedoch, dass sich kein Effekt nach Stimulation der HCE- und Sebozytenepithelzelllinie zeigt. Vielleicht werden hierbei andere AMP aktiv, wie z.B. β -Defensine (Harder *et al.*, 1997; Harder *et al.*, 2001) oder LL-37 (Travis *et al.*, 2000), die ein ähnliches antimikrobielles Spektrum auf der menschlichen Haut aufweisen. Es ist auch denkbar, dass andere S100-Proteine eine Rolle spielen. Jüngste Untersuchungen konnten zeigen, dass die Genexpression von Calprotectin (S100A8/ S100A9) durch in Bakterien enthaltenes Flagellin erhöht wird, hingegen indizieren Bakterien, die kein Flagellin besitzen keine Expression des S100-Proteins. Flagellin ist ein Baustein der Bakteriengeißeln und triggert die Expression von Calprotectin über den Pattern Recognition Rezeptor TLR5 (Toll-like Rezeptor 5) (Abtin *et al.*, 2005). Eine andere Studie zeigte, dass Bestandteile gram-

5. Diskussion

positiver (Lipoteichonsäure, Protein A) und gram-negativer (Lipopolysaccharide (LPS), Flagellin) Bakterien die Expression von Psoriasin und RNase7 in Haarfollikelzellen menschlicher Kopfhaut über TLR4 und TLR5 erhöhen (Reithmayer *et al.*, 2009). Garreis *et al.* (2011) wiesen die Hochregulation der Psoriasinexpression nach Stimulation von HCE-Zellen mit *Haemophilus influenza* nach. Hingegen ließ sich kein Effekt nach Stimulation mit *E. coli* erzielen. Es ist anzunehmen, dass die verwendeten Bakterienüberstände in dieser Arbeit keine Bakterienbestandteile enthalten, die TLR binden. Weiterhin ist eine unterschiedliche Verteilung der TLRs im Gewebe der Augenoberfläche denkbar. Auffällig in der vorliegenden Arbeit ist, dass die mittels ELISA gemessene Psoriasinkonzentration der HCE-Zellen in allen untersuchten Proben ca. 11 mal höher ist als in der HCjE- und der SZ-Zelllinie, die Konzentration jedoch nicht durch Stimulation mit Bakterienüberständen weiter gesteigert werden kann. Die Kornea ist die apikale Begrenzung des Auges und steht in ständigem Kontakt mit der Umwelt und somit in ständigem Kontakt mit Bakterien oder deren Bestandteilen, so dass ein kontinuierlicher Schutz sinnvoll erscheint. Auf der anderen Seite wird die Kornea kontinuierlich von Tränenflüssigkeit benetzt, in der hohe Psoriasinkonzentrationen nachgewiesen werden. Es ist also denkbar, dass es an der Kornea keiner weiteren Stimulation der Psoriasinexpression bedarf. Aus diesem Grund besteht z.B. bei einer Keratokonjunktivitis sicca, bei der eine Benetzungsstörung der Augenoberfläche mit Tränenflüssigkeit vorliegt, ein erhöhtes Infektionsrisiko. Es kann angenommen werden, dass multiple Mechanismen, die zur Psoriasinsekretion führen, zusammen spielen (Lee und Eckert, 2007) und diese wahrscheinlich durch Entzündungsmediatoren und Bakterienbestandteile getriggert werden (Boniface *et al.*, 2005; Wolk *et al.*, 2006).

5.3.2. Beeinflussung der Psoriasinkonzentration durch Zytokine und Wachstumsfaktoren

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β und TNF α), Wachstumsfaktoren (VEGF) und Bestandteilen der Tränenflüssigkeit (TFF3) auf die Regulation der Psoriasinexpression untersucht. Es ist bekannt, dass die Expression induzierbarer antimikrobieller Peptide durch Lipopolysaccharid (LPS), Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) stimulierbar ist und bei Entzündungen herraufreguliert wird. Im Falle einer Infektion kommt es zu einer Interaktion von „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) mit „Pathogen-Pattern-Recognition-Rezeptoren“. Ein Beispiel hierfür sind die dem Interleukin-1-

5. Diskussion

Rezeptor verwandten Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die nach Aktivierung über eine bislang noch nicht vollständig charakterisierte Signalkaskade (unter anderem durch Aktivierung von Molekülen wie MyD88, IRAK, IRAK-2, Tollip, TRAF6 und TAK-1) den intrazytoplasmatischen Transkriptionsfaktor NF- κ B translozieren und anschließend im Zellkern zur Aktivierung entsprechender Gene mit resultierender Produktion bestimmter antimikrobieller Peptide führen (Zasloff, 2002). Yan *et al.* (2008) demonstrierten in ihrer Arbeit, dass Psoriasin neutrophile Granulozyten aktiviert, die daraufhin eine Reihe von Chemokinen und Zytokinen, wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8/ CXCL), TNF α , Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α /CLL3), MIP-1 β /CLL und MIP-3 α /CLL20 ausschütten.

Vorarbeiten bestätigen eine starke Hochregulation von Psoriasin nach Stimulation mit TNF α , IL-1 β und VEGF in der HCE-Zelllinie, in der HCjE-Zelllinie konnte vergleichsweise kein positiver Effekt beobachtet werden (Schlorf, 2005). Eines der Ziele dieser Arbeit war es die Ergebnisse zu verifizieren und spezifizieren. Dabei sollte der Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nach Stimulation in unterschiedlichen Konzentrationen und Zeitintervallen auf die Psoriasinexpression untersucht werden.

Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das nach Kontakt mit körperfremden Substanzen, z.B. Pyrogenen, von Makrophagen sezerniert wird und daraufhin eine Immunantwort auslöst. Die Wirkungen von IL-1 β im Körper sind vielfältig. In der Leber wird beispielsweise die Akutphase-Reaktion aktiviert und Proteine der akuten Entzündungsphase (C-reaktives Protein und Mannose-bindendes Lektin) werden produziert. Im Knochenmark werden neutrophile Granulozyten mobilisiert und dadurch die Phagozytose von Fremdkörpern aktiviert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HCE-Zelllinien 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen von IL-1 β (5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml) stimuliert. 5 ng/ml IL-1 β bewirken eine 20-fache und 10 ng/ml IL-1 β eine 60-fache Steigerung der Psoriasinkonzentration. Bei der Stimulation mit höheren Dosen IL-1 β sinkt der Effekt wieder ab. Nach Stimulation mit 20 ng/ml IL-1 β wird die Psoriasinkonzentration auf den 30-fachen Wert und nach 50 ng/ml IL-1 β unter den 20-fachen Wert reduziert. Um zu klären, ob die Stimulationsdauer die Psoriasinexpression beeinflusst, wird in einem weiteren Versuch die HCE-Zelllinie mit 5 ng/ml IL-1 β für 6 h, 12 h und 24 h stimuliert. Dabei wird die höchste Psoriasinkonzentration nach 12 h (30-fache Steigerung) gemessen, wobei nach 24 h wieder ein Abfall der Psoriasinexpression (20-fach) beobachtet wird. Gläser *et al.* (2005) konnten nach Stimulation von primären

5. Diskussion

Keratinocyten mit IL-1 β ebenfalls eine erhöhte Psoriasinexpression beobachten. In einer Folgestudie demonstrierte die Arbeitsgruppe den inhibitorischen Effekt von IL-4 und -13 auf die Psoriasinexpression in primären Keratinocyten, wobei wiederum IL-17 und -22 eine erhöhte Psoriasinsekretion bewirkten (Gläser *et al.*, 2009). Ähnliche Versuchsreihen zeigen, dass IL-6 und Oncostatin-M beim Mamakarzinom die Psoriasinexpression induzieren. Dabei steigt mit zunehmender Stimulationskonzentration von IL-6 und Oncostatin-M die Psoriasinexpression (West und Watson, 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Stimulation mit IL-1 β bei einer Mindestkonzentration und Stimulationsdauer zu einem Abfall der Psoriasinexpression führt. Möglicherweise verursacht IL-1 β ab einer bestimmten Konzentration über einen unbekanntem Mechanismus eine negative Rückkopplung und hemmt die Psoriasinproduktion. Ferner ist eine kontrollierte Selbstlimitation der Entzündungsreaktion denkbar, die nach einer definierten Reaktionsdauer eintritt, oder es wird die Expression anderer AMP angeregt, die an Stelle von Psoriasin wirken. So zeigt eine kürzliche Studie, dass die Stimulation einer Korneaepithelzelllinie mit IL-1 β zu einer erhöhten Expression von humanem Defensin-9 führt (Mohammed *et al.*, 2010). Weiterhin ist bekannt, dass Zytokine und andere Entzündungsmediatoren im Rahmen von Entzündungsprozessen gewebeschädigend wirken. Dabei werden nicht nur Pathogene oder körperfremdes Material eliminiert, sondern auch gesunde Körperzellen. Ein Beispiel hierfür ist die rheumatoide Arthritis, bei der es zur erhöhten Ausschüttung von IL-1 β und TNF α durch aktivierte Makrophagen und Zerstörung von Gelenkknorpel und Knochen kommt (Niethart, 2002; Aktoris, 2004). Eine pathogene und gewebeschädigende Wirkung von Psoriasin ist bisher nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass Psoriasin vermutlich einen wichtigen Faktor im Rahmen von Entzündungsprozessen an der menschlichen Augenoberfläche darstellt.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF gehört zur Familie der Peptid-Wachstumsfaktoren und wurde ursprünglich als dimeres, 34-45 kDa großes Heparin-bindendes Glykopeptid identifiziert, das von Tumorzellen und Endothelzellen sezerniert wird (Senger *et al.*, 1983, 1990; Ferrara und Henzel, 1989). Wachstumsfaktoren sind Proteine mit niedrigen Molekulargewicht, die in geringer Konzentration in zahlreichen Geweben vorkommen. Sie können leicht in Zellen diffundieren um dort Vorgänge wie Zellproliferation, Differenzierung der Zelle oder Hemmung des Zellwachstums auszulösen. Nach einer Verletzung werden sie vermehrt gebildet um die Regeneration des Gewebes zu stimulieren (Sørensen *et al.*,

5. Diskussion

2003).

In geringer Konzentration kommt VEGF in der gesunden Kornea vor und wird hier besonders von Epithel- und Endothelzellen, aber auch schwach von Keratinozyten gebildet, dabei werden die VEGFR1 und 2 vom Limbusendothel und VEGFR1 vom Hornhautendothel exprimiert (Philipp *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe Gebhard *et al.*, (2005) wiesen die Expression von VEGF, sowie VEGFR1 und 2 an der Konjunktiva nach.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit aufsteigenden Konzentrationen von VEGF (5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml) stimuliert. Es kann demonstriert werden, dass mit steigender VEGF-Konzentration die Psoriasinexpression steigt und nach Stimulation mit 50 ng/ml VEGF der Höchstwert erreicht wird (30-fache Steigerung). Die Ergebnisse geben einen weiteren Hinweis darauf, dass Psoriasin wahrscheinlich an Entzündungsprozessen der Augenoberfläche beteiligt ist. So ist bekannt, dass VEGF chemotaktisch auf verschiedene Zellen wie Makrophagen und Chondroklasten wirkt (Gerber *et al.*, 1999). Eine ähnliche Funktion wäre auch für Psoriasin denkbar. Ferner ist eine antiangiogene oder additiv- angiogene Bedeutung von Psoriasin anzunehmen. Letzteres ist denkbar, da ebenfalls für andere antimikrobielle Peptide wie LL37/hCAP-18 eine wirksame angiogene Wirkung aufgezeigt werden konnte (Koczulla *et al.*, 2003). Allerdings ist auch die gegenteilige Funktion, also eine antiangiogene Wirkung vorstellbar. Hierbei würde die Induktion von Psoriasin bei VEGF-Erhöhung im Tränenfilm einer Vaskularisation der gefäßfreien Hornhaut entgegenwirken, indem VEGF über einen bislang unbekanntem Mechanismus gehemmt wird. In Endothelzellen ist eine solche hemmende Wirkung durch α -Defensine nachgewiesen worden (Chavakis *et al.*, 2004). Dieser Fragestellung ausführlich nachzugehen, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, weil rekombinantes Psoriasin nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Auf Grundlage der erhaltenen Erkenntnisse ist jedoch von einer regulatorischen Funktion des Psoriasin bei der Angiogenese oder Antiangiogenese an der Augenoberfläche auszugehen.

Tumornekrosefaktor α (TNF α)

TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin mit verschiedenen Effekten, wie z.B. Stimulation der Immunantwort und Auslösung oder Verstärkung von Entzündungen (Moo *et al.*, 2001). Weiterhin erhöht TNF α die Phagozytoseaktivität und Antikörperbildung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. TNF- α aktiviert IL-1, kann aber auch selbst durch IL-1 reguliert werden. Stimulationsversuche von HCE-Zellen mit TNF α führten in Voruntersuchungen zu einer Hochregulation von Psoriasin

5. Diskussion

(Schlorf, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit werden HCE-Zellen mit 5 ng/ml und 20 ng/ml TNF α stimuliert und die Wirkung hinsichtlich der Psoriasinproduktion untersucht. Bei Stimulation mit 5 ng/ml TNF α zeigt sich eine signifikante Steigerung der Psoriasin-expression (4-fache Steigerung). Ähnliche Ergebnisse werden nach Stimulation primärer Keratinozyten mit TNF α beobachtet (Gläser *et al.*, 2005). Interessanterweise ist nach Erhöhung der Stimulationskonzentration auf 20 ng/ml TNF α keine weitere Steigerung der Psoriasinproduktion nachweisbar, so dass davon auszugehen ist, dass die Psoriasinexpression durch Stimulation mit TNF α auf ihrem Höhepunkt angekommen ist. Eine Steigerung der Psoriasinkonzentration durch Stimulation mit weitaus höheren TNF α -Konzentrationen ist jedoch nicht auszuschließen. Vorkurzem zeigte eine Arbeit, dass bei Patienten mit atopischer Dermatitis, die in den Keratinozyten anfänglich schon stark erhöhte Psoriasinkonzentration durch Stimulation mit TNF α noch weiter gesteigert werden kann (Gläser *et al.*, 2009). Es ist denkbar, dass TNF α die Psoriasinexpression an der Augenoberfläche im Rahmen von akuten oder chronischen Entzündungszuständen heraufreguliert. Im menschlichen Auge nimmt TNF α einen zentralen Stellenwert in der Pathogenese der Uveitis ein, und in tierexperimentellen Studien wurde TNF α in den frühen Stadien einer Endotoxin-induzierten Uveitis nachgewiesen (De Vos *et al.*, 1994). Weiterhin ist denkbar, dass ein fehlender stimulatorischer Effekt durch TNF α zu einer Reduktion der Psoriasin-expression führt und so eine Infektion an der Augenoberfläche begünstigt. In einer jüngeren Studie wird bei Patienten mit juveniler Arthritis oder Morbus Bechterew nach Behandlung mit TNF α -Blockern (Etanercept) die Entwicklung einer endogene Uveitis beobachtet (Kakkassery *et al.*, 2010). So liegt die Vermutung nahe, dass der stimulatorische Effekt von TNF α auf Psoriasin die Entstehung oder Verhinderung von Entzündungsprozessen an der Augenoberfläche beeinflusst.

Trefoil Factor Family Peptid 3 (TFF3)

TFF-Peptide sind typische Produkte von Muzin-sezernierenden Zellen, vor allem im Gastrointestinaltrakt. Sie dienen dem Schutz und dem Erhalt der Oberflächenintegrität muköser Epithelien. TFF-Peptide interagieren mit Muzinen und aktivieren Signalkaskaden, die diverse molekulare Prozesse wie Zellmigration, Apoptose, Entzündungen und Angiogenese steuern (Thim, 1997). Bisher wurden drei TFF-Peptide (TFF1, TFF2, TFF3) nachgewiesen, deren gemeinsames Strukturmerkmal eine sogenannte TFF-Domäne ist (Thim, 1997), die aus etwa 40 Aminosäureresten, in denen sechs konservierte Cystein-Reste durch intramolekulare Disulfidbrücken in einer 1-5, 2-4 und 3-6 Konfiguration verbunden sind, besteht. Der 7. Cysteinrest von

5. Diskussion

TFF1 und TFF3 bildet eine intermolekulare Disulfidbrücke, die für die Dimerisierung der Peptide verantwortlich ist (Kinoshita *et al.*, 2000; Thim, 1989). In zweidimensionaler Darstellung ähnelt die TFF-Domäne einer Kleeblatt Struktur (Thim, 1989, Wright *et al.*, 1997). Untersuchungen an Lungengewebe legen die Vermutung nahe, dass TFF-Peptide wichtige wirtsspezifische Funktionen bei der Abwehr von Bakterien vermitteln, wie die Bindung an Wirtszellen, die Phagozytose und die Signalvermittlung an das Immunsystem (dos Santos Silva *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit werden HCE-Zellen mit 0.01, 0.1, 1 und 10 µg/ml TFF3 stimuliert. Dabei führt eine Stimulationskonzentration von 0.01 µg/ml TFF3 zu einer 3-fachen Steigerung der Psoriasinkonzentration. Höhere Stimulationskonzentrationen von TFF3 zeigen keine signifikante Steigerung der Psoriasinproduktion im Vergleich zur Kontrolle. Möglicherweise spielen Mechanismen eine Rolle, bei denen die Psoriasinproduktion anderen Stoffwechselprozessen untergeordnet ist oder durch einen negativen Feedbackmechanismen gehemmt wird. Bisher wurde die Produktion von TFF3 in den Epithelzellen des Ductus nasolacrimalis beschrieben. Dort wird TFF3 eine wichtige Rolle beim Transport der Tränenflüssigkeit durch die ableitenden Tränenwege und für die Rheologie der Tränenflüssigkeit zugeschrieben (Paulsen *et al.*, 2002). Eine ähnliche Funktion von Psoriasin ist eher unwahrscheinlich, da Psoriasin bisher als Peptid bekannt war, dass bei Entzündungsreaktionen heraufreguliert wird. Denkbar wäre jedoch, dass Psoriasin eine Rolle bei der kornealen Wundheilung spielt. TFF-Peptide werden auch vom Auge sezerniert. Aktuelle Studien belegen die Expression von TFF3 vor allem von Becherzellen der Konjunktiva zusammen mit dem Muzin MUC5AC, sowie Spuren von TFF1 (Hoffmann *et al.*, 2005; Langer *et al.*, 1999, Langer *et al.*, 2001).

In geringer Konzentration sind TFF1 und TFF3 in der gesunden Kornea nachweisbar (Steven *et al.*, 2004). Bei kornealen Erkrankungen wie z.B. Keratokonus, Fuchs Epitheldystrophie und Keratoconjunctivitis herpetica ist dagegen die TFF3-Expression stark erhöht. Außerdem konnte eine TFF3 Expression von den Becherzellen bei Pterygium conjunctivae nachgewiesen werden (Steven *et al.*, 2004). Eine kürzliche Arbeit von Paulsen *et al.* (2008) demonstrierte das Vorkommen hoher Konzentration von TFF3 in einem Korneadefektmodell und die wundheilungsfördernden Eigenschaften von TFF3 (Paulsen *et al.*, 2008).

Die Synthese von TFF1 und TFF3 ist, zusammen mit EGF, vermutlich für die Reparatur und Regeneration der Kornea nach Verletzungen von besonderer Bedeutung. Dabei spielen sowohl Zellwanderungsprozesse aber vermutlich auch

5. Diskussion

Differenzierungsvorgänge eine wichtige Rolle. Eine Studie von Göke et al., 2001 konnte zeigen, dass TFF3 in vitro die Proliferation primärer kornealer Epithelzellen anregt und somit eine wichtige Rolle bei der kornealen Wundheilung spielt. Eine mögliche Interpretation für die Heraufregulierung von Psoriasin durch TFF3 ist deren gemeinsame wichtige Rolle bei Reepithelialisierungsprozessen (epithelialen Restitution) oder die Unterstützung derselben, indem es Infektionen während der kornealen Wundheilung verhindert.

6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit gelingt es, Psoriasin in dem okulären Gewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates nachzuweisen. Weiterhin kann die Induktion von Psoriasin nach Stimulation mit Bakterienüberständen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren demonstriert werden. Die erhaltenden Erkenntnisse könnten in Zukunft durch weitere Forschungsvorhaben ergänzt werden, um die Funktion und Regulation von Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat noch besser zu verstehen. So wären weitere Untersuchungen an der Glandula lacrimalis hinsichtlich der Psoriasinexpression interessant, um herauszufinden, ob die Tränendrüse induzierbare antimikrobielle Peptide bildet und ob sie ggf. in der Lage ist, induzierbare antimikrobielle Peptide einer mikrobiellen Invasion anzupassen. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich in der PCR eine positive Bande bei einer kornealen Herpesvirusinfektion. Der Einfluss von Viren auf die Psoriasinexpression ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben und dem Wissen über eine virale Regulation der Psoriasinproduktion an der Augenoberfläche könnte hinsichtlich zukünftiger Behandlungsmethoden verschiedener okulärer Erkrankungen eine große Bedeutung zukommen. Auch könnten weiterführende Stimulationsversuche mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen von HCE-Zellen zu einem besseren Verständnis über das antimikrobielle Spektrum von Psoriasin beitragen. Experimente bei denen HCE-Zellen auf deren VEGF-Expression nach Stimulation mit rekombinantem Psoriasin untersucht werden, könnten Aufschluss über die regulatorische Funktion von Psoriasin im Rahmen der Angiogenese und der Antiangiogenese geben.

Die erhobenen Befunde dieser Arbeit haben klinische Relevanz im Hinblick auf die Behandlung von bakteriellen Keratitiden und Konjunktivitiden. Psoriasin kann in der Tränenflüssigkeit und in okulären Geweben der Augenoberfläche nachgewiesen werden. So ist eine Bedeutung im Rahmen der Pathogenese des trockenen Auges wahrscheinlich, muss aber in weiteren Experimenten detailliert untersucht werden.

Erkenntnisse, die in naher Zukunft über die Funktion von Psoriasin gewonnen werden, können sicher gut mit dem Kontext der vorliegenden Arbeit verknüpft werden und zum weiteren Verständnis der Wirkung von Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat beitragen.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Vorkommen, der Funktion und der Regulation des antimikrobiellen Peptids Psoriasin an der Augenoberfläche und am Tränenapparat. Psoriasin gehört zur Familie der niedermolekularen Kalzium-bindenden S100 Proteine, das von der Hauterkrankung Psoriasis, bei der das Peptid von den Keratinozyten in hoher Konzentration sezerniert wird, seinen Namen erhalten hat. Mittlerweile ist das Vorkommen von Psoriasin bei Hauttumoren und beim Mammakarzinom belegt. Ferner findet Psoriasin als Tumormarker Verwendung. Gläser *et al.*, (2005) konnten beweisen, dass Psoriasin antibakterielle Wirkung gegen *E. coli* besitzt. Besonders hohe Psoriasinkonzentrationen kommen auf der menschlichen Haut im Bereich des behaarten Kopfes, des Gesichts, der Achseln, sowie der Hand- und Fußflächen vor.

Immunhistochemisch gelingt der Nachweis von Psoriasin im Plattenepithel, in Haarfollikeln, in Meibomdrüsen des Augenlides und in der Kornea. Mittels RT-PCR, Western Blot und ELISA können diese Ergebnisse verifiziert werden. Zusätzlich kann Psoriasin in der Konjunktiva und im Ductus nasolacrimalis detektiert werden. Mittels ELISA gelingt der Nachweis einer geringen Psoriasinkonzentration auch in der Tränendrüse. Überraschenderweise werden hohe Psoriasinkonzentrationen in menschlicher Tränenflüssigkeit nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass Psoriasin eine wichtige Rolle im Rahmen der angeborenen Immunabwehr an der Augenoberfläche und im Tränenapparat spielt und geben eine mögliche Erklärung für die niedrige Infektionsrate mit *E. coli*.

Die Stimulation verschiedener Zelllinien mit Bakterienüberständen induziert die Psoriasinexpression unterschiedlich. *E. coli* reguliert die Psoriasinexpression in der Talgdrüsenzelllinie leicht herauf. Im Gegensatz dazu bewirken *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *B. cepacia* eine Steigerung der Psoriasinexpression in einer Bindehautepithelzelllinie. In einer Hornhautepithelzelllinie wird kein Effekt durch Stimulation beobachtet. Die Psoriasinsekretion wird wahrscheinlich durch Bakterienbestandteile getriggert, wobei das Expressionsmuster in den verschiedenen okulären Zelllinien unterschiedlich ausfällt. Die Ergebnisse lassen jedoch auf ein breiteres antibakterielles Wirkspektrum für Psoriasin schließen als bisher vermutet.

Die Psoriasinsekretion wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. IL-1 β führt zu einer hohen Expression von Psoriasin in der Hornhautepithelzelllinie. Die höchsten Werte werden dabei bei einer Stimulationskonzentration von 10 ng/ml und einer Stimulationsdauer von 12 h gemessen. Nach Stimulation der Bindehaut-

7. Zusammenfassung

epithelzelllinie mit dem Wachstumsfaktor VEGF wird ebenfalls eine Steigerung der Psoriasinproduktion erreicht, der höchste Wert wird dabei bei einer Stimulationskonzentration von 50 ng/ml gemessen. TNF α und das Kleeblattpeptid TFF3 bewirken eine leichte Induktion von Psoriasin, wobei TFF3 die Psoriasin-expression nur bei einer Stimulationskonzentration von 0.01 μ g/ml steigert. Höhere Konzentration bewirken einen Abfall der Psoriasinexpression. Die Erkenntnisse lassen auf eine wichtige Funktion von Psoriasin bei Entzündungs- und immunmodulatorischen Prozessen an der Augenoberfläche schließen. Außerdem ist eine mögliche antiangiogene oder additiv angiogene Wirkung für Psoriasin denkbar. Die Heraufregulation der Psoriasinexpression durch TFF3 lässt eine wichtige Funktion für Psoriasin bei Reepithelialisierungsprozessen während der kornealen Wundheilung vermuten, die weiterer Abklärung bedarf.

Die in der vorliegenden Arbeit zusammengetragenen Ergebnisse können dazu beitragen, die Pathomechanismen von einigen Augenerkrankungen besser zu verstehen und effektivere Behandlungsmethoden zu entwickeln.

8. Literaturverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

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(1):28-33.

Abtin A, Eckert L, Gläser R, Gmeiner R, Mildner M, Tschachler E (2010) The antimicrobial heterodimer S100A8/S100A9 (calprotectin) is upregulated by bacterial flagellin in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 130(10):2423-30.

Aktoris K, Hofmann B, Förstermann U, Starke K: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Aufl. Urban&Fischer, München-Jena, 2004, S. 364-369.

Alowami S, Qing G, Emberley E, Snell L, Watson PH (2003) Psoriasin (S100A7) expression is altered during skin tumorigenesis. *BMC Dermatology* 3:1.

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.

Arzumanyan VG, Vartanova NO, Serdyuk OA, Ozhovan IM (2010) Congenital immune defense of the hair. *Bull Exp Biol Med* 149(4):428-30.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

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

Brodersen DE, Etzerodt M, Madsen P, Celis JE, Thogersen HC, Nyborg J et al. (1998) EF-hands at atomic resolution: the structure of human psoriasin (S100A7) solved by MAD phasing. *Structure* 6:477-89.

8. Literaturverzeichnis

Brodersen DE, Nyborg J, Kjeldgaard M (1999) Zinc-binding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca²⁺-bound human psoriasin (S100A7) in the Zn²⁺-loaded and Zn²⁺-free states. *Biochemistry* 38:1695-704.

Boman HGJ (2003) Conformational behavior of temporin A and temporin L in aqueous solution: A computational/experimental study H.G. *J Intern Med* 254:197-215.

Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F (2005) IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 174:3695-702.

Borchman D, Yappert MC, Foulkus GN (2010) Changes in human meibum lipid with meibomian gland dysfunction using principal component analysis. *Exp Eye Res* 91(2):246-56.

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 gelelectrophoresis and mass spectrometry. *Respiratory Research* 6:118 doi:10.1186/1465-9921-6-118.

Burgisser DM, Siegenthaler G, Kuster T, Hellman U, Hunziker P, Birchler N, Heizmann C (1995) Amino acid sequence analysis of human S100A7 (psoriasin) by tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 257-263.

Celis JE, Rasmussen HH, Vorum H, Madsen P, Honore B, Wolf H, Orntoft T (1996) Bladder squamous cell carcinomas express psoriasin and externalize it to the urine. *Journal of Urology* 155(6):2105-2112.

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(11):1306-8.

Clohassy PA und Golden BE (1995) Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence. *Scand J Immunol* 151:6291-6301.

8. Literaturverzeichnis

Cullor JS, Mannis MJ, Murphy CJ, Smith WL, Selsted ME, Reid TW (1990) In vitro antimicrobial activity of defensins against ocular pathogens. *Arch Ophthalmol* 108:861-864.

De Vos AF, Klaren VN, Kijlstra A (1994) Expression of multiple cytokines and IL-1RA in the uvea and retina during endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3873-3883.

Diebold Y, Calonge M, de Salamanca ME, Callejo S, Rosa MRM, Sáez V, Siemasko KF, Stern MS (2003) Characterization of a Spontaneously Immortalized Cell Line (IOBA-NHC) from Normal Human Conjunctiva. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44:4263-4274.

Donato R (1991) Perspectives in S-100 protein biology. *Cell calcium* 12:713-726.

Donato R (2001) Family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 3:637-668.

Dos Santos SE, Ulrich M, Doring G, Botzenhart K (2000) Trefoil factor family domain in the human respiratory tract. *J Pathol* 190(2):133-42.

Emberley ED, Niu Y, Njue C, Kliwer EV, Murphy L, Watson PH (2003) Psoriasin (S100A7) expression is associated with poor outcome in estrogen receptor-negative invasive breast cancer. *Clinical Cancer Research* 9(7):2627-2631.

Enerbäck C, Porter DA, Seth D, Sgroi D, Gaudet J, Weremowicz S, Morten CC, Schnitt S, Pitts RL, Stampf J, Barnhart K, Poliak K (2002) Psoriasin expression in mammary epithelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* 1;62(1):43-7.

Fearson D, Austen K (1980) The alternative pathway of complement: A system for host resistance to microbial infection. *N Engl J Med* 303:259-261.

Ferrara N und Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858.

Fleming A (1922) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and

8. Literaturverzeichnis

secretions. In: Proceedings of the Royal Society of London 93B:306-317.

Fluckinger M, Haas H, Merschak P, Glasgow BJ, Redl B (2004) Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrob Agents Chem* 48:3367-3372.

Folk JE (1980) Transglutaminases. *Annu Rev Biochem* 49:517-31.

Gambichler T, Skrygan M, Tigges C, Kobus S, Gläser R, Kreuter A (2009) Significant upregulation of antimicrobial peptides and proteins in lichen sclerosus. *Br J Dermatol* 161(5):1136-42.

Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 710-720.

Garreis F, Schlorf T, Worlitsch D, Steven P, Bräuer L, Jäger 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. *Histochem Cell Biol* 134(1):59-73.

Garreis F, Gottschalt M, Schlorf T, Gläser R, Harder J, Worlitsch 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* 1;52(7):4914-22.

Gebhardt M, Mentlein R, Schaudig U, Pufe T, Recker K, Nolle B, Al-Samir K, Geerling G und Paulsen FP (2005) Differential expression of vascular endothelial growth factor implies the limbal origin of pterygia. *Ophthalmol* 112:1023-1030.

Gerber HP, Hillian KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller G-K, Rangell K, Wright BD, Radke F, Aquet M, Ferrara N (1999) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126:1149-1159.

Girgis DO, Dajcs JJ, O'Callaghan RJ (2003) Phospholipase A2 activity in normal and *Staphylococcus aureus*-infected rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:197-202.

8. Literaturverzeichnis

Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder J-M (2005) Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 6:57-64.

Gläser R, Meyer-Hoffert U, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Kobliakova J, Fölster-Holst R, Proksch E, Schröder JM, Schwarz T (2009) The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J Invest Dermatol* 129(3):641-9.

Gottsch JD, Li Q, Ashraf MF, O'Brien TP, Stark WJ, Liu SH (1998) Defensin gene expression in the cornea. *Curr Eye Res* 17:1082-1086.

Göke MN, Cook JK, Kunert KS, Fini ME, Gipson IK, Podolsky DK (2001) Trefoil peptides promote restitution of wounded corneal epithelial cells. *Exp Cell Res* 1;264(2):337-44.

Green-Church KB, Butovich I, Willcox M, Borchman D, Paulsen F, Barabino S, Glasgow BJ (2011) The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Tear Film Lipids and Lipid-Protein Interactions in Health and Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(4):1979-1993.

Grehn F *Augenheilkunde*. 30. Aufl. Springer, Heidelberg, 2008, S. 77-78.

Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM (2008) Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis* 14:456-470.

Gutgesell VJ, Stern GA, Hood CI (1982) Histopathology of meibomian gland dysfunction. *Am J Ophthalmol* 94:383-387.

Haddad S, Zhang Z, Leygue E, Snell L, Huang A, Niu Y, Hitchcock TH, Hole K, Murphy LC, Watson PH (2004) Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer. *American Journal of Pathology* 155(6):2057-2066.

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. *Biochem J* 339(Part 2):419-27.

8. Literaturverzeichnis

Hagens G, Roulin K, Hotz R, Saurat JH, Hellman U, Siegenthaler G (1999b) Probable interaction between S100A/ und E-FABP in the cytosol of human keratinocytes from psoriatic scale. *Moll Cell Biochem* 192:123-3.

Hardas BD, Zhao X, Zhang J, Longqing X, Stoll S, Elder JT (1996) Assignment of psoriasin to human chromosomal band 1q21: coordinate overexpression of clustered genes in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 106(4):753-758.

Hartschuh W, Weihe E, Reinecke M (1983) Peptidergic (neurotensin, VIP, substance P) nerve fibres in the skin. Immunohistochemical evidence of an involvement of neuropeptides in nociception, pruritus and inflammation. *Br J Dermatol* 109 (Suppl 25):14-17.

Haynes RJ, McElveen JE, Dua HS, Tighe PJ, Liversidge J (2000) Expression of human beta-defensins in intraocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(10):3026-31.

Haynes JH, Tighe PJ, Dua HS (1999) Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. *Br J Ophthalmol* 83(6):737-41.

Haynes JH, Tighe PJ, Dua HS (1998) Innate defence of the eye by antimicrobial defensin peptides. *Lancet* 352:451-452.

Hertzel AV, Bernlohr DA (2000) The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinolol Metab* 11:175-80.

Hoffmann W, Jagla W (2002) Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol* 213:147-181.

Hohl D (1990) Cornified cell envelope. *Dermatologica* 180:201-11.

Ishikawa K, Nakagawa A, Tanaka I, Suzuki M, Nishihira J (2000) The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Part 5):559-66.

8. Literaturverzeichnis

Jumblatt MM, McKenzie RW, Steele PS, Emberts CG, Jumblatt JE (2003) MUC7 expression in the human lacrimal gland and conjunctiva. *Cornea* 22(1):41-5.

Kakkassery V, Mergler S, Pleyer U (2010) Anti-TNF-alpha treatment: a possible promoter in endogenous uveitis? Observational report on six patients: occurrence of uveitis following etanercept treatment. *Curr Eye Res* 35(8):751-6.

Kathleen CL, Richard LE (2007) S100A7 (Psoriasin) - Mechanism of Antibacterial Action in Wounds. *J Invest Dermatol* 127:945-957.

Kijlstra A (1990) The role of lactoferrin in the nonspecific immune response on the ocular surface. *Regul Immunol* 3:193-197.

Kinoshita K, Taupin DR, Itoh H, Podolsky DK (2000) Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol Cell Biol* 20:4680-4690.

Knop E, Knop N, Brewitt H (2003) Das trockene Auge als komplexe Fehlregulation der funktionellen Anatomie der Augenoberfläche. Neue Impulse zum Verständnis des trockenen Auges. *Ophthalmologie* 100:917-928.

Knop N, Knop E (2001) Das Kryptensystem der menschlichen Konjunktiva hat eine sekretorische und eine immunologische Funktion. Abstract 99. Jahrestag DOG.

Knop N, Knop E (2009) Anatomie, Embryologie und Histologie der Meibomdrüsen. *Ophthalmologie* 106:872-883.

Knop E, Knop N, Brewitt H, Pleyer U, Rieck P, Seitz B, Schirra F (2009) Meibom-Drüsen Teil III: Dysfunktion (MGD)- Plädoyer für ein eigenständiges Krankheitsbild und wichtige Ursache für das trockene Auge. *Der Ophthalmologe* 106(11):966-979.

Knop E, Knop N, Millar T, Obata H und Sullivan DA (2011) The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Anatomy,

8. Literaturverzeichnis

Physiology, and Pathophysiology of the Meibomian Gland. *IOVS Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 (4) 1938-1978.

Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Clauss M, Bals R (2003) An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 111(11):1643-5.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J (1987) An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 317:985-90.47.

Korb DR, Blackie CA (2008) Meibomian gland diagnostic expressibility: correlation with dry eye symptoms and gland location. *Cornea* 27:1142-1147.

Korb DR, Henriquez AS (1980) Meibomian gland dysfunction and contact lens intolerance. *J Am Optom Assoc* 51:243-251.

Krenzer KL, Dana MR, Ullman MD et al. (2000) Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4874-4882.

Krstic RV: Human microscopic anatomy. An atlas for students of medicine and biology. Springer, Berlin-Heidelberg, 1991, Vol 1, pp. 257.

Kulski JK, Lim CP, Dunn DS & Bellgard M (2003) Genomic and phylogenetic analyses of the S100A7 (Psoriasin) gene duplications within the region of the S100 gene cluster on human chromosome 1q21. *J Mol Evol* 56:397-406.

Langer G, Jagla W, Behrens-Baumann W, Walter S, Hoffmann W (1999) Secretory Peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2220-2224.

Langer G, Walter S, Behrens-Baumann W, Hoffmann W (2001) TFF-Peptide: Neue mukusassozierte Sekretionsprodukte der Konjunktiva. *Ophthalmologe* 98:976-979.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-5.

8. Literaturverzeichnis

Lee KC, Eckert RL (2007) S100A7 (Psoriasin)-Mechanism of antibacterial Action in wounds. *J Invest Dermatol* 127:945-957.

Lehrer RI, Ganz T (2002) Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol*. 9:18-22.

Li X, De LE, Lu W (2005) Total chemical synthesis of human psoriasin by native chemical ligation. *Biochemistry* 44:14688-94.

Liu S, Richards SM, Lo K, Hatton M, Fay AM, Sullivan DA (2011) Changes in gene expression in human meibomian gland dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* iovs10-6482.

Lüllmann-Rauch R: Taschenatlas Histologie. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart-New York, 2006, S. 569-598.

Madsen P, Anant S, Rasmussen HH, Gromov P, Vorum H, Dumanski JP, Tommerup N, Collins JE, Wright CL, Dunham I, MacGinnitie AJ, Davitson NO, Celis JE (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.

Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honore B, Celis JE (1992) Molecular cloning and expression of a novel keratinocytes protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP] that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol* 99(3):299-305.

Mathers WD (1993) Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye. *Ophthalmology* 100:347-351.

McDermott AM (2009) The role of antimicrobial peptides at the ocular surface. *Ophthalmic Res* 41:60-75.

Meyer JE, Harder J, Sipos B, Maune S, Klöppel G, Bartels J, Schröder J-M, Gläser R (2008) Psoriasin (S100A7) is a principal antimicrobial peptide of the human tongue. *Mucosal Immunol* 1:239-243.

8. Literaturverzeichnis

Mildner M, Stichenwirth M, Abtin A, Eckhart L, Sam C, Gläser R, Schröder J-M, 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 Immunol* advance online publication.

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. *J Invest Dermatol* 106:989-92.

Mishima S, Maurice D (1961) The oily layer of the tear film and evaporation from the corneal surface. *Exp Eye Res* 1:39-45.

Mohammed I, Sulemann 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. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 51(9):4677-82.

Moo V, Sieper J, Herzog V, Muller BM (2001) Regulation of expression of cytokines and growth factors in osteoarthritic cartilage explants. *Clin Rheumatol* 20(5):353-8.

Moroz OV, Antson AA, Dodson GG, Wilson KS, Skibshoj I, Lukanidin EM et al. (2000) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human calcium-binding protein S100A12. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Part 2):189-91.

Moubayed N (2007) Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 133(4):253-261.

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(9):3795-801.

Nicolaidis N, Kaitaranta JK, Rawdah TN et al. (1981) Meibomian gland studies: comparison of steer and human lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 20:522-536.

8. Literaturverzeichnis

Nietlard FU, Pfeil J: Duale Reihe Orthopädie. 3. Aufl. Hippokrates, Stuttgart, 2002, S. 197-205.

Norn M (1987) Expressibility of meibomian secretion. Relation to age, lipid precorneal film, scales, foam, hair and pigmentation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 65:137-142.

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.

Olami Y, Zajicek G, Cogan M et al. (2001) Turnover and migration of meibomian gland cells in rats' eyelids. *Ophthalmic Res* 33:170-175.

Oram J, Reiter B (1979) Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim Biophys Acta* 170:351-353.

Stoeckelhuber M, Messmer EM, Schubert C, Stoeckelhuber BM, Koehler C, Welsch U, Bals R (2008) Immunolocalization of defensins and cathelicidin in human glands of Moll. *Ann Anat* 190:230-237.

Paulsen F, Hinz M, Schaudig U, Thale AB, Hoffmann W (2002) TFF-Peptides in the human efferent tear ducts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3359-3364.

Paulsen F, Corfield A, Hinz M, Hoffmann W, Schaudig U, Thale A, Berry M (2004) Characterization of mucins in human lacrimal sac and nasolacrimal duct. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1807-1813.

Paulsen F, Corfield A, Hinz M, Hoffmann W, Schaudig U, Thale A, Berry M (2003) Characterization of mucins in human lacrimal sac and nasolacrimal duct. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1807-1813.

Paulsen FP, Woon CW, Varoga D, Jansen A, Garreis F, Jäger 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 19:13418-27.

Paulsen F (2006) Cell and molecular biology of human lacrimal gland and nasolacrimal

8. Literaturverzeichnis

duct mucins. *Int Rev Cytol* 249:229-279.

Paulsen F, Berry M (2006) Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus. *Prog Histochem Cytochem* 41:1-53.

Perra MT, Serra A, Sirigu P, Turno F (1996) Histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity in human Meibomian glands. *Eur J Histochem* 40:39-44.

Philipp W, Speicher L, Humplel C (2000) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2514-2522.

Pleyer U, Baatz H (1997) Antibacterial protection of the ocular surface. *Ophthalmologica* 211(suppl 1):2-8.

Porre S, Heinonen S, Mäntyjärvi R, Rytönen-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(2):87-92.

Qu X-D, Lehrer RI (1998) Secretory phospholipase A₂ is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* 66:2791-2799.

Reithmayer K, Meyer KC, Kleditzsch P, Tiede S, Uppalapati SK, Gläser R, Harder J, Schröder JM, Paus R (2009) Human hair follicle epithelium has an antimicrobial defence system that includes the inducible antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) and RNase 7. *Br J Dermatol* 161(1):78-89.

Robin JB, Jester JV, Nobe J et al. (1985) In vivo transillumination biomicroscopy and photography of meibomian gland dysfunction. A clinical study. *Ophthalmology* 92:1423-1426.

8. Literaturverzeichnis

Robinson NA, Eckert RL (1998) Identification of transglutaminase-reactive residues in S100A11. *J Biol Chem* 273:2721-8.

Robinson NA, Lopic S, Welter JF, Eckert RL (1997) S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 272:12035-46.

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. *J Invest Dermatol* 121:132-41.

Ruse M, Lambert A, Robinson N, Ryan D, Shon KJ, Eckert RL (2001) S100A7, S100A10, and S100A11 are transglutaminase substrates. *Biochemistry* 40:3167-73.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

Saint Andre A, Blackwell NM, Hall LR, Hoerauf A, Brattig NW, Volkmann L, Taylor MJ, Ford L, Hise AG, Lass JH, Diaconu E, Pearlman E (2002) The role of endosymbiotic Wolbachia bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science* 295:1892-1895.

Sambrook J, Gething MJ (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342:224-5.

Sastry M, Ketchum RR, Crescenzi O, Weber C, Lubienski MJ, Hidaka H et al. (1998) The three-dimensional structure of Ca²⁺-bound calyculin: implications for Ca²⁺-signal transduction by S100 proteins. *Structure* 6:223-31.

Schäfer BW, Heizmann CW (1996) The S100 family of EF-hand calcium binding proteins: functions and pathologie. *Trends Biochem Sci* 25:638-43.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Peruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor

8. Literaturverzeichnis

cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219:983-985.

South AP, Cabral A, Ives JH, James CH, Mirza G, Marenholz I et al. (1999) Human epidermal differentiation complex in a single 2.5Mbp long continuum of overlapping DNA cloned in bacteria integrating physical and transcript maps. *J Invest Dermatol* 112:910-8.

Schiebler TH, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, Zillen K, Arnhold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann HJ, Kühnel W: *Anatomie*. 8. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 2002 S. 426, 688.

Schlapbach C, Yawalkar N, Hunger RE (2009) Human beta-defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa. *J Am Acad Dermatol* 61(1):58-65.

Schirra F, Richards SM, Liu M et al. (2006) Androgen regulation of lipogenic pathways in the mouse meibomian gland. *Exp Eye Res* 83:291-296.

Schlorf T (2005) Antimikrobielle Peptide an der Augenoberfläche. Diplomarbeit S:57-75.

Seifert P, Spitznas M (1999) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of the human eyelid glands. *Exp Eye Res* 68:685-692.

Silbernagl S, Despopoulos A: *Taschenatlas der Physiologie*. 7. Aufl. Thieme, Stuttgart-New York, 2007, S. 94-99.

Sirigu P, Shen RL, Pinto DS (1992) Human meibomian glands: the ultrastructure of acinar cells as viewed by thin section and freeze-fracture transmission electron microscopies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:2284-2292.

Song PI, Abraham TA, Park Y, Zivony AS, Harten B, Edelhauser HF, Ward SL, Armstrong CA, Ansel JC (2001) The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2867-2877.

Sohnle PG, Hunter MJ, Hahn B & Chazin WJ (2000) Zinc-reversible antimicrobial

8. Literaturverzeichnis

activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis* 182:1272-1275.

Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal AL, Roberts AA, Ganz T (2005) Differential regulation of beta defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 174(8):4870-9.

Steven P, Schafer G, Nolle B, Hinz M, Hoffmann W, Paulsen F (2004) Distribution of TFF peptides in corneal disease and pterygium. *Peptides* 25:819-825.

Sullivan BD, Evans JE, Cermak JM et al. (2002) Complete androgen insensitivity syndrome: effect on human meibomian gland secretions. *Arch Ophthalmol* 120:1689-1699.

Sullivan DA, Sullivan BD, Evans JE et al. (2002) Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. *Ann N Y Acad Sci* 966:211-222.:211-222.

Suzuki T, Schirra F, Richards SM et al (2008) Estrogen and progesterone control of gene expression in the mouse meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1797-1808.

Teraishi T, Yoshioka M (2001) Electron-microscopic and immunohistochemical studies of eyelid reopening in the mouse. *Anat Embryol* 204:101-107.

Thim L (1989) A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett* 250:85-90.

Thim L (1997) Trefoil peptides: from structure to function. *CMLS Cell mol life Sci* 53:888-903.

8. Literaturverzeichnis

Tieu DD, Peters AT, Carter RT, 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. *J Allergy Clin Immunol* 125(3):667-75.

Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, Espiritu C, Conway BD, Greenberg EP, McCray PB, Lehrer RI, Welsh MJ, Tack BF (2000) Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun* 68(5): 2748-2755.

Welsch U: Sobotta Repetitorium Histologie. 1. Aufl. Urban& Fischer, München-Jena, 2006, S. 217-225.

West NR und Watson PH (2010) S100A7 (psoriasin) is induced by the proinflammatory cytokines oncostatin-M and interleukin-6 in human breast cancer. *Oncogene* 29:2083-2092.

Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K et al. (2001) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defence, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 36:1309-23.

Wolf R, Howard OM, Dong HF, Voscopoulos C, Boeshans K, Winston J, Divi R, Gonsior M, Golgsmith P, Ahvazi B, Chavakis T, Oppenheim JJ, Yuspa SH (2008) Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation and products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *J Immunol* 15;181(2):1499-506.

Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio M-C, Thim L (1997) Rolling in the clover: the trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* 408:121-123.

Yamagami H, Schirra F, Liu M et al. (2002) Androgen influence on gene expression in

8. Literaturverzeichnis

the meibomian gland. *Adv Exp Med Biol* 506:477-481.

Yan Z, François N, Hiroko U, Shigaku I, Isao N, Ko O, Hideoki O (2008) Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. *Immunol* 124(3):357-367.

Zanetti MJ (2004) Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Leukoc Biol* 75:39-48.

Zasloff MA (1987) Class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(15):5449-5453.

Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *M Nature* 415:389-395.

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.

Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE (1999) Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* 113:1011-1020.

9. Thesen

1. Psoriasin kann auf der menschlichen Haut in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Das Peptid wird bei verschiedenen Hauterkrankungen und Karzinomen heraufreguliert und findet Anwendung als Tumormarker. In der vorliegenden Arbeit wird Psoriasin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat ebenfalls nachgewiesen und dient dort der angeborenen Immunabwehr.
2. Psoriasin wird vom Plattenepithel und von Haarfollikeln der Augenlider, von den Meibomdrüsen, von der Kornea und von der Konjunktiva, sowie vom Epithel des Ductus nasolacrimalis produziert. Niedrigere Psoriasinkonzentrationen werden in der Glandula lacrimalis detektiert.
3. Eine besonders hohe Psoriasinexpression kommt in den Meibomdrüsen der Augenlider vor. Eine Dysfunktion der Meibomdrüsen und eine damit verbundene Hochregulation der Psoriasinproduktion durch die Meibomdrüsen legen eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese des trockenen Auges nahe.
4. Psoriasin, das bisher noch nicht in okulären Gewebe beschrieben wurde, kommt in hoher Konzentration in Tränen vor. Dieser Befund legt nahe, dass Psoriasin möglicherweise zu einer niedrigen Infektionsrate an der Augenoberfläche beitragen könnte.
5. Bekannterweise führt Psoriasin auf der menschlichen Haut durch Zinkentzug zum Absterben von *Escherichia coli*. In der vorliegenden Arbeit reguliert *Escherichia coli* die Psoriasinexpression in einer Talgdrüsenzelllinie leicht herauf. Im Gegensatz dazu bewirken *Staphylokokkus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* eine Steigerung der Psoriasinexpression in einer Bindehautepithelzelllinie. Kein Effekt durch *Escherichia coli* wird in einer Hornhautepithelzelllinie beobachtet. Die Psoriasinexpression wird vermutlich durch Entzündungsmediatoren und Bakterienbestandteile getriggert. Die Ergebnisse lassen auf ein breiteres antibakterielles Spektrum für Psoriasin schließen als bisher angenommen wurde.
6. IL-1 β führt zu einer hohen Psoriasinexpression in einer Hornhautepithelzelllinie, die höchsten Werte werden dabei bei einer Stimulationskonzentration von 10 ng/ml und einer Stimulationsdauer von 12 Stunden gemessen. Höhere Stimulationskonzentrationen und längere Stimulationszeiten bewirken eine Herabregulation der Psoriasinexpression. Möglicherweise führt IL-1 β ab einer

9. Thesen

bestimmten Stimulationskonzentration über einen unbekanntes Mechanismus zu einer negativen Rückkopplung und Hemmung der Psoriasinexpression. Ferner ist eine kontrollierte Selbstlimitation der Entzündungsreaktion nach einer bestimmten Stimulationszeit denkbar, oder es wird die Expression anderer antimikrobieller Substanzen angeregt.

7. VEGF reguliert die Psoriasinexpression in der Hornhautepithelzelllinie herauf, wobei die Steigerung der Stimulationskonzentration von VEGF zu einer Steigerung der Psoriasinexpression führt. Die höchsten Psoriasinwerte werden bei einer Stimulationskonzentration von 50 ng/ml VEGF gemessen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse ist eine antiangiogene oder additiv angiogene Funktion von Psoriasin an der Augenoberfläche denkbar.
8. Ein stimulatorischer Effekt auf die Psoriasinexpression durch TNF α bei der Hornhautepithelzelllinie wird ebenfalls beobachtet. Eine Beteiligung von Psoriasin an Entzündungsprozessen an der Augenoberfläche und am Tränenapparat ist daher anzunehmen.
9. TFF3 stimuliert die Psoriasinexpression bei einer Stimulationskonzentration von 0.01 μ g/ml herauf, höhere Stimulationskonzentrationen führen dagegen zu einer Herabregulation von Psoriasin. Die Interaktion von Psoriasin mit TFF3 lässt auf eine wichtige Funktion im Rahmen von Reepithelialisierungsprozessen bei der kornealen Wundheilung schließen.
10. Klinische Relevanz kann Psoriasin bei der Behandlung von bakteriellen Keratitiden und Konjunktivitiden erlangen, und eine Bedeutung bei der Pathogenese des trockenen Auges ist denkbar.

Lebenslauf

Name	Maria Gottschalt
Wohnort	In der Gabel 1, 69123 Heidelberg
Geburtsdatum	21.08.1982
Geburtsort	Halle/Saale
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Michael Gottschalt, Lokschlosser Martina Gottschalt, Grundschullehrerin
Geschwister	Hans Gottschalt, Physiotherapeut Paul Gottschalt, Masseur und medizinischer Bademeister
Schulbildung	September 1989 bis Juni 1991 Otto-Schlag-Schule Halle/Saale September 1992 bis Juli 1993 Schule am Ludwigsfeld Halle/Saale September 1993 bis Juni 2002 Torgymnasium Halle/Saale
Schulabschluss	2002, Abitur
Ausbildung	seit Oktober 2002 Studium, Medizin Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg September 2008, Examen
Berufserfahrung	Basisweiterbildung (Common Trunk)

Allgemein- und Viszeralchirurgie
Paracelsus Klinik Karlsruhe
01.02.2009-31.01.2011

Assistenzärztin in der Gefäßchirurgie
Klinikum der Stadt Ludwigshafen am Rhein
01.02.2011-30.09.2011

Assistenzärztin in der Pathologie
Klinikum Worms
01.10.2011-31.03.2012

Assistenzärztin in der Pathologie
Helios Klinikum Wuppertal
seit dem 01.04.2012

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Maria Gottschalt

Danksagung

Ich möchte all denen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen, für seine Geduld und steten hilfreichen Rat während der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Dipl. Biol. Fabian Garreis danke ich besonders für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung, sowie praktischen Ratschlägen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Susann Möchter, Ute Beyer und Michaela Risch danke ich für die hilfreiche Anleitung und Betreuung während der Durchführung meiner Untersuchungen.

Weiterhin danke ich Herrn Dipl. Biol. Martin Schicht für die Anleitung und Ratschläge beim Schreiben dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Regine Gläser, Universitäts-Hautklinik Kiel, Christian-Albrechts-Universität Kiel, sei herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Experimente gedankt.

Auch den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Paulsen möchte ich für die entgegengebrachte Unterstützung danken.

Besonderer Dank gilt auch meiner Mutter und meiner restlichen Familie für deren Geduld und Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinem Lebensgefährten Jonathan Cichos und bei meinen Freunden bedanken, die stets ein offenes Ohr und Verständnis für mich hatten.