

Proteomische Funktionsanalyse humanbiologischer Systeme mittels chemisch modifizierter Proteine

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Markus Reinartz

aus Euskirchen

Bonn 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: PD Dr. Jochen Winter

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Diana Imhof

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2016

Erscheinungsjahr: 2016

meiner Mutter

Der größte Ruhm im Leben
liegt nicht darin, nie zu fallen,
sondern jedes Mal wieder
aufzustehen.

(Nelson Mandela)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Defensine.....	- 1 -
1.1.1 α -Defensine.....	- 3 -
1.1.2 β -Defensine.....	- 4 -
1.1.2.1 hBD1.....	- 4 -
1.1.2.2 hBD2.....	- 5 -
1.1.2.3 hBD3.....	- 5 -
1.1.3 Defensine in Karzinomen	- 5 -
1.1.4 Das orale Plattenepithelkarzinom.....	- 6 -
1.1.4.1 Karzinogenese.....	- 6 -
1.1.5 Speicheldrüsenkarzinome	- 8 -
1.1.5.1 Karzinogenese.....	- 8 -
1.2 Das Immunsystem	- 9 -
1.2.1 Monozyten.....	- 11 -
1.2.2 Allergie	- 12 -
1.2.3 Allergene	- 13 -
1.2.3.1 Pollen.....	- 14 -
1.2.3.1.1 Phl p 5, das Majorallergen des Wiesenlieschgrases	- 14 -
1.2.3.1.2 Bet v 1, Majorallergen der Birkenpollen	- 15 -
1.3 Massenspektrometrie.....	- 16 -
1.3.1 MALDI	- 17 -
1.3.1.1 MALDI ToF (engl. Time of Flight [ToF])	- 19 -
1.3.2 ElektroSpray-Ionisationsverfahren (ESI)	- 21 -
1.3.2.1 ESI-Massenanalytoren: Quadrupol und Ionenfalle.....	- 22 -
1.3.3 Tandem-MS	- 23 -
1.3.4 Proteomics	- 24 -
1.3.4.1 Isolierung.....	- 24 -
1.3.4.2 Auftrennungsstrategien.....	- 25 -
1.4 Zielsetzung	- 28 -
2 Material und Methoden	- 29 -
2.1 Material.....	- 29 -

2.1.1 Geräte	- 29 -
2.1.2 Geräte Max Planck Institut Köln	- 30 -
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	- 30 -
2.1.4 Chemikalien	- 30 -
2.1.5 Kits	- 32 -
2.1.6 Antikörper	- 33 -
2.1.7 Software	- 33 -
2.1.8 Peptide und Proteine	- 33 -
2.1.9 Puffer und Lösungen	- 34 -
2.2 Methoden	- 36 -
2.2.1 Zellkultur	- 36 -
2.2.1.1 Zelllinien	- 36 -
2.2.1.2 Splitten der Zellen	- 36 -
2.2.1.3 Einfrieren der Zellen	- 36 -
2.2.1.4 Auftauen der Zellen	- 37 -
2.2.2 Primärzellen	- 37 -
2.2.2.1 Isolation von Monozyten	- 37 -
2.2.3 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting [FACS]) ...	- 38 -
2.2.3.1 Charakterisierung von Monozyten mittels FACS	- 38 -
2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl	- 38 -
2.2.4 Zellaufarbeitung	- 39 -
2.2.4.1 Zellhomogenisierung (Potters)	- 39 -
2.2.4.2 Auftrennung der Zellextrakte durch Ultrazentrifugation	- 39 -
2.2.5 Protein-Labeling	- 39 -
2.2.5.1 Biotinylierung der Defensin-Moleküle	- 40 -
2.2.5.2 Allergen-Biotinylierung	- 41 -
2.2.6 Zellstimulationen	- 42 -
2.2.6.1 Inkubation mit biotinylierten Defensin-Molekülen	- 42 -
2.2.6.2 Inkubation mit biotinylierten Allergen	- 42 -
2.2.7 Biochemische Proteinaufarbeitung	- 43 -
2.2.7.1 Proteinaufreinigung mittels spezifischer Affinitätschromatographie	- 43 -
2.2.7.2 Bestimmung der Proteinmenge	- 44 -
2.2.7.3 Konzentrierung der Proteinproben	- 44 -

2.2.7.4 Eindimensionale Gelelektrophorese	- 44 -
2.2.7.5 Nachweis der Proteine im Gel	- 45 -
2.2.8 Tryptischer Verdau	- 45 -
2.2.8.1 Tryptischer In-Gel-Verdau	- 45 -
2.2.8.2 Tryptischer In-Lösung-Verdau	- 46 -
2.2.8.3 Aufreinigung des In-Lösung-Verdau	- 47 -
2.2.9 Massenspektrometrie	- 47 -
2.2.9.1 MALDI-TOF/TOF	- 47 -
2.2.9.2 NanoLC-ESI-Tandem-MS HCTultra	- 47 -
2.2.9.3 NanoLC-ESI-Tandem-MS LTQ Velos	- 48 -
2.2.9.4 NanoLC-ESI-Tandem-MS LTQ Orbitrap XL	- 48 -
2.2.10 Datenauswertung	- 49 -
2.2.10.1 Proteinscape	- 49 -
2.2.10.2 MaxQuant	- 50 -
3 Ergebnisse	- 51 -
3.1 Etablierung eines Systems zur Selektion von Interaktionspartnern humaner Defensine in oralen karzinogenen Zellen	- 51 -
3.2 Etablierung eines Systems zur Selektion von Interaktionspartnern von Allergenen in humanen Monozyten	- 55 -
3.3 Detektierte Protein-Protein Interaktionspartner	- 58 -
3.3.1 Selektierte Protein-Protein Interaktionspartner der α -Defensine in A64 Zellen	- 58 -
3.3.1.1 DEFA1:	- 58 -
3.3.1.2 DEFA2:	- 59 -
3.3.1.3 DEFA3:	- 60 -
3.3.1.4 DEFA4:	- 61 -
3.3.2 Selektierte Protein-Protein Interaktionspartner der β -Defensine in BHY Zellen	- 62 -
3.3.2.1 hBD1:	- 62 -
3.3.2.2 hBD2:	- 63 -
3.3.2.3 hBD3:	- 63 -
3.3.3 Selektierte Protein-Protein Interaktionspartner des Majorallergens Bet v 1 in primären Monocyten	- 65 -
3.3.3.1 Allergiker	- 65 -

3.3.3.2 Nichtallergiker	- 65 -
3.3.3.3 Vergleich Allergiker zu Nichtallergiker	- 66 -
3.3.4 Selektierte Protein-Protein Interaktionspartner des Majorallergens Phl p 5 in primären Monocyten	- 67 -
3.3.4.1 Allergiker	- 67 -
3.3.4.2 Nichtallergiker	- 68 -
3.3.4.3 Vergleich Allergiker zu Nichtallergiker	- 69 -
4 Diskussion	- 71 -
4.1 Etablierung eines Systems zur Selektion von Protein-Protein- Interaktionspartner	- 71 -
4.2 Detektierte Protein-Protein Interaktionspartner der humanen Defensine	- 72 -
4.2.1 α -Defensine	- 73 -
4.2.1.1 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner DEFA1	- 73 -
4.2.1.2 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner DEFA2	- 75 -
4.2.1.3 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner DEFA3	- 75 -
4.2.1.4 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner DEFA4	- 76 -
4.2.1.5 Zusammenfassung der α -Defensine	- 77 -
4.2.2 β -Defensine	- 77 -
4.2.2.1 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner hBD1	- 77 -
4.2.2.2 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner hBD2	- 79 -
4.2.2.3 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner hBD3	- 79 -
4.2.2.4 Zusammenfassung β -Defensine	- 80 -
4.3 Detektion von Protein-Protein Interaktionspartnern von Majorallergenen in primären humanen Monocyten	- 82 -
4.3.1 Protein-Protein Interaktionspartner des Majorallergens Bet v 1 in primären Monocyten	- 82 -
4.3.2 Protein-Protein Interaktionspartner des Majorallergens Phl p 5 in primären Monocyten	- 82 -
4.3.3 Zusammenfassung	- 84 -
5 Kurzzusammenfassung	- 85 -
6 Abkürzungsverzeichnis	- 86 -
7 Tabellenverzeichnis	- 90 -
8 Abbildungsverzeichnis	- 91 -

Inhaltsverzeichnis

9 Literaturverzeichnis	- 93 -
10 Publikationen.....	- 111 -
11 Danksagung	- 112 -

1 Einleitung

1.1 Defensine

Defensine sind niedermolekulare, kationische Peptide, die zur Klasse der antimikrobiellen Peptide (AMP) des angeborenen Immunsystems gehören. Sie besitzen ein Wirkspektrum sowohl gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze als auch gegen membranumhüllte Viren. Sie enthalten 18 bis 51 Aminosäuren, die in einer dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblattstruktur angeordnet sind. Diese Struktur wird durch drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Das Molekulargewicht liegt zwischen 3 und 5 kDa (Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1985).

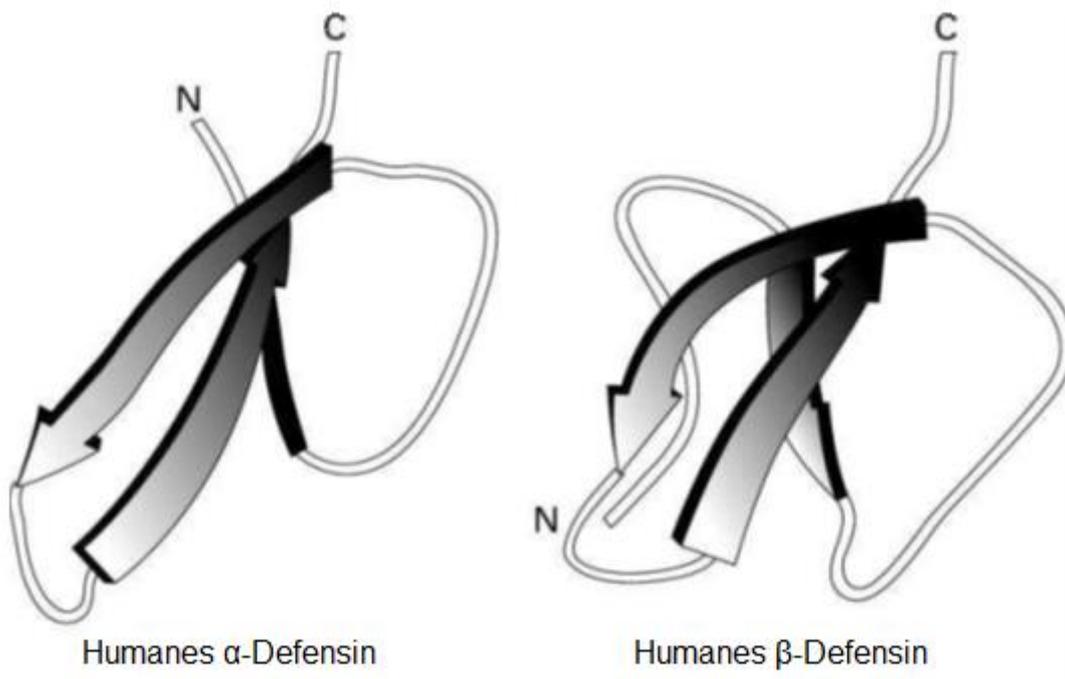


Abbildung 1: Struktur-Schemata humaner Defensine (verändert nach Ganz, 2004)

Aufgrund von Unterschieden in der Primärstruktur und durch eine unterschiedliche Anordnung der Disulfidverknüpfungen werden sie im humanen System in α - und β -Defensine eingeteilt (Pazgier et al, 2006). Beim Menschen liegen die Defensine in einem Cluster des Chromosom 8p22-p23 (Linzmeier et al, 2005). Derzeit sind sechs α -Defensine sowie vier β -Defensine charakterisiert. Andere Formen der Defensine wurden nur in Insekten und Pflanzen gefunden (Lehrer und Ganz, 2002). Eine besondere Form stellen die cyclischen θ -Defensine dar, welche bislang nur bei Rhesusaffen isoliert werden konnten (Lehrer et al, 1999).

1 Einleitung

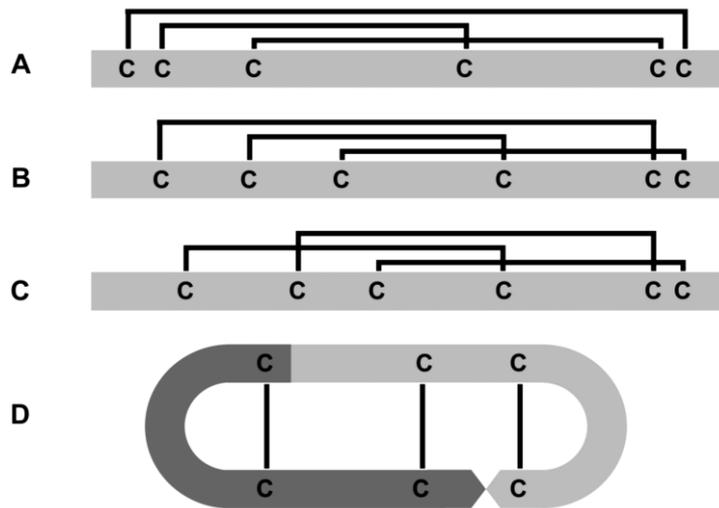


Abbildung 2: Darstellung der Disulfidbrücken der Defensine: (A) α -Defensine, (B) β -Defensine, (C) Defensine von Insekten, (D) θ -Defensine (Palffy et al, 2009)

Die antimikrobielle Wirkung der Defensine beruht auf der Zerstörung der Membranintegrität der Mikroorganismen. Die kationischen Defensine binden an die anionische Phospholipidreste der Zytoplasmamembranen und permeabilisieren diese (Hoover et al, 2000; Yang et al, 2004).

Ein weiterer beschriebener Mechanismus ist ein Insertieren und Aggregieren der Defensine mittels elektrostatischer Wechselwirkungen in zytoplasmatischen Membranen zu kanalähnlichen Poren und führen damit zu einer Veränderung des Membranpotentials (Gallo et al, 2002, Hill et al., 1991)).

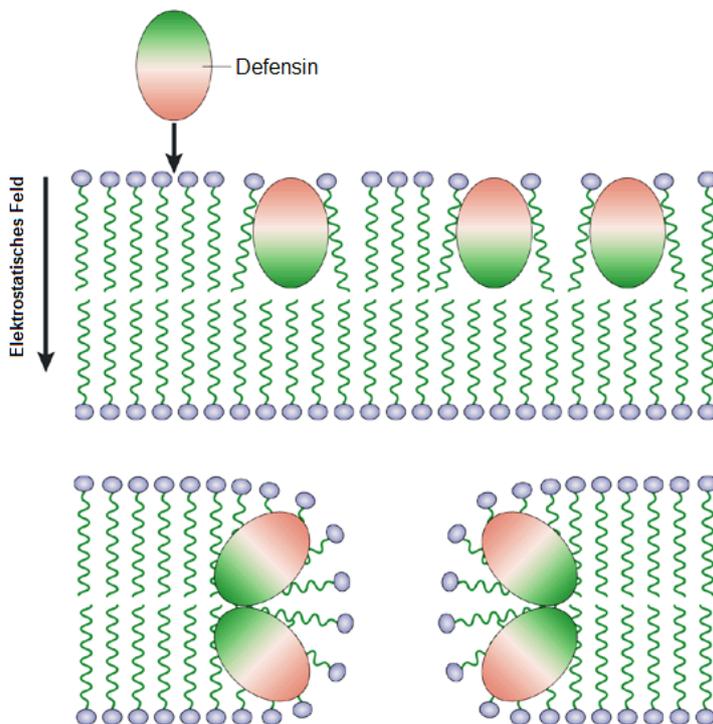


Abbildung 3: Modellmechanismus der Defensinwirkungsweise an Membranen (Ganz, 2003)

Dabei binden die Defensine bei gramnegativen Bakterien an Lipopolysaccharide, bei grampositiven Bakterien an Polysaccharide und Teichonsäurebausteine. Diese bakteriellen Membranstrukturen unterscheiden sich erheblich von den phosphatidylcholinreichen, eukaryotischen zytoplasmatischen Membranen, wodurch eine Selektivität erklärt werden kann (Schneider et al, 2005).

1.1.1 α -Defensine

Die humanen α -Defensine (DEFA) bestehen aus 29 bis 35 Aminosäuren. Die Disulfidbrücken werden jeweils von den Cysteinen der Position 1-6, 2-4 und 3-5 ausgebildet (Abb 2). α -Defensine werden von Neutrophilen synthetisiert, wodurch sie zuerst auch als „humane neutrophile Peptide“ (hNP) bezeichnet wurden. α -Defensine werden im Allgemeinen als Pre-pro-peptidsequenzen kodiert, bestehend aus einem „Precursor“-Molekül mit 90-100 Aminosäuren und einer Amino (N)-terminalen Sequenz (ca. 19 Aminosäuren), einem anionischen Segment (ca. 45 Aminosäuren) und einem Carboxy-terminalen reifen kationischen Defensin (Daher et al, 1998).

Von den sechs derzeit bekannten α -Defensinen werden DEFA1 bis DEFA4 primär in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten gefunden (Harwig et al, 1994, Wilde et al, 1995). Sie sind ebenfalls in aktivierten Lymphozyten, Monocyten sowie NK-Zellen nachgewiesen worden (Agerbert et al, 2000; Valore und Ganz, 1992). Die beiden α -Defensine HD-5 und HD-6 hingegen werden lediglich von den Panethzellen des Dünndarms sowie in Epithelzellen des weiblichen Urogenitaltraktes synthetisiert (Quale et al, 1998). Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung beeinflussen die α -Defensine sowohl das native als auch das adaptive Immunsystem (Yang et al, 2002). Für DEFA1 und DEFA2 konnte eine Mobilisierung von CD4+/CD45RA+ nativen Lymphozyten sowie CD8+T-Lymphozyten mit einer deutlich geringeren Wirkkonzentration als der antimikrobiellen Wirkkonzentration gezeigt werden. Sie stimulieren die Degranulation von Mastzellen mittels Histamin-Stimulation und steuern die Komplementaktivierung (Befus et al, 1999). Eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung auf eukaryotische Zellen konnte ebenfalls für diese Art der Defensine nachgewiesen werden (Lundy et al, 2004).

DEFA1	A \dot{C} Y \dot{C} RIPAC \dot{I} AGERRYGT \dot{C} IYQGRLWAF $\dot{C}\dot{C}$
DEFA2	CYCRIPACIAGERRYGT \dot{C} IYQGRLWAF $\dot{C}\dot{C}$
DEFA3	DCYCRIPACIAGERRYGT \dot{C} IYQGRLWAF $\dot{C}\dot{C}$
DEFA4	VCSCRLVFCRRTELRVGNCLIGGVSF \dot{Y} \dot{C} CTRVD
HD-5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRL $\dot{C}\dot{C}$ R
HD-6	TCHCR-RSCYSTEYSYGT \dot{C} TVMGINHRF $\dot{C}\dot{C}$ L

Abbildung 4: Aminosäuresequenz der reifen, humanen α -Defensine (Raj und Dentino, 2002)

1.1.2 β -Defensine

Die β -Defensine des Menschen bestehen aus 36 bis 51 Aminosäuren. Sie werden über die Cystein-Sulfhydrylgruppen an Position 1-5, 2-4 und 3-6 (Abb 2) oxidativ verknüpft und weisen die typische β -Faltblattstruktur auf (Abb 1) (Beisswenger und Bals, 2005). Die Struktur der β -Defensin-Vorstufen ist im Gegensatz zu den α -Defensinen erheblich einfacher. Sie bestehen aus einer Signalsequenz, ein kleines Pro-Segment, und dem reife Peptid am C-Terminus (Daher et al, 1998). Die humanen β -Defensine werden von epithelialen Zellen der Haut, Niere, Lunge, des Gastrointestinal- sowie des Urogenitaltraktes exprimiert (Harder et al, 1997, Bensch et al, 1995). Im oralen Bereich werden sie in Epithelzellen der Speicheldrüse, der Zunge, des Zahnfleisches und der Mukosa der Wangen gebildet (Dunsche et al, 2001, Bonass et al, 1999).

Die Defensine zeigen antimikrobielle Aktivität, indem sie mit den Membranen der Mikroorganismen reagieren (Beisswenger und Bals, 2005) und so eine wichtige Rolle bei der angeborenen sowie der adaptiven Immunität spielen. Sie modulieren die Cytokinantwort von mononuklearen Blutzellen (Boniotto et al., 2006), regen die Histaminfreisetzung in Mastzellen an und üben Chemoattraktion auf unreife dendritische Zellen sowie T-Zellen aus (Garcia et al, 2001).

hBD-1 DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGT**CYRGKAKCCK**

hBD-2 GIGDPVTCCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTK**CCKKP**

hBD-3 GIINTLQKYYCRVRGGRC**AVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCRRK**

hBD-4 EFELDRICGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYAC**CLRKWDESLNRTKP**

Abbildung 5: Aminosäuresequenz der reifen, humanen β -Defensine (Bauer et al, 2001).

1.1.2.1 hBD1

hBD1 ist das einzige humane β -Defensin, bei dem die Genexpression konstitutiv erfolgt. Es ist wirksam gegen grampositive und gramnegative Bakterien, membrantragende Viren und Pilze. Es hat immunmodulierende Eigenschaften wie die Induktion von Interleukinen, die Degranulation von Mastzellen und die Unterstützung der Phagozytose (Steinstraesser et al, 2008). Die antimikrobielle Wirkung ist im Vergleich zu hBD2 und hBD3 geringer, dafür weist hBD1 eine starke zytotoxische Wirkung auf (Donald et al., 2003).

1.1.2.2 hBD2

Das Peptid hBD2 wirkt gegen gramnegative Bakterien und wird verstärkt in entzündeten Regionen gebildet (Mathews et al., 1999). Das β -Defensin zeigt ein annähernd ähnliches Wirkspektrum wie hBD1, wobei die Expression des Peptides im Normalzustand jedoch geringer ist (Steinstraesser et al., 2008). Durch Bakterien oder Zytokine wird die Synthese induziert (Liu, 2002).

1.1.2.3 hBD3

Die Wirkung von hBD3 ist sowohl antibakteriell, antiviral als auch antimykotisch (Steinstraesser et al, 2008). Die chemotaktische Wirkung beeinflusst Monozyten, Makrophagen und Mastzellen (Soruri et al, 2007). Die Synthese von hBD3 wird ebenso wie die des Peptides hBD2 induziert (Semple et al, 2006).

1.1.3 Defensine in Karzinomen

In diversen epithelialen Karzinomen zeigt sich eine Veränderung der Expression der humanen Defensine zu normalem Gewebe (Meyer und Harder, 2007). α -Defensine weisen in malignen Geweben eine erhöhte Expression auf (Droin et al, 2009). In oralen Karzinomen wurde eine Erhöhung des hNP-1 Niveaus nachgewiesen (Mizukawa et al, 2001), ebenso wie in Nierenkarzinomen ist eine veränderte Expression der α -Defensine gezeigt worden (Müller et al, 2002).

Die β -Defensine gelten hingegen als Tumorsuppressoren (Donald et al, 2003, Sun et al, 2006, Winter et al, 2011). Das Fehlen von hBD1 ist bei Nieren- und Prostatakarzinomen nachgewiesen worden (Grambichler et al, 2006) und auch in oralen Plattenepithelkarzinomen ist eine Reduktion der Expression dieses Peptides gezeigt worden (Wenghoefer et al, 2008a). Als eine Ursache hierfür wird die Mutation des Promoterpunktes des DEFB1 Genes vermutet. In Speicheldrüsenkarzinomen konnte eine Verschiebung des hBD1 aus dem zytosolischen Bereich der Zelle in den Zellkern nachgewiesen werden (Wenghoefer et al, 2008b, Pantelis et al, 2009). In Zellkulturen maligner OSCC bewirkte die Zugabe von hBD1 eine Verminderung der Proliferation der Tumorzellen (Bullard et al, 2008). Für hBD2 konnte in oralen Plattenepitheltumoren ein geringerer Level dieses Defensins gegenüber gesundem Gewebe gezeigt werden (Wenghoefer et al, 2008b).

In malignen Lungentumoren konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Expression an hBD2 und einer geringeren Zelldifferenzierung festgestellt werden (Shestakova et al, 2010). Im Gegensatz zu den Verringerungen der Level dieser beiden humanen β -Defensine zeigt sich bei dem hBD3 eine Erhöhung des RNA-Levels in OSCCs gegenüber gesundem Gewebe (Wenghoefer et

al, 2008b). Ebenfalls ist eine Korrelation zwischen der Differenzierung der oralen Tumore und der erhöhten hBD3 Expression beschrieben worden (Kesting et al, 2009). Auch in Basalzellkarzinomen der Haut ist eine höhere Konzentration an hBD3 gegenüber gesundem Gewebe nachgewiesen worden (Gambichler et al, 2006).

1.1.4 Das orale Plattenepithelkarzinom

Das orale Plattenepithelkarzinom (oral squamous cell carcinoma, OSCC) ist eine maligne Erkrankung des Kopf-Hals-Bereiches und stellt die sechsthäufigste Krebserkrankung weltweit dar (Argiris et al, 2008). Die Therapie erweist sich als sehr schwierig, was durch eine frühe lymphogene Metastasierung der OSCCs zu erklären ist (Syrigos et al, 2009). Als Risikofaktoren der Entstehung gelten eine langjährige Exposition mit Tabak und Alkohol (Zygiogianni et al, 2011), eine Infektion mit onkogenen humanen Papiloma Viren (HPV 16, HPV 18, HPV 30, HPV 31) (Kreimer et al, 2011), Umweltgifte und genetische Prädispositionen (Marur und Forastiere, 2008). Neben den klassischen Risikofaktoren spielt auch schlechte Mundhygiene bei der Entstehung des OSCC eine wichtige Rolle.

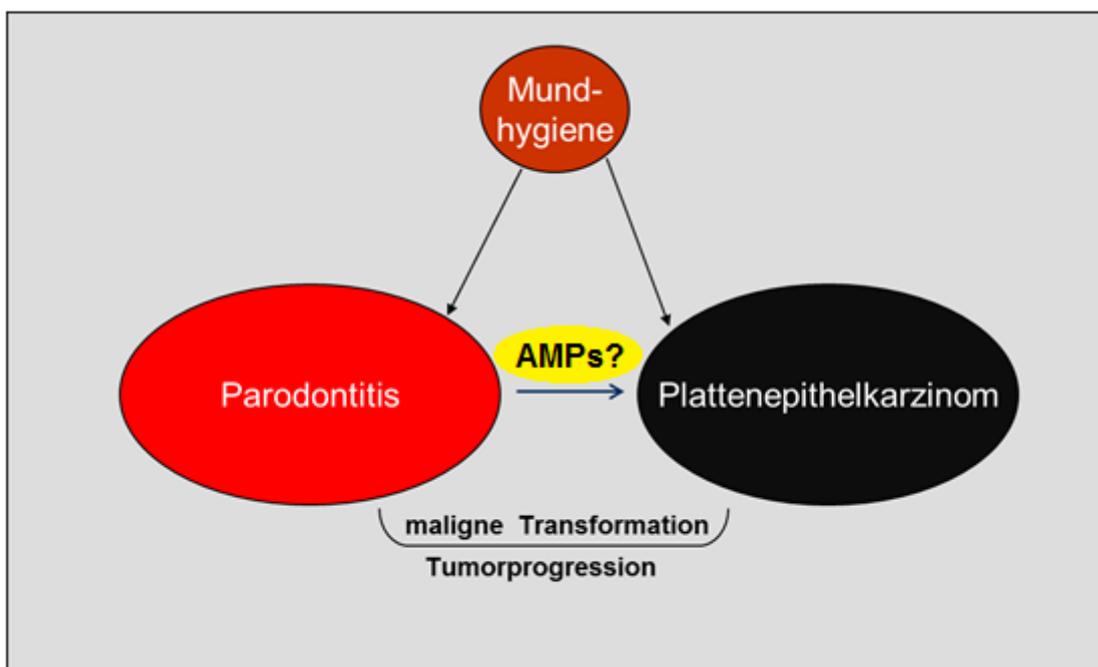


Abbildung 6: Molekulare Entwicklung durch AMPs von der Entzündung (Parodontitis) zur oralen Tumorgenese (von J. Winter zur Verfügung gestellt).

1.1.4.1 Karzinogenese

Orale Plattenepithelkarzinome entwickeln sich aus präkanzerösen Läsionen. Die bereits beschriebenen Risikofaktoren und chronische Entzündungen sind der Auslöser für die Entstehung derartiger Läsionen (Hullmann et al, 2010).

Durch Kumulationen verschiedener genetischer Veränderungen können aus den Läsionen über unterschiedliche Zwischenschritte invasive Karzinome entstehen. An OSCCs sind verschiedene genetische Veränderungen bei der Tumorentstehung bekannt. So führt die Aktivierung von Onkogenen durch Amplifikation oder Überexpression, sowie die Inaktivierung durch eine Mutation von Tumorsuppressorgenen zur Deregulation der Proliferation der Zelle und somit zur Tumorentstehung (Hardisson, 2003). Zu den bekanntesten Veränderungen in den oralen Plattenepithelkarzinomen gehört die Inaktivierung des CDK-Inhibitors 2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A [p16]) sowie des Tumorsuppressorproteines p53 (Scully et al, 2000). Die Funktion von p53 ist die Arretierung einer Zelle während der G-Phase zur DNA-Reparatur bzw. zur Einleitung der Apoptose, falls eine Reparatur der DNA nicht mehr möglich ist. Somit verlieren Zellen bei der Inaktivierung des p53 Pathways die Fähigkeit in den programmierten Zelltod überzugehen (Syrjanen, 2005). Diese Art der Mutation wird als letzter Schritt im Übergang vom prä malignen zum invasiven Karzinom verantwortlich gemacht. Das p16-Protein, welches ebenfalls in die Regulierung des Zellzykluses eingebunden ist, wird in einer früheren Phase der Entwicklung einer Läsion zum OSCC inaktiviert. Hierbei handelt es sich zumeist um Punktmutationen, Hypermethylierungen, Insertionen sowie Deletionen (Hardisson, 2003).

Des Weiteren wird bei der Entstehung der oralen Plattenepithelkarzinome eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (epidermal growth factor receptor [EGFR]) beobachtet. Durch diese Überexpression wird über den EGF vermittelten Signalweg unter anderem die Proliferation der Zellen aktiviert, was ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen zur Folge hat (Marur und Forastiere, 2008). Bei einer Infektion durch das HPV-Virus wird die virale DNA in das Genom der Zelle eingebaut. Dies führt zur Expression viraler Onkoproteine, die nicht, wie schon beschrieben, die DNA der Zelle verändern, sondern funktionell in die Signalwege der Tumorsuppressorproteine eingreifen. Durch eine Ubiquitinierung oder Degradierung der Tumorsuppressorproteine kommt es wiederum zur erhöhten Proliferation der befallenen Zellen, was diese zu einer Transformation in einen malignen Zustand führt. (Syrjanen, 2005).

Weitere genetische Veränderungen werden mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht. Abweichungen in diversen Protoonkogenen der Zellregulation und in Genen, welche für die Reparatur der DNA der Zelle verantwortlich sind, werden ebenfalls mit der Entartung, die zur Bildung der OSCCs führt in Verbindung gebracht (Scully et al, 2000). Ebenfalls gehören zu diesen tumorinduzierenden Veränderungen auch Eingriffe in die Synthese der Defensine (Meyer und Harder, 2007).

Es ist jedoch nicht eine Abfolge spezifischer genetischen Veränderungen, sondern vielmehr deren Anhäufung für die Karzinogenese entscheidend (Califano et al, 1996).

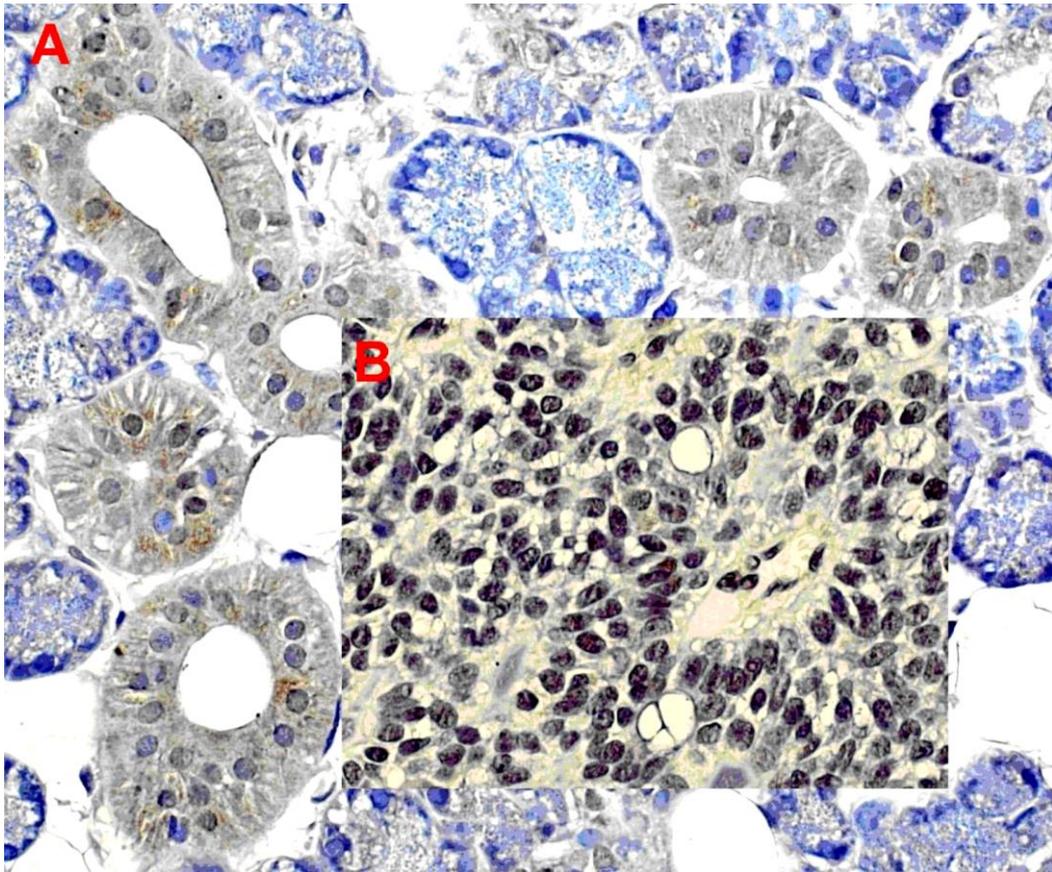


Abbildung 7: Speicheldrüsengewebe: (A) gesund, (B) malignes Karzinom (Wenghoefer et al, 2008b)

1.1.5 Speicheldrüsenkarzinome

Speicheldrüsenkarzinome stellen einen eher kleinen Teil der malignen Tumore im Kopf- und Halsbereich dar (Weber et al, 2002). Auch bei dieser Art der Tumore gibt es verschiedene Arten an belastenden Faktoren, welche eben diese Bildung auslösen können. Als eindeutig anerkannter Faktor gilt eine längere Strahlenexposition, zusätzlich kommen auch die diversen Faktoren, welche ebenso die oralen Plattenepithelkazinome induzieren, in Betracht (Lang et al, 2005).

1.1.5.1 Karzinogenese

Die molekularbiologischen Mechanismen die zur Entstehung der Speicheldrüsenkarzinome beitragen, sind derzeit nur teilweise erforscht (Pantelis et al, 2009).

Eine veränderte Expression des p73 Proteins sowie des Tumorproteins p63 (transformation-related protein 63), die beide zur Familie der p53 Proteine gehören, ist bekannt (Weber et al, 2002). Auch Überexpressionen des Rezeptors HER-2/neu

(human epidermal growth factor receptor 2 [CD340]), der zur Familie des EGFR gehört, tragen zu einer Neubildung von Speicheldrüsenkarzinomen bei (Jaehne et al, 2005). HER2/neu stimuliert die Zellproliferation und hemmt die Apoptose über den mTOR-Signalweg. Als Faktoren, welche die letztendliche Differenzierung dieser Art von Kopf- und Halsbereichstumoren verstärken, gelten Mutationen im Bereich des p53 Tumorsuppressorproteines, eine verstärkte Synthese cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs), sowie eine hohe Überproduktion des Wachstumsproteins c-erbB2 (cellular avian erythroblastosis homologue B2) (Cheuk und Chan, 2007).

Auch bei den Speicheldrüsenkarzinomen gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass Defensine einen bedeutenden Einfluss auf den Ablauf der Karzinogenese innehaben (Meyer und Harder, 2007).

1.2 Das Immunsystem

Das humane Immunsystem, das in ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem eingeteilt wird, ist ein komplexes System unterschiedlicher Effektorzellen und Moleküle.

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie des Körpers. Es sorgt für die Abwehr gegen Infektionen durch Bakterien, Viren oder anderen gefährlichen Einflüssen. Immunzellen bekämpfen zum Teil Antigene, die in der Regel keine Gefahr für den Menschen darstellen, diese Reaktion wird als Hypersensitivität bezeichnet.

Die Immunzellen besitzen verschiedene Mechanismen (Abb 8) um Antigene aufzunehmen. Hierbei wird der Vorgang der Aufnahme von in Flüssigkeit gelöstem Antigen als Pinozytose bezeichnet. Dabei wird die Flüssigkeit mit darin gelösten Substanzen aus der Umgebung der Zelle in kleine Vesikel eingeschlossen und internalisiert (Marshall und Nachmias, 1965). Das Antigen gelangt so direkt ins Zellplasma. Bei der Phagozytose liegt ein ähnlicher Mechanismus vor. Hierbei werden die Fremdpartikel von Phagosomen umschlossen und in das Zytoplasma transportiert. Für den Einstülpungsvorgang ist häufig die Erkennung der Oberfläche notwendig, was z.B. durch Anlagerung von Antikörpern gewährleistet werden kann. Im Immunsystem phagozytieren vor allem Makrophagen, aber auch neutrophile Granulozyten; Monozyten und dendritische Zellen verfügen über diesen Mechanismus (Groves et al, 2008). Die Vorgänge der Pinozytose und der Phagozytose werden auch unter dem Oberbegriff Endozytose zusammengefasst (Jacques, 1966). Neben dieser ungerichteten Endozytose gibt es einen gerichteten Mechanismus. Bei der rezeptorvermittelte Endozytose, bei der ein spezifischer Rezeptor auf der Zelloberfläche vorhanden sein muss, wird nach der Bindung seines Substrats die Endozytose einleitet. Rezeptorvermittelte Endozytose ist häufig clathrinabhängig (Mousavi et al, 2004). Das Hexamer Clathrin besteht aus drei schweren und drei leichten Untereinheiten (Pearse, 1976). Mehrere dieser Hexamere

1 Einleitung

lagern sich zu einem komplexen Gerüst zusammen, wodurch Vesikel geformt werden. Da die Struktur nach der Aufnahme ATP-abhängig aufgelöst werden muss, wird dieser Aufnahmemechanismus als aktiver Prozess eingeteilt (Kirsch und Beevers, 1993).

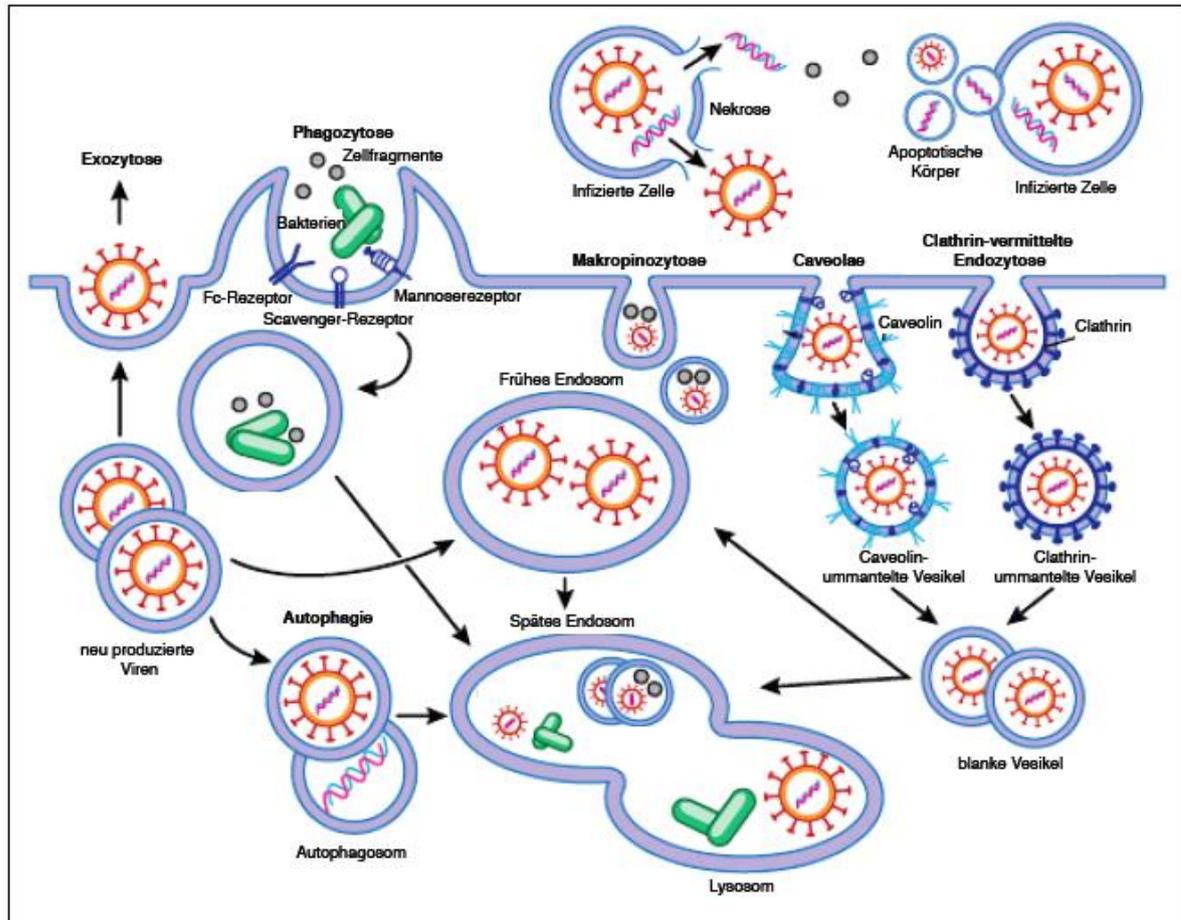


Abbildung 8: Aufnahmemechanismen von Antigenen (verändert nach Blasius und Beutler, 2010)

Essentiell für die Immunantwort sind Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, welche zur Phagozytose befähigt sind. Die Monozyten nehmen neben der Phagozytose zahlreiche weitere wichtige Funktionen wahr. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten, diese sind dazu imstande nach einem Erstkontakt bestimmte antigene Strukturen des Fremdorganismus zu erkennen. Bei einem zweiten Kontakt mit dem Antigen sind diese Zelltypen dann in der Lage schnell und gezielt auf das Pathogen zu reagieren.

1.2.1 Monozyten

Humane Monozyten sind Zellen mit einem Durchmesser von ca. 20 µm. Sie werden im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet und nach der Ausreifung ins Blut abgegeben (Robbins und Swirski, 2010), im Blutkreislauf verbleiben sie für mehrere Tage, bevor sie in die verschiedenen Gewebe einwandern (Tacke und Randolph, 2006).

Im humanen System sind die Monozyten aufgrund von verschiedenen Oberflächenproteinen, die als „cluster of differentiation“ (CD) beschrieben werden, in vier Hauptgruppen eingeteilt worden. Die Unterteilung erfolgt anhand von zwei Oberflächenproteinen, dem CD14, einer Komponente des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptor-Komplexes, und CD16, dem Fcγ-R („fragment crystallizable“ γ-Rezeptor) III. Bei den klassischen Monozyten die 90 % der Gesamtpopulation darstellen, handelt es sich um CD14 positive Zellen die kein CD16 tragen. Bei den übrigen Gruppe der Monozyten handelt es sich um CD14 positive CD16 positive, sowie um CD14 negative CD16 negative und CD14 negative CD16 positive Populationen (Ziegler-Heitbrock et al, 2010).

Zum einen sind Monozyten, wie schon erwähnt, Vorläuferzellen für Makrophagen und dendritische Zellen, zum anderen ist diese Zellart ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems, der verschiedene Effektorfunktionen übernimmt (Bigley et al, 2011). Monozyten nehmen Erreger über „pattern-recognition“-Rezeptoren (PRRs) wahr, die sowohl auf der Zelloberfläche, als auch in endosomalen Vesikeln und im Zytoplasma zu finden sind. Diese PRRs erkennen bestimmte hochkonservierte Bestandteile von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten, sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) (Abbas et al, 2007). Lektine, „Toll-like“-Rezeptoren (TLRs), N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)-Rezeptoren, Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (NOD)-Rezeptoren oder „scavenger“-Rezeptoren gehören zu diesen PRRs (Janeway und Medzhitov, 2002). Eine besondere Stellung nehmen PRRs wie „scavenger“-Rezeptoren und Lektine ein, die nach der Aktivierung durch Fremdkörper eine Phagozytose einleiten. Auch Immunglobulin (Ig) bindende Rezeptoren wie FcαR (CD89), FcεRI oder des FcγRI (CD64), und Komplementrezeptoren (CR) CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) können die Phagozytose initiieren (Kantari et al, 2008). Dabei kommt es nach der Bindung der Fremdstoffe an die Rezeptoren zu einer Veränderung des Zytoskeletts durch Ausbildung von Vesikeln. Der Inhalt wird ins Innere der Monozyten überführt. Durch Verschmelzung mit Lysosomen entstehen Phagolysosomen, in denen die Fremdkörper zersetzt werden (Desjardins et al, 1994). Bei dieser Antigenprozessierung in den Phagolysosomen binden Proteinstücke an MHC-Klasse-2 Moleküle, diese Komplexe werden dann zur äußeren Zellmembran der Monozyten transportiert und dort präsentiert.

1.2.2 Allergie

Der Begriff Allergie ist definiert als „hypersensitive Reaktion durch spezifische immunologische Mechanismen“ (Johansson et al, 2004). Hierbei handelt es sich um eine verstärkte spezifische Abwehrreaktion des humanen Immunsystems gegenüber normalerweise harmlosen Substanzen im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeitsreaktion. Diese allergieauslösenden Substanzen werden als Allergen bezeichnet (Ring et al, 2004).

Allergische Reaktionen werden nach beteiligten Antigenen und Antikörperklassen in vier Klassen eingeteilt (Gell und Coombs, 1968): IgE-vermittelte Soforttypreaktion (Typ I), zytotoxische Reaktion (Typ II), Immunkomplexreaktion (Typ III) und zellvermittelte Spättypreaktion (Typ IV). Die ersten drei Typen der allergischen Reaktionen werden durch Antikörper vermittelt, während an der Ausprägung der Typ IV Allergie T-Zellen beteiligt sind (Mygind et al, 2000).

Bei der allergischen Sofortreaktion des Typs I handelt es sich um ein Zusammenspiel freier allergenspezifischer IgEs und des membranständigen hochaffinen FcεRI Rezeptors und des niedrigaffinen FcεRII (CD23) Rezeptors für IgE Antikörper. Die Bildung allergenspezifischer IgE Antikörper, die als Schlüsselprozess für den Mechanismus einer Allergie angesehen werden, wird als Sensibilisierung bezeichnet (Prussin und Metcalfe, 2006). Diese erfolgt beim Erstkontakt und wird durch eine Störung des Gleichgewichts der T-Helferzellen (CD4+ Zellen) TH1 und TH2 hervorgerufen. Bei einer allergischen Reaktion kommt es in diesem System zu einer Verschiebung in Richtung des TH2-Typen. Antigenpräsentierende, phagozytierende Zellen (APC, antigen presenting cell), wie Mastzellen und Basophile, internalisieren das Antigen und präsentieren Teile von diesem an der Zelloberfläche. Durch die Bindung des an einen MHCII-Komplexes (MHCII, major histocompatibility complex class II protein) gebundenen Antigenfragmentes an einen T-Zell Rezeptor werden die naiven CD4+ Zellen aktiviert und die Differenzierung wird initiiert (Ansel et al, 2006). Die ausdifferenzierten Zellen der beiden Subtypen TH1 und TH2 exprimieren ein charakteristisches Zytokinprofil, welches eine sowohl zelluläre als auch humorale Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene auslöst (Nakanishi et al, 1995).

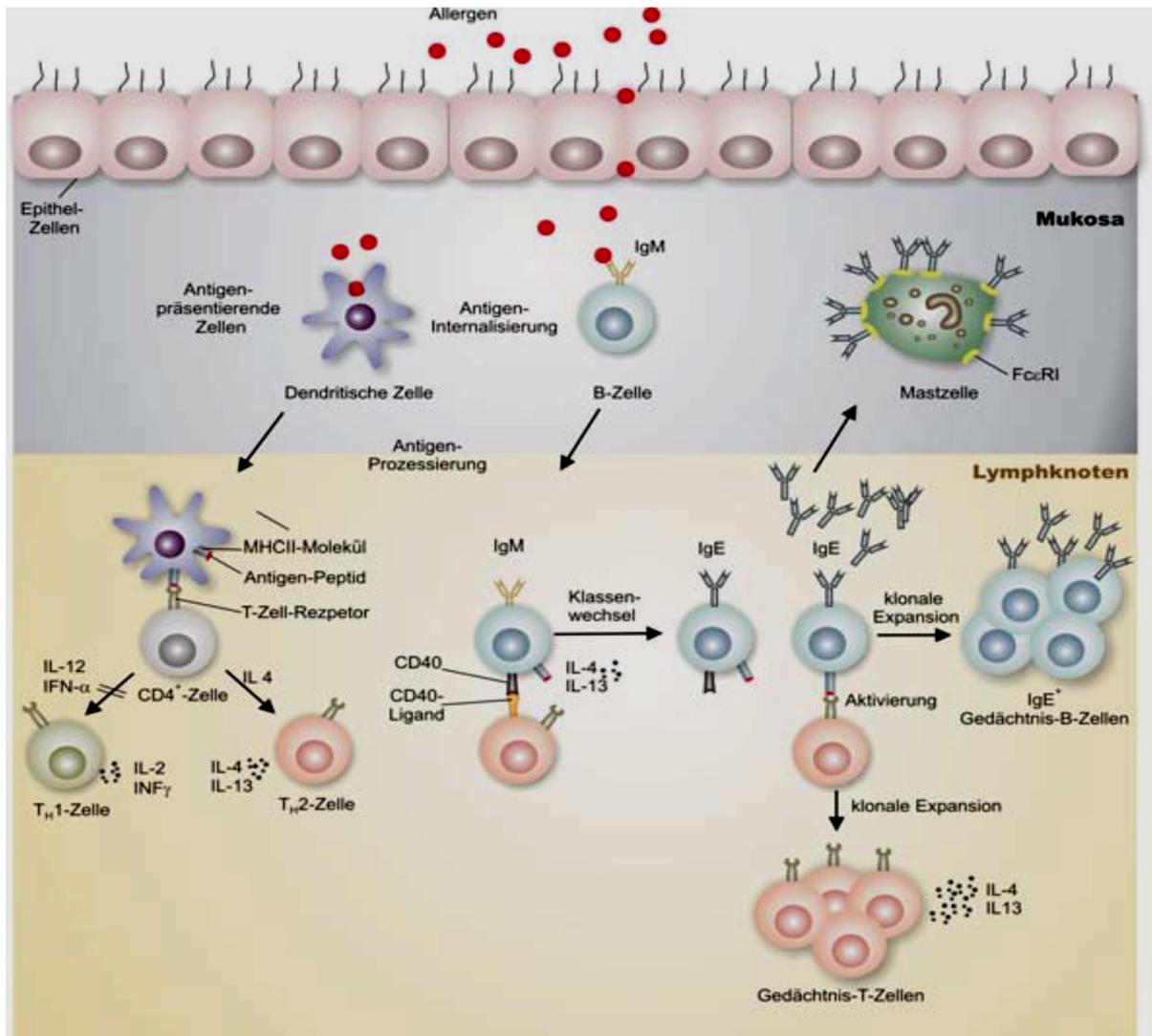


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Sensibilisierung (verändert nach Ring et al, 2004)

Nach einem erneuten Kontakt mit dem Allergen kommt es zur Kreuzvernetzung von FcεRI gebundenen IgE-Molekülen. In Folge dessen werden Mediatoren wie Histamin, Prostaglandine und Leukotriene durch Exocytose freigesetzt, welche dann für das Auftreten der allergischen Symptome verantwortlich sind.

1.2.3 Allergene

Allergene sind Substanzen (Antigene), welche die hypersensitiven Reaktionen des Immunsystems in Allergikern auslösen können. Bei den meisten Allergenen handelt es sich um Proteine oder Glykoproteine (Valenta und Kraft, 2001).

Für diese Allergene besteht die charakteristische Immunreaktion darin, an IgE zu binden, wobei die Bindungsstelle als Epitop bezeichnet wird. Charakteristisch für

diese Art der Immunreaktion ist eine Quervernetzung der Allergene mit den bindenden IgE-Antikörpern. Hierfür werden zwei epitope Regionen am Allergen benötigt. Für allergene Proteine gibt es keine primären Eigenschaften, wie z.B. eindeutige sterische Strukturen, um eine allergische Reaktion auszulösen. Vielmehr erscheint es, dass ein Zusammenspiel diverser Faktoren, wie die Anzahl der Epitope pro Molekül, die Ausbildung von Kavitäten in der dreidimensionalen Struktur oder die Stabilität des Allergens gegenüber einer Proteolyse, für die Induktion eine Rolle spielen.

Auch eine Proteaseaktivität des allergenen Proteins, welche zur Überwindung der epithelialen Barriere förderlich sein kann, scheint von Vorteil zu sein (Hammad und Lambrecht, 2008).

1.2.3.1 Pollen

Als Pollen werden die männlichen Gametophyten der Pflanzen bezeichnet. Dabei kann eine Pflanze je nach Art bis zu 10^8 Pollenkörner pro Jahr produzieren, wobei windbestäubende Pflanzen zu den stärksten Produzenten gehören. Ihre Pollen können durch ihre makromolekularen Eigenschaften kilometerweit transportiert werden, zu dieser Gruppe zählen Bäume, Sträucher und Gräser. Diese Art der Verbreitung ist prädestiniert, allergische Reaktionen auszulösen (Saloga et al, 2012).

1.2.3.1.1 Phl p 5, das Majorallergen des Wiesenlieschgrases

Die botanische Familie der Süßgräser (Poaceae), die weltweit verbreitet ist und aus etwa 9000 Spezies besteht, zu denen auch alle bekannten Getreidearten zählen, stellt die Hauptquelle von Gräserpollen-Allergenen dar (Anderson und Lidholm, 2003). Die verschiedenen Gräserpollen-Allergene sind nach immunologischen und strukturellen Eigenschaften in 13 Gruppen eingeteilt worden (Taketomi et al, 2006). 95% aller Gräser Allergiker weisen spezifische Antikörper gegen das Gräserpollen-Allergen 5 des Wiesenlieschgrases (*Phleum pratense*) auf (Valenta et al, 1992).

Das Allergen kommt in der Natur in zwei Isoformen vor, Phl p 5a und Phl p 5b, die aber nur geringe Unterschiede im Molekulargewicht und den biochemischen Eigenschaften aufweisen, was auf die hohe Sequenzhomologie zurückzuführen ist (Würtzen et al, 1999). Phl p 5 besteht aus 4 α -Helices, die als Bündelstruktur um ein hydrophobes Zentrum angeordnet sind (Maglio et al, 2002). Als biologische Funktion konnte für das Gräserallergen 5 eine Ribonukleaseaktivität nachgewiesen werden (Bufe et al, 1996a).

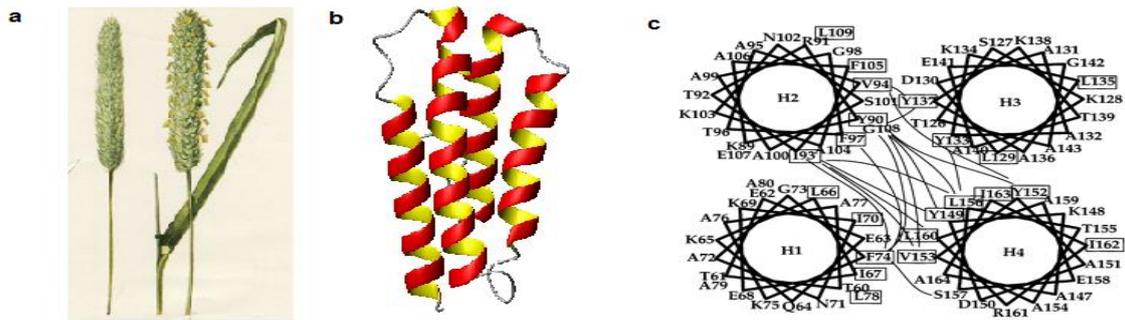


Abbildung 10: Phl p 5 (a) Darstellung der Rispenähren des Wiesenlieschgrases, (b) Strukturmodellierung Phl p 5 (https://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap_02?dB_Type=0&allid=377, 11.2014), (c) Bündelstruktur Phl p 5 (Maglio et al, 2002)

1.2.3.1.2 Bet v 1, Majorallergen der Birkenpollen

Die Birke zählt in der nördlichen Hemisphäre zu einem der bedeutendsten Verursacher allergischer Reaktionen. In Birkenpollen sind bislang 6 unterschiedliche Allergene identifiziert worden, wobei gegen das Bet v 1 (*Betula pendula*) Allergen die höchste Sensibilisierung in den bekannten Gruppen vorliegt (Jarolim et al, 1989).

Bet v 1, das zur Proteinfamilie der PR10 Proteine gehört, ist ein acides Protein mit einem Molekulargewicht von 17,5 kDa, das keine Glykosylierung besitzt (Grote, 1991). Die dreidimensionale Struktur des Moleküls wird durch sieben antiparallele β -Faltblattstrukturen dominiert, die sich um drei unterschiedlich große α -Helices legen (Gajehde et al, 1996). Als biologische Funktion des Proteins ist eine RNase-Aktivität nachgewiesen worden. Auf Grund von Sequenzhomologiestudien wird darauf geschlossen, dass Bet v 1 die Funktion eines „pathogenesis related protein“ hat, welches bei mikrobiellem Befall induziert wird (Bufe, 1996b).

Durch die große Sequenzhomologie zu anderen Mitgliedern der PR10 Proteinfamilie kommt es bei Bet v 1 zu einer großen Anzahl an Kreuzreaktivitäten, die sich vor allem im Bereich der Nahrungsmittel-Allergien wie Haselnuss, Apfel oder Sellerie zeigen (Vieths et al, 2002).

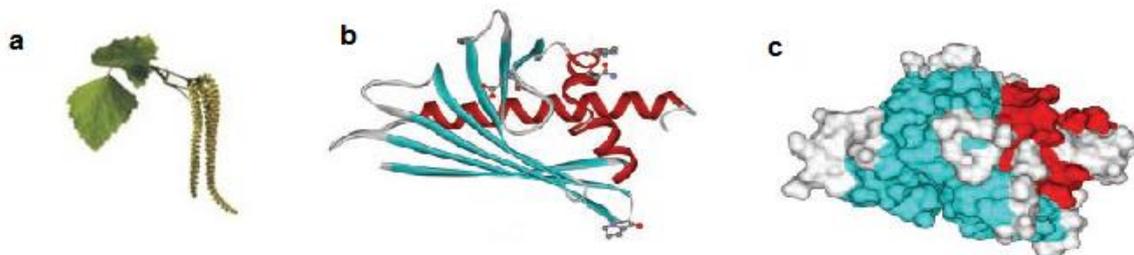


Abbildung 11: Bet v 1
 (a) Männlicher Blütenstand der Hängebirke (b) Strukturmodellierung Bet v 1
 (c) Dreidimensionales Modell Bet v 1 (Holm et al, 2004)

1.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine analytische Methode zur Bestimmung der Masse von Atomen oder Molekülen. Diese Methode stellt ein wichtiges Hilfsmittel zur Charakterisierung chemischer bzw. biochemischer Verbindungen dar (Budzikiewicz und Schäfer, 2005). Bei dieser Analysetechnik wird sich das Masse-zu-Ladungsverhältnis(m/z) von Ionen im Hochvakuum zu Nutze gemacht (Lottspeich und Zorbas, 1998; Lottspeich und Engels, 2012). Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, welche die zu analysierenden Teilchen in die Gasphase überführt und ionisiert, einem Analysator oder auch Massenselektor, der die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis separiert, und einem Detektor, der die spezifischen relativen Intensitäten der einzelnen Ionen aufnimmt (Aebersold und Mann, 2003). Obwohl die MS schon seit den zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts in der Chemie zur Analyse von Molekülen eingesetzt wurde, konnte diese Analysetechnik erst mit Einführung schonender Ionisierungsmethoden Ende der achtziger Jahre auch für die Peptid- und Proteinanalytik eingesetzt werden. Die Entwicklung der Elektronensprayionisierung (ESI) und der Matrixassistenten Lasersorption/Ionisierung (MALDI) machten die intakte Überführung von biologischen Makromolekülen wie Peptiden, Proteinen, komplexen Kohlenhydraten oder Nukleinsäureketten in die Gasphase möglich.

Die erste Technik, die es ermöglichte Proteine zu bestimmen und diese den entsprechenden DNA-Sequenzen zuzuordnen, war eine Elektrophorese kombiniert mit einer N-terminalen Edman-Sequenzierung (Edman et al, 1967; Hewick et al, 1981; Aebersold et al, 1987). Die maximale Empfindlichkeit dieser Technik liegt bei ca. 10 pmol, was 1 μg eines 100 kDa Proteins entspricht. Die N-terminale Sequenzierung hat durch ihre Methodik eine geringe Empfindlichkeit. Bei dem Verfahren kommt es durch die vorgelagerte Elektrophorese und durch hochsensible Aufreinigungen während der Sequenzierung zu einer Blockierung von bis zu 50% aller N-terminalen Proteine. Auch Modifikationen der Proteine wie Phosphorylierungen oder Glykosilierungen führen bei der Edman-Sequenzierung zu Problemen (Kellner et al, 1999; Lottspeich und Engels, 2012). Mit der steigenden Anzahl an DNA Sequenzdaten und den damit ableitbaren Proteinsequenzen haben jedoch andere Proteinidentifizierungsstrategien, die auf MS-Verfahren beruhen, an Bedeutung gewonnen. Zudem liegt die Empfindlichkeit bei dieser Technik im unteren Picomol- beziehungsweise oberen Femtomol-Bereich (Lottspeich und Engels, 2012).

Die Entwicklung leistungsfähiger, analytischer Verfahren wie die High Performance Liquid Chromatography (HPLC), der Edman-Abbau und die Entwicklung schonender Ionisationsverfahren in der Massenspektrometrie (Barber et al, 1981; Karas und Hillenkamp, 1988; Fenn et al, 1989) führten zu einem exponentiellen Anstieg der Charakterisierung unbekannter Peptide und Proteine. 1988 waren erst 60 Sequenzen biologisch aktiver Peptide im humanen System veröffentlicht (Sundler et al, 1988), wogegen im Jahre 2001 bereits mehr als 500 Einträge in SwissProt

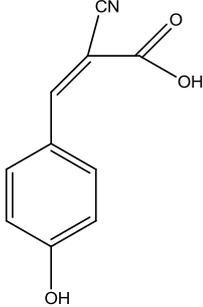
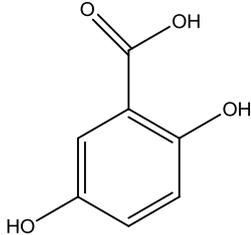
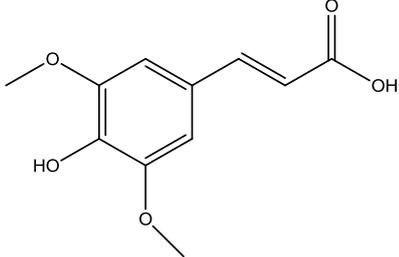
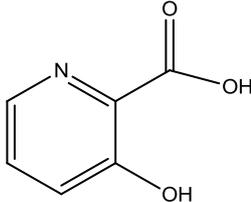
1 Einleitung

(Bairoch und Apweiler, 1996; Bairoch und Apweiler, 1999; Boeckmann et al, 2003) verzeichnet waren. Die Charakterisierung der Proteine erfolgt über die mittels MS ermittelten Peptide, die über einen Abgleich mit DNA-Sequenzdatenbanken identifiziert werden (Lottspeich und Engels, 2012).

1.3.1 MALDI

MALDI beruht auf der gemeinsamen Kristallisation eines Analyten und einer geeigneten Matrix, bestehend aus kleinen organischen Molekülen (Tabelle 1) (Gobom et al., 2001).

Tabelle 1: Matrixsubstanzen für die MALDI-MS in der biochemischen Analytik

Matrix	Struktur	geeignet für
2-Cyano-4-hydroxyzimtsäure		Peptide
2,5-Dihydroxybenzoessäure (DHB)		Peptide, Proteine, Komplexe Kohlenhydrate
3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure		Proteine
3-Hydroxypicolinsäure		RNA, DNA

1 Einleitung

Hierzu wird der gelöste Analyt mit einem 1000 bis 10000 fachen Überschuss (mol/mol) an Matrixsubstanz gemischt und auf einer Stahlplatte (MALDI-Platte) auskristallisiert. Dieser Variante wird als „dried-droplet“ Präparation (Karas und Hillenkamp, 1988; Tanaka et al, 1988) bezeichnet. Eine andere Präparationsmethode ist die „surface“- bzw Dünnschichtpräparation, bei der der gelöste Analyt auf eine bereits kristallisierte Matrix aufgebracht wird (Vorm et al., 1994). Im Hochvakuum der Ionenquelle des MS wird die Probe mit UV Lasern, entweder mit einer Wellenlänge von 355 nm (Nd:YAG-Laser) oder 337 nm (N₂-Laser), mit einem wenige Nanosekunden langem Impuls bestrahlt (Abb 12). Hierbei wird das π -Elektronensystem der Matrix angeregt, so dass es nicht zum Erreichen eines thermischen Gleichgewichtes und somit zu einer Zerstörung der Biomoleküle kommt, welches zu einer starken Ausdehnung des Probengemisches führen würde, sondern wird vielmehr ein Teil des Gemisches abgelöst, und es erfolgt eine partielle Ionisierung der gasförmigen Analyt- und Matrixmoleküle. Da die thermische Belastung sehr gering ist, ist die Fragmentierungsrate der Biomoleküle ebenfalls gering, so entstehen mehrheitlich einfach geladene Analytionen vom Typ $[M+H]^+$ (Karas et al, 2000; Gobom et al, 2001). Durch Zusammenstöße der Analyt- und Matrixmolekülen kommt es im Vakuum zu einer Übertragung der Protonen auf die Analytmoleküle. Dabei hängt die Ausbeute der Analytionen, den „lucky survivors“ (Karas und Kruger, 2003), sowohl von der Protonenaffinität der Probenmatrix als auch von der Überlebensrate der Analytionen ab (Jaskolla et al., 2008) (Abb12). Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die große Toleranz gegenüber Verunreinigungen, welche zum Beispiel durch Puffer, Detergenzien oder durch biochemische Probenvorbearbeitungen (z.B. Gelelektrophorese, tryptischer Verdau) eingebracht werden, und die MS-Analyse stören könnten.

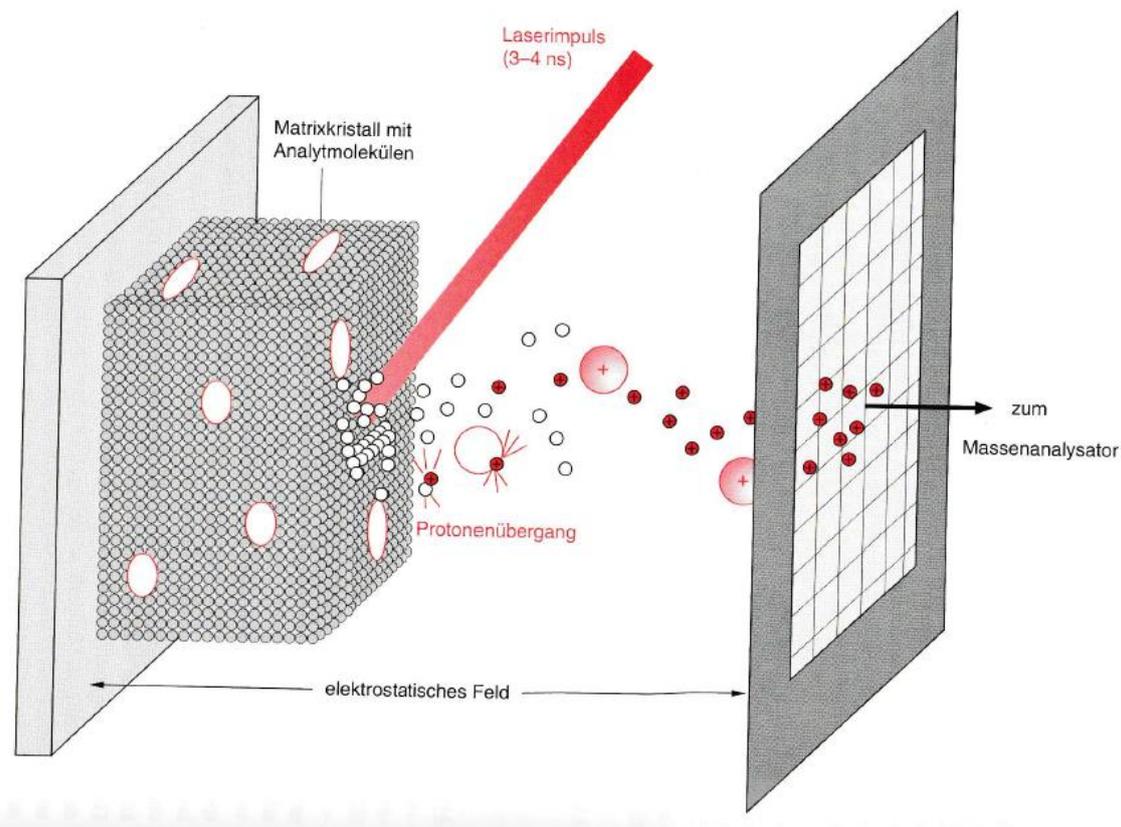


Abbildung 12: MALDI-Prinzip (verändert nach Lottspeich und Engels, 2012)

1.3.1.1 MALDI ToF (engl. Time of Flight [ToF])

Ein Flugzeit-MS eignet sich auf Grund der beschriebenen Ionenquelle des MALDI besonders. Diese Methode beruht auf der Bestimmung der Flugzeit der Ionen in einer feldfreien Driftstrecke (Lottspeich und Zorbas, 1998; Knochenmuss, 2008). Hierzu werden die mittels MALDI generierten Ionen in einem elektrostatischen Feld beschleunigt. Durch ihre unterschiedlichen Massen besitzen die verschiedenen Ionen unterschiedliche kinetische Energien und somit auch unterschiedliche Geschwindigkeiten. So werden die Ionengruppen in Abhängigkeit ihres Masse-Zu-Ladungsverhältnisses in der feldfreien Driftstrecke aufgespalten. Ein Ion höherer Masse benötigt dabei mehr Zeit zum Durchfliegen der Driftstrecke als ein Ion mit einer geringeren Masse (Abb 13).

1 Einleitung

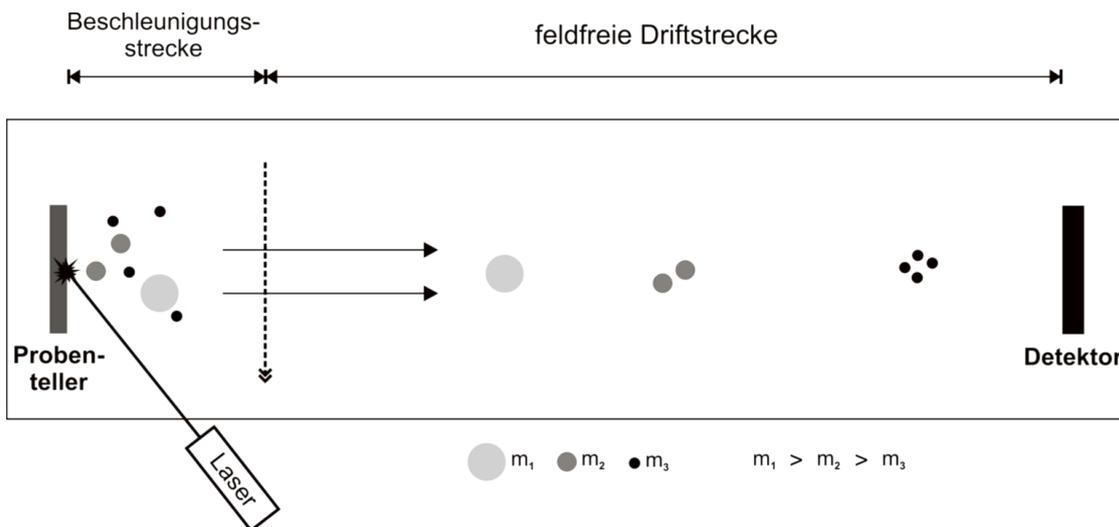


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines MALDI ToF (Lottspeich und Engels, 2012)

Problematisch bei ToF-Analysatoren ist eine Unschärfe bei der Aufspaltung gleicher Massen. Diese Unschärfe ergibt sich aus den unterschiedlichen Ursprungsstandorten, der Startgeschwindigkeit und etwaigen Kollisionen der Analytationen. Eine Verbesserung dieses Effektes wird durch die Verwendung eines Reflektors erzielt (Mamyrin et al., 1973; Han et al, 2008), welcher ein zweites der Flugrichtung entgegengesetztes Feld erzeugt (Abb 14). Dabei dringen Ionen mit einer höheren kinetischen Energie tiefer in das elektrische Feld ein, durch diesen Effekt werden die anfänglichen Unschärfen reguliert und Ionen gleicher Masse gelangen zeitgleich an den Detektor.

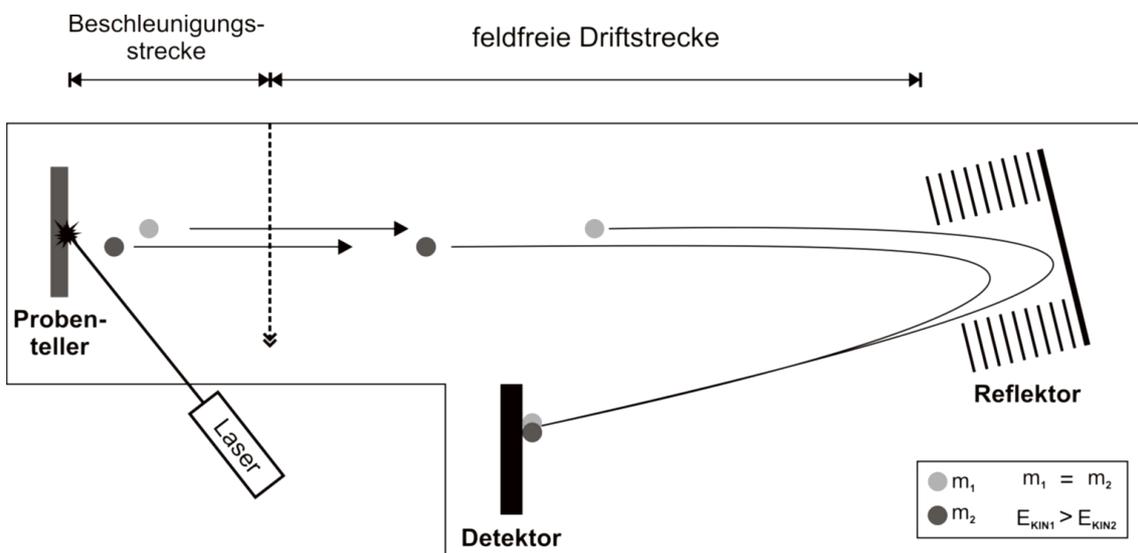


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines MALDI ToF mit Reflektor (Lottspeich und Engels, 2012)

1.3.2 ElektroSpray-Ionisationsverfahren (ESI)

Das Elektrospray-Ionisationsverfahren (Abb 15) ist eine Methode, bei der die Transformation der Analytmoleküle in Lösung zur Ionisierung und Desolvatisierung im Hochvakuum führt (Yamashita und Fenn, 1984; Fenn et al., 1989). Die in Lösung befindlichen Analytmoleküle werden durch eine leitfähige Kapillare, an der die Anode eines Hochspannungsfeldes anliegt, versprüht. Durch die Ausbildung eines Taylor-Konus werden an dessen Spitze kleine hochgeladene Tröpfchen abgestoßen. Durch kontinuierliches Verdampfen des Lösungsmittels kommt es zu spontanen Coulomb-Explosionen, die zur Bildung von Mikrotröpfchen bis hin zur vollständigen Desolvatisierung des Analyten führen (Dole et al, 1968; Mack et al, 1970), der Vorgang wird durch ein entgegenströmendes geheiztes „drying gas“ unterstützt (Lottspeich und Engels, 2012).

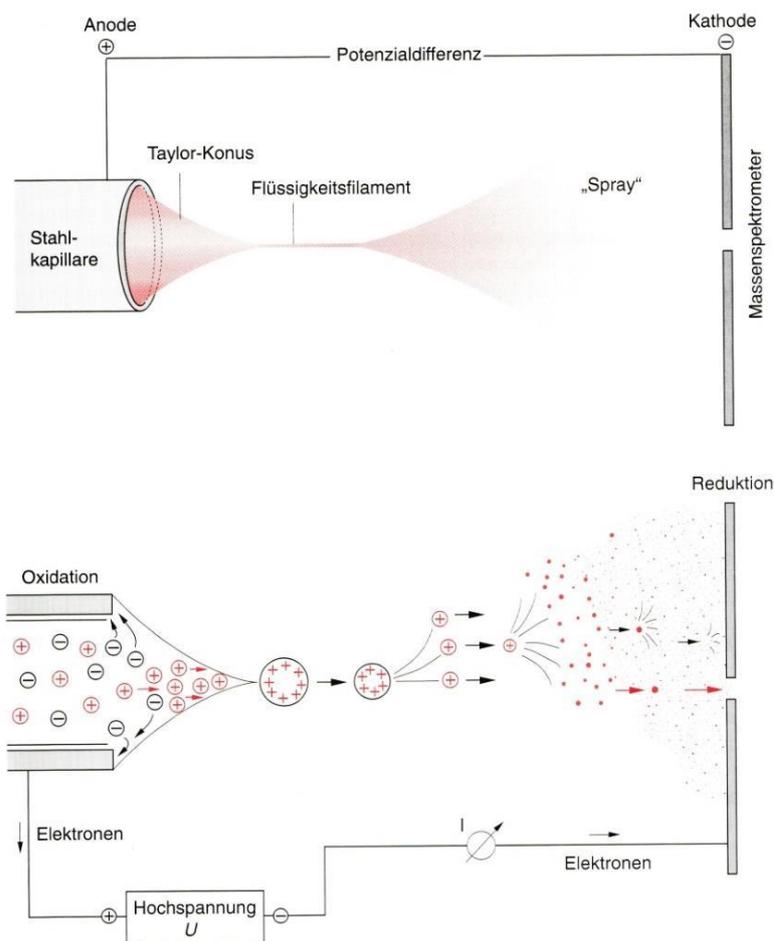


Abbildung 15: Schematische Darstellung des makroskopischen und mikroskopischen ESI-Prozesses (Lottspeich und Engels, 2012)

Anschließend werden die Ionen ins MS überführt. Beim ESI-Verfahren kann es zur Bildung mehrfach geladener Ionen der allgemeinen Formel $[M+nH^+]^n$ kommen, wobei M für die Masse des Analyten steht und n die Anzahl der Ladungen angibt. Durch

eine Veränderung der Ausrichtung des angelegten elektrischen Feldes können bei dieser Methode auch negativ geladene Ionen detektiert werden. Für die Analytik biologischer Makromoleküle war die Entwicklung des nano-ESI (Wilm und Mann, 1994; Wilm und Mann, 1996) von großer Bedeutung, da durch die hierbei umgesetzte niedrigere Flussrate und das höhere elektrische Feld die Nachweisgrenze um einen Faktor 10 gesenkt werden konnte. Ein weiterer Vorteil dieser Verbesserung ist das Resultat einer Erhöhung der zu detektierender Analytmoleküle (Schmidt et al., 2003). Auch die Erhöhung der Toleranz gegenüber Kontaminationen, wie z.B. erhöhten Salzkonzentrationen, ist für das Arbeiten mit biologischen Molekülen vorteilhaft (Wilm und Mann, 1996; Juraschek et al., 1999).

1.3.2.1 ESI-Massenanalytoren: Quadrupol und Ionenfalle

Der Quadrupol-Massenanalysator, welcher sowohl als Breitbandmassenfilter als auch als selektierenden Massenfilter eingesetzt werden kann, ist vor allem bei ESI-Quellen sehr verbreitet. Die Flugroute der Ionen folgt hierbei einer Achse zwischen vier parallel liegenden Stabelektroden, deren Schnittpunkte mit einer Ebene senkrecht zur Zylinderachse ein Quadrat bilden. Im Wechselfeld zwischen den Quadrupol-Stäben findet eine m/z -Selektierung statt. Der Vorteil dieses Massenanalysators ist ein schnelles und kontinuierliches Scannen des erzeugten Ionenstromes. Jedoch ist die Auflösung dieses Analysators deutlich geringer als die eines MS-ToFs. Ein deutlicher Auflösungsgewinn wird durch die Kombination der beiden Systeme im QToF gerade bei komplexen biomolekularen Analysen erzielt (Schlundt et al., 2009).

Ionenfallen oder „iontraps“ folgen im Wesentlichen dem Messprinzip des Quadrupols. Diese Massenanalytoren bestehen aus einer Ringelektrode mit zwei Endkappen, über die die Analytionen durch zentrische Einlassöffnungen in die Falle und wieder heraus gelangen können (Paul et al, 1990; Tolmachev et al, 2000; Mao und Douglas, 2003). Sowohl die Scangeschwindigkeit als auch die Auflösung der Ionenfallen ist gegenüber einem Quadrupol 10-fach erhöht. Eine besondere Form einer Ionenfalle stellt die Orbitrap (OT) dar (Makarov, 2000). Bei dieser Variante bewegen sich die Ionen auf Bahnen um eine spindelförmige Elektrode, die elektrostatische Anziehungskraft der Ionen zur Elektrode wird durch die entgegengesetzte Zentrifugalkraft kompensiert und führt zu einer tangentialen Bewegung der Ionen um die Elektrode. Für jedes Ion ergibt sich daraus ein Signal in Form einer spezifischen Sinusfunktion, die so gemessene Resonanzfrequenz wird durch eine Fouriertransformation in ein Massensignal übersetzt. Die Scangeschwindigkeit und das Auflösungsvermögen dieser besonderen Art der Ionenfalle ist um einen Faktor 20 höher als bei den „normalen“ linearen Ionenfallen (LTQ). Als eine Art „Goldstandard“ haben sich vor allem in der Analyse biologischer Makromoleküle sogenannte LTQ-OT-Hybridmodelle entwickeln können (Mitchell, 2010).

1.3.3 Tandem-MS

Die Tandem-MS- bzw. MS/MS-Technik ist eine Zweischnitt-Massenanalyse. Bei der Collision Induced Dissociation Methode (CID) werden die Ionen durch Kollisionen mit einem Inertgas (z.B. Argon) angeregt. Die Stoßenergie wird dabei in Schwingungsenergie transformiert, was wiederum zu Bindungsbrüchen führt. Eine Alternative zu diesem Verfahren ist der Einsatz von Elektronen anstelle des Gases im Electron Capture Dissociation (ECD). Diese Methode führt zur Bildung von Radikal-Kationen des Typs $[M+nH]^{(n-1)+}$, die anschließend zerfallen. Die durch die Bindungsbrüche oder den Zerfall entstandenen Ionen werden als Fragment- bzw. Produkt-Ionen bezeichnet. Bei einfach geladenen Ionen entsteht dabei ein geladenes, detektierbares und ein neutrales Teilchen, bei mehrfach geladenen Vorgängerionen entstehen durch Ladungsabstoßung zwei geladene und somit detektierbare Fragmente. Diese Fragmentationen werden nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann (Biemann, 1982; Roepstorff und Fohlman, 1984) bezeichnet.

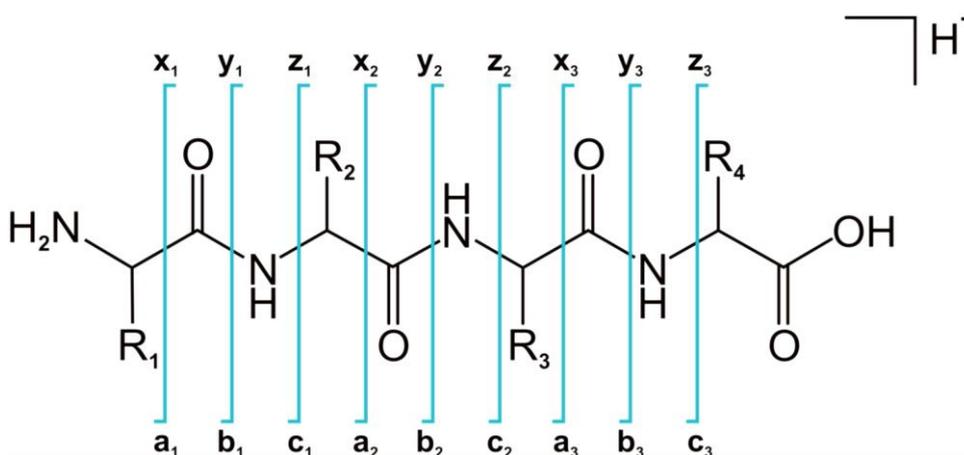


Abbildung 16: Fragmentierungsschema nach Roepstorff (Lottspeich und Engels, 2012)

Verbleibt die Ladung am N-Terminus des Fragmentions, so wird dieses als a-, b- oder c-Ion bezeichnet, je nachdem ob die Spaltung vor, in oder nach der Peptidbindung erfolgt. Wenn der C-Terminus der Ladungsträger ist, werden die jeweiligen Fragmente als x-, y- und z-Ion deklariert. Der zusätzliche Index gibt die Anzahl der Aminosäuren des Fragmentions an. Bei CID Experimenten entstehen bevorzugt die b- und y-Serien (Abb 16). Als zusätzliche Analysemethoden werden die relative Intensitäten der Fragmentionen sowie die der Massenverluste zum Aufschluss der Aminosäuresequenz der Peptide hinzugezogen (Kapp et al, 2003; Parker et al, 2004; Schmidt et al, 2006). Bei Fragmentierungen mittels Hochenergie-CID (1-2 keV) kann es des Weiteren zu Brüchen der Seitenketten und posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen kommen (Johnson et al, 1987), wodurch eine weitere Bestimmung der Analyte ermöglicht wird.

Neben der Untersuchung der Primärsequenz eines Proteins ist die Analyse posttranslationaler Modifikationen (Quadroni 2001; Rudd et al. 2001) und die Lokalisation von Disulfidbrücken von großer Bedeutung (Neitz et al. 2001). Zudem können mit der MS auch in gewissen Grenzen nichtkovalente Wechselwirkungen (Kuwata et al. 1998; Lyubarskaya et al, 1998), untersucht werden.

1.3.4 Proteomics

Der Begriff Proteom wurde Mitte der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts von Williams und Wilkins 1996 eingeführt. Das Proteom bezeichnet das ermittelte Proteinmuster eines Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment unter definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt (Lottspeich, 1999). Es ist also nicht wie das Genom als statisches System, welches in jeder Zelle vorliegt, zu betrachten (Venter et al., 2001), sondern vielmehr als hochdynamische Verflechtung verschiedener Komponenten. Der dynamische Bereich der Proteine einer biologischen Probe kann mehrere Zehnerpotenzen umfassen, was zum einen durch den gewebe- und zellspezifischen Ablauf der Proteinbiosynthese bestimmt ist, zum anderen aber auch durch äußere Einflüsse auf deren Qualität und Quantität verursacht wird (Anderson und Anderson, 2002). Als Proteomics wird somit die Identifizierung und Charakterisierung komplexer Proteingemische (Proteome) bezeichnet.

1.3.4.1 Isolierung

Da das Proteom eine sehr große Dynamik und damit einhergehende Komplexität aufweist, wird zur Analyse ein spezifischer Schritt benötigt, um versuchsspezifische Isolierungen oder Anreicherungen zu erzielen. Für diese bindungsspezifische Art der Isolierung kommt die Affinitätschromatographie zur Anwendung. Bei dieser Trennmethode werden spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und einem an eine Matrix gebundenen Bindungspartner genutzt. Als bekanntester Vertreter dieses Trennverfahrens gilt die Immunpräzipitation (IP). Hierbei fungiert ein immobilisierter Antikörper als „Köder“ (bait) um Proteine mittels Epitopeninteraktion aus einer Lösung zu extrahieren. Bei der Koimmunpräzipitation (CoIP) können nach demselben Prinzip Proteinkomplexe isoliert werden, bei denen die Analyte sekundär an antikörpergebundene Proteine assoziiert sind. Anstelle eines Antikörpers können ähnlich der CoIP Proteine, die mit den Analyten wechselwirken, eingesetzt werden. Diese Köderproteine werden mittels einer Affinitäts-Struktur (Tag) markiert und über ein strukturspezifisches immobilisiertes Substrat gebunden. Häufig verwendete Tags sind z.B. die Glutathion S-Transferase (GST)-, Histidin (His)-, FLAG-, und der Biotin-Tag (Scheich et al, 2003).

1.3.4.2 Auftrennungsstrategien

Durch die hohe Komplexität der Proteome aus Geweben, Zellen oder Pulldown - Experimenten und der Möglichkeit der daraus resultierenden großen Anzahl an Analyten ist eine Fraktionierung der Proben sinnvoll. Diese Separierung kann nach diversen Eigenschaften, wie der Ladung, der Größe oder physikalischer Spezifitäten erfolgen. Hierzu gibt es mehrere unterschiedliche Strategien, welche alle als Ziel die Gewinnung vollständiger Proteine haben. Diese Proteine können anschließend nach einem Verdau durch Endoproteinasen als definierte Peptide mittel MS analysiert werden (Abb 17). Die Strategien können in zwei unterschiedliche Ansätze aufgeteilt werden, die sich aus dem Zeitpunkt des Verdaues der Proteine ergeben. Bei den gelbasierten Methoden (in-Gel-Verdau) werden die Proteine erst separiert und anschließend verdaut. Zum einen können die intakten Proteine mittels eindimensionaler (1D) Gelelektrophorese aufgetrennt werden, bei der die Auftrennung der Proteine über deren Molekulare Masse erfolgt. Zum anderen kann die Auftrennung über ein zweidimensionales (2D) Gel (Klose, 1975; O'Farrell, 1975) erfolgen. Hier erfolgt in der ersten Dimension eine Auftrennung der Proteine des Gemisches über deren isoelektrischen Punkt und in der Zweiten über deren Molekulare Masse.

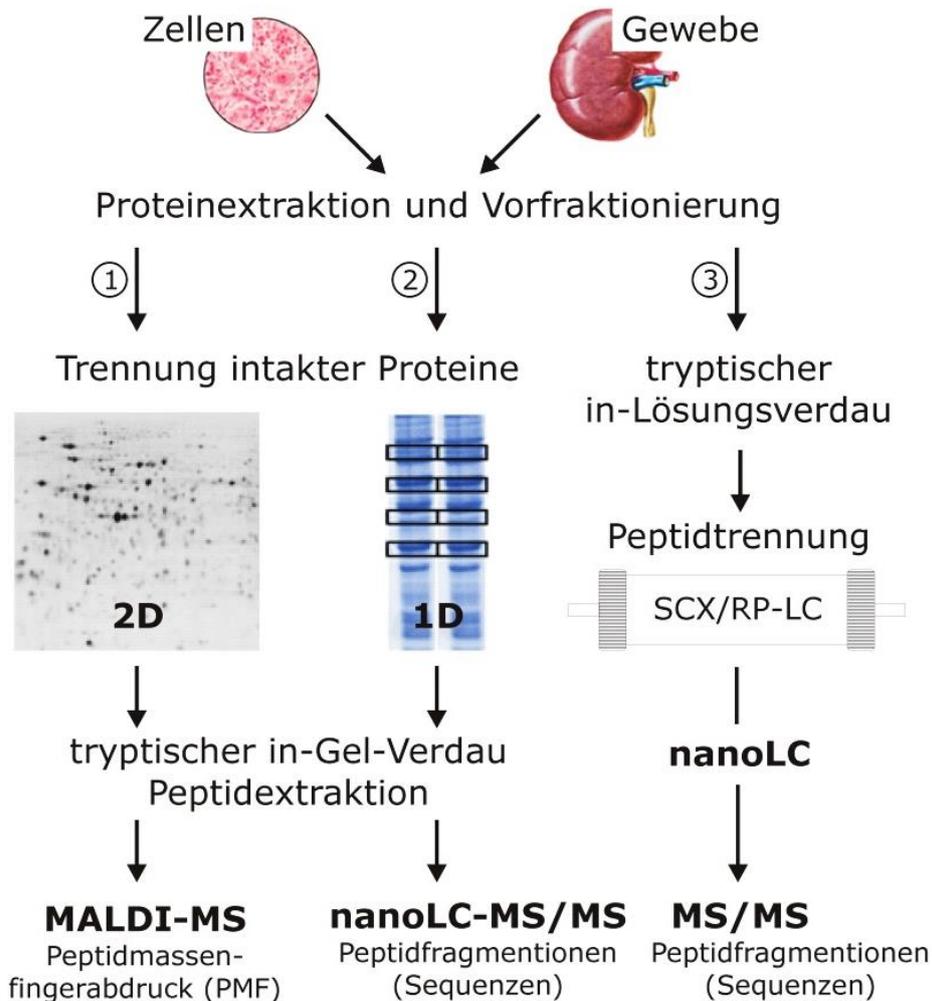


Abbildung 17: Strategien zur Proteomanalyse (verändert nach Krause, 2008)

Diese beiden Methoden unterscheiden sich durch ihr unterschiedliches Auflösungsvermögen. Das 1D Gel hat gegenüber dem 2D Gel eine geringere Auflösung, ist aber zum Teil sensitiver, da bei dieser Methode auch niedrig abundante Proteine oder Membranproteine, sowie Proteine mit extrem großem Molekulargewicht fraktioniert werden können (Gorg et al, 2004; Körbel et al, 2005). Bei beiden Methoden entsteht ein Gelbild, welches durch Färbung sichtbar gemacht wird, und auf dem die Proteine als sogenannte „Spotts“ auftreten. Üblicherweise werden die Proteinspots mit klassischen Techniken wie nicht-kolloidaler bzw. kolloidaler Coomassie Brilliant Blue Färbung oder Silberfärbung sichtbar gemacht. Während Coomassie Brilliant Blue nicht sensitiv genug ist (Empfindlichkeit 0.5-1 µg / Spot) um die Mehrzahl der aufgetrennten Proteine in einem komplexen Proteingemisch zu visualisieren, ist die Silberfärbung zwar empfindlicher (Empfindlichkeit ca. 1-10 ng / Spot), jedoch die Quantifizierung schwieriger (Quadroni und James, 1999; Berggren et al, 2000). Zur Lösung dieser Problematik wurden neue Färbetechniken, die auf Fluoreszenzfarbstoffen basieren, entwickelt. Als wichtige Vertreter dieser Farbstoffe gelten „SYPRO orange“, „SYPRO red“ und vor allem „SYPRO ruby“ (Steinberg et al, 1996; Patton et al, 2000).

1 Einleitung

Bei den gelbasierten Methoden werden die Proteine getrennt, und anschließend mittels in-Gel-Verdau (Rosenfeld et al, 1992) durch eine Endoproteinase verdaut (Rosenfeld et al., 1992). Bei dem zweiten Ansatz wird das Proteom per in-Lösung-Verdau verdaut, und anschließend über eine nano-LC (Flüssigchromatographie [liquid chromatographie (LC)]) getrennt. Zur besseren Auftrennung kann eine weitere LC Dimension wie z.B. ein starker Kationentauscher (SCX) oder eine Umkehrphase(RP) vorgeschaltet werden (Washburn et al, 2001; Gilar et al, 2005).

1.4 Zielsetzung

Durch die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms (Lander et al, 2001) stiegen die Erwartungen in Bezug auf das Verständnis von Einflüssen genetischer Disposition oder der Entstehung von Krankheiten (Venter et al, 2001). Dies erwies sich aber als Trugschluss, da sich zeigte, dass erst die exprimierten Proteine die Zellabläufe bestimmen (Bauer und Küster, 2003). Die genomischen Sequenzen zeigen nur das Potential zur Expression eines Gens auf, wobei sich die exprimierten Gene der Zellen quantitativ mittels Transkriptions-Analysen bestimmen lassen. Die gebildeten Proteine unterliegen aber einem permanenten Auf- oder Abbau, was sich in Aktivitätsveränderungen, unterschiedlichen Lokalisationen, veränderten molekularen Wechselwirkungen oder in Stabilitätsunterschieden zeigt (Pawson und Scott, 2005). Das Proteom ist dabei mit mehr als einer Million Spezies wesentlich umfangreicher als die zugrunde liegende genetische Information (ca. 30000 humane Gene (Walsh et al, 2005)), sondern auch dynamischer (Berg et al., 2003), was durch ein vielschichtiges Muster von Protein-Protein-Interaktionen zustandekommt (Rubin, 2001).

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer auf einem Affinitäts-Pulldown beruhenden Methode zur Anreicherung interagierender Proteine. Diese so aufgereinigten Protein-Protein-Interaktionspartner sollen im Anschluss mittels LC-MS-Verfahren analysiert und bestimmt werden.

Diese so etablierte Methode sollte zum einen in einem humanen Tumorzelllinien-System eingesetzt werden. Es konnte in diversen Studien zu Untersuchungen der Auswirkung humaner Defensine auf die Proliferation oraler Karzinome ein Einfluss auf genomischer Ebene nachgewiesen werden (Winter et al., 2011; Winter et al, 2012; Wenghoefer et al, 2012). Nun sollten im Laufe dieser Studie die proteomischen Bindungspartner der humanen α - und β -Defensinen in diesem System ermittelt werden.

Zum anderen sollten in dieser Arbeit die proteomischen Bindungspartner, die bei der Aufnahme von zwei spezifischen Majorallergenen in primären humanen Monozyten zum Tragen kommen, analysiert werden. Dabei soll ermittelt werden, ob auch andere Aufnahme- und Signalwege als der hinlänglich bekannte hochaffine FC ϵ Rezeptors für diesen Mechanismus in Frage kommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Modell Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleissheim, D
Analysewaage Sartorius Analytic A 120 S	Sartorius, Göttingen, D
ChemiDoc™XRS System	BioRad, München, D
Durchflusszytometer FACScanto	BD, Heidelberg, D
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Elektr. Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Elektrophorese System MINI SUB™	BioRad, München, D
FugeOne™ Mikrozentrifuge	Starlab, Ahrensburg, D
Gefrierschrank Revco ULT 790-3-V31 (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Inkubator Heraeus® BB15	Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, D
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, D
NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen, D
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Thermo Schüttler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Schüttler MS1	IKA® Werke, Staufen, D
Wasseraufbereitungssystem MilliQ	Merck Millipore, Darmstadt, D
Wasserbad GFL 1012	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge 5804 R + 5415 R	Eppendorf, Hamburg, D

2.1.2 Geräte **Max** **Planck** **Institut** **Köln**

Massenspektrometer

HCTultra PTM Discovery System	Bruker Daltonics, Bremen, D
LTQ Velos	Thermo Fischer Scientific, Bremen, D
QExactive Plus Orbitrap	Thermo Fischer Scientific, Bremen, D
UltraflexIII ToF/ToF	Bruker Daltonics, Bremen, D

Nano Flüssigkeitschromatographie

Easy-nLC II	Bruker Daltonics, Bremen, D
Proxeon Easy-nLC	Thermo Fischer Scientific, Bremen, D
Easy-nLC UPLC	Thermo Fischer Scientific, Bremen, D

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen BD (Heidelberg, D), Corning (Tewksbury, MA, USA), Eppendorf (Hamburg, D), Greiner bio-one (Frickenhausen, D), Merck Millipore (Darmstadt, D), Nunc (Bremen, D), Sarstedt (Nümbrecht, D), Thermo Fisher Scientific (Bremen, D) und Whatman (Solingen, D) bezogen.

2.1.4 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
7-AAD (7-Aminoactinomycin D)	Sigma-Aldrich, München, D
Acetonitril	Merck, Darmstadt, D
Ameisensäure	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt, D
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München, D
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, D

2 Material und Methoden

BenchMark™ Protein Ladder	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München, D
Bromphenol Blau	Merck, Darmstadt, D
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, D
Iodacetamid (C ₂ H ₄ INO)	Sigma-Aldrich, München, D
Dextran	Sigma-Aldrich, München, D
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, D
DMEM	Sigma-Aldrich, München, D
DMSO	Sigma-Aldrich, München, D
Ethanol	Applichem, Gatersleben, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
EZ-Link NHS-PEG ₁₂ -Biotin	Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, München, D
Flamingo Stain	BioRad, München, D
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, D
Glycin	Promega, Madison, WI, USA
Guanidiniumchlorid	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, München, D
KCl	Applichem, Gatersleben, D
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Sigma-Aldrich, München, D
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München, D
Magermilchpulver	Applichem, Gatersleben, D
Methanol	Applichem, Gatersleben, D
NaCl	Sigma-Aldrich, München, D
Na ₂ S ₂ O ₃	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄	Progen, Heidelberg, D

NycoPrep	Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Merck, Darmstadt, D
PBS	Merck, Darmstadt, D
Penicilin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, D
RPMI	Merck, Darmstadt, D
SDS	Sigma-Aldrich, München, D
StrataClean	StrataGene, La Jolla, CA, USA
Sucrose	Serva, Heidelberg, D
Sypro® Ruby	Sigma-Aldrich, München, D
Tetramethylethyldiamin	Serva, Heidelberg, D
Tris Base	Sigma-Aldrich, München, D
Tris HCl	Sigma-Aldrich, München, D
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, München, D
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich, München, D
Trypsin (MS grade)	Promega, Madison, WI, USA
Trypsin EDTA	Invitrogen, Darmstadt, D
Tween 20	BioRad, München, D

2.1.5 Kits

NuPAGE® Novex® 3-8% Tris-Acetate Proteingele	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pierce Silver Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
µMacs™ Streptavidin Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
Slide-A-Lyzer Dialyse Unit	Thermo Fisher Scientific, Bremen, D

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Klon	Hersteller
Streptavidin PE	Streptavidin-Phycoerythrin		BD, Heidelberg, D
CD14 PE	PE Maus Anti-Human CD14	M5 E2	BD, Heidelberg, D
FcεRI	anti-FcεRI	22 E7	Hoffmann-La Roche, Basel, CH
GaM FITC	Ziege Anti Maus (Goat Anti-Mouse IgG, F(ab') ₂ Fragment Specific) FITC		Jackson Immuno Research, Suffolk, UK

2.1.7 Software

Software	Hersteller
Compass 1.5	Bruker Daltonics, Bremen, D
Proteinscape 3.0	Bruker Daltonics, Bremen, D
MaxQuant	Max-Planck Institut für Biochemie, Abteilung für Proteomics, München, D
ExPasy	Swiss Institute of Bioinformatics, Basel, CH
KEGG	Kanehisa Laboratories, Kyoto, JPN
String db 9.1	biobyte solutions GmbH, Heidelberg, D
ChemBioDraw Ultra 12	Cambridgesoft, Waltham, MA, USA

2.1.8 Peptide und Proteine

Die α- und β-Defensine wurden von der Firma Peptanova (Sandhausen, D) bezogen (Abb18).

DEFA1	ACYCRIPACIAGERRYGT C IYQGRLWAF C C
DEFA2	CYCRIPACIAGERRYGT C IYQGRLWAF C C
DEFA3	DCYCRIPACIAGERRYGT C IYQGRLWAF C C
DEFA4	VCSCRLVFCRRTELRVGN C LIGGVSFTY C CTRVD
hBD-1	DHYNCVSSGGQCLYSAC P IFTKIQGT C YRGKAK C CK
hBD-2	GIGDPVTCLKSGA I CHPVF C PRRYKQIGT C GLPGTK C CKKP
hBD-3	GIINTLQKYY C RVRGGR C AVLS C LPKRRQIGK C DTRGRK C CRRK

Abbildung 18: Aminosäuresequenzen der eingesetzten humanen α - und β -Defensine

Die Allergene Bet v1 und Phl p 5 wurden von der Firma Biomay (Wien, A) bezogen (Abb 19).

Bet v 1:

GVFNYETETTSVIPAARLFKAFILDGDNLFPKVAPQAISSVENIEGNGGPG
TIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK
IVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLA
HSDAYN

Phl p 5:

AVPRRGPRGGPGRSYAADAGYAPATPAAAGAEAGKATTEEQKLIEDINV
GFKA AVAAAASVPAGDKFKTFEAAFTSSSKAATAKAPGLVPKLDAAYSV
AYKAAVGATPEAKFDSFVASLREALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMKIP
AGELQIIDKIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDT
YKCIPSLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQP
ATGAATVAAGAATTATGAASGAATVAAGGYKV

Abbildung 19: Aminosäuresequenzen der eingesetzten Allergene

2.1.9 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
FACS Puffer (10x), pH 7.4	155 mM NaCl, 70,9 mM Na ₂ HPO ₄ , 28,8 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 % FBS (v/v), 153,8 μ M NaN ₃
EDTA-Stock / pH 8	0,5 M Na ₂ EDTA

2 Material und Methoden

Dextran Lösung (8 %)	493,8 mM Dextran (v/v) in einer NaCl Lösung (0,9 %)
NaCl Lösung (0,9 %)	155 mM NaCl
Monozyten Wasch-Lösung	155 mM NaCl, 151,5 µM BSA, 1,7 mM EDTA
Glycin-HCl / pH 2,8	1 M Glycin
PBS (1x) / pH 7,4	137 mM NaCl, 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
Tris Lösung / pH 11	1 M Tris

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

Die verwendete BHY-Zelllinie (Cell Line Service, Eppelheim, D) stammt von einem gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinom. Die BHY-Zelllinie wurde bereits in anderen Studien zu Untersuchungen der Auswirkung der Defensine auf die Proliferation der OSCCs herangezogen (Winter et al., 2011). Vor dem Hintergrund der Kenntnis des Ursprungskarzinoms und der bisherigen Untersuchung von Genexpressionsraten in BHY-Zellen wurde die Zelllinie als Vertreter von oralen Plattenepithelkarzinomzellen in dieser Arbeit verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm² bzw. 175 cm²) in DMEM mit 10% FBS und 1% Pen/Strep in einem Inkubator unter 5% CO₂ bei 37°C vermehrt.

Die ebenfalls verwendete A64-CLS (Adenoma, Submaxillary Gland)-Zelllinie (Cell Line Service, Eppelheim, D) zeigte regulatorische Effekte der Genexpression bei Defensinen (Winter et al., 2012) Diese Zelllinie wurde in DMEM mit 10% FBS und 1% Pen/Strep in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.1.2 Splitten der Zellen

Bei einem konfluenten Zellrasen in den Zellkulturflaschen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA 0,05% (w/v) für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde bei den gelösten Zellen mit dem doppelten Volumen serumhaltigem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden vom Boden der Flaschen gespült und im Verhältnis 1:3 auf weitere Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.1.3 Einfrieren der Zellen

Die konfluenten Zellen wurden mit PBS gewaschen und im Brutschrank für 5 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA 0,05% (w/v) inkubiert. Die Trypsin-Reaktion der abgelösten Zellen wurde mit der doppelten Menge serumhaltigem Medium inhibiert. Die Zellen wurden vom Boden der Flaschen gespült und die Zellsuspension bei 300 g für 5 min

zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde in 500 µl Einfriermedium (DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep und 5% DMSO) resuspendiert und in 1 ml Kryo-Röhrchen abgefüllt. Diese wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer („Mr. Frosty“, Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene) bei -80°C eingefroren. Der Container gewährleistet eine kontinuierliche Abkühlung mit ca. 1°C/min.

2.2.1.4 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zentrifugiert. Das überständige Einfriermedium wurde abpipettiert und das Pellet in DMEM mit 10% FBS und 1% Pen/Strep resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen überführt und mit serumhaltigem Medium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

2.2.2 Primärzellen

2.2.2.1 Isolation von Monozyten

Die Monozyten wurden aus humanem peripherem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Das Blut wurde in S-Monovetten mit EDTA als Gerinnungshemmer gesammelt und in 50 ml-Röhrchen überführt. 10 Volumina EDTA-Blut wurden sorgfältig mit 1 Volumen einer vorgewärmten 8% Dextran-Lösung gemischt. Nach 45-50 min Inkubation bei RT trennt sich das Gemisch in zwei Schichten, die untere Schicht enthält die Erythrozyten und die obere Schicht mit Blutplasma die Leukozyten. Das Blutplasma wurde vorsichtig aufgenommen und in einem Verhältnis von 2:1 über NycoPrep 1,068 geschichtet. Bei einer anschließenden Zentrifugation bei 650 g für 20 min bei RT entsteht eine Zwischenphase zwischen Plasma und NycoPrep, die in einem neuen 50-ml-Röhrchen gesammelt wurde und drei- bis viermal mit Monozyten Waschmedium gewaschen und bei 140 g für 10 min zentrifugiert wurde. Abschließend wurde die Zellzahl, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, bestimmt.

2.2.3 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting [FACS])

2.2.3.1 Charakterisierung von Monozyten mittels FACS

Zur Kontrolle der Oberflächenproteine der primären Zellen wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Für die Färbung der Monozyten wurden 1×10^5 Monozyten in 100 μl 4°C kalten FACS-Puffers in 96-Well-Platten angefärbt. Hierzu wurden der unkonjugierte Primärantikörper oder der jeweilige Isotypkontrollantikörper zugegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellpellets in 100 μl FACS-Puffer des entsprechenden fluorchrom-markierten Sekundär-Antikörpers suspendiert, für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 100 μl FACS-Puffer mit 5% (v / v) Mausserum suspendiert, für 15 min bei 4°C inkubiert und zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen mit direkt-konjugierten Zelltyp-spezifische Antikörper in 100 μl FACS-Puffer für 15 min bei 4° C inkubiert. Die Messungen wurden auf einem FACSCanto - Durchflusszytometer (BD Biosciences), ausgestattet mit einem 488 nm und einem 635 nm Laser durchgeführt. Die Messdaten wurden mit der FACSDiva (BD Biosciences) oder FlowJo (TreeStar) Software analysiert.

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der aus peripherem Blut gewonnen Monozyten wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Dabei wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an 0,2% Trypanblaulösung verdünnt. Die Konzentration der ungefärbten lebenden und blau gefärbten toten Zellen konnte anschließend über die Auszählung von vier Großquadraten (16 Kleinquadrate pro Großquadrat) im Phasenkontrastmikroskop nach folgender Formel bestimmt werden:

$$n[\text{Zellen/ml}] = N \times V \times 10^4$$

n = Zellzahl

N = Mittelwert der ungefärbten oder gefärbten Zellen pro Großquadrat

V = Verdünnungsfaktor

2.2.4 Zellaufarbeitung

2.2.4.1 Zellhomogenisierung (Pottern)

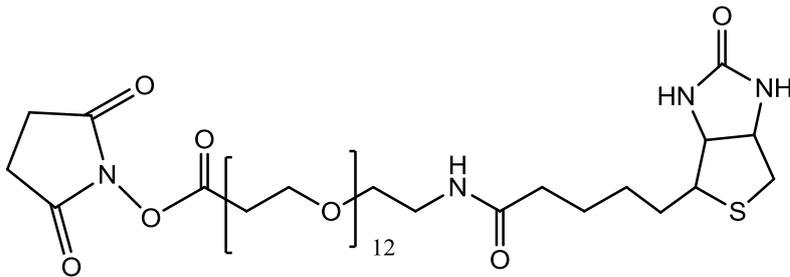
1×10^7 Zellen der eingesetzten Zelllinien bzw. 4×10^7 Zellen der primären humanen Monozyten wurden für die Homogenisierung bei 300 g für drei Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml eines Puffer - 250 mM Sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 – mit 10 μ M der Proteaseinhibitoren Aprotinin und Leupeptin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein eisgekühltes Potter-Glastube überführt. Mit einem Pistill wurden die Zellen homogenisiert. Die Zellextrakte wurden auf Eis gelagert.

2.2.4.2 Auftrennung der Zellextrakte durch Ultrazentrifugation

Um mikrosomale Membranen zu extrahieren, wurde die gewonnen Proteinsuspension in Oak Ridge Centrifuge Tubes überführt. Diese wurden in eine Avanti JA- Zentrifuge mit einem JA-21 Rotor gestellt und bei 15000 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in Polyallomer Centrifugation Tubes überführt. In einer Optima LE-80K UltraZentrifuge mit SW 40 Ti Rotor wurde der Überstand bei 100000 g und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 μ l einer Lösung aus 50 mM Tris-HCl mit einem pH 7,5 und 20% (v/v) Glycerin aufgenommen und bei – 20°C eingefroren.

2.2.5 Protein-Labeling

Als Affinitätstag wurde ein Biotin-Tag gewählt. Das niedermolekulare Biotin-Molekül mit einer Masse von 240 Da bindet hochspezifisch an Avidin aus Hühnereiweiß bzw. Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*. Zudem ist das Biotin-Molekül ungeladen, wodurch Effekte des gebunden Proteins nicht beeinflusst werden (Ternynck T et al, 1990). Um das sterische Verhalten der Proteine möglichst nicht zu beeinflussen und die Bindung an den Affinitätskomplexpартner zu erleichtern, ist dieser Tag mit einem 12 Einheiten langen Polyethylenglykol-Spacer versehen. Die reaktive Einheit des Biotinylierungsreagenz stellt ein NHS-Ester dar. Die Proteine wurden am N-Terminus mit dem Biotin-Label versehen. Dieses Biotinylierungsreagenz (Abb 20) wurde in DMSO gelöst eingesetzt.



EZ-Link NHS-PEG₁₂-Biotin

Abbildung 20: Biotinylierungsreagenz

2.2.5.1 Biotinylierung der Defensin-Moleküle

Die Biotinylierung der einzelnen Defensin - Moleküle wurde am N-Terminus der Peptide durchgeführt. Die Defensine wurden mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Wasser gelöst. Die Biotinylierung wurde mit dem EZ-Link NHS-PEG₁₂ Biotin Reagenz (Pierce [Thermo Fischer]) (Abb 20) durchgeführt. Für die einzelnen Peptide wurde die Menge an Biotinylierungsreagenz mit einer Konzentration von 250 mmol pro l nach folgender Berechnung ermittelt:

$$Y = ml \text{ Protein} \times \frac{mg \text{ Protein}}{ml \text{ Protein}} \times \frac{mmol \text{ Protein}}{MW \text{ Protein}} \times \frac{20 \text{ mmol Biotin}}{mmol \text{ Protein}}$$

$$\mu l \text{ Biotin} = Y \times \frac{1 * 10^6 \mu l}{250 \text{ mmol}}$$

Die jeweiligen Peptide wurden mit der berechneten Menge des EZ-Link NHS-PEG₁₂ Biotin Reagenz versetzt, und die Lösung mit PBS mit einem pH-Wert von 6,5 auf 50 µl aufgefüllt. Durch diesen pH Wert, der experimentel als Optimum ermittelt wurde, werden die Seitenketten von Aminosäuren wie Lysin oder Arginin mit Aminofunktions-Einheiten protoniert, wodurch die Reaktion mit dem reaktiven NHS-Ester unterbunden wird. Die Aminogruppe des Peptids liegt unter diesen Bedingungen unprotoniert vor und lässt sich dadurch selektiv biotinylieren (Abb 21). Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 2 M Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) Lösung (pH 10) gestoppt, dabei reagiert der NHS-Ester der noch nicht gebundene reaktiven Biotinylierungsreagenz mit dem primären Amin der im hohen Überschuss vorliegenden Tris Lösung ab.

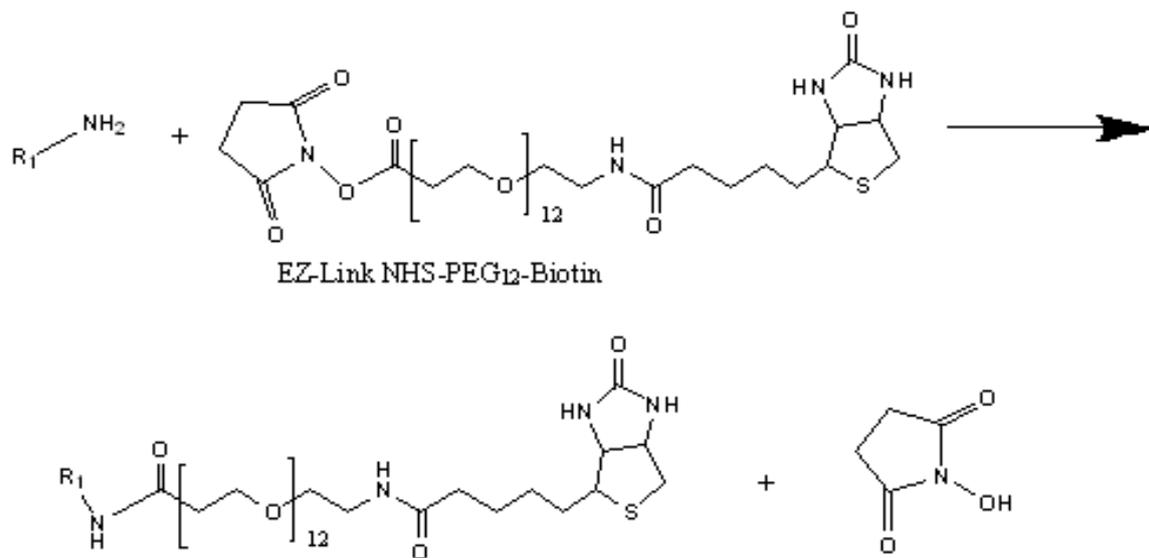


Abbildung 21: Reaktionsschemata der N-terminalen Biotinylierung von Proteinen

Zur Entsalzung der Lösung und der Entfernung der restlichen Reaktionsprodukte wurde im Anschluss eine Dialyse zur Aufreinigung der Peptide durchgeführt. Diese erfolgte in Slide-A-Lyzer-Einheiten mit einem Größenausschluss von 2 kDa. Die Dialyse erfolgte gegen 50 ml Wasser bei Raumtemperatur unter Rühren für eine Stunde. Hierbei wurde der Dialysepuffer zweimal gewechselt. Anschließend wurden die entsalzten Peptide im Vakuum getrocknet. Zur Reaktionskontrolle wurden die Proben tryptisch verdaut (siehe 2.2.8) und mittels ESI-MS analysiert.

2.2.5.2 Allergen-Biotinylierung

20 µg der Allergene Bet v1 und Phl p5 wurden mit der berechneten Menge entsprechend der Formel aus 1.2.5.1 des EZ-Link NHS-PEG₁₂ Biotin Reagenz (Abb. 3) versetzt, und die Lösung mit PBS mit einem pH-Wert von 6,5 auf 50 µl aufgefüllt. Durch diesen pH Wert werden die Seitenketten von Aminosäuren wie Lysin oder Arginin mit Aminofunktions-Einheiten protoniert, wodurch die Reaktion mit dem reaktiven NHS-Ester unterbunden wird. Die Aminogruppe des Peptids liegt unter diesen Bedingungen unprotoniert vor und lässt sich dadurch selektiv biotinylieren (Abb 2). Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 2 M Tris Lösung (pH 10) gestoppt, dabei reagiert der NHS-Ester der noch nicht gebundene reaktiven Biotinylierungsreagenz mit dem primären Amin der im hohen Überschuss vorliegenden Tris Lösung ab. Zur Entfernung der Reaktionsprodukte wurde im Anschluss eine Dialyse zur Aufreinigung der Peptide durchgeführt. Diese erfolgte in Slide-A-Lyzer-Einheiten mit einem Größenausschluss

von 2 kDa. Die Dialyse erfolgte gegen 50 ml Wasser bei Raumtemperatur unter Rühren für eine Stunde. Hierbei wurde der Dialysepuffer zweimal gewechselt. Anschließend wurden die entsalzten Peptide im Vakuum getrocknet.

2.2.6 Zellstimulationen

2.2.6.1 Inkubation mit biotinylierten Defensin-Molekülen

Nach Erreichen von 80-100% Konfluenz wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 24 h in serumfreien Medium gehalten. Die Zellen wurden entsprechend der basalen Sekretion der α - und β -Defensine über 240 min bei einer Endkonzentration von 50 nM (Winter et al, 2011) des jeweiligen gelabelten Peptides in einem Inkubator unter 5% CO₂ bei 37°C stimuliert. Die Zellen wurden mit Ripa-Puffer lysiert, und das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die mittels Ultrazentrifugation gewonnen Membranfraktionen der Zelllinien wurden für 10 min bei 37°C mit einer Endkonzentration von 50 nM des biotinylierten Peptides inkubiert, und anschließend auf Eis gelagert.

2.2.6.2 Inkubation mit biotinylierten Allergen

Die 5×10^6 aus humanem peripherem Blut isolierten Monozyten wurden zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Monozyten wurden mit 4 μ l des biotinylierten Allergens mit einer Konzentration von 5 μ g/ml für 10 min bei 37 °C inkubiert, die Menge an Allergen wurde als Sättigungswert mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb 22). Danach wurden die Zellen zentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Zellpellet mit Ripa-Puffer lysiert und das Lysat auf Eis gelagert.

Die Stimulation der Membranfraktionen der Monozyten wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt. Die Proteinsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

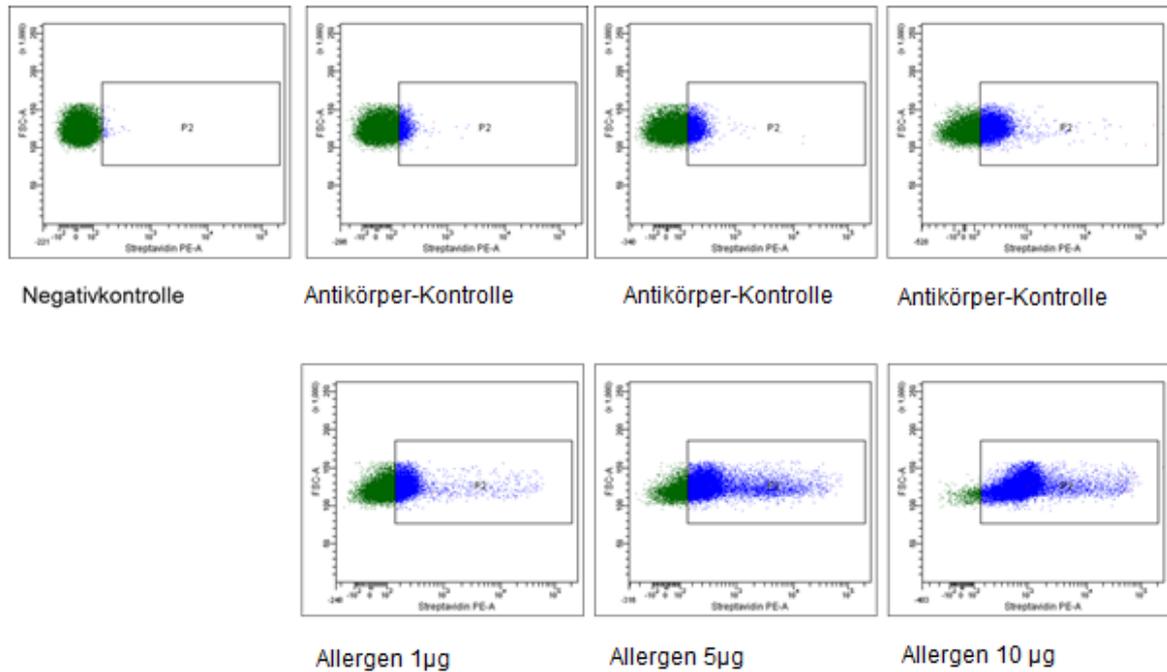


Abbildung 22: FACS-Kontrolle der Monozytenikubation mit Phl p 5 für 10 min bei 37°C, die rechte Wolke stellt die Zellen der spezifischen Allergenaufnahme dar.

2.2.7 Biochemische Proteinaufarbeitung

2.2.7.1 Proteinaufreinigung mittels spezifischer Affinitätschromatographie

Um die mit dem Biotin-Tag versehenen Proteine und deren Komplexpartner aufzureinigen, wurde eine Methode der Affinitätschromatographie mit avidingekoppelten magnetischen Partikeln angewandt. Hierfür wurden Streptavidin gekoppelte μ macs Microbeads von Miltenyi (μ Macs™ Streptavidin Kit) verwendet. Bei diesem Kit werden Säulen, die mit Edelstahlkügelchen gefüllt sind, eingesetzt. In einem starken Magneten führen diese Kügelchen zu einer Verstärkung des Magnetfeldes (Miltenyi Biotec: MicroBeads; Details; MACS Columns. http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/macs-technology/microbeads_dp.aspx, 16.02.2015). Magnetische Partikel können dadurch in der Säule festgehalten werden, während nicht magnetische Partikel von der Säule gespült werden. Über die an diese magnetischen μ Beads gebundene Streptavidin-Gruppe können Proteine mit Biotinlabeln aufgereinigt werden. Bei der Interaktion von Biotin mit Streptavidin beträgt die Dissoziationskonstante K_d $1,3 \cdot 10^{-15}$ M und stellt eine der stärksten Interaktionen in biologischen Systemen dar. Das aus Bakterien gewonnene Streptavidin hat zudem den Vorteil gegenüber dem Avidin, dass es kein Glykoprotein ist und es bei der Aufreinigung nicht zu unspezifischen

Bindungen von Kohlenhydrat-Rezeptoren an den Aufreinigungskomplex kommt (<https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-19-04369>; 28.03.2015).

Die Verwendung der μ macs Beads erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Hierfür wurden die Lysate der stimulierten Zellen bzw. die stimulierten Proteinsuspensionen der mittels Ultrazentrifugation gewonnenen Membranfraktionen der Zellen mit 100 μ l Streptavidin-Beads versetzt, gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Säule nach Herstellerangaben vorbereitet und zweimal mit 100 μ l RIPA-Puffer gespült. Der Reaktionsansatz wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Danach wurde die Säule viermal mit je 100 μ l PBS gewaschen um unspezifisch gebundene Protein von der Säule zu entfernen. Jeder Durchfluss wurde separat aufgefangen. Anschließend wurden die Sterptavidin-Biotin-Komplexe durch eine Erniedrigung des pH Wertes mittels eines Glycin-Puffers mit einem pH 2,8 gelöst, und die aufgereinigten Interaktionspartner aufgefangen. Die μ macs-Beads wurden zur Kontrolle in einem gesonderten Tube nach der Entnahme der Säulen aus dem Magneten aufgefangen.

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinmenge

Die Proteinmenge der Versuche wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurde eine BSA Verdünnungsreihe eingesetzt.

2.2.7.3 Konzentrierung der Proteinproben

Die Fraktionen wurden mit 10-25 μ l Strataclean Resin versetzt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden unter schütteln inkubiert. Danach wurde der Überstand bis auf ein geringes Restvolumen abgenommen. Das Präzipitat wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt auf ein SDS-Gel aufgetragen. Durch den Stromfluss wurden die Proteine vom Resin elektroeluiert und wurden im Gel getrennt.

2.2.7.4 Eindimensionale Gelelektrophorese

Das Protokoll für die klassischen SDS-Gele wurde aus der Protokollsammlung von Sambrook et al. (2001) entnommen und wird hier nicht näher vorgestellt.

Die eindimensionale denaturierende „sodiumdodecylsulfate-polyacrylamidegelelectrophoresis (SDS-PAGE)“ dient der Auftrennung von Protein und Peptiden nach ihrem Molekulargewicht. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-Protein-Komplexe. Dabei bindet das Natriumdodecylsulfat im Verhältnis von circa 1,4 g pro Gramm Protein (Laemmli, 1970).

Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und für ca. 3-5 min bei 95°C inkubiert, und auf Eis abgekühlt. Die Probe wurde in eine Geltasche eingebracht, als Marker wurde der Page Ruler Prestained Protein Ladder verwandt. Als Gele wurden Gradientengele NuPAGE® Novex® 3-8% Tris-Acetate Proteingele der Firma Life Technologies verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 300 V und Raumtemperatur über drei Stunden durchgeführt.

2.2.7.5 Nachweis der Proteine im Gel

Die Gele wurden mit dem Silver Staining Kit von Pierce oder mit SyproRuby von BioRad nach den Anleitungen des jeweiligen Herstellers gefärbt. Für die Detektion der mit SyproRuby gefärbten Spots bzw. zum Ausstechen dieser Spots wurde ein UV-Transilluminator benutzt.

2.2.8 Tryptischer Verdau

2.2.8.1 Tryptischer In-Gel-Verdau

Der In-Gel-Verdau der ausgeschnittenen Proteinspots erfolgte mit der in der Proteomanalytik am häufigsten eingesetzten Protease Trypsin. Dabei werden die Proteine C-terminal von den Aminosäuren Arginin und Lysin geschnitten, sofern diesen kein Prolin folgt. Die Proteinverdaue wurden manuell in 0,5 ml Lowbinding Eppendorftubes durchgeführt.

Die gefärbten Proteinbanden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Gelsücke für 15 Minuten in ACN geschüttelt, die Lösung verworfen, und die Gelstücke im Vakuum getrocknet. Die Gelstücke wurden zweimal in 40 µl einer Lösung aus 50 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) und 100 mM Natriumthiosulfat im Verhältnis 1:1 für je 15 Minuten gewaschen, danach wurden die Gelstücke in 40 µl Wasser gelegt, so dass die Stücke komplett bedeckt sind, und nach zehn Minuten wurde dieselbe Menge an ACN hinzugefügt. Nach weiteren 15 Minuten wurde die gesamte Flüssigkeit entfernt und für zehn Minuten durch 40 µl einer 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Lösung pH 8 ersetzt, dann wurde dasselbe Volumen an ACN hinzugefügt und für weitere 15 Minuten inkubiert. Nach der Entfernung aller Flüssigkeit wurden die entfärbten Gelstücke abschließend für 15 Minuten in 40 µl ACN gewaschen.

Für die Reduktion der Proteine wurde die Flüssigkeit entfernt und durch 40 µl einer Lösung aus 10 mM DTT in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8) ersetzt. Die Gelstücke wurden darin für 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Die Gelstücke wurden abzentrifugiert, die Lösung abpipettiert, und durch 40 µl ACN ersetzt. Nach zehn Minuten wurde die Lösung entfernt und die Gelstücke zur Alkylierung der Proteine in 40 µl einer Lösung aus 55 mM Iodoacetamid in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8) aufgenommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Stücke für 15 Minuten in 40 µl einer 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung pH 8 gewaschen. Die Lösung wurde entfernt und für zehn Minuten durch 40 µl ACN ersetzt. Anschließend wurde das ACN entfernt und die Gelstücke in 40 µl eines Verdau-Puffer einer 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (pH 8) mit 8 µl Trypsin (7,4 ng/µl) gegeben. Die Proben wurden über Nacht im Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Gelstücke werden in 40 µl eine Lösung aus ACN/Wasser/Ameisensäure im Verhältnis 47,5/47,5/5 (v/v) überführt. Nach 15 Minuten wurde die Lösung entfernt und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum bis zu einem geringen Volumen eingengt und bei – 80°C eingefroren.

2.2.8.2 Tryptischer In-Lösung-Verdau

Auch beim In-Lösung-Verdau wurde die Protease Trypsin eingesetzt. Bei dieser Methode wurden die Proteine nicht zuerst durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt, sondern es wurde das Eluat des Pull Down Versuches eingesetzt.

Die Proteine wurden in einer Lösung aus 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl (pH 8) und 5 mM DTT aufgenommen und bei 60°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wird die Lösung langsam abgekühlt. Mit einer Lösung aus 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,8) und 1 mM Calciumchlorid wurde die Reaktionslösung verdünnt bis die Konzentration des eingesetzten Guanidinhydrochlorids unter 1 M lag. Anschließend wurde 1,5 µg in 50 mM Essigsäure gelöstes Trypsin zugegeben und die Lösung über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde zur Inaktivierung des Trypsins bei – 20 °C eingefroren.

2.2.8.3 Aufreinigung des In-Lösung-Verdau

Zur Entfernung der hohen Salzkonzentrationen, die durch die Methode des In-Lösung-Verdaues eingebracht wurden, wurde der tryptischer In-Lösung-Verdau Ansatz mittels Pierce C18 Spin Columns entsalzt.

Die Verdau-Lösung wurde auf das aktivierte C18 Harz der Spin Columns pipettiert und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde zur vollständigen Bindung aller Peptidstücke zweimal erneut auf das Harz pipettiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Harz zweimal mit einer wässrigen Lösung aus 2% TFA und 20% ACN gewaschen und für 1 Minute zentrifugiert. Zur Elution der gereinigten Proteinfragmente wurde eine wässrige Lösung von 70% ACN auf das C18 Harz gegeben und die Spin Columns zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und die vereinigten Eluate im Vakuum eingengt.

2.2.9 Massenspektrometrie

2.2.9.1 MALDI-TOF/TOF

Die gekoppelten Proteine und Peptide wurden mit einem MALDI-TOF/TOF-Instrument (Ultraflex III TOF/TOF), ausgestattet mit einem YAG Laser (355 nm) mit einer Frequenz von 1 - 200 Hz analysiert. Als Matrixsystem wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet. Zur Probenvorbereitung wurde die dried-droplet-Methode verwendet (Karas und Hillenkamp, 1988). Dazu wurden Probe und Matrixlösung vermischt (1:1, v/v), auf dem AnchorChip-Probenträger aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Ein Subspektrum wurde durch die Summierung von 100 aufeinanderfolgenden Laserschüssen erzeugt. Die Subspektren, an verschiedenen Positionen eines Spots gemessen, wurden zu einem Spektrum gemittelt.

2.2.9.2 NanoLC-ESI-Tandem-MS HCTultra

Nach der Trypsinspaltung der gelgetrennten Proteine wurden die ersten LC-MS/MS-Analysen mit einem HCTultra PTM Discovery System - Massenspektrometer (Bruker, Bremen, DE), ausgestattet mit einem Proxeon Easy-nLCLC-System (Proxeon, Odense, Dänemark), durchgeführt. 30 µl der Probe wurden injiziert und auf einer Vorsäule (Reprosil-Pur C18AQ, 5 µm, 120 Å Poren, 100 µm x 3cm Kap, Dr Maisch, Ammerbuch, DE) unter Verwendung von 0,1% Ameisensäure, 2% ACN in Wasser aufkonzentriert. Nach Elution auf die analytische Säule (Reprosil-Pur C18AQ, 3 µm,

120 Å Poren, 75 µm x 10cm, Dr Maisch, Ammerbuch, DE) wurden die Peptide mit einer Flussrate von 300 nl/min und einem Gradienten Tabelle 2 in 54 min getrennt. Das Elutionssystem bestand aus A: 0,1% Ameisensäure (FA) (v/v) in Wasser, B: 0,1% FA (v/v) in ACN. Die MS/MS-Spektren wurden im datenabhängigen Modus (data dependent mode) erstellt.

Tabelle 2: nLC Gradient HCTultra und LTQ Velos

Zeit [min]	Dauer [min]	Flussrate [nl/min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]
0	0	300	100	0
35	35	300	72	28
45	10	300	5	95
53	8	300	5	95
54	1	300	95	5

2.2.9.3 NanoLC-ESI-Tandem-MS LTQ Velos

Der gelgetrennten Proteine wurden nach dem Trypsin-Verdau durch LC-MS/MS-Analysen mit einem LTQ Velos lineare Ionenfallen - Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich, DE), ausgestattet mit einem Bruker Easy-nLC II LC-System (Bruker, Bremen, DE), durchgeführt. 16 µl der Probe wurden injiziert und auf einer Vorsäule (Reprosil-Pur C18AQ, 5 µm, 120 Å Poren, 100 µm x 3cm Kap, Dr Maisch, Ammerbuch, DE) unter Verwendung von 0,1% Ameisensäure, 2% ACN in Wasser aufkonzentriert. Nach Elution auf die analytische Säule (Reprosil-Pur C18AQ, 3 µm, 120 Å Poren, 75 µm x 15cm, Dr Maisch, Ammerbuch, DE) wurden die Peptide mit einer Flussrate von 300 nl/min und dem Gradienten entsprechend Tabelle 2 in 54 min getrennt. Das Elutionssystem bestand aus A: 0,1% Ameisensäure (FA) (v/v) in Wasser, B: 0,1% FA (v/v) in ACN. Die MS/MS-Spektren wurden im datenabhängigen Modus (data dependent mode) erstellt.

2.2.9.4 NanoLC-ESI-Tandem-MS LTQ Orbitrap XL

Für die LC-MS/MS-Analysen mit dem LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich, DE), ausgestattet mit einem Thermo Scientific EASY-nLC 1000 System (Thermo Scientific, Dreieich, DE), wurden die mittels In-Lösung-Verdau-Proben eingesetzt. 10 µl der Probe wurden injiziert und auf einer EASY-Spray column (50 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 2 µm particles, 100 Å pore size) wurden die Peptide mit einer Flussrate von 250 - 300 nl/min und dem Tabelle 3 entsprechendem Gradienten in 150 min getrennt. Das Elutionssystem bestand aus A: 0,1% Ameisensäure (FA) (v/v) in Wasser, B: 0,1% FA (v/v) in ACN. Die MS/MS-Spektren wurden im datenabhängigen Modus (data dependent mode) erstellt.

Tabelle 3: nLC Gradient LTQ Orbitrap XL

Zeit [min]	Dauer [min]	Flussrate [nl/min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]
0	0	250	98	2
10	10	250	95	5
110	100	250	80	20
120	10	250	75	25
130	10	250	60	40
135	5	250	10	90
140	5	300	10	90
145	5	300	95	5
150	5	300	95	5

2.2.10 Datenauswertung

Für die Datenanalyse der MS Experimente wurden durch den Einsatz der unterschiedlichen Massenspektrometer und der sich daraus ergebender Datenstrukturen verschiedene Programme zur Datenauswertung eingesetzt.

2.2.10.1 Proteinscape

Die Datenauswertung erfolgte mittels Data Analysis (Compass 1.5, Bruker) und Proteinscape 3.0. Dazu wurde der Such-Algorithmus von Mascot (Matrix Science, London, UK) angewandt. Es wurde maximal ein missed cleavage (unvollständiger tryptischer Verdau) im Rahmen der Datenbanksuche akzeptiert. Die Massentoleranz wurde für die Precursor-Ionen auf 100 ppm begrenzt. Für die MS/MS-Toleranz wurden weniger als 0,2 Da akzeptiert. Ausschließlich solche Proteine wurden als Proteinhit anerkannt, für die mindestens 2 Peptide detektiert worden waren. Diese Peptide mussten eine Signifikanzgrenze um 0,05 beim Mascot-Score aufweisen. Die False Discovery Rate (FDR) zur Ausgrenzung falsch positiver Ergebnisse wurde mit 1% einbezogen. Als Modifikationen wurden eine statische Carbamidomethylierung der Cystein-Reste (Alkylierung durch Iodacetamid) und eine variable Oxidation der Methionin-Reste berücksichtigt (http://www.matrixscience.com/help/mis_help.html 28.03.2015). Als Datenbank wurde die Proteindatenbank swisprot und eine IPI humane Proteindatenbank (international protein index, Version 3.52, 148380 Sequenzeinträge; 62526836 Aminosäuren beinhaltend) eingesetzt.

2.2.10.2 MaxQuant

Für die Experimente mit dem LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer wurde die Identifizierung mittels der Software MaxQuant durchgeführt (Version 1.0.12.31, Cox und Mann, 2008; Cox et al., 2009). Dafür wurden generierte Peaklisten (msm-Dateien) an eine Mascot-Suchmaschine (Matrix Science Ltd, London, GB) übertragen und gegen eine IPI humane Proteindatenbank (international protein index, Version 3.52, 148380 Sequenzeinträge; 62526836 Aminosäuren beinhaltend) durchsucht. Die Massentoleranz der Vorläufer- und Tochterionen wurde auf 7 ppm gesetzt. Als variable Modifizierungen wurden sowohl Oxidationen am Methionin-Rest als auch Alkylierungsaddukte am Cystein-Rest berücksichtigt. Als Grundlage für die Einhaltung der Falschidentifizierungshäufigkeit (false discovery rate [FDR]) mit $<0,01$ galt die statistische Fehlerwahrscheinlichkeit (posterior error probability [PEP]) basierend auf einer implizierten inversen Datenbank. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn mindestens zwei Peptide der Sequenz zugeordnet werden konnten.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Systems zur Selektion von Interaktionspartnern humaner Defensine in oralen karzinogenen Zellen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionspartnern humaner Defensine in oralen karzinogenen Zellen.

Orale Plattenepithelkarzinome entwickeln sich aus präkanzerösen Läsionen. Neben den klassischen Risikofaktoren ist auch schlechte Mundhygiene und daraus resultierende chronische Entzündungen (Abb: 23) ein Auslöser für die Entstehung derartiger Läsionen (Hullmann et al, 2010). Diverse verschiedene genetische Veränderungen werden mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht (Scully et al, 2000). Zu diesen tumorinduzierenden Veränderungen gehören ebenfalls Eingriffe in die Synthese der Defensine (Meyer und Harder, 2007).

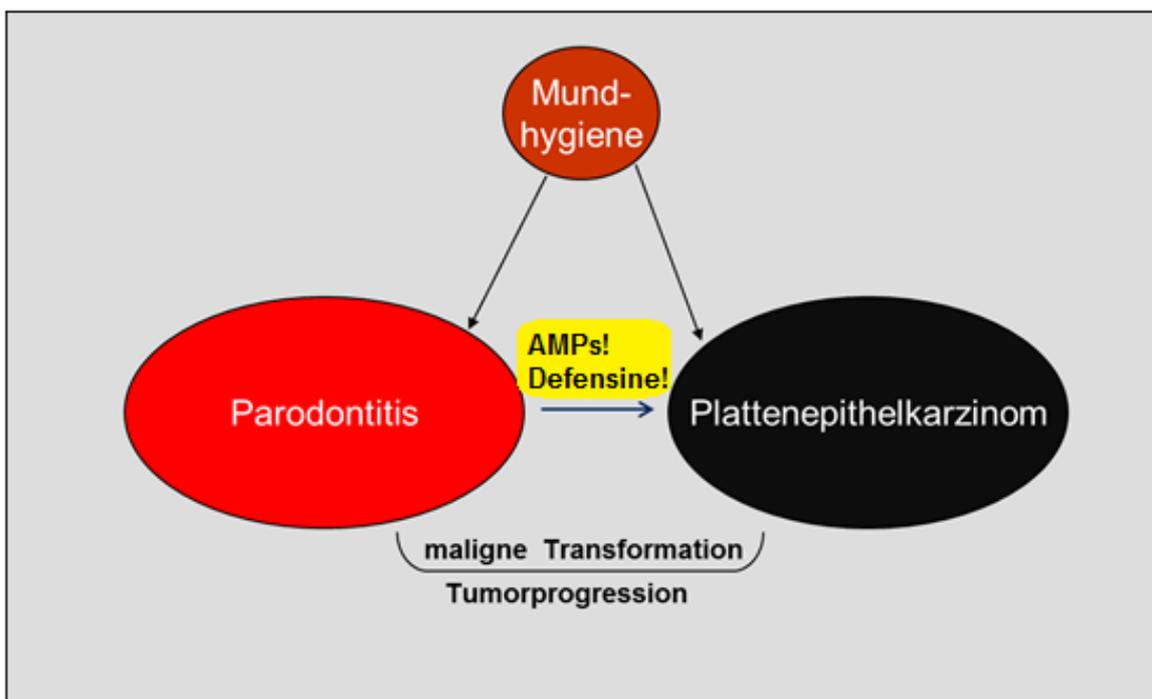


Abbildung 23: Hypothese der Auswirkung der Defensine auf die Entstehung oraler Tumore (von J. Winter zur Verfügung gestellt)

Bei der Entstehung der oralen Plattenepithelkarzinomen ist jedoch nicht eine Abfolge spezifischer Veränderungen, sondern vielmehr deren Anhäufung für die Karzinogenese entscheidend (Califano et al, 1996).

3 Ergebnisse

In verschiedenen Studien (Winter et al, 2011; Winter et al, 2012a; Winter et al, 2012b) konnten Auswirkung von humanen Defensine auf regulatorische Effekte sowie auf die Proliferation von oralen Karzinomen auf Gen-Ebene nachgewiesen werden.

Ein Teil dieser Arbeit war die Etablierung eines Systems um die Bindungspartner der humanen α - und β -Defensine in oralen Karzinomen zu detektieren.

Als humanbiologische Systeme wurden hierfür die Zelllinien BHY und A64 (siehe 2.2.1.1) eingesetzt, wobei die A64-Zelllinie als System für die α -Defensine (Wenghoefer et al, 2008) und die BHY-Zelllinie für die β -Defensine (Winter et al., 2011) genutzt wurden.

Die Zellen wurden entsprechend der basalen Sekretion (Winter et al, 2011) mit den Defensinen (2.1.8) inkubiert. Um die Defensine und ihre putativen Interaktionspartner von den restlichen zellulären Proteinen auftrennen zu können, sind die Defensine, die als Köderproteine fungierten, N-terminal mit einem Affinitätstag gekoppelt worden (2.2.5.1). Als Affinitätstag wurde Biotin gewählt. Das niedermolekulare Biotin-Molekül mit einer Masse von 240 Da bindet hochspezifisch an Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* (Dissoziationskonstante K_d $1,3 \cdot 10^{-15}$ M). Zudem ist das Biotin-Molekül ungeladen, wodurch Effekte des gebunden Proteins nicht beeinflusst werden (Ternynck T et al, 1990). Das Biotin-Molekül ist über einen 12 Einheiten langen Polyethylenglykol-Spacer mit dem Zielmolekül verknüpft, die Länge des Spacer ist so gewählt, um das sterische Verhalten der Proteine möglichst nicht zu beeinflussen und die Bindung an den Affinitätskomplexbpartner zu erleichtern, längere Polyethylenglykol-Spacer hingegen bilden Mäanderstrukturen aus, die das Verhalten des gelabelte Proteins beeinflussen können. Die beiden Zelllinien wurden mit den Biotin gekoppelten Defensinen 4 h lang bei 37°C stimuliert und anschließend lysiert (2.2.6.1). Die Protein-Lysate wurden anschließend über Streptavidin gekoppelte Beads (2.2.7.1) auf gereinigt. Die einzelnen Fraktionen an Lysat-Durchläufen und Waschphasen, sowie der Bait-Proteingebundenen Interaktionspartner und der übriggebliebenen Beads wurde getrennt aufgefangen. Die einzelnen Phasen der Affinitätsaufreinigung wurden aufkonzentriert (2.2.7.4) und mittels Gelelektrophorese (2.2.7.4) aufgetrennt, die aufgetrennten Proteinbanden wurden durch eine Silberfärbung (2.2.7.5) sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 24 und Abbildung 25 dargestellt.

Nach der Auswertung des Polyacrylamidegeles aus Abbildung 24 wurde das System auf vier Waschschrte beschränkt, da sich zeigte, dass schon nach zwei Waschschrten keine Proteinauswaschungen mehr nachweisbar waren. Die zwei zusätzlichen Waschschrte wurden als Absicherung beibehalten. Bei der Proteinbande, die in der Bead-Phase zu erkennen ist, handelt es sich um das Streptavidin der μ macs Beads.

3 Ergebnisse

Marker Durchfluss 1. Waschschritt 2. Waschschritt 3. Waschschritt 4. Waschschritt 5. Waschschritt 6. Waschschritt 7. Waschschritt Beads



Abbildung 24: Silbergefärbtes Gel mit den Proteinbanden des Durchflusses der sieben aufeinanderfolgenden Waschschrte und der Beads (die verbrauchten μ macs Beads). Die Proteinbande in der Lane der Beads wurde als das gekoppelte Streptavidin mittels MS/MS bestimmt.

Marker aufgereinigte Interaktionspartner

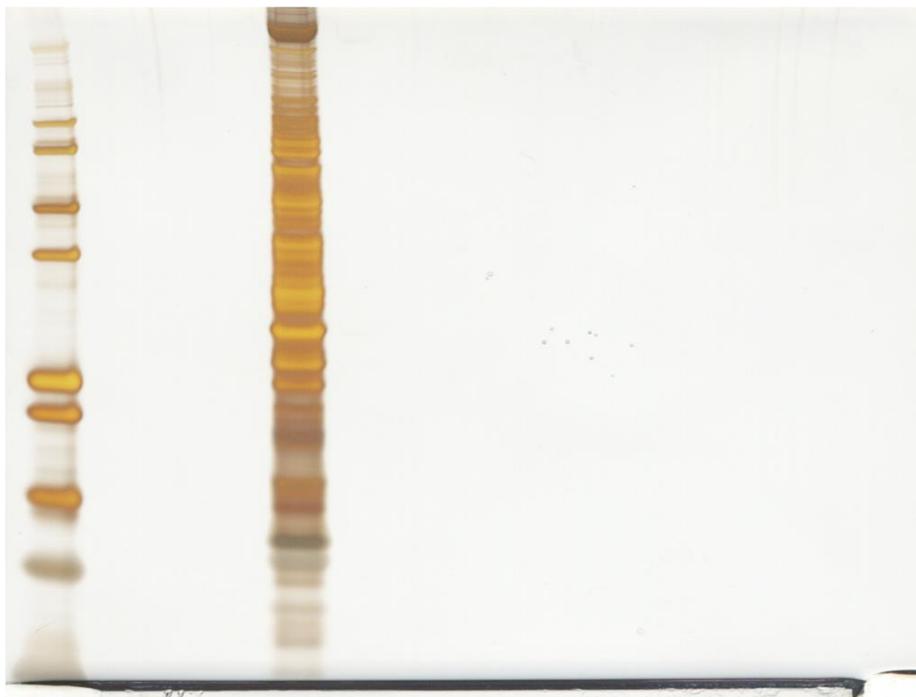


Abbildung 25: Silbergefärbtes Gel mit den Proteinbanden der aufgereinigten Interaktionspartner.

3 Ergebnisse

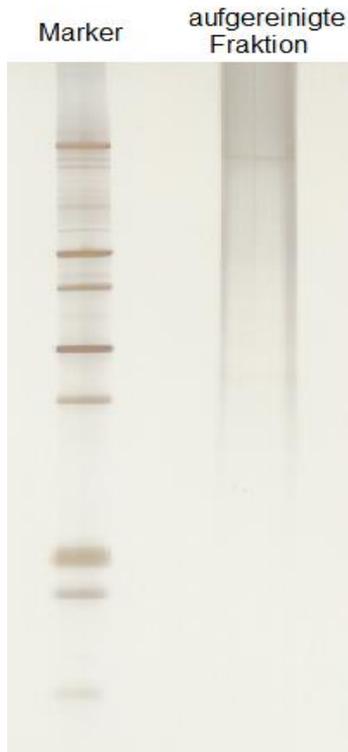


Abbildung 26: Silbergefärbtes Gel der aufgereinigten Fraktion der Negativkontrolle.

Die in Abbildung 25 erkennbaren Proteinbanden der aufgereinigten Interaktionspartner wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut (2.2.8.1). Nach der Trypsinspaltung wurden die gelgetrennten Proteine mittels MS/MS analysiert (2.2.9.2). Dabei wurden die ersten LC-MS/MS-Analysen mit einem HCTultra PTM Discovery System - Massenspektrometer der Firma Bruker, ausgestattet mit einem Proxeon Easy-nLCLC-System (Proxeon, Odense, Dänemark), durchgeführt. Hierbei konnten jedoch nur sehr wenige Peptidstücke nachgewiesen, und den entsprechenden Proteinen zugeordnet werden (Abb 26). Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Messungen mit einem LTQ Velos lineare Ionenfallen - Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich, DE), ausgestattet mit einem Bruker Easy-nLC II LC-System (Bruker, Bremen, DE), durchgeführt (2.2.9.3).

Um unspezifische Bindungen an Komponenten des Systems auszuschließen wurde die Stimulation als Negativkontrolle mit nicht biotinylierten Defensinen in den einzelnen Systemen durchgeführt. Die Proben wurden, wie in den Versuchen mit den biotinylierten Proteinen, aufgereinigt und analysiert. Hierbei konnten im SDS-Gel (Abb 26) keine Proteinbanden detektiert werden.

3 Ergebnisse

MTCKMSQLERNIE TIINTFHQYSVKLGHPDTLN
QGEFKELVRKDLQNFLKKE NKNEKVIEHIMEDLD
TNADKQLSFEE FIMLMARLTWASHEKMHE GDEG
PGHHHKPGLGEGTP

detektierte Peptide [Sequenz]	Sequenzabdeckung
R.NIETIINTFHQYSVK.L	11 - 25
K.LGHPDTLNQGEFK.E	26 - 38
R.KDLQNFLK.K	43 - 50
K.DLQNFLK.K	44 - 50
K.DLQNFLKKE.E	44 - 51
K.VIEHIMEDLDTNADK.Q	58 - 72
R.LTWASHEK.M	86 - 93

Abbildung 27: Sequenzabdeckung der detektierten Peptide am Beispiel des detektierten S100A9 aus der Membranfraktion der hBD2 Stimulation. Die Abbildung veranschaulicht die Unterschiede der sieben detektierten Peptide des S100 Proteins. Die Länge der einzelnen Peptide und die Kombination der Lage aller detektierten Peptide in der Aminosäuresequenz des zugeordneten Proteines zeigt eine gute Sequenzabdeckung, was die Sicherheit der Analyse-Methode untermauert.

Um eine abundantere Analyse der einzelnen Systeme durchzuführen, die es ermöglicht auch geringere Mengen an interagierendem Protein nachweisen zu können, wurden die mikrosomale Membranen dieser Zellsystem extrahiert (2.2.4.2) und anstatt der intakten Zellen eingesetzt.

Die aus den massenspektrometrischen Messungen erhaltenen Spektren wurden mittels Data Analysis (Compass 1.5, Bruker) und Proteinscape 3.0 ausgewertet (2.2.10.1) (Abb 27). Die so analysierten Interaktionspartner der eingesetzten Köder-Proteine wurden mit dem Programm String db 9.1 prozessiert.

3.2 Etablierung eines Systems zur Selektion von Interaktionspartnern von Allergenen in humanen Monozyten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionspartnern des Major-Birkenallergene Bet v 1 und des Major-Grassallergenes Phl p 5 in primären humanen Monozyten.

Dabei wurde das für die Defensine etablierte System entsprechend der Proteine sowie des anderen Zellsystems abgewandelt.

In diesem System wurden als Zellsystem Monozyten, die aus humanem peripherem Blut gewonnen wurden (2.2.2.1), eingesetzt. Diese Monozyten wurden mittels

3 Ergebnisse

Durchflusszytometrie charakterisiert (2.2.3.1). Dabei wurden die Zellen nach ihren zellspezifischen Oberflächenproteinen eingeordnet.

Die beiden Allergene Bet v 1 und Phl p 5 wurden wie in dem für die Defensine etablierten System mit demselben Biotin-Tag versehen (2.2.5.2). Die Stimulationsdauer, die Reaktionstemperatur sowie die Konzentration der Allergene wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt, die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Diese Ergebnisse belegen, dass eine Stimulation der Monozyten mit einer Konzentration von 5 µg/ml des Allergens für 10 min bei 37 °C effektive Ergebnisse liefern werde.

Die Monozyten wurden den Ergebnissen der FACS-Analyse nach mit den Biotin gekoppelten Allergenen 10 min bei 37°C stimuliert und anschließend lysiert (2.2.6.2). Die Protein-Lysate wurden wie auch bei der ersten etablierten Methode über Streptavidin gekoppelte Beads (2.2.7.1) auf gereinigt.

3 Ergebnisse

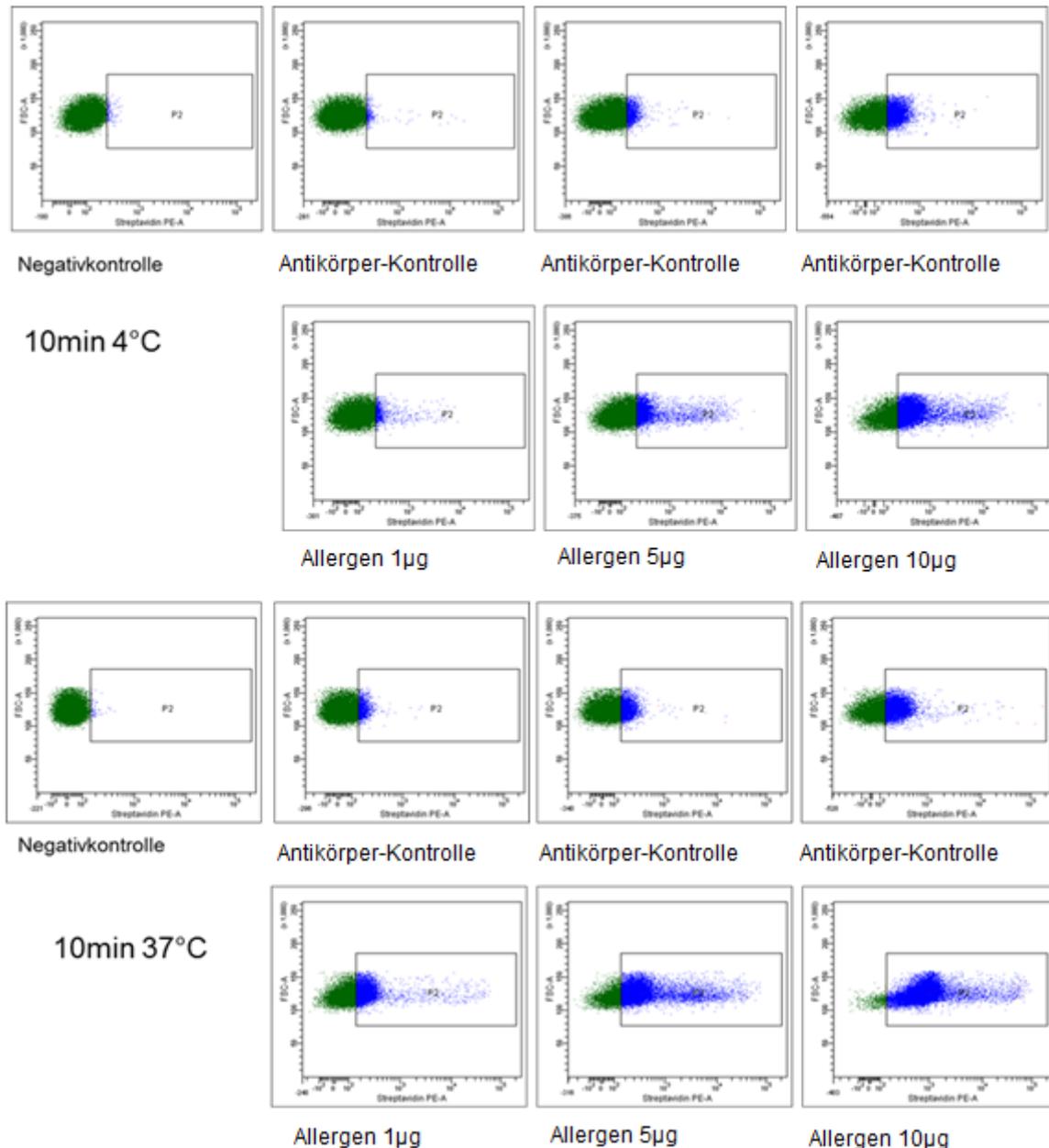


Abbildung 28: FACS-Kontrolle der Inkubation von Monocyten mit Phl p 5 mit Konzentrationen von 1 µg, 5 µg und 10 µg des Allergens bei 4°C und 37°C für jeweils 10 min. Die rechte Wolke stellt die Zellen mit der spezifischen Allergenaufnahme dar.

Die aufgereinigte Proteinsuspension der Affinitätsaufreinigung wurde aufkonzentriert (2.2.7.4) und mittels Gelelektrophorese (2.2.7.4) aufgetrennt. Die durch eine Silberfärbung (2.2.7.5) sichtbar gemachten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und mit der Endopeptidase Trypsin im Gel verdaut (2.2.8.1).

Nach dem tryptischen Verdau wurden die entstandenen Peptide mittels MS/MS mit einem LTQ Velos lineare Ionenfallen - Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich, DE), ausgestattet mit einem Bruker Easy-nLC II LC-System (Bruker, Bremen, DE) (2.2.9.3), analysiert. Auch bei diesem System wurde um geringere Mengen an interagierendem Protein nachweisen zu können die mikrosomale

Membranen dieser Zellen extrahiert (2.2.4.2) und anstatt der intakten Monozyten eingesetzt.

Um unspezifische Bindungen an Komponenten des Systems auszuschließen, wurde die Stimulation mit nicht biotinylierten Allergenen durchgeführt, und die Proben, wie in der etablierten Methode mit den biotinylierten Proteinen, aufgereinigt und analysiert. Hierbei konnten im SDS-Gel keine Proteinbanden detektiert werden.

Die aus den massenspektrometrischen Messungen erhaltenen Spektren wurden mittels Data Analysis (Compass 1.5, Bruker) und Proteinscape 3.0 ausgewertet (2.2.10.1). Die so analysierten Interaktionspartner der eingesetzten Köder-Proteine wurden mit dem Programm String db 9.1 prozessiert.

3.3 Detektierte Protein-Protein Interaktionspartner

Die Tabellen zeigen die selektierten Proteine der Stimulationsversuche. Hierbei sind die Proteine, die in den intakten Zellen detektiert wurden, blau, die Proteine der Membranfraktionen, rot und die Proteine, die in beiden Fraktionen analysiert wurden, schwarz dargestellt.

3.3.1 Selektierte Protein-Protein Interaktionspartner der α -Defensine in A64 Zellen

3.3.1.1 DEFA1:

Bei der Stimulation der A64 Zellen mit dem biotinyliertem DEFA1 sind verschiedene Proteine (Tabelle 4) als Interaktionspartner detektiert worden. Hierzu zählen die Rezeptoren CD44, ITGA3, ITGB1 und SSR1, desweiteren wurden membranständige Bindungsproteine wie EZR, HRNR und VCL, die die Rezeptoren mit der Membran und dem zellulären Zytoskelet verbinden. Ebenfalls konnten Interaktionen des DEFA1 mit DSG1 und DSP detektiert werden, diese Proteine sind Teile der Desmosomen. Bindungspartner dieses Defensins sind auch S100A8 und S100A11, diese Mitglieder der S100-Proteinfamilie sind in verschiedene zellulärefunktionen eingebunden. Protein-Protein-Interaktionen mit den Proteinen CDC37, CDC42, HSPA4 und KPNB1 konnten detektiert werden. Das DEFA1 bindet auch an die Catenine CTNNA1 und CTNNB1, so wie an das zelluläre PA2G4-Protein.

Tabelle 4: Selektierte Interaktionspartner von DEFA1 in A64 Zellen

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD44	CD44	37	Hyaluronsäure Rezeptor
CDC37	Cell division cycle 37 homolog	9	HSP90 Interaktionspartner
CDC42	Cell division cycle 42	10	Zellmigration

3 Ergebnisse

CTNNA1	Catenin alpha 1	16	Zelladhäsion
CTNNB1	Catenin beta 1	9	Transkriptions Regulation
DSG1	Desmoglein	9	Desmosom Bindung
DSP	Desmoplakin	31	Desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe
EZR	Ezrin	61	Cytoskeletale-Bindung
HRNR/S100A18	Hornerin	7	Bindungsprotein
HSPA4	Heat Shock 70kDa protein 4	18	Proteinimport
ITGA3	CD49C	18	Fibronectin Rezeptor
ITGB1	CD29	29	Fibronectin Rezeptor
KPNB1	Importin beta 1	13	Nucleus Proteinimport
PA2G4	proliferation-associated 2G4	19	Wachstums Regulation
S100A8	S100-A8	9	Inflammation und maligne Progression
S100A11	S100-A11	8	Zelldifferenzierung
VCL	Vinkulin	146	Actin-Bindung

3.3.1.2 DEFA2:

Bei der proteomischen Analyse der Stimulation mit DEFA2 wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Proteine detektiert. Hierbei wurden Bindungen mit den Rezeptoren CD44, CD47, ITGA6 und ITGB1 nachgewiesen, zudem wurden auch Bindungen zu den rezeptorgekoppelten Bindungsmolekülen EZR und VCL detektiert. Zu den Interaktionspartnern dieses alpha Defensins gehören DSP, ein Bestandteil der Desmosomen, sowie die Proteine S100 A8 und A11. Protein-Protein-Interaktionen mit den Proteinen CDC37, CDC42, HSPA9, HSPD1 und IQGAP1, sowie zu dem Protein wurden ebenfalls bestimmt. Bei dieser Stimulation wurde eine Bindung des induzierten DEFA2 zu zellulärem DEFA1 nachgewiesen.

Tabelle 5: Selektierte Interaktionspartner von DEFA2 in A64 Zellen

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD44	CD44	21	Hyaluronsäure Rezeptor
CD47	CD47	2	Zelladhäsion
CDC37	Cell division cycle 37 homolog	10	HSP90 Interaktionspartner
CDC42	Cell division cycle 42	10	Zellmigration
DEFA1	Defensin alpha 1	6	Antimikrobielles Peptid
DSP	Desmoplakin	3	desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe
EZR	Ezrin	8	Cytoskeletales-Bindungsprotein
HSPA9	Mortalin	20	Zellproliferation
HSPD1	Chaperonin	63	Proteinimport
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	10	CDC42 Bindungsprotein

3 Ergebnisse

ITGA6	Integrin alpha 6	3	Laminin Rezeptor (ITGA6/ITGB4 Komplex)
ITGB1	CD29	17	Fibronectin Rezeptor
PA2G4	proliferation-associated 2G4	15	Wachstums Regulation
S100A11	S100-A11	7	Zelldifferenzierung
S100A8	S100-A8	2	Inflammation und maligne Progression
VCL	Vinkulin	48	Actin-Bindungsprotein

3.3.1.3 DEFA3:

Bei der Stimulation mit dem DEFA3 sind mehrere Protein-Protein-Interaktionen (Tabelle 6) ermittelt worden worden. Zu diesen Interaktionspartnern zählen die Rezeptoren CD44, IGF2R und ITGB1 und das Bindungsprotein EZR. Desweiteren wurden die desmosomalen Komplexproteine DSG1 und DSP bestimmt. Aus der Familie der S100 Proteinfamilie wurden Bindungen zu den Proteinen A7, A8, A9 und A11 nachgewiesen. Weitere Interaktionspartner des DEFA3 in den A64-Zellen sind HSPA9, HSPD1, CTNNA1 und PA2G4.

Tabelle 6: Selektierte Interaktionspartner von DEFA3 in A64 Zellen

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD44	CD44	25	Hyaluronsäure Rezeptor
CDC42	Cell division cycle 42	11	Zellmigration
CTNNA1	Catenin alpha 1	9	Zelladhäsion
DSG1	Desmoglein	3	Desmosom Bindung
DSP	Desmoplakin	4	desmosomale Cadherin- Plakoglobin Komplexe
EZR	Ezrin	64	Cytoskeletales-Bindungsprotein
HSPA9	Mortalin	30	Zellproliferation
HSPD1	Chaperonin	27	Proteinimport
IGF2R	Insulin-like growth factor 2 receptor	2	IGF2 Rezeptor
ITGB1	CD29	3	Fibronectin Rezeptor
PA2G4	proliferation-associated 2G4	40	Wachstums Regulation
S100A7	S100-A7	16	Wachstums Regulation
S100A8	S100-A8	11	Inflammation und maligne Progression
S100A9	S100-A9	18	S100A8 Komplexbildner
S100A11	S100-A11	3	Zelldifferenzierung

3.3.1.4 DEFA4:

Die Stimulation mit biotinyliertem DEFA4 von A64-Zellen führte zur Detektion, der in Tabelle 7 dargestellten Proteine. Die membranständigen Rezeptoren CD97, ITGA3 und ITGB1, sowie die Kern-Rezeptoren IPO4 und KPNB1 wurden als Interaktionspartner bestimmt. Die Bindungsproteine EZR und MSN, sowie die desmosomalen Komplexproteine DSG1 und DSP wurden ebenfalls nachgewiesen. Weitere Proteine, die in diesem Pulldown-Experiment detektiert wurden, sind CDC37, HSPA9, HSPD1, ILK und PA2G4, sowie die beiden Mitglieder der S100 Proteinfamilie S100A4 und S100A8.

Tabelle 7: Selektierte Interaktionspartner von DEFA4 in A64 Zellen

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD97	CD97 antigen	2	Adhäsionsrezeptor (EGF-like Domänen)
CDC37	Cell division cycle 37 homolog	14	HSP90 Interaktionspartner
DSG1	Desmoglein	5	Desmosom Bindung
DSP	Desmoplakin	32	desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe
EZR	Ezrin	62	Cytoskeletales-Bindungsprotein
HSPA9	Mortalin	66	Zellproliferation
HSPD1	Chaperonin	80	Proteinimport
ILK	integrin-linked kinase	19	Integrin Bindungsprotein
IPO4	Importin 4	6	Nucleus Transportrezeptor
ITGA3	CD49C	2	Laminin Rezeptor
ITGB1	CD29	23	Fibronectin Rezeptor
KPNB1	Importin beta 1	29	Nucleus Proteinimport
MSN	Moesin	71	Cytoskeletales-Bindungsprotein
PA2G4	proliferation-associated 2G4	40	Wachstums Regulation
S100A4	S100-A4	2	Metastasin
S100A8	S100-A8	2	Inflammation und maligne Progression

3.3.2 Selektierte Protein-Protein Interaktionspartner der β -Defensine in BHY Zellen

3.3.2.1 hBD1:

Bei der Stimulation der BHY Zellen mit dem biotinyliertem hBD1 sind verschiedene Proteine (Tabelle 8) als Bindungspartner detektiert worden. hBD1 interagiert mit den Membranrezeptoren CD44, CD47, ITGA2, ITGB1, den Kernrezeptoren IPO7, KPNB1 und TNPO2 und den Zytoskeletalen-Bindungsproteinen EZR und MSN. Desweiteren konnten Interaktionen mit CDC42 und dem desmosomalen Komplexbildner DSP, sowie den Heat Shock Proteinen HSPA9 und HSPD1, und dem Wachstumsregulator PA2G4. Aus der Protein-Familie der Catenine konnten das CTNNA1, CTNNB1 und CTNND1, sowie aus der Familie der S100 Proteine das S100A7, S100A8 und S100A9 als Interaktionspartner detektiert werden.

Tabelle 8: Selektierte Interaktionspartner von hBD1 in BHY Zellen

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD44	CD44	11	Hyaluronsäure Rezeptor
CD47	CD47	2	Zelladhäsion
CDC42	Cell division cycle 42	3	Zellmigration
CTNNA1	Catenin alpha 1	21	Zelladhäsion
CTNNB1	Catenin beta 1	22	Transkriptions Regulation
CTNND1	Catenin delta 1/p120	10	Signaltransduktion
DCD	Dermicidin	20	Antimikrobielles Protein
DSP	Desmoplakin	9	desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe
EZR	Ezrin	71	Cytoskeletales-Bindungsprotein
HSPA9	Mortalin	69	Zellproliferation
HSPD1	Chaperonin	14	Proteinimport
IPO7	Importin 7	13	Nucleus Proteinimport
ITGA2	CD49B	15	Laminin Rezeptor
ITGB1	CD29	6	Fibronectin Rezeptor
KPNB1	Importin beta 1	28	Nucleus Proteinimport
MSN	Moesin	122	Cytoskeletales-Bindungsprotein
PA2G4	proliferation-associated 2G4	14	Wachstums Regulation
S100A7	S100-A7	4	Wachstums Regulation
S100A8	S100-A8	10	Inflammation und maligne Progression
S100A9	S100-A9	5	S100A8 Komplexbildner
S100A11	S100-A11	8	Zelldifferenzierung
TNPO2	Transportin 2	5	Nucleus Importprotein

3.3.2.2 hBD2:

Bei der proteomischen Analyse der Stimulation der BHY Zellen mit hBD2 wurden die in Tabelle 9 gezeigten Proteine detektiert. Dabei kam es zu Interaktionen mit den Rezeptoren der Zellmembran, CD44, EGFR, ITGA6, ITGB1 und dem Nucleus-Rezeptor KPNB1. Die Bindungsproteine EZR und MSN wurden ebenso wie die Proteine CDC42 und PAK2, die dem Selben Pathway zugeordnet werden, bestimmt. HSPA9 und HSPD1, sowie das als Wachstumsregulator fungierende Protein PA2G4 konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Aus der Familie der S100 Proteine wurden die Mitglieder S100A8, S100A9 und S100A11, sowie die von den Cateninen CTNNA1 und CTNND1 detektiert.

Tabelle 9: Selektierte Interaktionspartner von hBD2 in BHY Zellen

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD44	CD44	21	Hyaluronsäure Rezeptor
CDC42	Cell division cycle 42	9	Zellmigration
CTNNA1	Catenin alpha 1	6	Zelladhäsion
CTNND1	Catenin delta 1	7	Signaltransduktion
DSP	Desmoplakin	34	desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe
EGFR	Epidermal growth factor receptor	9	Wachstumsfaktor Rezeptor
EZR	Ezrin	44	Cytoskeletales-Bindungsprotein
HSPA9	Mortalin	27	Zellproliferation
HSPD1	Chaperonin	39	Proteinimport
ITGA6	Integrin alpha 6	15	Laminin Rezeptor (ITGA6/ITGB4 Komplex)
ITGB1	CD29	9	Fibronectin Rezeptor
KPNB1	Importin beta 1	22	Nucleus Proteinimport
MSN	Moesin	58	Cytoskeletales-Bindungsprotein
PA2G4	proliferation-associated 2G4	22	Wachstums Regulation
PAK2	p21	7	CDC42 Pathway
S100A8	S100-A8	7	Inflammation und maligne Progression
S100A9	S100-A9	7	S100A8 Komplexbildner
S100A11	S100-A11	3	Zelldifferenzierung

3.3.2.3 hBD3:

Bei den PullDown-Experimenten mit hBD3 als Stimulanz wurden die in Tabelle 10 dargestellten Proteine mittels der beschriebenen proteomischen Methode detektiert. Zu diesen Interaktionspartnern zählen die Plasmamembranrezeptoren CD44, ITGA6 und ITGB1, sowie die Kernrezeptoren IPO7 und KPNB1. Die Zytoskeletalen-

3 Ergebnisse

Bindungsproteine EZR und HRNR, der desmosomale Komplexbildner DSP und die Heat Shock Proteine HSPA9 und HSPD1, sowie der HSP90 Interaktionspartner CDC37 konnten als Bindungspartner des hBD3 bestimmt werden. Auch mit den Cateninen CTNNA1 und CTNNB1, und dem Wachstumsregulator PA2G4 konnten Protein-Protein-Interaktionen mit dem hBD3 nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Selektierte Interaktionspartner von hBD3 in BHY Zellen

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD44	CD44	14	Hyaluronsäure Rezeptor
CDC37	Cell division cycle 37 homolog	10	HSP90 Interaktionspartner
CTNNA1	Catenin alpha 1	5	Zelladhäsion
CTNNB1	Catenin beta 1	8	Transkriptions Regulation
DSP	Desmoplakin	34	desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe
EZR	Ezrin	38	Cytoskeletales-Bindungsprotein
HRNR/S100A18	Hornerin	10	Bindungsprotein
HSPA9	Mortalin	27	Zellproliferation
HSPD1	Chaperonin	45	Proteinimport
IPO7	Importin 7	6	Nucleus Proteinimport
ITGA6	Integrin alpha 6	6	Laminin Rezeptor (ITGA6/ITGB4 Komplex)
ITGB1	CD29	3	Fibronectin Rezeptor
KPNB1	Importin beta 1	19	Nucleus Proteinimport
PA2G4	proliferation-associated 2G4	17	Wachstums Regulation
S100A11	S100-A11	3	Zelldifferenzierung

3.3.3 Selektierte Protein-Protein Interaktionspartner des Majorallergens Bet v 1 in primären Monocyten

3.3.3.1 Allergiker

Bei den PullDown Experimenten mit biontyniliertem Bet v 1 in primären humanen Monocyten eines Allergikers wurden die in Tabelle 11 gezeigten Proteine detektiert. Aus der Proteinfamilie der Annexine wurden das ANXA1 und ANXA2 nachgewiesen, sowie aus der Familie der S100-Proteine die Mitglieder A4, A7, A8, A9 und A18. Von den Proteinkomponenten der Desmosomen konnten DSG1, DSP und JUP bestimmt werden. Weitere Protein-Protein-Interaktionspartner des Bet v 1 sind das Cathepsin CTSS und das CDC42.

Tabelle 11: Selektierte Interaktionspartner von Bet v 1 in primären Monocyten eines Bet v 1 Allergikers

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
ANXA1	Annexin A1	5	Membranfusion
ANXA2	Annexin A2	2	Calciumreguliertes Membranprotein
CDC42	Cell division cycle 42	2	Zellmigration
CTSS	Cathepsin S	2	Proteinabbau (MHC II)
DSG1	Desmoglein 1	2	Desmosom Bindung
DSP	Desmoplakin	12	desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe
HRNR/S100A18	Hornerin	9	Vesikelbildung
JUP	Junction plakoglobin	2	Adhesion
S100A4	S100-A4	6	Zellrekrutierung
S100A7	S100-A7	2	Regulierung der Immunantwort
S100A8	S100-A8	5	Regulierung der Immunantwort
S100A9	S100-A9	4	Regulierung der Immunantwort

3.3.3.2 Nichtallergiker

Bei der Stimulation primärer Monocyten eines Nichtallergikers mit biotinyliertem Bet v 1 und der anschließenden proteomischen Analyse der Interaktionspartner wurden die in Tabelle 12 dargestellten Proteine detektiert. Die hierbei nachgewiesenen Proteine sind das ALB, APOD, DCD, DSP und MPO.

Tabelle 12: Interaktionspartner von Bet v 1 in primären Monocyten eines Nichtallergikers

Genbezeichnung	Protein	detektierte Peptide [Anzahl]	Funktion
ALB	Albumin	8	Transportprotein

3 Ergebnisse

APOD	Apolipoprotein	9	T-Zell Migrationshemmung
DCD	Dermcidin	17	IgG Bindungsprotein
DSP	Desmoplakin	6	desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe
MPO	Myeloperoxidase	10	Bestandteil der Immunabwehr

3.3.3.3 Vergleich Allergiker zu Nichtallergiker

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Interaktionspartner von Bet v 1 in primären Monozyten eines Allergikers und eines Nichtallergikers zeigen sich kaum Übereinstimmungen. Nur die Bindung des Bet v 1 an das Desmoplakin (DSP) konnte bei beiden Systemen detektiert werden. Im System des Allergikers kam es hingegen des Systems des Nichtallergikers zu einer höheren Anzahl an Interaktionen. So wurden Mitglieder der Annexine und S100-Proteinfamilie detektiert, sowie das Cathepsin S, das den antigenpräsentierenden Molekülen der MHC II Familie zugeordnet wird. Bei der Detektion der PPIs im System des Nichtallergikers wurden dagegen nur wenige Partner ermittelt. Hierzu gehören die in die Immunabwehr eingebundenen Proteine APOD, DCD und MPO sowie das Bindungsprotein Albumin.

Tabelle 13: Unterschiede der selektierten Interaktionspartner der Inkubation mit Bet v 1

Genbezeichnung	Protein	Funktion	System
CDC42	Cell division cycle 42	Zellmigration	Allergiker
CTSS	Cathepsin S	Proteinabbau (MHC II)	Allergiker
DSG1	Desmoglein 1	Desmosom Bindung	Allergiker
HRNR/S100A18	Hornerin	Vesikelbildung	Allergiker
JUP	Junction plakoglobin	Adhesion	Allergiker
S100A4	S100-A4	Zellrekrutierung	Allergiker
S100A7	S100-A7	Regulierung der Immunantwort	Allergiker
S100A8	S100-A8	Regulierung der Immunantwort	Allergiker
S100A9	S100-A9	Regulierung der Immunantwort	Allergiker
ANXA1	Annexin A1	Membranfusion	Allergiker
ANXA2	Annexin A2	Calciumreguliertes Membranprotein	Allergiker
ALB	Albumin	Transportprotein	Nichtallergiker
APOD	Apolipoprotein	T-Zell Migrationshemmung	Nichtallergiker
DCD	Dermcidin	IgG Bindungsprotein	Nichtallergiker
DSP	Desmoplakin	desmosomale Cadherin-Plakoglobin Komplexe	Nichtallergiker
MPO	Myeloperoxidase	Bestandteil der Immunabwehr	Nichtallergiker

3.3.4 Selektierte Protein-Protein Interaktionspartner des Majorallergens Phl p 5 in primären Monocyten

3.3.4.1 Allergiker

Die in Tabelle 13 gezeigten Proteine sind die mittels Massenspektrometrie detektierten Protein-Protein-Interaktionspartner von Phl p 5 in Monocyten eines Allergikers. Hierbei wurden die membranständige Oberflächenproteine CD14, CD33, CD44, CD47, CD48, CD53, CD63, CD68, CD97 und CD99 nachgewiesen. Als weitere Bindungspartner konnten der hochaffine IgE Rezeptor FCER1G, das MHC I Antigen HLA-B, das MHC II Antigen HLA-DQB1, das niedrigaffine HMHA1, an LAIR2, PIGR, sowie IGHM nachgewiesen werden. Ebenso konnten die Rezeptoren ITGA2B, ITGAM, ITGB3 und LRP1, sowie die Transportrezeptoren LMAN1 und M6PR als Bindungspartner des Phl p 5 Allergens bestimmt werden. Aus der Proteinfamilie der Cathepsine wurden die Proteine CTSG, CTSH, CTSS und CTSZ, sowie aus der Familie der S100-Proteine die Mitglieder A4, sowie das Heterotetramer S100A8/S100A9 nachgewiesen. Auch das membranständige, cytoskeletale Bindungsprotein EZR konnte als Interaktionspartner detektiert werden.

Tabelle 14: Selektierte Interaktionspartner von Phl p 5 in primären Monocyten eines Phl p 5 Allergikers

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14	9	Bindungsprotein
CD33/SIGLEC3	Myeloid cell surface antigen CD33	3	Adhensionsmolekül
CD44	CD44	2	Hyaluronsäure Rezeptor
CD47	Leukocyte surface antigen CD47	2	Adhensionsrezeptor
CD48	CD48	2	CD2 Ligand
CD53	Leukocyte surface antigen CD53	2	Signaltransduction
CD63	CD63	2	TIMP1 Rezeptor
CD68	Macrosialin	2	Bindungsprotein
CD97	CD97	2	Adhensionsrezeptor
CD99	CD99	2	Adhensionsligand
CTSG	Cathepsin G	2	Proteinabbau
CTSH	Cathepsin H	2	Vesicelbildung
CTSS	Cathepsin S	12	Proteinabbau (MHC II)
CTSZ	Cathepsin Z	6	Vesicelbildung
EZR	Ezrin	2	Cytoskeletales- Bindungsprotein
FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I receptor	3	IgE Rezeptor
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	5	Antigenpräsentation

3 Ergebnisse

HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	2	Antigenpräsentation
HMHA1	Histocompatibility HA-1	6	MHC Komplexbildner
IGHM	Ig mu chain C region	15	Antigenbindung
ITGA2B	Integrin alpha 2	34	Fibronectin Rezeptor
ITGAM	Integrin alpha M	23	ICAM-Rezeptor
ITGB3	Integrin beta 3	11	Laminin Rezeptor
LAIR2/CD306	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2	2	Rezeptor
LMAN1	lectin, mannose-binding, 1	2	Bindungsprotein
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1	2	Endozytoserezeptor
M6PR	mannose-6-phosphate receptor	3	Transportprotein
PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	2	IgA und IgM Rezeptor
S100A4	S100-A4	3	Zellrekrutierung
S100A8	S100-A8	134	Regulierung der Immunantwort
S100A9	S100-A9	80	Regulierung der Immunantwort

3.3.4.2 Nichtallergiker

Bei der Stimulation primärer Monocyten eines Nichtallergiker mit biontinyliertem Phl p 5 wurden die in Tabelle 14 dargestellten Interaktionspartner detektiert. In diesem Experiment wurden Protein-Protein-Interaktionen mit den Oberflächenproteinen CD1A, CD14, CD44, CD47, CD48, CD53, CD63 und CD97 nachgewiesen. Aus der Proteinfamilie der Cathepsine wurden die Proteine CTSG und CTSZ, sowie aus der Familie der S100-Proteine die Mitglieder A4, sowie das Heterotetramer S100A8/S100A9 als Bindungspartner des Allergenes bestimmt. Weitere detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner sind die MHC I Antigene HLA-A, HLA-B, HLA-C und der immunoglobulinähnliche Rezeptor LAIR2. Ebenso konnten die Rezeptoren ITGA2B, ITGAM, ITGB3 und LRP1, sowie die Transportrezeptoren LMAN1 und M6PR als Bindungspartner des Phl p 5 Allergens nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine Interaktion mit MPO detektiert werden.

Tabelle 15: Selektierte Interaktionspartner von Phl p 5 in primären Monocyten eines Nichtallergikers

Genbezeichnung	Protein	Peptide [Anzahl]	Funktion
CD1A	T-cell surface glycoprotein CD1a	2	Antigenpräsentation
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14	6	Bindungsprotein
CD44	CD44	2	Hyaluronsäure Rezeptor
CD47	Leukocyte surface antigen CD47	2	Adhensionsrezeptor
CD48	CD48	6	CD2 Ligand
CD53	Leukocyte surface antigen CD53	3	Signaltransduction

3 Ergebnisse

CD63	CD63	5	TIMP1 Rezeptor
CD97	CD97	5	Adhensionsrezeptor
CTSG	Cathepsin G	10	Proteinabbau
CTSZ	Cathepsin Z	7	Vesicelbildung
HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen	8	Antigenpräsentation
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	9	Antigenpräsentation
HLA-C	HLA-C protein	7	Antigenpräsentation
ITGA2B	Integrin alpha 2	38	Fibronectin Rezeptor
ITGAM	Integrin alpha M	6	ICAM-Rezeptor
ITGB3	Integrin beta 3	8	Laminin Rezeptor
LAIR2	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2	2	Rezeptor
LMAN2	lectin, mannose-binding, 2	6	Bindungsprotein
M6PR	mannose-6-phosphate receptor	2	Transportprotein
MPO	Myeloperoxidase	330	Bestandteil der Immunabwehr
S100A4	S100-A4	12	Zellrekutierung
S100A8	S100-A8	128	Regulierung der Immunantwort
S100A9	S100-A9	90	Regulierung der Immunantwort

3.3.4.3 Vergleich Allergiker zu Nichtallergiker

Bei dem Vergleich der Systeme eines Allergikers und eines Nichtallergikers der Inkubation primärer Monocyten mit Phl p 5 kommt es zu einer großen Überschneidung der detektierten Proteine. In beiden Systemen sind Interaktionen mit den Oberflächenproteinen CD14, CD44, CD47, CD48, CD53, CD63, und CD97 nachgewiesen worden. Bei den Catepsinen kommen die Moleküle G und Z in beiden Systemen vor, ebenso alle detektierten Intergine und alle ermittelten Vertreter der S100 Proteinfamilie. Desweiteren wurden sowohl bei dem Allergiker als auch bei dem Nichtallergiker System Bindungen mit HLA-B, LAIR2 und M6PR nachgewiesen. Im System des Allergikers kam es zu weiteren Bindung wie den Oberflächenmolekülen CD33, CD68 und CD99 sowie mit den Catepsinen H und S, die den MHC II Molekülen zugerechnet werden. Ebenso kam es nur im System des Allergikers zu einer Bindung an den hochaffinen IgE FCER1G Rezeptor, den Ig mu chain IGHM, das MHC II Molekül HLA-DQB1 und den MHC Komplexbildner HMHA1. Desweiteren konnten hierbei Interaktionen mit dem Lectin LMAN1, dem Endozytoserezeptormolekül LRP1 und dem IgA und IgM Rezeptor PIGR nachgewiesen werden. Bei dem System des Nichtallergikers kam es hingegen zu Bindungen an das Oberflächenprotein CD1A, sowie an die MHC I Moleküle HLA-A und HLA-C. Ebenfalls wurde eine Bindung an das Lectin LMAN2 und an die Myeloperoxidase (MPO), die einen zentralen Bestandteil der Immunabwehr darstellt, detektiert.

3 Ergebnisse

Tabelle 16: Unterschiede der selektierten Interaktionspartner der Inkubation mit PhI p 5

Genbezeichnung	Protein	Funktion	System
CD33/SIGLEC3	Myeloid cell surface antigen CD33	Adhensionsmolekül	Allergiker
CD68	Macrosialin	Bindungsprotein	Allergiker
CD99	CD99	Adhensionsligand	Allergiker
CTSH	Cathepsin H	Vesicelbildung	Allergiker
CTSS	Cathepsin S	Proteinabbau (MHC II)	Allergiker
EZR	Ezrin	Cytoskeletales-Bindungsprotein	Allergiker
FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I receptor	IgE Rezeptor	Allergiker
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	Antigenpräsentation	Allergiker
HMHA1	Histocompatibility HA-1	MHC Komplexbildner	Allergiker
IGHM	Ig mu chain C region	Antigenbindung	Allergiker
LMAN1	lectin, mannose-binding, 1	Bindungsprotein	Allergiker
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1	Endozytoserezeptor	Allergiker
PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	IgA und IgM Rezeptor	Allergiker
CD1A	T-cell surface glycoprotein CD1a	Antigenpräsentation	Nichtallergiker
HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen	Antigenpräsentation	Nichtallergiker
HLA-C	HLA-C protein	Antigenpräsentation	Nichtallergiker
LMAN2	lectin, mannose-binding, 2	Bindungsprotein	Nichtallergiker
MPO	Myeloperoxidase	Bestandteil der Immunabwehr	Nichtallergiker

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines Systems zur Selektion von Protein-Protein-Interaktionspartner

Das Proteom unterliegt einem permanenten Auf- oder Abbau, was sich in Aktivitätsveränderungen, unterschiedlichen Lokalisationen, veränderten molekularen Wechselwirkungen oder in Stabilitätsunterschieden zeigt (Pawson und Scott, 2005). Es ist gegenüber dem statisch erscheinendem Genom dynamischer (Berg et al., 2003), was sich durch ein mehrschichtiges Muster von Protein-Protein-Interaktionen zeigt (Rubin, 2001). Protein-Protein-Interaktionen sind somit für die Weitergabe von Informationen in biologischen Systemen von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit wurde eine proteomische Methode etabliert, die die Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Pulldown-Protokoll für die Identifizierung von proteinspezifischen Protein-Protein-Interaktionen angewendet. Zur Bindung der Interaktionspartner wurden die Proteine, deren PPIs untersucht werden sollten, mit einem Biotin-Tag versehen, um eine Affinitätschromatographie durchführen zu können. Für die Aufreinigung und der somit verbundenen Anreicherung der Interaktionspartner wurden magnetische Agarose-Beads eingesetzt, die sich durch ihre geringe Größe auszeichnen (http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscellseparation/macstechnology/microbeads_dp.aspx)(Abb: 29).

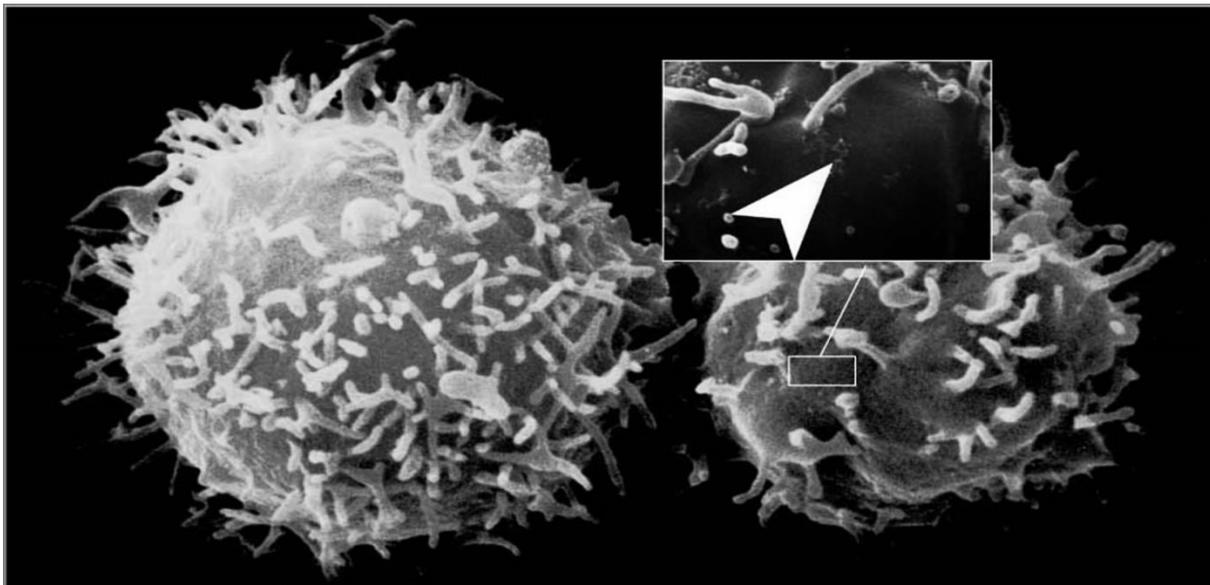


Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Prof. Groscurth, Zürich, CH) isolierter CD8+ T-Zellen mit gebundenen Beads (Vergrößerter Ausschnitt) (von Miltenyi Biotec zur Verfügung gestellt).

Im Gegensatz zu einer quervernetzten Agarose, die als Standardmatrix in vielen Pulldown-Experimenten zum Einsatz kommt (Quill et al., 2001; von Rechenberg et al., 2005; Lavagni et al., 2009), kam es bei den magnetischen Agarose-Beads, durch die geringe Größe der eigentlichen Beads und die sterische Abschirmung der funktionellen Streptavidin-Einheiten, nicht zu einer Anlagerung der Proteine. Die eingesetzten Allergene haben eine Kohlenhydrat-Bindungsstelle (Ebo et al, 2004), welche zu unspezifischen Bindungen der Köderproteine an die Agarosematrix führten, und dadurch die Aufreinigungsstrategie negativ beeinflusste. Die Kopplung von immobilisiertem Avidin oder Streptavidin an Agarose zur Affinitätsaufreinigung biotinylierter Peptide oder Proteine ist ebenso weit verbreitet (Claypool et al., 2002; Schulze und Mann, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass die Biotin-Streptavidin-Bindung zu den stärksten nicht-kovalenten Bindungen zählt, wird diese Wechselwirkung in den verschiedensten Methoden der Biochemie (Liu et al., 2006) und anderen analytischen Anwendungen (Willner, 1999) genutzt. Die Biotin-Streptavidin-Bindung weist eine hohe spezifische Affinität ($KD = 1,3 \cdot 10^{-15} \text{ M}^{-1}$) auf, des Weiteren ist das Streptavidin im Gegensatz zum Avidin nicht glykosyliert, wodurch es nicht zu etwaigen anderen unspezifischen Bindungen kommen kann (<https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-19-04369>; 28.03.2015).

Im weiteren Verlauf war für dieses Methodenkonzept entscheidend, mit welchem Lösungsmittel und mit wie vielen Waschschritten, die nichtbinden Proteine entfernt werden können. Die Durchführung von Waschschritten nach der Inkubation ist deswegen wichtig, da viele Proteine in hohen Konzentrationen im Zellextrakt vorhanden sind und auch zu unspezifisch Bindungen an den verschiedenen Komponenten führen können (Lottspeich und Engels, 2012). Durch die Entfernung dieser Proteine im Verlauf mehrerer Waschschrritte kommt es zu einer Erhöhung der Spezifität der realen Interaktionspartner und einer Abreicherung der sogenannten Hintergrundproteine unterhalb der Detektionsgrenze. Für dieses Pulldown-Protokoll konnte gezeigt werden, dass nach vier Waschschrritten mit PBS im silbergefärbten SDS-Gel keine Auswaschungen an Proteinen mehr nachgewiesen werden konnten. Ebenfalls konnte in einer Negativkontrolle gezeigt werden, dass es an den eingesetzten magnetischen Agarose-Beads und den anderen Versuchskomponenten zu keiner unspezifischen Bindung mit den jeweiligen Zellextrakten gekommen ist.

4.2 Detektierte Protein-Protein Interaktionspartner der humanen Defensine

Auf transcriptioneller Ebene konnte in diversen Studien (Winter et al, 2011, Winter et al, 2012a) ein Einfluss der humanen β -Defensine auf die Proliferation von oralen Karzinomen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten Wenghoefer et al (2008b) mittels immunhistochemischer Methoden nachweisen, dass hBD1 in Tumorzellen nicht mehr im Zytoplasma sondern im Zellkern lokalisiert ist. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit untersuchten Winter et al 2012b die Wirkung von α -Defensine in Speicheldrüsenkarzinomen. In diesen Karzinomen

konnte sowohl auf transcriptioneller Ebene als auch mittels immunhistochemischer Nachweismethoden ein Einfluss der Expression der α -Defensine, ebenso wie schon bei den β -Defensinen, auf die Tumorentstehung und Progression nachgewiesen werden.

Mittels des im ersten Teil der Arbeit etablierten Affinitäts-Protokolls und der anschließenden Detektion mittels Massenspektrometrie wurden die Interaktionspartner der jeweiligen humanen Defensine bestimmt.

In den Versuchen entsprach die eingesetzte Menge der jeweiligen Defensinmoleküle der der humanen basalen Sekretion.

4.2.1 α -Defensine

4.2.1.1 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner DEFA1

Bei der Inkubation von A64-Zellen mit DEFA1 konnten verschiedene Interaktionspartner detektiert werden, die verschiedenen Pathways zugeordnet werden konnten. Die nachgewiesenen PPIs können dabei insbesondere in die Pathways der Focal Adhesion (hsa04510), der Regulation des Aktin-Cytoskeletes (hsa04810) und des Adherens Junction (hsa04520) (Abb.:30) eingruppiert werden. All diese Pathways beeinflussen die Proliferation und Migration der Zellen.

Auch die Betrachtung der einzelnen Interaktionspartner des DEFA1 legen eine Zuordnung in die Richtung dieser Zellfunktionen nahe. So konnten Bindungen an verschiedene Rezeptoren nachgewiesen werden, wie den Hyaluronsäure Rezeptor CD44, sowie die Fibronectin Rezeptoren ITGA3 (CD49c) und ITGB1 (CD29). Diese Rezeptoren werden mit der Entstehung und Entwicklung verschiedener Tumorformen assoziiert. Dabei werden die Fibronectin Rezeptoren mit der Anfangsphase der Tumorgenese verknüpft (Bauer et al, 2014), wo hingegen CD44 (Li et al, 2007) mit der Proliferation und Metastasierung assoziiert wird. Ebenso wurden Proteine wie Vinkulin (Le Clainche et al, 2010), Hornerin und Ezrin (Austermann et al, 2009) detektiert, welche als Bindungsproteine zwischen den Rezeptoren, der Plasmamembran und dem Actin-Cytoskelett fungieren. Vor allem für das Protein Ezrin ist eine aktive Einbindung in die Metastasierung von Krebszellen belegt (Salas et al, 2009). Das ebenfalls detektierte Mitglied der Rho-Familie CDC42 beeinflusst die Organisation des Cytoskeletes, die Migration der Zellen, sowie das Zellwachstum (Meller et al, 2002). Interaktionen mit Proteinen wie CDC37, dem Heat Shock Protein HSPA4 (Furlini et al, 1994) oder dem Karyopherin (KPNB1) (Wagstaff und Jans, 2007) belegen den Transport von DEFA1 durch das Zytoplasma bis hin zum Kern. Dabei ist für das detektierte CDC37 eine Verstärkung der Proliferationsrate in Prostata-Karzinomen nachgewiesen worden (Schwarze et al, 2003).

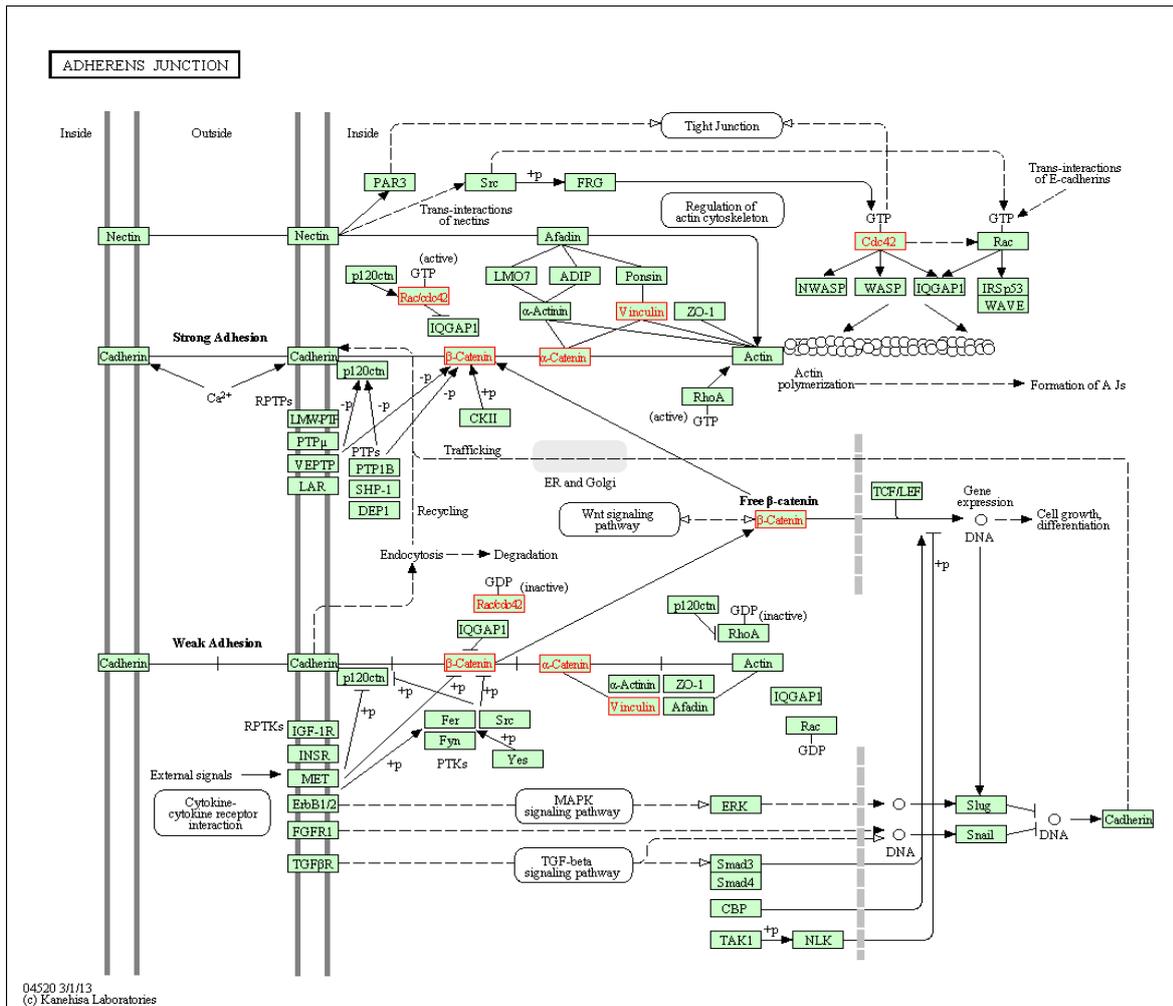


Abbildung 30: Adherens Junction Pathway. Die rot markierten Proteinbausteine der Pathways entsprechen den detektierten PPIs. Das DEFA1 interagiert mit Proteinen die Einfluss auf Zellfunktionen wie die Migration und das Zellwachstum beeinflussen. (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?144525370429722/hsa04520.args).

Für das KPNB1 ist für Karzinome im Brust-, Hals- und Kopf-, sowie dem Lungen-Bereich eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Tumore nachgewiesen worden (Yang et al, 2015). CTNNA1, DSG1 und DSP sind Bestandteile von desmosomalen Strukturen, die Zell-Zell Adhäsionen ausbilden (Sacco et al, 1995), Beeinflussungen dieser Proteine führen zu einer Erhöhung der Krebsinvasion und Metastasierung (Oda et al, 1993). Die detektierte Wechselwirkung von DEFA1 mit den Proteinen CTNNB1 (Humstoe et al, 2010) oder PA2G4 (Liu et al, 2008), die beide eine Regulatorische Funktion innehaben, belegt eine systemische Interaktion. Vor allem Protein-Protein-Interaktionen mit dem Beta-Catenin (CTNNB1), das als Transkription-Regulator fungieren kann (Du et al, 2015), als auch das proliferationsassoziierte 2G4 Protein (PA2G4), welches als Wachstums-Regulator in der Zelle agiert (He et al, 2013), belegen den Bezug des α-Defensins auf Pathways wie den ERBB3-Signaltransduktions-Pathway. Die Bindung an die S100-Proteine A8 (Voss et al,

2011) und A11 (Kouno et al, 2008) belegt einen weiteren Effekt auf zelluläre Funktionen wie Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose.

4.2.1.2 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner DEFA2

Die detektierten Interaktionspartner bei der Stimulation mit biotinyliertem DEFA2 ergaben zum Teil dieselben Protein-Hits, wie bei der Stimulation mit DEFA1. Ebenso erfolgte auch hierbei die Zuordnung der detektierten Proteine in die für DEFA1 ermittelten Pathways. Zu den ebenfalls bestimmten Proteinen gehören die Rezeptoren CD44 und ITGB1, sowie die membranständigen Bindungsproteine EZR und VCL. Ebenso die Vertreter der S100 Proteinfamilie A8 und A11, sowie das Desmoplakin (DSP), die Proteine CDC37 und CDC42, und der Wachstumsregulator PA2G4.

Unterschiedlich zu der Stimulation mit DEFA1 sind hingegen die folgenden PPIs. Für DEFA2 konnte eine Bindung an den Rezeptor CD47 nachgewiesen werden. CD47 ist ein Komplexpartner membranständiger Integrine, diese Komplexe induzieren Pathways, die Bezug zu Adhäsion, Migration und Teilung der Zelle innehaben (Brown und Frazier, 2001). Bei verschiedenen Krebsvarianten (Chao et al, 2012) führen Veränderungen an CD47 zu einer verstärkten Proliferationsrate (Sick et al, 2011). Der Laminin Rezeptor ITGA6 konnte ebenfalls als Interaktionspartner ermittelt werden. Dieses Integrin ist beteiligt an der Zell-Zell-Adhäsion und der Signaltransduktion (Pawar et al, 2007), in karzinogenen Systemen wird es mit der Proliferation in Verbindung gebracht (Kwon et al, 2013). Das detektierte Protein IQGAP1 ist ein Effektor-Protein des ebenfalls detektierten CDC42 und beeinflusst ebenso wie das CDC42-Protein die Organisation des Cytoskeletes, die Migration der Zellen und die Zell-Zell-Adhäsion (Ren et al, 2005). Mit HSPA9 und HSPD1 wurden Interaktionen mit Mitgliedern der Familie der Heat-Shock-Proteine nachgewiesen. Bei Mortalin (HSPA9) handelt es sich um ein Protein der Heat-Shock-Protein 70 Unterfamilie, dass die Proliferation der Zelle kontrolliert (Matzusaki et al, 2013). HSPD1 fungiert als Bestandteil von Chaperonen (Horwich et al, 2007).

4.2.1.3 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner DEFA3

Auch bei dieser Stimulationsvariante kam es zu Überschneidungen mit den Interaktionspartnern der anderen beiden α -Defensin-Stimulationen. Wie schon bei der Stimulation mit DEFA1 wurden die Rezeptoren CD44 und ITGB1 und das Bindungsprotein Ezrin nachgewiesen. Ebenso wurden die desmosomalen Proteine CTNNA1, DSG1 und DSP, sowie der Wachstumsregulator PA2G4 als Interaktionspartner bestimmt. Auch Proteine die bei der Stimulation mit DEFA2 detektiert wurden, sind bei diesem Ansatz ebenfalls bestimmt worden. Dabei handelt es sich um die beiden Vertreter der Heat-Shock-Proteine HSPA9 und HSPD1. Bei

der Stimulation mit DEFA3 wurde neben den beiden S100-Proteinen A8 und A11, die schon bei der DEFA1 Stimulation belegt wurden, auch die Proteine A7 und A9 ermittelt. Psoriasin (S100A7) ist ein Hauptfaktor für die Anikiis-Resistenz und Tumorprogression in OSCCs (Dey et al, 2015). Das S100A9 zeigt einen Einfluss auf die Inflammation und maligne Progression (Voss et al, 2011). In karzinogenen Strukturen konnte für die Interaktion dieser beiden S100 Proteine ein Einfluss auf die Zelldifferenzierung nachgewiesen werden (Martinsson et al, 2005). Als weitere Protein-Protein-Interaktion konnte eine Bindung an IGF2R nachgewiesen werden. Dieser Rezeptor ist in die Regulation zellulärer Prozesse wie die Proliferation und die Zellteilung eingebunden. Ebenso fungiert IGF2R als Tumorsuppressor, der das Zellwachstum durch die Beeinflussung diverser Liganden reguliert (Di Bacco und Gill, 2003). Auch die in diesem System detektierten PPIs konnten in die Pathways der Regulation des Aktin-Cytoskeletes (hsa04810), der Focal Adhesion (hsa04510) und des Tight Junction (hsa04530) eingeordnet werden (http://www.genome.jp/kegg-bin/search_pathway_object).

4.2.1.4 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner DEFA4

Bei der Stimulation der A64-Zellen mit DEFA4 konnten diverse Interaktionspartner detektiert werden, die zum Teil schon in den Stimulationsversuchen der anderen α -Defensine nachgewiesen wurden. Zu dem schon bekannten Fibronectin Rezeptor ITGB1 konnte auch der Komplexpartner ITGA3 nachgewiesen werden (Mueller et al, 1999). Des Weiteren wurde mit ILK ein Protein nachgewiesen, welches mit ITGB1 interagiert, und in zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Migration, Signaltransduktion und Proliferation eingebunden ist (Qin und Wu, 2012). Ein weiterer identifizierter Rezeptor stellt CD97 dar, dieser Adhäsionsrezeptor zeichnet sich durch mehrere EFG like Domänen am N-terminalen Fragment aus (Gordon et al, 2011). CD97 ist in die Zell-Zell-Adhäsion involviert und reguliert die Lokalisierung von beta-Catenin über den wachstumsregulierenden AKT Pathway (Hsiao et al, 2011). Des Weiteren konnten auch in diesem System sowohl CDC37, HSPA9 und HSPD1 als Mitglieder der Heat-Shock-Protein-Familie, als auch DSG1 und DSP aus der Gruppe der Desmosomen bestimmt werden. Ebenso konnten das Cytoskeletale Bindungsprotein Ezrin sowie das zur selben Proteinfamilie gehörende Moesin (MSN) bestimmt werden (Gary und Bretscher, 1993). Neben dem schon identifizierten KPNB1 konnte mit IPO4 ein weiteres Importin nachgewiesen werden (Jäkel et al, 2002). Zu den in den vorangegangenen Stimulationen dokumentierten Interaktionspartnern gehört ebenfalls das wachstumsregulierende PA2G4 Protein. Ebenso wurde das schon beschriebene S100A8 detektiert, eine weitere Protein-Protein-Interaktion mit dem aus derselben Proteinfamilie stammende S100A4 konnte hierbei nachgewiesen werden. Metastasin (S100A4) unterstützt die Tumorentstehung durch die Stimulierung der Angiogenese und die Migration der Zellen (Hernandez et al, 2013).

4.2.1.5 Zusammenfassung der α -Defensine

Zusammenfassend lässt sich über die Inkubation der A64-Zellen mit den humanen α -Defensinen sagen, dass für die vier eingesetzten Vertreter dieser Gruppe Protein-Protein-Interaktionen mit diversen Proteinen nachgewiesen werden konnten, die einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen ausüben. Diese Ergebnisse zeigen auch auf der Ebene des Proteoms die von Winter et al 2012b veröffentlichten Zusammenhänge auf der transkriptioneller Ebene. Außerdem konnte anhand der detektierten Interaktionspartner gezeigt werden, dass die α -Defensine mit Proteinen verschiedener Zellebenen bzw. Pathway-Stadien interagieren. In diesen Systemen konnten Bindungen an Rezeptoren wie CD44 und das cytoskeletale Bindungsprotein Ezrin gezeigt werden, Bindungen an verschiedene Mitglieder der Heat-Shock-Proteine, die Defensine durch das Cytoplasma transportieren, Importine wie das KPNB1 oder IPO4, welche die Proteine in den Zellkern bringen können und transcriptionale Regulatoren wie das CTNNB1, die einen direkten Einfluss auf die Transcription der RNA und somit die Zellantwort haben. Ebenso konnten die detektierten Proteine in Pathways wie hsa04510, hsa04520, hsa04530 und hsa04810 eingeordnet werden.

Die große Übereinstimmung der detektierten PPIs erklärt sich durch die große Ähnlichkeit der eingesetzten Köder-Proteine. Die α -Defensine haben alle dieselbe Struktur (Abb:1, S.1) und unterscheiden sich selbst auf sequenzieller Ebene zum Teil nur in einer Aminosäure (Abb: 18, S. 34).

4.2.2 β -Defensine

4.2.2.1 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner hBD1

Auch bei der Stimulation der BHY-Zellen mit dem biotinylierten hBD1 kommt es zu detektierten Protein-Protein-Interaktionen, die schon bei der Stimulation der A64-Zellen mit den α -Defensinen ermittelt werden konnten. Das hBD1 interagiert ebenfalls mit CD44, CD47 und ITGB1. Das in diesem System bestimmte ITGA2 bildet mit ITGB1 den Laminin Rezeptor CD49b (Naci und Aoudjit, 2014), der über den ERK Pathway und p38 MAPK Pathway die Regulation der Zellproliferation beeinflusst (Zhang und Liu, 2002)(Abb:31).

4 Diskussion

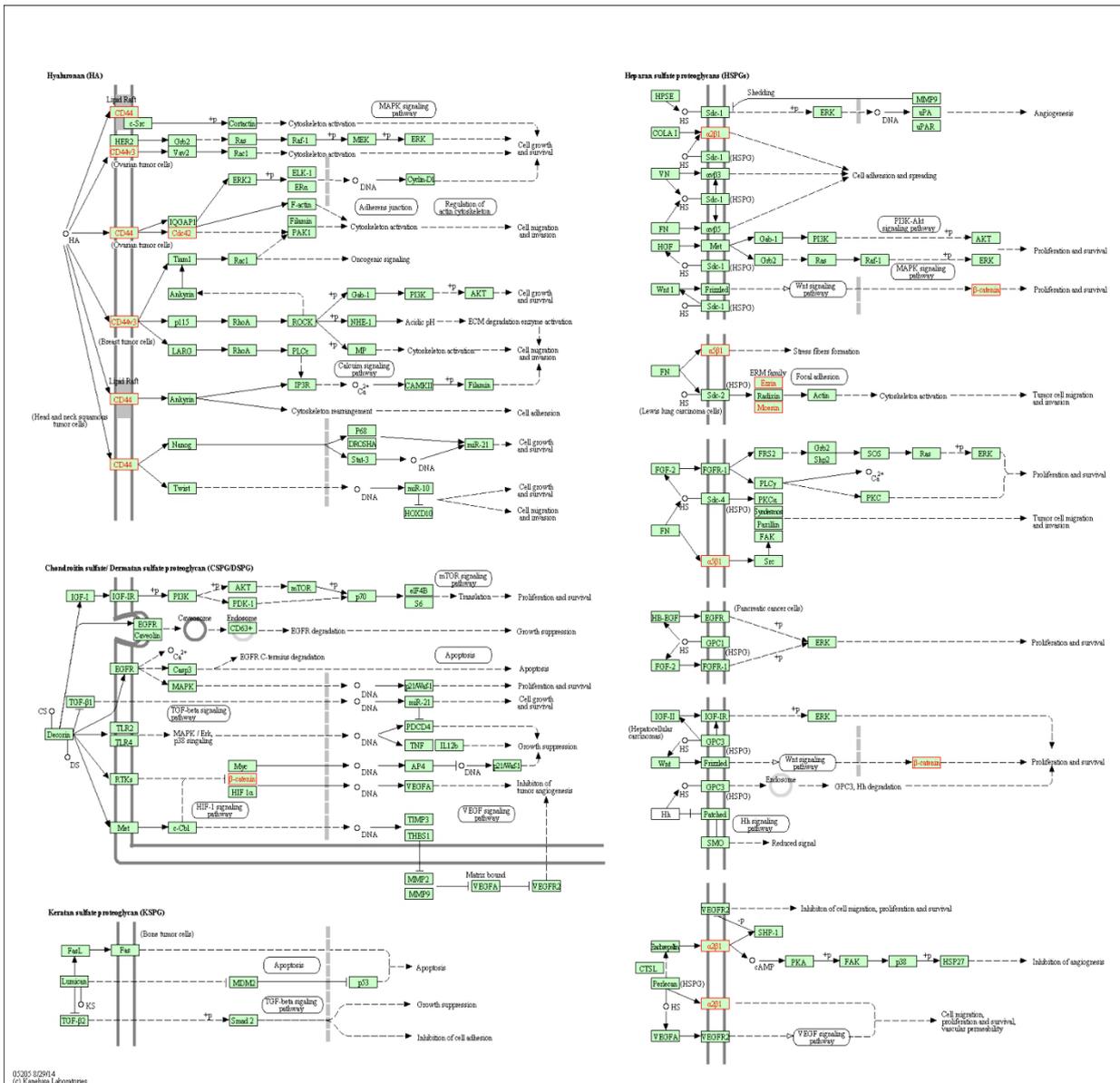


Abbildung 31: Pathways. Die rot markierten Proteinbausteine der Pathways entsprechen den detektierten PPIs des hBD1 in BHY-Zellen (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?144541887216188/hsa05205.args).

Weitere Interaktoren sind die Zellkernrezeptoren KPNB1, IPO7 und TNPO2, die alle in den Nuclear Pore Complex (NPC) eingebunden sind, und RAN-vermittelt Substrate in den Zellkern importieren (Paraskeva et al, 1999). Wie schon bei der Stimulation mit den alpha-Defensinen wird in dieser Inkubation der BHY Zellen die Bindungsproteine Ezrin und Moesin nachgewiesen. Ebenso wurden die desmosomalen Proteine CTNNA1 und DSP als Interaktionspartner bestimmt. Auch die bereits bestimmten Vertreter der Heat-Shock-Proteine HSPA9 und HSPD1, sowie die Mitglieder der S100-Proteinfamilie A7, A8 und A9 konnten in diesem System als PPIs des hBD1 nachgewiesen werden. Zu den bereits im A64-System detektierten Proteinen CDC42, CTNNB1 und PA2G4, die in Wachstumsfaktor Pathways eingebunden sind, wurde das delta Catenin (CTNND1), das ebenfalls in diese

Pathways integriert ist und mit den bereits ermittelten Proteinen interagiert, nachgewiesen.

4.2.2.2 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner hBD2

Die detektierten Interaktionspartner der Inkubation der BHY-Zellen mit biotinyliertem hBD2 ergaben wiederum eine große Übereinstimmung mit den Proteinen, die bei der Inkubation mit hBD1 nachgewiesen werden konnten. In diesem System konnte der EGF Rezeptor als Bindungspartner des Defensins bestimmt werden. Diese Rezeptorbindung, sowie die Bindungen an die auch im hBD1-System nachgewiesenen Rezeptoren CD44 und den Integrinkomplex ITGA6 und ITGB1 belegen einen Einfluss auf die wachstumsregulatorischen Prozesse der Zelle (Danen und Yamada, 2001). Auch die Bindung an PAK2, CDC42, CTNND1 und PA2G4 weist auf einen wichtigen Einfluss dieses beta Defensins auf die Tumorzell-Migration, Adhäsion und Invasion hin (Guo et al, 2015). Gleichfalls zeigt es dessen Bedeutsamkeit auf die schon beschriebenen Pathways wie der Regulation des Cytoskeletes (hsa04810), Focal Adhesion (hsa04510) oder Adhärenz Junction (hsa04520), aber auch in Pathways wie dem MAPK signaling (hsa04010) oder dem PI3K-Akt signaling (hsa04151) (http://www.genome.jp/kegg-bin/search_pathway_object), und somit dessen Auswirkung auf die Proliferation der Zelle. Auch die Detektion von PPIs wie den Mitgliedern der Heat-Shock-Proteine HSPA9 und HSPD1, sowie die der S100-Proteinfamilie A8, A9 und A11, CTNNA1 und DSP den Vertretern der desmosomalen Proteine, dem Importin KPNB1 oder den Bindungsproteinen Ezrin und Moesin die den ERM Proteinkomplex bilden, geben wie schon bei den vorherigen Systemen Hinweise, die diese Beeinflussung des hBD2 aufzeigen.

4.2.2.3 Detektierte Protein-Protein-Interaktionspartner hBD3

Auch in diesem BHY-Zell-System konnten mit biotinyliertem hBD3 Protein-Protein-Interaktionen bestimmt werden. So konnten Bindungen an den Hyaluronsäure Rezeptor CD44, sowie den Lamellen-Komplex-Rezeptor ITGA6 und ITGB1 nachgewiesen werden. Ebenso wurden die Heat-Shock-Proteine HSPA9 und HSPD1 und der HSP-Interaktionspartner CDC37 detektiert, sowie das S100-A11. Als Vertreter der desmosomalen Proteine konnten CTNNA1 und DSP bestimmt werden, die Importin KPNB1 und IPO7, der Wachstumsfaktor PA2G4 und das Bindungsproteinen Ezrin. Mit der Detektion dieser PPIs konnte diese Pathways wie der Regulation des Cytoskeletes, der Focalen Adhesion und dem PI3K-Akt Signaling zugeordnet werden (http://www.genome.jp/kegg-bin/search_pathway_object).

4.2.2.4 Zusammenfassung β -Defensine

Für die Inkubation der BHY-Zellen mit den humanen β -Defensinen konnten für die drei Vertreter dieser Gruppe Protein-Protein-Interaktionen mit diversen Proteinen nachgewiesen werden. Wie schon bei den α -Defensinen zeigt sich eine gewisse Übereinstimmung der Ergebnisse der einzelnen Systeme. Diese Überschneidungen der detektierten Protein-Interaktionspartner lässt sich mit der strukturellen Konformität der Mitglieder dieser Familie erklären (Abb:1, S.1; Abb:2, S.2). Diese Proteine konnte eine Zuordnung in verschiedene tumorassoziierte Pathways nachgewiesen werden (Abb: 32). Zu diesen Pathways zählen der Adeherens Junction Pathway, der Focal Adhesion Pathway, des Wnt signaling Pathway und über den EGF-Rezeptor der Pathway des MAPK sinalings. All diese Pathways können Einfluss auf die Proliferation der Zelle nehmen.

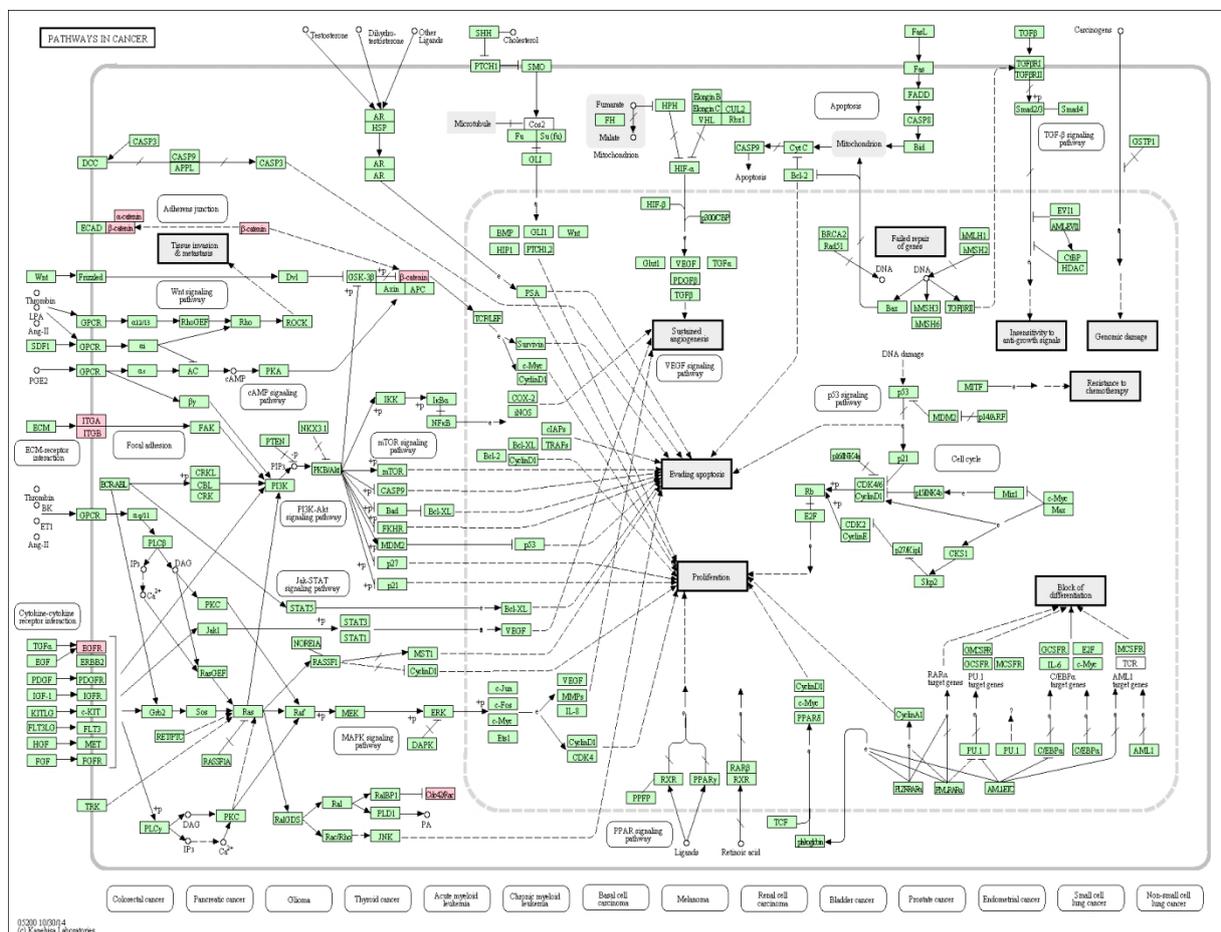


Abbildung 32: Pathways in cancer (hsa05200). Die rot markierten Proteinbausteine der Pathways entsprechen den detektierten PPIs der hBD-Systeme. Die nachgewiesenen Interaktionspartner konnten verschiedenen Pathways zugeordnet werden, hierzu gehören der Pathway der Adeherens Junctions, der Focal Adhesion, des Wnt signaling und über den EGF-Rezeptor den Pathway des MAPK sinalings. All diese Pathways können die Proliferation der Zelle beeinflussen (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?14455170433467/hsa05200.args).

4 Diskussion

Damit konnte die von Winter et al. 2011 auf transcriptioneller Ebene veröffentlichten Zusammenhänge zum Einfluss der β -Defensine auf orale Karzinome auch auf proteomischer Ebene nachgewiesen werden.

4.3 Detektion von Protein-Protein Interaktionspartnern von Majorallergenen in primären humanen Monocyten

Auch in dieser Pilotstudie wurde das im ersten Teil etablierte Affinitäts-Protokoll und die anschließende Detektion mittels Massenspektrometrie zur Ermittlung putativer Interaktionspartner von Majorallergenen in primären humanen Monocyten eingesetzt werden. Dabei sollte ermittelt werden, ob auch andere Aufnahme- und Signalwege als der hinlänglich bekannte hochaffine FC ϵ Rezeptors für diesen Mechanismus in Frage kommen.

4.3.1 Protein-Protein Interaktionspartner des Majorallergens Bet v 1 in primären Monocyten

Die Durchführung der Analytik dieses Systems erwies sich für die Messung der Membranfraktion als äußerst schwierig. Obwohl die Pulldown-Experimente und die anschließende Gelelektrophorese augenscheinlich positive Ergebnisse lieferten, konnten nach dem tryptischen Verdau keine verwertbaren massenspektrometrischen Ergebnisse erzielt werden. So konnten für dieses System nur die Ergebnisse der Pulldown-Experimente mit den intakten Zellen genutzt werden. Aus diesem Grund fällt der Vergleich der Inkubation primärer humaner Monocyten mit Bet v 1 eines Allergikers und eines Nichtallergikers eher rationell aus.

Nach Ausschluss der Gemeinsamkeiten, bei denen es sich um Desmoplakin (DSP), den Hauptbaustein des desmosomalen Cadherin-Plakoglobin Komplexes handelt, konnten in dem System des Nichtallergikers nur vier Proteine ermittelt werden, die der Immunantwort der Zelle zugeordnet werden konnten, aber untereinander keinen Zusammenhang bilden. Im System der inkubierten Monocyten eines spezifischen Allergikers hingegen konnten Protein-Protein-Interaktionen mit den Vertretern der S100 Familie A4, A7, A8 und A9 nachgewiesen werden. Vor allem Proteine wie das Psoriasin (S100A7) oder der Proteinkomplex aus den Beiden S100-Proteinen A8 und A9 spielt eine gewichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort (Vogl et al, 2014). Für das detektierte ANXA1 sind Zusammenhänge im Th1 und Th2-System bekannt (Kamal et al, 2001). Auch die Interaktion mit Cathepsin S (CTSS) einer C1-Peptidase, welche den Proteinabbau von Allergenen zur Antigenpräsentation im MHC II System durchführt (Munger et al, 1995), belegt die zelluläre Reaktion auf das Allergen.

4.3.2 Protein-Protein Interaktionspartner des Majorallergens Phl p 5 in primären Monocyten

4 Diskussion

Die im Bet v 1 System aufgetretenen Probleme zeigten sich in der Inkubation der primären humanen Monocyten eines Nichtallergikers und eines Allergikers nicht. In diesem System führte die Analyse der Pulldown Experimente sowohl der intakten Zellen als auch der Membranfraktion der Monozyten zu expliziteren Ergebnissen.

Im Vergleich der beiden eingesetzten primären humanen Monocyten ist es zu einer großen Anzahl an Überschneidungen von Proteinen gekommen, die sowohl beim Nichtallergiker als auch beim Allergiker zu Protein-Protein-Interaktionen führten. Nach dem Ausschluss dieser Überschneidungen zeigte sich, dass es bei den Monocyten des Nichtallergikers nur zu PPIs mit MPO und HLA-A kommt, wobei die Interaktion mit dem MPO ebenfalls im nichtallergischen Bet v 1 System detektiert worden ist. Bei den PPIs des Allergikers mit biotinyliertem Phl p 5 kommt es zu Bindungen an Oberflächenproteine wie CD33, CD68, CD98, PIGR und den für die Allergenenbindung bekannten hochaffinen FCε Rezeptor. Ebenso konnten Interaktionen mit den Cathepsinen S und H, sowie mit der MHC II Komponente HLA-DQB1 bestimmt werden. Diese Proteine belegen eine Einordnung der Ergebnisse in Pathways wie hsa04612 (Antigen Processing and Presentation) (Abb: 33), hsa04145 (Phagosome) und hsa04664 (FCεR1 signaling) (http://www.genome.jp/kegg-bin/search_pathway_object).

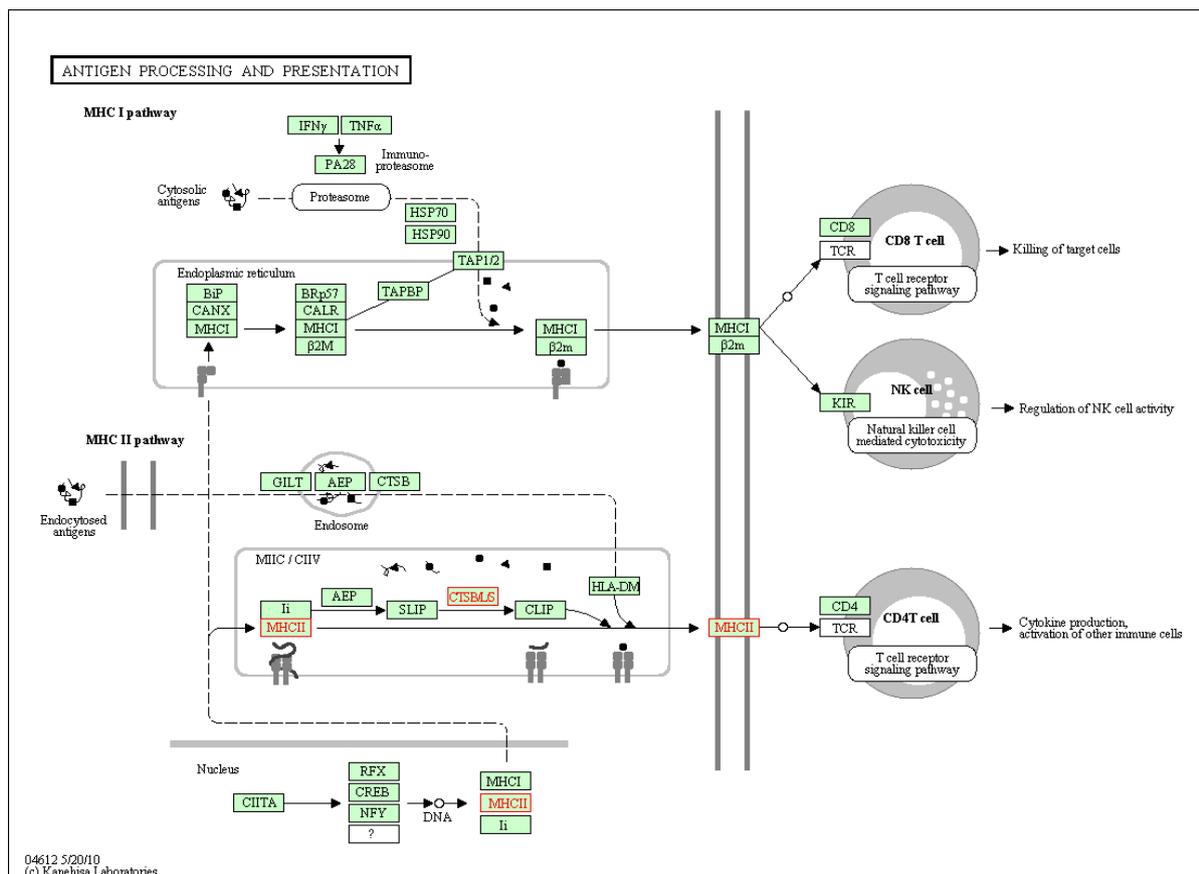


Abbildung 33: Antigen Processing and Presentation Pathway. Die rot markierten Proteinbausteine der Pathways entsprechen den detektierten PPIs. Die Interaktionspartner belegen die Einordnung in den MHC II Pathway (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?14456103866678/hsa04612.args).

4.3.3 Zusammenfassung

Für die Inkubation mit Phl p 5 konnte ein Bezug auf schon bekannte Zellabläufe bei allergischen Reaktionen auf proteomischer Ebene gezeigt werden. So konnte neben der Bindung an den hochaffinen FC ϵ Rezeptor auch Bindungen an andere Oberflächenproteine nachgewiesen werden.

Die vorallem im Bet v 1 System detektierten S100-Proteine erscheinen für die untersuchten Monocyten fragwürdig. Ob es sich bei diesen detektierten PPIs um eine Verunreinigung im Zuge der Methodik der Zellextraktion durch Fremdzellen wie Keratinocyten handelt, müsste mittels anderer molekularbiologischer Methoden wie z.B. einer PCR analysiert werden.

Die Anwendung des etablierten Pulldown-Protokolls und die anschließende proteomische Analyse der Interaktionspartner dieses Systems erwiesen sich als schwierig. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Allergen-Versuche zeigen, dass für eine explizite Aufklärung der PPIs, sowohl eine Inkubation der intakten Zellen, als auch der Membranfraktion von Nöten ist. Für die angewandte Methodik ist eine große Anzahl an spezifischen humanen primären Monozyten von einem Spender erforderlich, was die Durchführung der Versuche, und die anschließende Analytik erschwert. Ein weiteres Hindernis könnte auch die N-terminale Lage des Biotin-Labels darstellen, welches das Bindungsverhalten des Allergens beeinflussen könnte.

5 Kurzzusammenfassung

Das humane Proteom unterliegt gegenüber dem eher statischen Genom einem kontinuierlichen Auf- und Abbau. Diese Dynamik zeigt sich durch ein mehrschichtiges Muster an Protein-Protein Interaktionen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein Pulldown Protokoll etabliert, welches mit einer anschließenden Analyse mittels Proteomics zur Identifizierung von proteinspezifischen Protein-Protein-Interaktionen angewendet wurde.

Mittels dieses Pulldown Protokolls wurden in oralen Tumorzellen die Interaktionspartner humaner α - und β -Defensine ermittelt. Auf genomischer Ebene wurde in mehreren Studien festgestellt, dass die Defensine spezifische Einflüsse auf das Proliferationsverhalten der Zellen haben. Diese Auswirkung konnte auch auf proteomischer Ebene durch die Detektion charakteristischer Protein-Protein-Interaktionen belegt werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden mit dem im ersten Teil der Arbeit etablierten Protokoll die Protein-Bindungspartner von allergieauslösenden Majorallergenen in primären humanen Monocyten von allergenspezifischen Allergikern und Nichtallergikern ermittelt.

6 Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Å	Ångström
α	alpha
Abb	Abbildung
ACN	Acetonitril
AMP	Antimikrobielles Peptid
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
AS	Aminosäure
β	beta
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CaCl ₂	Calciumchlorid
C ₂ H ₄ INO	Iodacetamid
CD	cluster of differentiation
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CHCA	α-Cyano-4-hydroxycimtsäure (<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision induced dissociation</i>)
CoIP	Koimmunpräzipitation
CR	Komplement-Rezeptor
CRM	Model des geladenen Rückstandes (<i>charged residue model</i>)
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTL	Zytotoxische T-Zellen (<i>cytotoxic T cell</i>)
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DEFA	α-Defensin
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECD	electron capture dissociation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ESI	Elektronensprayionisation (<i>electrospray ionization</i>)
ETD	Elektronentransfer Dissoziation

6 Abkürzungsverzeichnis

	(<i>electron transfer dissociation</i>)
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FDR	Falschidentifizierungshäufigkeit (<i>false discovery rate</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FT	Fouriertransformation
g	Gramm
h	Stunde
hBD	Humanes β -Defensin
HCD	hochkollisionsinduzierte Dissoziation (high collision induced dissociation)
HCl	Hydrogenchlorid
hNP	Humanes neutrophiles Peptid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie (high-performance liquid chromatography)
HPV	humane Papillomviren
ICR	Ionencyclotronresonanz
IEM	Ionenemissionsmodell (ion evaporation model)
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
K_a	Assoziationskonstante
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Kaliumhexacyanoferrat (III)
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LTQ	Linear trap quadropol
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption/- ionisation (matrix assisted laser desorption/ionization)
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

6 Abkürzungsverzeichnis

MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MS/MS	tandem Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium- Granat-Laser
ng	Nanogramm
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid (1-Hydroxy-2,5- pyrrolidindion)
nLC	Nano Flüssigchromatographie (nano liquid chromatography)
nM	Nanomolar
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OH	Hydroxygruppe
OSCC	Orales Plattenepithel-Karzinom (oral squamous cell carcinoma)
OT	Orbitrap
π	pi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
PEP	statistische Fehlerwahrscheinlichkeit (posterior error probability)
pH	pH Wert (negativer Dekadischer- Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
pm	Pikometer
PMF	Peptidmassenfingerabdruck (peptide mass fingerprint)
Phosphonat	Phosphonomethylen-L-phenylalanin
ppm	Teile/Million (parts per million)
PPI	Protein-Protein-Interaktionen
PRR	Pattern-Reognition Rezeptor
ProtA	Protein A
PTM	posttranslationale Modifizierung
Pulldown	Protein-Interaktionsexperimente
QToF	Quadrupol-ToF-Hybridinstrument
RP	Umkehrphase (reversed phase)

6 Abkürzungsverzeichnis

RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
S/N	Signal-zu-Rauschverhältnis (signal to noise)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Strep	Streptomycin
Tab	Tabelle
Tag	Affinitäts-Struktur
TAP	stufenweise Affinitätsreinigung (tandem affinity purification)
θ	theta
TCR	T-Zellrezeptor (T cell receptor)
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid)
TLR	Toll-Like Rezeptor
ToF	Flugzeit (time of flight)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
v/v	Volumenanteile
w/v	Gewicht pro Volumenanteil

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Matrixsubstanzen für die MALDI-MS in der biochemischen Analytik ...	- 17 -
Tabelle 2: nLC Gradient HCTultra und LTQ Velos	- 48 -
Tabelle 3: nLC Gradient LTQ Orbitrap XL	- 49 -
Tabelle 4: Selektierte Interaktionspartner von DEFA1 in A64 Zellen	- 58 -
Tabelle 5: Selektierte Interaktionspartner von DEFA2 in A64 Zellen	- 59 -
Tabelle 6: Selektierte Interaktionspartner von DEFA3 in A64 Zellen	- 60 -
Tabelle 7: Selektierte Interaktionspartner von DEFA4 in A64 Zellen	- 61 -
Tabelle 8: Selektierte Interaktionspartner von hBD1 in BHY Zellen.....	- 62 -
Tabelle 9: Selektierte Interaktionspartner von hBD2 in BHY Zellen.....	- 63 -
Tabelle 10: Selektierte Interaktionspartner von hBD3 in BHY Zellen.....	- 64 -
Tabelle 11: Selektierte Interaktionspartner von Bet v 1 in primären Monocyten eines Bet v 1 Allergikers	- 65 -
Tabelle 12: Interaktionspartner von Bet v 1 in primären Monocyten eines Nichtallergikers	- 65 -
Tabelle 13: Unterschiede der selektierten Interaktionspartner der Inkubation mit Bet v 1	- 66 -
Tabelle 14: Selektierte Interaktionspartner von Phl p 5 in primären Monocyten eines Phl p 5 Allergikers	- 67 -
Tabelle 15: Selektierte Interaktionspartner von Phl p 5 in primären Monocyten eines Nichtallergikers.....	- 68 -
Tabelle 16: Unterschiede der selektierten Interaktionspartner der Inkubation mit Phl p 5	- 70 -

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur-Schemata humaner Defensine.....	- 1 -
Abbildung 2: Darstellung der Disulfidbrücken der Defensine.....	- 2 -
Abbildung 3: Modellmechanismus der Defensinwirkungsweise an Membranen.....	- 2 -
Abbildung 4: Aminosäuresequenz der reifen, humanen α -Defensine	- 3 -
Abbildung 5: Aminosäuresequenz der reifen, humanen β -Defensine.....	- 4 -
Abbildung 6: Molekulare Entwicklung durch AMPs von der Entzündung zur oralen Tumorgenese	- 6 -
Abbildung 7: Speicheldrüsengewebe: (A) gesund, (B) malignes Karzinom.....	- 8 -
Abbildung 8: Aufnahmemechanismen von Antigenen	- 10 -
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Sensibilisierung.....	- 13 -
Abbildung 10: Phl p 5 (a) Darstellung der Rispenähren des Wiesenlieschgrases, (b) Strukturmodellierung, (c) Bündelstruktur	- 15 -
Abbildung 11: Bet v 1 (a) Männlicher Blütenstand der Hängebirke, (b) Strukturmodellierung, (c) Dreidimensionales Modell	- 15 -
Abbildung 12: MALDI-Prinzip.....	- 19 -
Abbildung 13: Schematische Darstellung eines MALDI ToF	- 20 -
Abbildung 14: Schematische Darstellung eines MALDI ToF mit Reflektor	- 20 -
Abbildung 15: Schematische Darstellung des makroskopischen und mikroskopischen ESI-Prozesses	- 21 -
Abbildung 16: Fragmentierungsschema nach Roepstroff	- 23 -
Abbildung 17: Strategien zur Proteomanalyse	- 26 -
Abbildung 18: Aminosäuresequenzen der eingesetzten humanen α - und β -Defensine	- 34 -
Abbildung 19: Aminosäuresequenzen der eingesetzten Allergene.....	- 34 -
Abbildung 20: Biotinylierungsreagenz	- 40 -
Abbildung 21: Reaktionsschemata der N-terminalen Biotinylierung von Proteinen	- 41 -

Abbildung 22: FACS-Kontrolle der Monozyteninkubation..... - 43 -

Abbildung 23: Hypothese der Auswirkung der Defensine auf die Entstehung oraler Tumore - 51 -

Abbildung 24: Silbergefärbtes Gel (Durchfluss, Waschschrirte, Beadfraktion) - 53 -

Abbildung 25: Silbergefärbtes Gel (Eluat)..... - 53 -

Abbildung 26: Silbergefärbtes Gel (Negativkontrolle). - 54 -

Abbildung 27: Sequenzabdeckung der detektierten Peptide - 55 -

Abbildung 28: FACS-Kontrolle der Inkubation von Monocyten mit Phl p 5 - 57 -

Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme gebundenen Beads..... - 71 -

Abbildung 30: Adherens Junction Pathway.. - 74 -

Abbildung 31: Pathways (hBD1)..... - 78 -

Abbildung 32: Pathways in cancer..... - 80 -

Abbildung 33: Antigen Processing and Presentation Pathway. - 83 -

9 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtmann AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. **2007**, Elsevier-Verlag.

Aebersold RH, Teplow DB, Hood LE, Kent SB. Electroblothing onto activated glass. High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence analysis. *J Biol Chem.* **1986**; 261(9): 4229-38.

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **2003**; 422 (6928): 198-207.

Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R. The human antimicrobial and chemotactic peptide LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, **2000**, 96: 3086-3093.

Allam JP, Würtzen PA, Reinartz M, Winter J, Vrtala S, Chen KW, Valenta R, Wenghoefer M, Appel T, Gros E, Niederhagen B, Bieber T, Lund K, Novak N. Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-beta1 and IL-10-producing properties. *J Allergy Clin Immunol.* **2010**; 126(3):638-45.

Allan BB, Moyer BD, Balch WE. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **2000**; 289 (5478): 444-448.

Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002; 1(11):845-67.

Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2003**. 130:87-107.

Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol.* **2006**; 24:607-56.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL Head and neck cancer. *Lancet.*, **2008**. 371, 1695-1709.

Austermann J., Nazmi A.R., Heil A., Fritz G., Kolinski M., Filipek S., Gerke V. Generation and characterization of a novel, permanently active S100P mutant. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, 1793:1078-1085.

Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its new supplement TrEMBL. *Nucleic Acids Res.* **1996**; 24(1):21-5.

Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999. *Nucleic Acids Res.* **1999**; 27(1):49-54.

Barber M; Bordoli RS; Elliott GJ; Sedgwick RD; Tyler AN. Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* ,**1982**.54 (4): 645A–657A.

Bauer F, Schweimer K, Kluver E, Conejo-Garcia JR, Forssmann WG, Rosch P, Adermann K, Sticht H. Structure determination of human and murine β -defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Science*, **2001**, 10: 2470-2479.

Bauer A, Küster B. Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* **2003**; 270 (4): 570-578.

Bauer KM, Watts TN, Buechler S, Hummon AB. Proteomic and functional investigation of the colon cancer relapse-associated genes NOX4 and ITGA3. *J Proteome Res.* **2014**; 13(11):4910-8.

Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J. Immunol.*, **1999**, 163: 947-953.

Beisswenger C., Bals R. Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity *Curr Protein Pept Sci.* **2005**, 6, 255-64

Bensch K.W., Raida M., Magert H.J., Schulz-Knappe P., Forssmann W.G. hBD1: a novel beta-defensin from human plasma *FEBS Lett.* **1995**, 368 331-5

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin* **2003**; 5. Auflage.

Berggren K, Chernokalskaya E, Steinberg TH, Kemper C, Lopez MF, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis.* **2000**, 21(12):2509-21.

Bigley V, M. Haniffa, S. Doulatov, X. N. Wang, R. Dickinson, N. McGovern, L. Jardine, S. Pagan, I. Dimmick, I. Chua, J. Wallis, J. Lordan, C. Morgan, D. S. Kumararatne, R. Doffinger, B. M. van der, J. van Dongen, A. Cant, J. E. Dick, S. Hambleton, M. Collin. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J.Exp.Med.* **2011**. 208:227-234.

Biemann K. Sequencing of proteins. *J Mass Spec Ion Phys*, **1982**, 45, 183-194.

Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, **2010**, 32, 305-15.

Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S, Schneider M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* **2003**; 31(1):365-70.

Bonass WA, High AS, Owen PJ, Devine DA. Expression of beta-defensin genes by human salivary glands. *Oral Microbiol Immunol* **1999**; 14: 371–374.

Boniotto M, Jordan WJ, Eskdale J, Tossi A, Antcheva N, Crovella S, Connell ND, Gallagher G. Human β -defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, 50: 1433-1441.

Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. Trends Cell Biol. **2001**; 11(3):130-5.

Budzikiewicz H, Schäfer M. Massenspektrometrie: Eine Einführung, 5. Auflage, **2005**, Wiley-VCH Weinheim.

Bufe A, Betzel C, Schramm G, Petersen A, Becker WM, Schlaak M, Perbandt M, Dauter Z, Weber W. Crystallization and preliminary diffraction data of a major pollen allergen. Crystal growth separates a low molecular weight form with elevated biological activity. J Biol Chem. **1996a**; 271(44):27193-6.

Bufe A, Spangfort MD, Kahlert H, Schlaak M, Becker WM. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. Planta. **1996b**;199(3):413-5.

Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunol Rev. **2004**; 198:169-84.

Bullard RS, Gibson W, Bose SK, Belgrave JK, Eaddy AC, Wright CJ, Hazen-Martin DJ, Lage JM, Keane TE, Ganz TA, Donald CD. Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: new insight into its potential role in cancer. Mol Immunol **2008**; 45: 839–848.

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res **1996**; 56: 2488–2492.

Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. Curr Opin Immunol. **2012**; 24(2):225-32.

Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology Histopathology. **2007**, 51 1-20.

Claypool SM, Dickinson BL, Yoshida M, Lencer WI, Blumberg RS. Functional reconstitution of human FcRn in Madin-Darby canine kidney cells requires co-expressed human beta 2-microglobulin. J Biol Chem **2002**; 277 (31): 28038-28050.

Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol **2008**; 26 (12): 1367-1372.

Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen JV, Mann M. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. Nat Protoc **2009**; 4 (5): 698-705.

Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI.; Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins; J. Virol., **1986**, 60, 1068-1074

Danen EH, Yamada KM. Fibronectin, integrins, and growth control. J Cell Physiol. **2001**; 189(1):1-13.

Desjardins M, LA Huber, RG Parton, Griffiths G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J.Cell Biol.* **1994**, 124:677-688.

Di Bacco A, Gill G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene.* **2003**; 22(35):5436-45.

Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* **1968**, 49: 2240-2247.

Donald CD, Sun CQ, Lim SD, Macoska J, Cohen C, Amin MB, Young AN, Ganz TA, Marshall FF, Petros JA. Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* **2003**; 83: 501–505

Droin N, Hendra JB, Ducoroy P, Solary E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. *J Proteomics* **2009**; 72: 918–927

Du Y, Wang Y, Zhang F, Wu W, Wang W, Li H, Xia S, Liu H. Regulation of metastasis of bladder cancer cells through the WNT signaling pathway. *Tumour Biol.* **2015**. [Epub ahead of print]

Dunsche A, Acil Y, Siebert R, Harder J, Schröder JM, Jepsen S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* **2001**; 30: 154–158

Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. *Clin Exp Allergy.* **2004**; 34(1):137-44.

Edman P, Begg G. A protein sequenator. *Eur J Biochem*, **1967**. 1(1): 80-91.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**; 246 (4926): 64-71.

Ferone D, van Hagen MP, Kwekkeboom DJ, van Koetsveld PM, Mooy DM, Lichtenauer-Kaligis E, Schönbrunn A, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ. Somatostatin receptor subtypes in human thymoma and inhibition of cell proliferation by octreotide in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* **2000**; 85(4):1719-26.

Furlini G, Vignoli M, Re MC, Gibellini D, Ramazzotti E, Zauli G, La Placa M. Human immunodeficiency virus type 1 interaction with the membrane of CD4+ cells induces the synthesis and nuclear translocation of 70K heat shock protein. *J Gen Virol.* **1994**; 75 (Pt 1):193-9.

Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, Løwenstein H, Spangfort MD. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol.* **1996**; 3(12):1040-5.

Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2002**, 110: 823-831.

Gambichler T., Skrygan M., Huyn J., Bechara F. G., Sand M., Altmeyer P., Kreuter A. Pattern of mRNA expression of beta-defensins in basal cell carcinoma BMC Cancer. **2006**, 6 ,163.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest **1985**; 76: 1427–1435.

Ganz T. Defensins: anti-microbial peptides of innate immunity. Nat. Rev. Immunol., **2003**, 3: 710-720.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. C R Biol. **2004**; 327(6):539-49.

Garcia J.R., Jaumann F., Schulz S., Krause A., Rodriguez-Jimenez J., Forssmann U., Adermann K., Kluver E., Vogelmeier C., Becker D., Hedrich R., Forssmann W.G., Bals R. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction Cell Tissue Res. **2001**, 306, 257-64.

Gary R, Bretscher A. Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins. Proc Natl Acad Sci USA. **1993**; 90(22):10846-50.

Gell PGH, Coombs RRA (**1963**) The classification of allergic reactions underlying disease. Blackwell Science, Oxford.

Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. J Sep Sci **2005**; 28 (14): 1694-1703.

Gobom J, Schuerenberg M, Mueller M, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. Anal Chem **2001**; 73 (3): 434-438.

Gordon S, Hamann J, Lin HH, Stacey M. F4/80 and the related adhesion-GPCRs. Eur J Immunol. **2011**; 41(9):2472-6.

Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics **2004**; 4 (12): 3665-3685.

Grote M. Immunogold electron microscopy of soluble proteins: localization of Bet v I major allergen in ultra-thin sections of birch pollen after anhydrous fixation techniques. J Histochem Cytochem. **1991**; 39(10):1395-401.

Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. Cell Mol Life Sci **2008**, 65, 1957-76.

Guo Y, Kenney SR, Muller CY, Adams S, Rutledge T, Romero E, Murray-Krezan C, Prekeris R, Sklar LA, Hudson LG, Wandinger-Ness A. R-Ketorolac Targets Cdc42 and Rac1 and Alters Ovarian Cancer Cell Behaviors Critical for Invasion and Metastasis. Mol Cancer Ther. **2015**; 14(10):2215-27.

Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol.* **2008**; 8(3):193-204.

Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Biol Chem*, **2008**,12,483-490.

Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J.M. A peptide antibiotic from human skin *Nature.* **1997**, 387, 861.

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, **2003**, 260, 502-508.

Harwig SS, Ganz T, Lehrer RI. Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing. *Methods Enzymol.*, **1994**, 236: 160–172.

He HC, Ling XH, Zhu JG, Fu X, Han ZD, Liang YX, Deng YH, Lin ZY, Chen G, Chen YF, Mo RJ, Zhong WD. Down-regulation of the ErbB3 binding protein 1 in human bladder cancer promotes tumor progression and cell proliferation. *Mol Biol Rep.* **2013**; 40(5):3799-805.

Hernández JL, Padilla L, Dakhel S, Coll T, Hervas R, Adan J, Masa M, Mitjans F, Martinez JM, Coma S, Rodríguez L, Noé V, Ciudad CJ, Blasco F, Messegue R. Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody. *PLoS One.* **2013** ; 8(9):e72480

Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem.* **1981**; 256(15): 7990-7.

Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*, **1991**, 251: 1481-1485.

Hillenkamp F, Peter-Katalinic J. MALDI MS. **2007**, Wiley-Blackwell.

Holm J, Gajhede M, Ferreras M, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, Lund L, Jacobi H, Millner A, Würtzen PA, Spangfort MD. Allergy vaccine engineering: epitope modulation of recombinant Bet v 1 reduces IgE binding but retains protein folding pattern for induction of protective blocking-antibody responses. *J Immunol.* **2004** 15;173(8):5258-67.

Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, Puri A, Oppenheim JJ, Chertov O, Lubkowski J. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem* **2000**; 275: 32911–32918

Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2007**;23:115-45.

Hsiao CC, Chen HY, Chang GW, Lin HH. GPS autoproteolysis is required for CD97 to up-regulate the expression of N-cadherin that promotes homotypic cell-cell aggregation. *FEBS Lett.* 2011; 585(2):313-8.

Hullmann M, Kunkel M, Reichert TE. Diagnostik und Therapie oraler präkanzeröser Läsionen. *Der MKG-Chirurg*, **2010**.1, 7-15.

Humtsoe JO, Liu M, Malik AB, Wary KK. Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Mol Cell Biol.* **2010**; 30(7):1593-606.

Jacques P. [Lysosomes and endocytosis]. *Brux Med* **1966**. 46, 1053-9.

Jaehne M, Roeser K, Jaekel T, Schepers JD, Albert N, Loning T. Clinical and immunohistologic typing of salivary duct carcinoma: a report of 50 cases *Cancer.* **2005**, 103, 2526-33.

Jäkel S, Mingot JM, Schwarzmaier P, Hartmann E, Görlich D. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J.* **2002**; 21(3):377-86.

Janeway CA, Jr. and R. Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* **2002**. 20:197-216.

Jarolim E, Rumpold H, Endler AT, Ebner H, Breitenbach M, Scheiner O, Kraft D. IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy.* **1989** Aug;44(6):385-95.

Jaskolla TW, Lehmann WD, Karas M. 4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**, 105, 12200-12205.

Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. (2004): Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol*, **2003**, 113(5):832-6.

Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem*, **1987**. 59, 2621-2625.

Juraschek R, Dulcks T, Karas M. Nanoelectrospray--more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *J Am Soc Mass Spectrom* **1999**; 10 (4): 300-308.

Kamal AM, Smith SF, De Silva Wijayasinghe M, Solito E, Corrigan CJ. An annexin 1 (ANXA1)-derived peptide inhibits prototype antigen-driven human T cell Th1 and Th2 responses in vitro. *Clin Exp Allergy.* **2001**; 31(7): 1116-25.

Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib.Microbiol.* **2008**, 15:118-146.

Kapp EA, Schutz F, Reid GE, Eddes JS, Moritz RL, O'Hair RA, Speed TP, Simpson RJ. Mining a tandem mass spectrometry database to determine the trends and global factors influencing peptide fragmentation. *Anal Chem* **2003**; 75 (22): 6251-6264.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **1988**; 60 (20): 2299-2301.

Karas M, Gluckmann M, Schafer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* **2000**; 35 (1): 1-12.

Karas M, Kruger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev* **2003**; 103 (2): 427-440.

Kellner R, Lottspeich F, Meyer HE, *Microcharacterization of Proteins*, **1999**, Wiley-VCH Weinheim.

Kesting MR, Loeffelbein DJ, Hasler RJ, Wolff KD, Rittig A, Schulte M, Hirsch T, Wagenpfeil S, Jacobsen F, Steinstraesser L. Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Invest.* **2009** ;27(5):575-81.

Kirsch T, Beevers L. Uncoating of clathrin-coated vesicles by uncoating ATPase from developing peas. *Plant Physiol*, **1993**, 103, 205-12.

Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **1975**; 26 (3): 231-243.

Krause E. Proteomics. In: Offermanns S, Rosenthal W.: *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York **2008**; 2. Edition.

Knochenmuss R. Positive/negative ion ratios and in-plume reaction equilibria in MALDI. *International Journal of Mass Spectrometry* **2008**; 273 (1-2): 84-86.

Körbel S, Büchse T, Prietzsch H, Sasse T, Schümann M, Krause E, Brock J, Bittorf T. Phosphoprotein profiling of erythropoietin receptor-dependent pathways using different proteomic strategies. *Proteomics* **2005**; 5 (1): 91-100.

Kouno T, Mizuguchi M, Sakaguchi M, Makino E, Mori Y, Shinoda H, Aizawa T, Demura M, Huh NH, Kawano K. The structure of S100A11 fragment explains a local structural change induced by phosphorylation. *J Pept Sci.* **2008**; 14(10):1129-38.

Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, Hildesheim A, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Giuliano AR. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2011**. 20, 172-182.

Kwon J, Lee TS, Lee HW, Kang MC, Yoon HJ, Kim JH, Park JH. Integrin alpha 6: a novel therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* **2013**; 43(5):1523-30.

Kuwata H, Yip TT, Yip CL, Tomita M, Hutchens TW. Bactericidal domain of lactoferrin: detection, quantitation, and characterization of lactoferricin in serum by SELDI affinity mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* **1998**; 245(3):764-73.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**; 227 (5259): 680-685.

Lavagni P, Indrigo M, Colombo G, Martegani E, Rosenblum K, Gnesutta N, Zippel R. Identification of novel RasGRF1 interacting partners by large-scale proteomic analysis. *J Mol Neurosci* **2009**; 37 (3): 212-224.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, De-war K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczkzy J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shown-keen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wen-ning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weins-tock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Ded-hia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Ga-lagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Mo-ran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**; 409 (6822): 860-921.

Lang S, Rotter N, Lorenzen A, Ihrler S, Eckel R, Holzel D, Rasp G, Wollenberg B, Sommer K. Salivary gland carcinomas. 1. Epidemiology, etiology, malignancy criteria, prognostic parameters and classification HNO. **2005**, 53, 817-26.

Lehrer RI, Ganz T.: Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.*, **1999**, 11: 23-27.

Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.*, **2002**, 14: 96-102.

Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. "Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis". *Cell Res.* **2007**, 17 (1): 3–14.

Linzmeier RM, Ganz T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in α - and β -defensin regions at 8p22-p23. *Genomics*, **2005**, 86: 423-430.

Liu AY. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, **2002**, 118: 275-281.

Liu Z, Ahn JY, Liu X, Ye K. Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2006**; 103(29):10917-22.

Liu J, Tiefenauer L, Tian S, Nielsen PE, Knoll W. PNA-DNA hybridization study using labeled streptavidin by voltammetry and surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Anal Chem.* **2006**, 78(2):470-6.

Lottspeich F, Zorbas H. *Bioanalytik*, **1998**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin.

Lottspeich F. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* **1999**. 38, 2476-2492.

Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*, 3. Auflage, **2012**, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin.

Lundy FT, Orr DF, Gallagher JR, Maxwell P, Shaw C, Napier SS, Cowan CG, Lamey PJ, Marley JJ. Identification and overexpression of human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in squamous cell carcinomas of the human tongue. *Oral Oncol* **2004**; 40: 139–144

Lyubarskaya YV, Carr SA, Dunnington D, Prichett WP, Fisher SM, Appelbaum ER, Jones CS, Karger BL. Screening for high-affinity ligands to the Src SH2 domain using capillary isoelectric focusing-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Anal Chem.* **1998**; 70(22):4761-70.

Mack LL, Kralik P, Rheude A, Dole M. Molecular Beams of Macroions. II *J Chem Phys*, **1970**, 52, 4977-4985.

Maglio O, Saldanha JW, Vrtala S, Spitzauer S, Valenta R, Pastore A. A major IgE epitope-containing grass pollen allergen domain from Phl p 5 folds as a four-helix bundle. *Protein Eng.* **2002**; 15(8):635-42.

Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* **2000**; 72 (6): 1156-1162.

Mamyrin BA, Karataev, VI, Shmikk DV, Zagulin VA. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov Phys JETP*, **1973**, 37, 45.

Mao D, Douglas DJ. H/D exchange of gas phase bradykinin ions in a linear quadrupole ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom*, **2003**, 14, 85-94.

Marshall JM, Nachmias VT. Cell Surface and Pinocytosis. *J Histochem Cytochem* **1965**, 13, 92-104.

Martinsson H, Yhr M, Enerbäck C. Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Exp Dermatol.* **2005**; 14(3):161-8.

Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*, **2008**. 83, 489-501.

Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB, Jr. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* **1999**;67:2740-5.

Matsuzaki H, Fujimoto T, Tanaka M, Shirasawa S. Tespa1 is a novel component of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes and affects mitochondrial calcium flux. *Biochem Biophys Res Commun.* **2013**; 433(3):322-6.

Meller N, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Del Pozo MA, Schwartz MA. Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat Cell Biol.* **2002**; 4(9):639-47.

Meyer JE, Harder J. Antimicrobial peptides in oral cancer. *Curr Pharm Des* **2007**; 13: 3119–3130.

Mitchell P. Proteomics retrenches. *Nat Biotechnol* **2010**; 28 (7): 665-670.

Mizukawa N, Sawaki K, Nagatsuka H, Kamio M, Yamachika E, Fukunaga J, Ueno T, Takagi S, Sugahara T. Human alpha-and beta-defensin immunoreactivity in oral mucoepidermoid carcinomas. *Anticancer Res.* **2001**; 21(3C):2171-4.

Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J*, **2004**, 377, 1-16.

Mueller SC, Gherzi G, Akiyama SK, Sang QX, Howard L, Pineiro-Sanchez M, Nakahara H, Yeh Y, Chen WT. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem.* **1999**; 274(35):24947-52.

Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT, Becker V, Müller GA, Flad T. Human alpha-defensins HNP-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation. *Am J Pathol.* **2002**; 160(4):1311-24.

Munger JS, Haass C, Lemere CA, Shi GP, Wong WS, Teplow DB, Selkoe DJ, Chapman HA. Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A beta peptides: a distinct role for cathepsin S. *Biochem J.* **1995**; 311 (Pt 1):299-305.

Mygind N, Dahl R, Pedersen S, Thestrup-Pedersen K (**2000**): Allergologie Textbuch und Farbatlas, Bechermünz-Verlag, Augsburg.

Naci D, Aoudjit F. Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways. *Cell Signal.* **2014**; 26(9):2008-15.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Chu CC, Matsumoto H, Hase K, Nagai N, Tanaka T, Miyasaka M, Paul WE, Shinka S. IL-2 inhibits IL-4-dependent IgE and IgG1 production in vitro and in vivo. *Int Immunol.* **1995**; 7(2):259-68.

Neitz S, Jürgens M, Kellmann M, Schulz-Knappe P, Schrader M. Screening for disulfide-rich peptides in biological sources by carboxyamidomethylation in combination with differential matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2001**; 15(17):1586-92.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **1975**; 250 (10): 4007-4021.

Oda T, Kanai Y, Shimoyama Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Hirohashi S. Cloning of the human alpha-catenin cDNA and its aberrant mRNA in a human cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* **1993**; 193(3):897-904.

Palfy R., Gardlik R., Behuliak M., Kadasi L., Turna J., Celec P. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides *Mol Med.* **2009**, 15, 51-9

Pantelis A, Wenghoefer M, Haas S, Merkelbach-Bruse S, Pantelis D, Jepsen S, Bootz F, Winter J. Down regulation and nuclear localization of human beta-defensin-1 in pleomorphic adenomas of salivary glands. *Oral Oncol* **2009**; 45: 526–530

Paraskeva E, Izaurralde E, Bischoff FR, Huber J, Kutay U, Hartmann E, Lührmann R, Görlich D. CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol.* **1999**; 145(2):255-64.

Parker KC, Patterson D, Williamson B, Marchese J, Graber A, He F, Jacobson A, Juhasz P, Martin S. Depth of proteome issues: a yeast isotope-coded affinity tag reagent study. *Mol Cell Proteomics* **2004**; 3 (7): 625-659.

Patton WF. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*, **2000**. 21(6): 1123-44.

Paul W. Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen (Nobel-Vortrag). *Angew Chem*, **1990**, 102, 780-789.

Pawar SC, Demetriou MC, Nagle RB, Bowden GT, Cress AE. Integrin alpha6 cleavage: a novel modification to modulate cell migration. *Exp Cell Res.* **2007**; 313(6):1080-9.

Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling - 50 years and counting. *Trends Biochem Sci* **2005**; 30 (6): 286-290.

Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci.* **2006**; 63(11):1294-313.

Pearse BM. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1976**, 73, 1255-9.

Prussin C, Metcalfe DD IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *JACI*, **2006**, 117:450-6.

Qin J, Wu C. ILK: a pseudokinase in the center stage of cell-matrix adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* **2012**; 24(5):607-13.

Quadroni M, James P. Proteomics and automation. *Electrophoresis.* **1999**; 20(4-5):664-77.

Quadroni M. Specific Detection and Analysis of Phosphorylated Peptides by Mass Spectrometry. *Proteome Research: Mass Spectrometry.* (**2001**). P. James. Berlin, Springer-Verlag. 1: 187 - 206.

Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am. J. Pathol.,* **1998**, 152: 1247-1258.

Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 98 (22): 12527-12531.

Raj PA, Dentino AR. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Letters,* **2002**, 206: 9-18.

Ren JG, Li Z, Crimmins DL, Sacks DB. Self-association of IQGAP1: characterization and functional sequelae. *J Biol Chem.* **2005**; 280(41):34548-57.

Ring J, Fuchs T, Schultze-Weringhaus G (2004): Weißbuch Allergie in Deutschland (2. aktualisierte Auflage), Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft mbH & Co KG München

Robbins CS, Swirski FK. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol.Life Sci.* **2010**, 67:2685-2693.

Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **1984**; 11 (11): 601.

Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Bio-chem* **1992**; 203 (1): 173-179.

Rubin GM. The draft sequences. Comparing species. *Nature* **2001**; 409 (6822): 820-821.

Rudd PM, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry AH, Heberstreit HF, Dwek RA. Glycoproteomics: High Throughput Sequencing of Oligosaccharide Modifications to Proteins. *Proteome Research: Mass Spectrometry.* (**2001**). P. James. Berlin, Springer-Verlag. 1: 207 - 228.

Sacco PA, McGranahan TM, Wheelock MJ, Johnson KR. Identification of plakoglobin domains required for association with N-cadherin and alpha-catenin. *J Biol Chem.* **1995**; 270(34):20201-6.

Salas S, de Pinieux G, Gomez-Brouchet A, Larrousserie F, Leroy X, Aubert S, Decouvelaere AV, Giorgi R, Fernandez C, Bouvier C. Ezrin immunohistochemical expression in cartilaginous tumours: a useful tool for differential diagnosis between chondroblastic osteosarcoma and chondrosarcoma. *Virchows Arch.* **2009**; 454(1):81-7.

Saloga J, Klimek L, Buhl R, Mann W, Knop J, Grabbe S. Allergologie Handbuch. 2. Auflage. **2012**. Stuttgart : Schattauer GmbH,

Sambrook J, Russel DE. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volume 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY **2001**.

Scheich C, Sievert V, Bussow K. An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography. BMC Biotechnol, **2003**, 3, 12.

Schlundt A, Sticht J, Piotukh K, Kosslick D, Jahnke N, Keller S, Schuemann M, Krause E, Freund C. Proline-rich sequence recognition: II. Proteomics analysis of Tsg101 ubiquitin-E2-like variant (UEV) interactions. Mol Cell Proteomics **2009**; 8 (11): 2474-2486.

Schmidt A, Karas M, Dulcks T. Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI? J Am Soc Mass Spectrom **2003**; 14 (5): 492-500.

Schmidt F, Krah A, Schmid M, Jungblut PR, Thiede B. Distinctive mass losses of tryptic peptides generated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight. Rapid Commun Mass Spectrom **2006**; 20 (5): 933-936.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. J. Mol. Medicin, **2005**, 83: 587-595.

Schulze WX, Mann M. A novel proteomic screen for peptide-protein interactions. J Biol Chem **2004**; 279 (11): 10756-10764.

Schwarze SR, Fu VX, Jarrard DF. Cdc37 enhances proliferation and is necessary for normal human prostate epithelial cell survival. Cancer Res. **2003**; 63(15):4614-9.

Scully C, Field JK, Tanzawa H Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. Oral Oncol., **2000**. 36, 256-263.

Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. J Clin Invest, **1985**; 76: 1436–1439.

Semple CA, Gautier P, Taylor K, Dorin JR. The changing of the guard: Molecular diversity and rapid evolution of β -defensins. Mol. Divers.; **2006**, 10: 575-584.

Shestakova T, Zhuravel E, Bolgova L, Zaitsev S, Efanova O, Soldatkina M, Pogrebnoy P. Immunohistochemical analysis of beta-defensin-2 expression in human lung tumors. Exp Oncol. **2010**; 32(4):273-6.

Sick E, Boukhari A, Deramaudt T, Rondé P, Bucher B, André P, Gies JP, Takeda K. Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway. Glia. **2011**; 59(2):308-19.

Soruri A, Grigat J, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J. beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. Eur J Immunol **2007**; 37: 2474

Steinberg TH, Jones LJ, Haugland RP, Singer VL. SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem.* **1996**; 239(2):223-37.

Steinstraesser L., Koehler T., Jacobsen F., Daigeler A., Goertz O., Langer S., Kesting M., Steinau H., Eriksson E., Hirsch T. Host defense peptides in wound healing *Mol Med.* 14, **2008**, 528-37

Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, mei Ho S, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **2006**; 66: 8542–8549

Sundler F, Hakanson R., Peptide hormone-producing endocrine/paracrine cells in the gastroenteropancreatic region. *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* Vol. 6. , **1988**, The Peripheral Nervous System. A. Bjorklund, T. Hokfelt, C. Owman Elsevier Science Pub.

Syrigos KN, Karachalios D, Karapanagiotou EM, Nutting CM, Manolopoulos L, Harrington KJ. Head and neck cancer in the elderly: an overview on the treatment modalities. *Cancer Treat Rev*, **2009**. 35, 237-245.

Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, **2005**. 59-66.

Taketomi EA, Sopenete MC, de Sousa Moreira PF, de Assis Machado Vieira F. Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Braz J Otorhinolaryngol.* **2006**; 72(4):562-7.

Tacke F, Randolph G J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, **2006**, 211:609-618.

Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**; 2 (8): 151-153.

Tolmachev AV, Udseth HR, Smith RD. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2000**, 14, 1907-1913.

Valenta R, Vrtala S, Ebner C, Kraft D, Scheiner O. Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* **1992**; 97(4):287-94.

Valenta R, Kraft D. Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation. *Immunol Rev.* **2001**; 179:119-27.

Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood*, **1992**, 79, 1538-1544

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J,

McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Camin-ha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dom-broski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* **2001**; 291 (5507): 1304-1351.

Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci.* **2002**; 964:47-68.

Vogl T, Eisenblätter M, Völler T, Zenker S, Hermann S, van Lent P, Faust A, Geyer C, Petersen B, Roebrock K, Schäfers M, Bremer C, Roth J. Alarmin S100A8/S100A9 as a biomarker for molecular imaging of local inflammatory activity. *Nat Commun.* **2014**; 5:4593.

von Rechenberg M, Blake BK, Ho YS, Zhen Y, Chepanoske CL, Richardson BE, Xu N, Kery V. Ampicillin/penicillin-binding protein interactions as a model drug-target system to optimize affinity pull-down and mass spectrometric strategies for target and pathway identification. *Proteomics* **2005**; 5 (7): 1764-1773.

Vorm O, Roepstorff P, and Mann M. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Anal Chem.* **1994**, 66, 3281-3287.

Voss A, Bode G, Sopalla C, Benedyk M, Varga G, Böhm M, Nacken W, Kerkhoff C. Expression of S100A8/A9 in HaCaT keratinocytes alters the rate of cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* **2011**; 585(2):440-6.

Wagstaff KM, Jans DA. Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic.* **2009**; 10(9):1188-98.

Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ, Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**; 44 (45): 7342-7372.

Washburn MP, Wolters D, Yates JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **2001**; 19 (3): 242-247.

Weber A., Langhanki L., Schutz A., Gerstner A., Bootz F., Wittekind C., Tannapfel A. Expression profiles of p53, p63, and p73 in benign salivary gland tumors *Virchows Arch.* **2002**, 441, 428-36.

Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Götz W, Reich R, Berg´e S, Martini M, Allam JP, Jepsen S, Merkelbach-Bruse S, Fischer HP, Novak N, Winter J. Nuclear hBD1 accumulation in malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer*, **2008a**; 8: 290

Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Reich R, Martini M, Allam JP, Novak N, Berg´e S, Jepsen S, Winter J. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **2008b**; 37: 660–663

Wilde CG, Griffith JE, Marra MN, Snable JL, Scott RW. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem* **1989**; 264: 11200–11203.

Wilhelmsen K, Copp J, Glenn G, Hoffman RC, Tucker P, van der Geer P. Purification and identification of protein-tyrosine kinase-binding proteins using synthetic phosphopeptides as affinity reagents. *Mol Cell Proteomics* **2004**; 3 (9): 887-895.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteomes to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*. **1996**; 14(1):61-5.

Wilm MS, Mann M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1994**; 136 (2-3): 167-180.

Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **1996**; 68 (1): 1-8.

Willner I, Katz E. *Bioelectronics*, VCH Weinheim **1999**, 5.

Winter J, Pantelis A, Reich R, Martini M, Kraus D, Jepsen S, Allam JP, Novak N, Wenghoefer M. Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *Cancer Invest.*, **2011** ;29(3):196-201.

Winter J, Mohr S, Pantelis A, Kraus D, Allam JP, Novak N, Reich R, Martini M, Jepsen S, Götz W, Wenghoefer M. IGF-1 deficiency in combination with a low basic hBD2 and hBD3 gene expression might counteract malignant transformation in pleomorphic adenomas in vitro. *Cancer Invest.* **2012a**; 30(2):106-13.

Winter J, Pantelis A, Kraus D, Reckenbeil J, Reich R, Jepsen S, Fischer HP, Allam JP, Novak N, Wenghoefer M. Human α -defensin (DEFA) gene expression helps to characterise benign and malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer.* **2012b**; 12:465.

Würtzen PA, Bufe A, Wissenbach M, Madsen HO, Ipsen H, Arnved J, Van Neerven RJ. Identification of isoform-specific T-cell epitopes in the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5. *Clin Exp Allergy.* **1999**; 29(12):1614-25.

Yamashita M, Fenn JB. Electro spray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J Phys Chem,* **1984**, 88, 4459-4465.

Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.,* **2002**, 23: 291-296.

Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol.* **2004**;22:181-215.

Yang L, Hu B, Zhang Y, Qiang S, Cai J, Huang W, Gong C, Zhang T, Zhang S, Xu P, Wu X, Liu J. Suppression of the nuclear transporter-KPN β 1 expression inhibits tumor proliferation in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* **2015**; 32(4):128.

Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **2002**; 12(1):9-18.

Ziegler-Heitbrock L, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. Macpherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, M. B. Lutz. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood,* **2010**, 116:e74-e80.

Zygiogianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Psyrris A, Kouvaris J, Kelekis N, Kouloulis V. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. *Head Neck Oncol* , **2011**, 3, 2.

10 Publikationen

Murmann T, Carrillo-García C, Veit N, Courts C, Glassmann A, Janzen V, Madea B, **Reinartz M**, Harzen A, Nowak M, Perner S, Winter J, Probstmeier R. **Staurosporine and extracellular matrix proteins mediate the conversion of small cell lung carcinoma cells into a neuron-like phenotype.** PLoS One. 2014; 9(2): e86910.

Dommisch H, **Reinartz M**, Backhaus T, Deschner J, Chung W, Jepsen S. **Antimicrobial responses of primary gingival cells to Porphyromonas gingivalis.** J Clin Periodontol. 2012; 39(10): 913-22.

Schaefer AS, Richter GM, Dommisch H, **Reinartz M**, Nothnagel M, Noack B, Laine ML, Folwaczny M, Groessner-Schreiber B, Loos BG, Jepsen S, Schreiber S. **CDKN2BAS is associated with periodontitis in different European populations and is activated by bacterial infection.** J Med Genet. 2011; 48(1): 38-47.

Allam JP, Würtzen PA, **Reinartz M**, Winter J, Vrtala S, Chen KW, Valenta R, Wenghoefer M, Appel T, Gros E, Niederhagen B, Bieber T, Lund K, Novak N. **Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-beta1 and IL-10-producing properties.** J Allergy Clin Immunol. 2010; 126(3): 638-45.

Publikation der Diplomarbeit:

Hufbauer M, Lazić D, **Reinartz M**, Akgül B, Pfister H, Weissenborn SJ. **Skin tumor formation in human papillomavirus 8 transgenic mice is associated with a deregulation of oncogenic miRNAs and their tumor suppressive targets.** J Dermatol Sci. 2011; 64(1): 7-15.

11 Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Diana Imhof für die Begutachtung der Arbeit, sowie der Bereitschaft diese Dissertation vor der Fachgruppe Pharmazie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zu vertreten.

Herrn PD Dr. Jochen Winter möchte ich für die Überlassung des interessanten Defensin Themas und seiner andauernden Unterstützung danken. Für seine stete Diskussionsbereitschaft, die guten Ratschläge, sowie für die gewährten Freiheiten im Zuge der Arbeit bin ich sehr dankbar.

Frau Prof. Dr. Natalija Novak danke ich für die Überlassung des interessanten Allergie Themas sowie ihrer Unterstützung.

Herrn PD Dr. Dr. Matthias Wenghoefer danke ich für die Förderung des Defensin Themas dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. Jürgen Schmidt vom Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung für die Möglichkeit die Protomics-Messungen in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Dr. Thomas Colby für die Einführung und Anleitung dieser Methodik und der zugehörigen Bioinformatik, und die stete Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei diversen Fragen. Anne Harzen danke ich für die Einweisung in die Tiefen der proteomischen Probenaufarbeitung.

Den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors für Immunbiologie gilt mein besonderer Dank dafür, dass sie das Arbeiten in der Gruppe so angenehm gestalteten und immer für Diskussionen offen waren: Nils Schoof, Juana Alica Hart und Mareike Borstar.

Die Arbeit wurde im Rahmen von TP10 in der von der DFG und der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn geförderten Klinischen Forschergruppe KFO 208 sowie vom SFB 704 durchgeführt. Ich danke der DFG und der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Obwohl nicht in diese Arbeit eingegangen, möchte ich auch Dr. Marianne Engeser für das Wiederbeleben des Interesses an der chemischen Analytik im speziellen an der Massenspektrometrie danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Diana, Dominik und Lina, die mir fachlich, seelisch und moralisch zur Seite gestanden haben, sowie bei Tjarko, Tanja, Milian, Maray und Matheo für ruhige Momente außerhalb der Institute.

Meiner Familie möchte ich von Herzen dafür danken, dass sie mich immer unterstützt hat.