



AUS DEM INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE  
FRAU PROFESSOR DR. D. MÄNNEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Funktionelle Charakterisierung von  
Maus-beta-Defensin 14 (mBD14)  
in Entzündungsreaktionen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Biomedizinischen Wissenschaften

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Nicola Barabas

2012

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2009 bis Oktober 2012 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Thomas Hehlhans am Institut für Immunologie der Universität Regensburg.

**Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:**

05. Oktober 2012

**Die Arbeit wurde angeleitet von:**

Betreuer: Professor Dr. Thomas Hehlhans

1. Mentor : PD Dr. Wulf Schneider

2. Mentorin: Professorin Dr. Daniela Männel

Dekan: Professor Dr. Dr. Torsten E. Reichert

**Tag der mündlichen Prüfung:**

11. Dezember 2012

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Nicola Barabas, geboren am 15.10.1984 in Rosenheim, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 04.10.2012

---

Nicola Barabas

---

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung .....	1
1.1. Einführung in das Immunsystem.....	1
1.2. Die Entzündungsreaktion .....	2
1.3. Wichtige Signalwege in der Vermittlung einer Entzündungsreaktion.....	3
1.3.1. Der TLR-vermittelte Signalweg .....	3
1.3.2. Der G Protein-gekoppelte Rezeptor (GPCR)-vermittelte Signalweg.....	4
1.4. Antimikrobielle Peptide und die Familie der Defensine .....	6
1.5. Antimikrobielle Aktivität von Defensinen .....	9
1.6. Immunmodulatorische Funktionen von $\beta$ -Defensinen .....	10
1.6.1. Pro-inflammatorische Wirkung von $\beta$ -Defensinen .....	10
1.6.2. Anti-inflammatorische Wirkung von $\beta$ -Defensinen.....	11
1.7. Einfluss von $\beta$ -Defensinen auf das Tumorstadium.....	12
1.8. Ziel der Arbeit .....	12
2. Material und Methoden .....	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Geräte.....	14
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3. Chemikalien, Medien und Reagenzien.....	16
2.1.4. Puffer und Lösungen .....	19
2.1.5. Kits .....	22
2.1.6. Enzyme .....	23
2.1.7. Oligonukleotide .....	23
2.1.8. Peptide .....	24
2.1.9. Plasmide .....	24
2.1.10. Sonden .....	24
2.1.11. Antikörper.....	24
2.1.12. Zelllinien.....	25
2.1.13. Versuchstiere .....	25
2.1.14. Software und Internet-Ressourcen .....	25
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.1. Isolation genomischer DNA .....	26
2.2.2. Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen.....	26
2.2.3. Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebe.....	26

---

2.2.4. Vermessung von DNA und RNA .....	27
2.2.5. Reverse Transkription .....	27
2.2.6. Restriktionsverdau .....	28
2.2.7. Southern Blot .....	29
2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
2.2.9. Quantitative Real-Time PCR (qPCR) .....	31
2.3. Proteinbiochemische Methoden .....	32
2.3.1. Isolation von Proteinextrakten.....	32
2.3.2. Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose und Proteinaufreinigung .....	32
2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	33
2.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.3.5. Western Blot .....	34
2.3.6. Coomassie-Färbung .....	35
2.3.7. Dot Blot .....	35
2.3.8. Bestimmung des Nitrit-Gehalts .....	36
2.3.9. Bestimmung der MPO-Aktivität in Kolon-Gewebe.....	36
2.3.10. „Enzyme linked immunosorbend assay“ (ELISA).....	37
2.4. Zellbiologische Methoden .....	38
2.4.1. Zellkulturbedingungen.....	38
2.4.2. Expression von mBD14:Ig mittels <i>Drosophila</i> -Schneider 2 Zellen.....	38
2.4.3. Expression des Kontrollpeptids SIg+ in HEK 293-Zellen .....	39
2.4.4. Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	39
2.4.5. Bestimmung der Lebendzellzahl .....	39
2.4.6. Generierung von <i>bone marrow derived macrophages</i> (BMDM).....	40
2.4.7. Generierung von <i>bone marrow derived dendritic cells</i> (BMDC).....	41
2.4.8. Isolierung von Milzzellen.....	41
2.4.9. Isolierung und Diff-Quick-Färbung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PECs)....	42
2.4.10. Stimulierungen .....	42
2.4.10.1. Stimulierungen zur Analyse der Zytokin-Produktion in der mBD14:Ig transgenen Maus .....	42
2.4.10.2. Stimulierung des Inflammasoms .....	43
2.4.10.3. Vorstimulierung mit Defensinen .....	43
2.4.10.4. Einsatz verschiedener Inhibitoren .....	44
2.4.10.5. Stimulierung von PECs .....	44

---

2.4.10.6. Stimulierung von Milzzellen für eine intrazelluläre TNF-Färbung.....	45
2.4.11. MACS-Separation .....	45
2.4.12. Durchflusszytometrie .....	45
2.4.13. Intrazelluläre TNF-Färbung.....	46
2.5. Histologische Methoden .....	47
2.5.1. Vorbereiten und Färben histologischer Schnitte .....	47
2.5.2. Bestimmung des histologischen Scores.....	47
2.5.3. Histologische Färbung von mBD14:Ig.....	48
2.6. Tierexperimentelle Methoden .....	48
2.6.1. Tierhaltung .....	48
2.6.2. Serumgewinnung .....	49
2.6.3. Induktion von PECs.....	49
2.6.4. <i>Intravenöse</i> LPS-Gabe für die intrazelluläre TNF-Färbung.....	49
2.6.5. <i>In vivo</i> -Stimulierung mit LPS oder CpG .....	49
2.6.6. <i>In vivo</i> -Vorstimulierung mit hBD2 .....	50
2.6.7. Induktion einer akuten DSS-induzierten Colitis.....	50
2.7. Statistik.....	51
3. Ergebnisse.....	52
3.1. Charakterisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie .....	52
3.1.1. Nachweis des mBD14:Ig-Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene .....	53
3.1.2. Nachweis des mBD14:Ig-Transgens auf Protein-Ebene .....	54
3.1.3. <i>In vitro</i> -Phänotypisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie .....	55
3.1.3.1. Untersuchung der TNF-Produktion nach TLR-Stimulierung von BMDM sowie BMDC .....	55
3.1.3.2. Untersuchung der TNF- und NO-Produktion von Peritonealexsudatzellen (PECs).....	56
3.1.3.3. Analyse der Zellzusammensetzung von PECs .....	57
3.1.3.4. Analyse des Aktivierungsstatus von BMDM.....	58
3.1.4. <i>In vivo</i> -Phänotypisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie .....	59
3.1.4.1. Analyse der TNF-Produktion nach i.p. Injektion von LPS oder CpG.....	59
3.1.4.2. Bestimmung der intrazellulären TNF-Konzentration nach i.v. Injektion von LPS .....	59
3.1.4.3. Untersuchung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis.....	61

---

3.2. Immunregulatorische Funktion von mBD14.....	62
3.2.1. Analyse des pro-inflammatorischen Effekts von mBD14.....	63
3.2.2. Analyse der mBD14-induzierten Signalwege .....	68
3.2.2.1. Untersuchung der Interaktion des mBD14 mit <i>Toll like</i> Rezeptoren (TLRs) .....	68
3.2.2.2. Untersuchung der Interaktion von mBD14 mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	69
3.2.2.3. Analyse möglicher Interaktionspartner von mBD14.....	72
3.2.3. Analyse der Aktivierung von BMDM durch mBD14 .....	75
3.2.4. <i>In vivo</i> -Analyse des pro-inflammatorischen Effekts von Defensinen.....	77
4. Diskussion .....	79
4.1. Charakterisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie .....	79
4.1.1. Nachweis des mBD14:Ig-Transgens .....	79
4.1.2. Phänotypisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie.....	79
4.2. Immunregulatorische Funktion von mBD14.....	82
4.2.1. mBD14-vermittelter pro-inflammatorischer Effekt.....	82
4.2.2. Induktion des G Protein-gekoppelten Signalwegs durch mBD14.....	84
4.2.3. Aktivierung von Makrophagen durch mBD14.....	86
4.2.4. Modell der pro-inflammatorischen Wirkung von mBD14.....	87
5. Zusammenfassung .....	89
6. Abbildungsverzeichnis .....	91
7. Literaturverzeichnis .....	93
8. Anhang .....	105
9. Danksagung .....	106

**Abkürzungsverzeichnis**

AP	alkalische Phosphatase
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cell</i>
BMDM	<i>bone marrow derived macrophage</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
CpG	CpG-Oligonukleotid (20mer)
d	Tag
dd	bidestilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSS	Dextransulfat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbend assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
F <sub>c</sub>	<i>crystallisable fragment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
FPRL-1	<i>formyl peptide receptor-like 1</i>
g	Gravitation
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor

---

h	Stunde
hBD2	human $\beta$ -Defensin 2
hBD3	human $\beta$ -Defensin 3
hIgG	human Immunglobulin G
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
I $\kappa$ B	<i>inhibition of <math>\kappa</math>B</i>
IL	Interleukin
i.m.	<i>intramuskulär</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IRAK	<i>IL-1 receptor associated kinase</i>
i.v.	<i>intravenös</i>
IVC	<i>isolated ventilated cage</i>
kb	Kilobasen
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliamper
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
mBD14	Maus $\beta$ -Defensin 14
mBD4	Maus $\beta$ -Defensin 4
MCP-1	<i>macrophage/monocyte chemotactic protein 1</i>
MDP	Muramyl-Dipeptid
Mek	<i>mitogen activated protein kinase/Erk kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MPO	myeloide Peroxidase
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene</i> 88
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumvanadat
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
ng	Nanogramm

---

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
pA	poly A
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-Propyl]-[R]-Cysteinyl-[S]-Seryl-[S]-Lysyl-[S]-Lysyl-[S]-Lysyl-[S]-Lysin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEC	<i>peritoneal exsudate cell</i>
PEI	Polyethylenimin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
poly I:C	Polyinosin:Polycytidin-Säure
P/S	Penicillin / Streptomycin
PTX	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative Real-Time PCR
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	<i>subcutan</i>
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SOS	<i>son of sevenless</i>

---

<i>Src-like</i>	<i>sarcoma-like</i>
tg	transgen
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF-R-associated factor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing IFN<math>\beta</math></i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ M	Micromolar = micromol/Liter
$\mu$ m	Micrometer
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

## **1. Einleitung**

### **1.1. Einführung in das Immunsystem**

Säugetieren besitzen ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem. Im Zuge der angeborenen Immunantwort verhindern zunächst physische und chemische Barrieren z.B. epitheliale Grenzflächen und von Epithelzellen produzierte antimikrobielle Substanzen ein Eindringen von Pathogenen in den Organismus. Des Weiteren können Phagozyten wie Neutrophile und Makrophagen Pathogene aufnehmen und eliminieren. Ferner sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in der Lage Pathogene direkt zu zerstören. Verschiedene Proteine im Blut wie Mitglieder des Komplementsystems sorgen ebenfalls für eine direkte Bekämpfung von Mikroben, während Zytokine für eine weitere Aktivierung und Regulation verschiedener Immunzellen verantwortlich sind. Die angeborene Immunantwort reagiert innerhalb von Stunden auf eindringende Pathogene. Dabei können die Zellen Pathogene anhand gemeinsamer Muster, so genannter PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), mittels *Toll like* Rezeptoren (TLRs) erkennen und unterscheiden.

Dem gegenüber steht das adaptive Immunsystem, das sich vor allem durch seine besondere Spezifität und das immunologische Gedächtnis auszeichnet. Es besteht aus T- und B-Lymphozyten. T-Zellen vermitteln die zelluläre Immunantwort und lassen sich in T<sub>Helfer</sub>-Zellen und zytotoxische T-Zellen untergliedern. Erstere aktivieren weitere Zellen des Immunsystems durch Produktion von Zytokinen, während zytotoxische T-Lymphozyten direkt Zellen erkennen und eliminieren können. B-Lymphozyten dagegen sind die Antikörperproduzenten eines Organismus und vermitteln somit die humorale Immunantwort. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem reagieren Zellen der adaptiven Immunität erst nach frühestens zwölf Stunden. Dafür können sie auf Grund der T- und B-Zell-Rezeptoren sogar nah verwandte Mikroben und Moleküle unterscheiden. Darüber hinaus werden nach einer erstmaligen Infektion Gedächtniszellen gebildet, die bei einem erneuten Kontakt mit dem Pathogen zu einer schnelleren und deutlich verstärkten Immunreaktion führen.

Das angeborene und das adaptive Immunsystem sind eng miteinander verknüpft. Zum einen führt die angeborene Immunantwort gegen Pathogene zur Induktion des adaptiven Immunsystems z.B. durch die Produktion verschiedener Zytokine und durch die Präsentation von Antigenen an Zellen der adaptiven Immunantwort. Abhängig von dem Zytokinprofil oder dem Antigen-präsentierenden Rezeptor wird die nachfolgende adaptive Immunreaktion gesteuert. Zum anderen nutzen und verstärken Zellen der adaptiven Immun-

antwort Mechanismen des angeborenen Immunsystems, z.B. durch weitere Stimulierung von Makrophagen.

Somit stellt das Immunsystem ein fein reguliertes Netzwerk verschiedener Komponenten dar, das eine effektive Abwehr eindringender Pathogene gewährleistet. (Abbas, 2005)

## **1.2. Die Entzündungsreaktion**

Als Entzündung wird die frühe lokale Reaktion des angeborenen Immunsystems bezeichnet, während der Leukozyten zur Infektionsstelle rekrutiert und aktiviert werden (Abbas, 2005). Die Entzündungsreaktion ist für die Eliminierung eindringender Pathogene, die Beseitigung beschädigter Strukturen und Zellen sowie die Wiederherstellung von Gewebefunktionen zuständig. Damit besitzt sie eine Schlüsselfunktion im Erhalt der Gewebshomöostase (Henson, 2005). Als Antwort auf Pathogene wird eine Entzündungsreaktion durch Zytokine wie TNF oder IL-1 $\beta$ , durch Chemokine sowie durch Defensine initiiert, die die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten bewirken. Zytokine, aber auch mikrobielle Bestandteile wie LPS stimulieren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die wiederum Blutleukozyten binden und deren Einwanderung in das entzündete Gewebe induzieren können. Darüber hinaus tragen auch Komplementfaktoren wie C5q und Lipidfaktoren wie Leukotrien B<sub>4</sub> zur Migration und Aktivierung von Leukozyten bei. Zunächst wandern hauptsächlich Neutrophile in das entzündete Gewebe ein, werden jedoch mit der Zeit auf Grund ihrer geringen Lebensdauer und veränderter Chemokinprofile durch später rekrutierte monozytäre Zellen myeloiden Ursprungs ersetzt. Die Phagozyten werden anschließend hauptsächlich durch mikrobielle Produkte und von NK-Zellen produziertem IFN $\gamma$  aktiviert, um die eingedrungenen Pathogene zu phagozytieren und so zu eliminieren. Dabei erkennen Neutrophile und Makrophagen Mikroben hauptsächlich durch die Opsonisierung der Pathogene z.B. durch Antikörper, Komplementproteine oder Lektine. Die anschließend phagozytierten Pathogene werden durch mikrobizide Moleküle wie ROS (*reactive oxygen species*) oder Stickstoffmonoxyd (NO) zerstört. Phagozyten identifizieren Mikroorganismen auch auf Grund von PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Letztere binden an *Toll like* Rezeptoren (TLRs) auf der Oberfläche der Phagozyten und induzieren spezifische Signalkaskaden, die jedoch nicht zur Phagozytose sondern zu einer weiteren Aktivierung des Immunsystems führen. Eine große Rolle spielen dabei Zytokine wie IL-12, die NK-Zellen und T-Zellen aktivieren können. (Abbas, 2005)

In der Regel verursacht eine Entzündungsreaktion nur sehr geringe Schäden. In manchen Fällen kommt es jedoch zu einer überschießenden Immunreaktion, die zu ernsthaften Gewebsschädigungen, Multiorganversagen oder sogar zum Tod führen kann. Auch chronische Erkrankungen und Autoimmunkrankheiten zählen zu den Folgen unkontrollierter Entzündungsreaktionen. Daher ist eine präzise Regulation der Immunreaktion notwendig, die nach einer Eliminierung des initialen Stimulus, die pro-inflammatorische Mediatoren, die Entzündungszellen und den verbleibenden Zelldebris beseitigt (Henson, 2005).

### **1.3. Wichtige Signalwege in der Vermittlung einer Entzündungsreaktion**

#### **1.3.1. Der TLR-vermittelte Signalweg**

*Toll like* Rezeptoren (TLRs) erkennen verschiedene pathogene Muster wie Lipopolysaccharide, CpG-Motive der DNA oder doppelsträngige RNA. Neben diesen TLR-Agonisten sind auch Defensine in der Lage, über TLR4 oder TLR1/2 Antigen-präsentierende Zellen zu aktivieren (Birygyn et al., 2002; Funderburg et al., 2007). Bisher konnten elf Mitglieder der TLR-Familie identifiziert werden, wobei TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 auf der Zelloberfläche, TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 dagegen in endosomal/lysosomalen Kompartimenten lokalisiert sind (Abb. 1). Die meisten TLRs bilden Homodimere, wohingegen TLR1/2 und TLR2/6 heterodimerisieren. Die Interaktion des Liganden mit einem TLR führt zur Anlagerung eines zytoplasmatischen Adapterproteins an die TIR (*Toll/IL-1 receptor*)-Domäne des TLR. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), bei TLR3 dagegen um TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing IFN $\beta$* ). Anschließend erfolgt die Rekrutierung von IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*), die nach einer Autophosphorylierung von MyD88 dissoziiert und TRAF6 (*TNF-R-associated factor-6*) aktiviert. TRAF6 wiederum induziert die I $\kappa$ B (*inhibition of  $\kappa$ B*)-Signalkaskade, die zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) führt. In einigen Fällen kann stattdessen auch die MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Kaskade induziert werden, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (*activator protein-1*) führt. Dadurch werden unter anderem verschiedene inflammatorische Zytokine, aber auch Adhäsionsmoleküle exprimiert. (Abbas, 2005; Beutler, 2004; www.cellsignal.com, 2012)

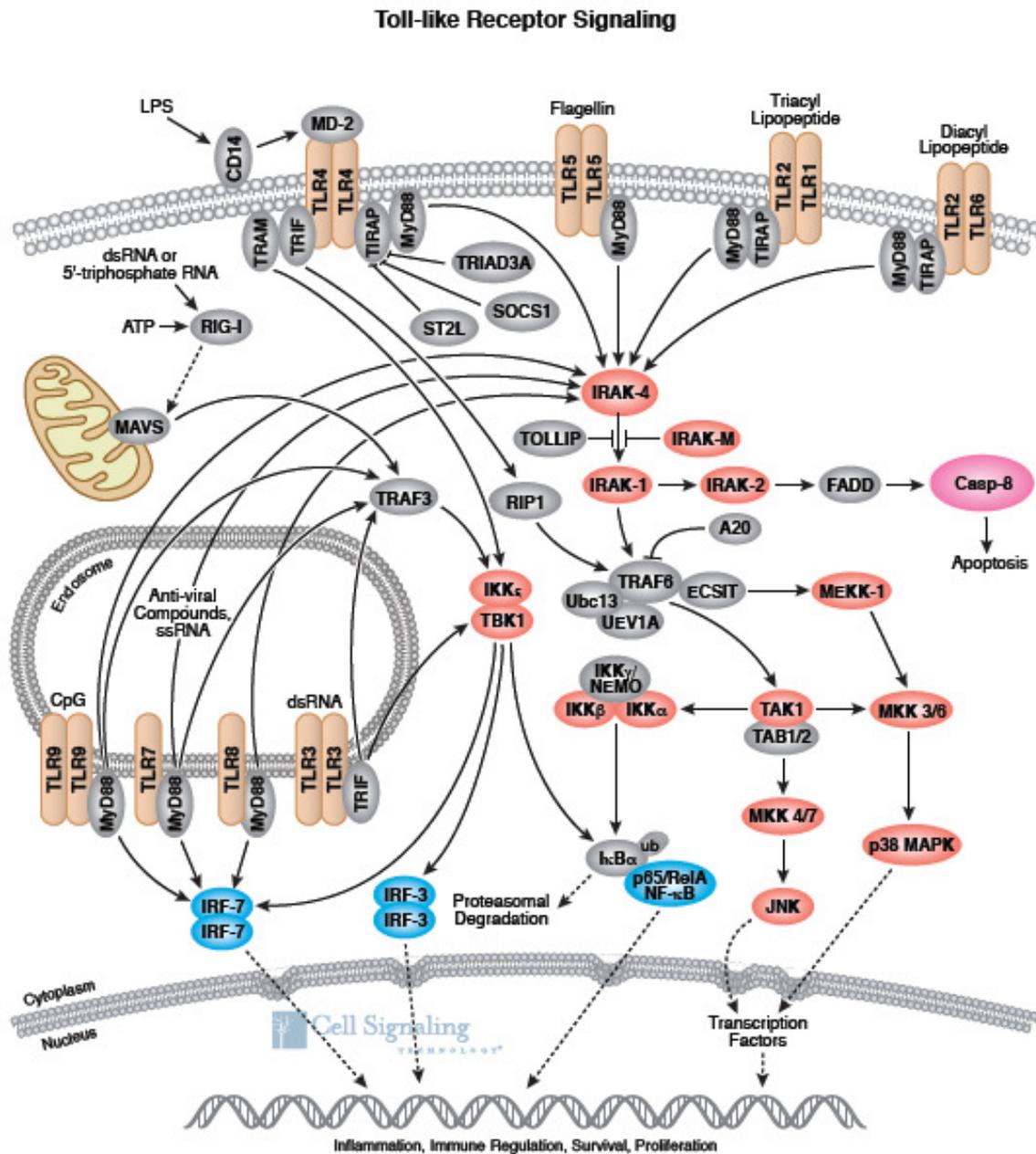


Abb. 1: Toll like Rezeptor-vermittelter Signalweg.

(www.cellsignal.com, 2012)

### 1.3.2. Der G Protein-gekoppelte Rezeptor (GPCR)-vermittelte Signalweg

G Protein-gekoppelte Rezeptoren sind in eine Vielzahl biologischer Funktionen wie Foto- und Chemorezeption, Exozytose, Chemotaxis sowie der Kontrolle des Blutdrucks oder der Funktion der Blutplättchen involviert. Auch eine Defensin-induzierte Chemotaxis von Immunzellen beruht auf der Interaktion mit einem GPCR. Ebenso vielfältig sind die Signalwege, die auf die Stimulierung eines GPCR folgen. Grundsätzlich handelt es sich bei GPCRs um sieben-Transmembran-Rezeptoren, die nach Aktivierung an ein heterotrimäres

G Protein binden, das aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit besteht. Dies führt zu einem Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des G Proteins und damit zu einer Dissoziation der  $\alpha$ - von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Bisher sind etwa 20 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten beschrieben, die sich auf Grund von Sequenzähnlichkeiten in vier Familien unterteilen lassen:  $G_i$ ,  $G_q$ ,  $G_s$  und  $G_{12}$ . Dabei reguliert jede  $\alpha$ -Untereinheit die Aktivität mehrerer sekundärer Botenstoffe. Für diese Arbeit ist hauptsächlich der für eine Chemotaxis verantwortliche  $G_i$ -vermittelte Signalweg von Interesse, der im Folgenden genauer charakterisiert wird. Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit können über verschiedene Signalwege eine MAPK-Kaskade initiieren (Abb. 2). Die  $\alpha$ -Untereinheit nutzt dabei häufig die Proteinkinasen A und C (PKA und PKC), die bei  $G_s$  und  $G_q$  Protein-gekoppelten Rezeptoren eine Rolle spielen. Die dissoziierte  $\beta\gamma$ -Untereinheit dagegen kann die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) aktivieren. Dies führt über *Src-like (sarcoma-like)* Kinasen und SOS (*son of sevenless*) zu einer Aktivierung der GTPase Ras (*rat sarcoma*), die wiederum die MAP3K Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) phosphoryliert. Diese phosphoryliert die MAP2K Mek1/2 (*mitogen activated protein kinase/Erk kinase*), die daraufhin die MAPK Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) aktiviert. Erk1/2 kann anschließend in den Nukleus wandern und dort Transkriptionsfaktoren aktivieren.

Auch die G Protein-gekoppelte Signalkaskade unterliegt einer präzisen Regulierung. So führt z.B. die Interaktion eines Liganden mit einem GPCR zur Internalisierung des Rezeptors über Moleküle wie  $\beta$ -Arrestin oder Dynamin. (Seger et al., 1995; Gutkind, 2000; Knippers, 2006)

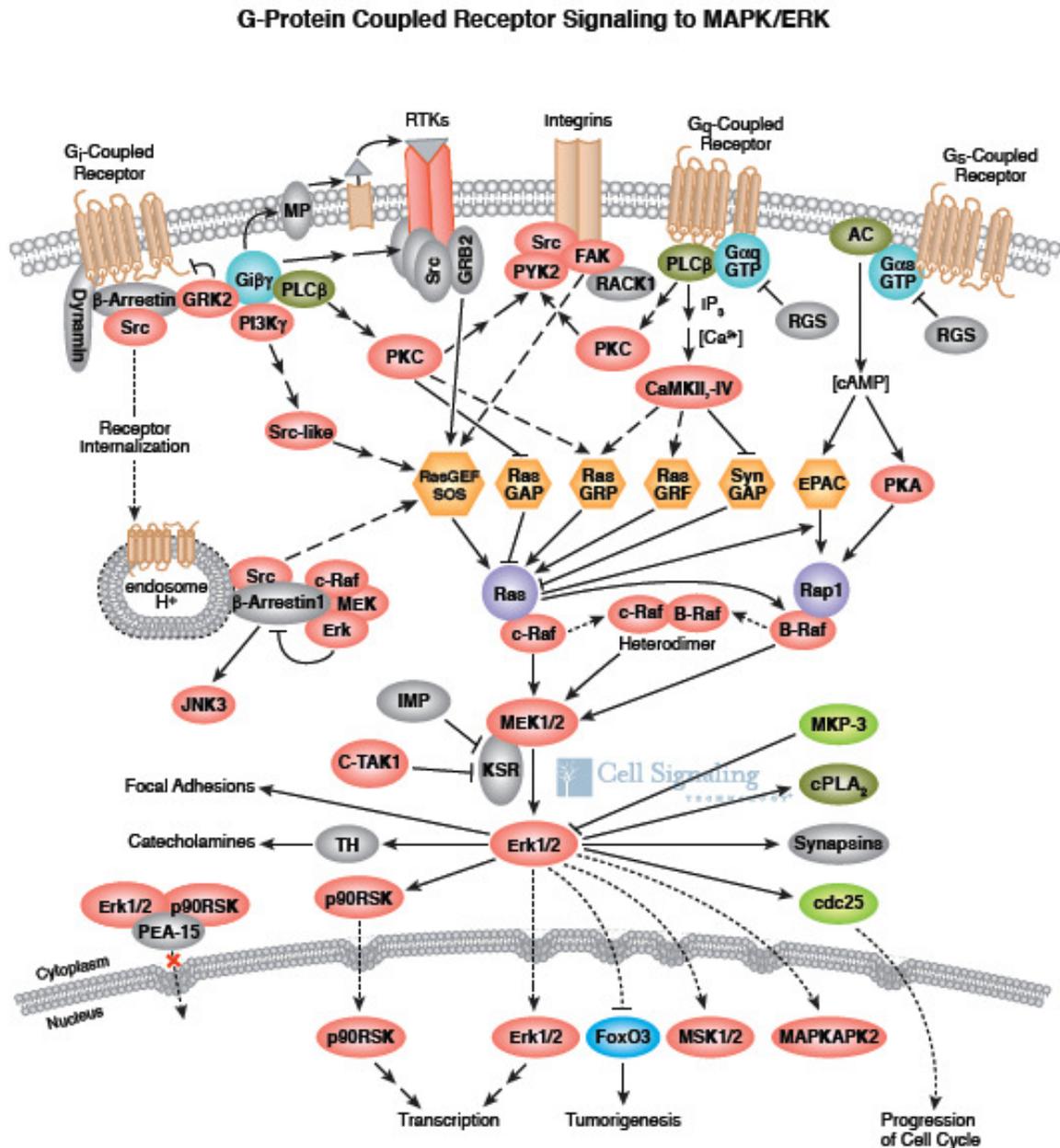


Abb. 2: G Protein-gekoppelter Rezeptor-vermittelter Signalweg. (www.cellsignal.com, 2012)

### 1.4. Antimikrobielle Peptide und die Familie der Defensine

Alle Lebewesen sind täglich einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen ausgesetzt. Neben epithelialen Barrieren wie der Haut und den Schleimhäuten bieten antimikrobielle Peptide einen effektiven Schutz vor eindringenden Bakterien, Viren und Pilzen (McCormick et al., 2000). Bisher sind über 400 antimikrobielle Peptide verteilt auf alle mehrzelligen Organismen wie Pilze, Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten nachgewiesen (Hoffmann et al., 1999), wobei im Jahr 1981 Cecropin A und B aus Motten als erste Vertreter dieser Fa-

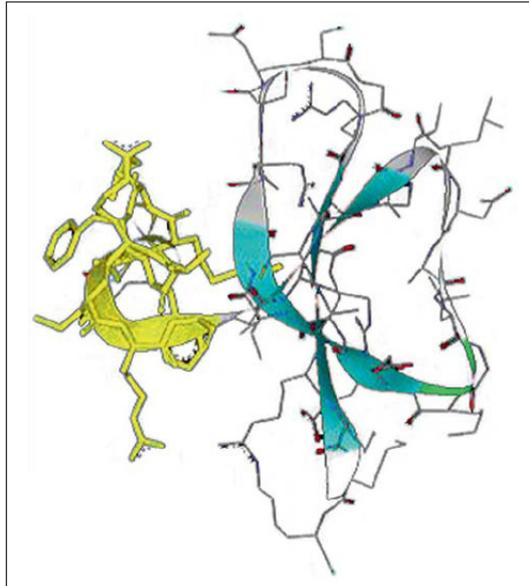
milie identifiziert wurden (Steiner et al., 1981). Die ersten beschriebenen Defensine waren die  $\alpha$ -Defensine HNP1-3 des Menschen (Ganz et al., 1985). Defensine lassen sich entsprechend ihrer genomischen Organisation und der unterschiedlichen Disulfidbrückenbindungen in  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\theta$ -Defensine unterteilen (Yang et al., 2004). Die  $\beta$ -Defensine stellen hierbei evolutionsgeschichtlich die älteste Gruppe dar, deren verwandte Formen in allen mehrzelligen Organismen vertreten sind.  $\alpha$ -Defensine findet man dagegen ausschließlich in Säugetieren und zyklische  $\theta$ -Defensine sogar nur in einigen Affenarten (Tang et al., 1999; Lehrer, 2004). Antimikrobielle Peptide erfüllen neben der mikrobiziden Aktivität Aufgaben in der Immunmodulation, der Wundheilung oder der Embryonalentwicklung. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle in der Fertilität einiger Spezies sowie bei verschiedenen Erkrankungen wie Krebs (Semple et al., 2012).

Defensine gehören zu den wichtigsten Vertretern antimikrobieller Peptide. Dabei handelt es sich um kleine Peptide mit einer Größe von ca. 30 bis 45 Aminosäuren mit einem amphipatischen Aufbau, bei dem das Molekül über einen hydrophoben und einen kationischen Bereich verfügt (Zasloff, 2002). Die hohe Anzahl positiv-geladener Aminosäuren ist zugleich eine Besonderheit der Defensine, wobei das humane  $\beta$ -Defensin 3 (hBD3) und das Maus- $\beta$ -Defensin 14 (mBD14) mit je +11 bzw. +12 die höchsten Nettoladungen aufweisen (Nava et al., 2009). Des Weiteren besitzen Defensine drei Disulfidbrückenbindungen, das so genannte „6-Cystein-Motiv“.

Im humanen Genom sind die meisten der bisher analysierten  $\beta$ -Defensine in einem ca. 450kb umfassenden Cluster auf dem Chromosom 8 lokalisiert (Linzmeier et al., 1999), das mit großer Wahrscheinlichkeit durch Duplikation der ursprünglichen Gene entstand (Sparkes et al., 1989). Zusätzlich wurden fünf weitere Defensin-kodierende Gencluster identifiziert (Schutte et al., 2002). Die  $\beta$ -Defensin-Gene bestehen üblicherweise aus zwei Exon-Bereichen, deren erster die Signalsequenz und das Propeptid kodiert, während der zweite die Sequenz des reifen Peptids enthält. Die Nukleotidsequenz des zweiten Exon-Bereichs ist schwach konserviert, da es wahrscheinlich einer schnellen Evolution zur besseren Anpassung des Organismus an seine mikrobielle Umwelt unterlag (Semple et al., 2012). Des Weiteren existieren unterschiedliche Kopienzahlen einzelner  $\beta$ -Defensine, die in verschiedenen Veröffentlichungen mit Erkrankungen wie Psoriasis oder Morbus Crohn assoziiert werden (Hollox et al., 2008; Fellermann et al., 2006).

Neben posttranslationalen Modifikationen wie einer proteolytischen Prozessierung oder Glykosylierung sind Defensine vor allem durch ihre Disulfidbrückenbindungen charakterisiert (Zasloff, 2002).  $\beta$ -Defensine bilden dadurch eine Struktur mit freiem N-Terminus und

drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern aus (Taylor et al., 2008) (Abb. 1). HBD1 und hBD2 liegen anschließend in monomerer Form vor, während hBD3 Dimere bilden kann (Schibli et al., 2001).



**Abb. 3: Struktur des Maus- $\beta$ -Defensins 14 (mBD14).**

Homologiemodell basierend auf der Struktur von hBD3. Antimikrobielle Aminosäuren sind gelb gekennzeichnet, die  $\beta$ -Faltblätter blau. (Taylor et al., 2008)

Defensine werden von unterschiedlichen Zellpopulationen produziert. Die  $\alpha$ -Defensine HNP1, HNP2 und HNP3 werden hauptsächlich von Neutrophilen exprimiert, während Paneth-Zellen HD5 und HD6 sowie deren Mausanaloga, die Cryptidine, produzieren (Ouellette et al., 2001). Die Hauptquelle für  $\beta$ -Defensine dagegen sind Keratinozyten und Epithelzellen (Harder et al., 1997), jedoch können auch Zellen des Immunsystems wie dendritische Zellen diese Peptide exprimieren. Die Expression der meisten  $\beta$ -Defensine ist durch TLR-Agonisten wie LPS oder CpG sowie durch pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-6 oder IL-22 induzierbar (z.B. Röhl et al., 2008; Kanda et al., 2011), wohingegen hBD1 und  $\alpha$ -Defensine konstitutiv exprimiert werden (Yang et al., 2004). Defensine können durch Zytokine jedoch nicht nur induziert sondern auch reguliert werden. So führt eine Stimulierung von Keratinozyten mit IL-10, IL-4 oder IL-13 zu einer verminderten Produktion von hBD2 (Kanda et al., 2011). Darüber hinaus werden Defensine vermehrt während verschiedener Krankheiten wie Psoriasis (Weinberg et al., 1998), unterschiedliche Formen der Arthritis (Paulsen et al., 2002) oder Darmentzündungen (Aldhous et al., 2009; Hirota et al., 2010; Rahmann et al., 2010) produziert. Auch eine UV-Bestrahlung oder eine

Verletzung der Haut kann die Produktion der antimikrobiellen Peptide induzieren (Gläser et al., 2009; Ahrens et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das Maus- $\beta$ -Defensin 14 (mBD14) untersucht. Die Identifikation und Charakterisierung dieses Defensins erfolgte erstmals im Jahr 2008 (Röhrl et al., 2008; Hinrichson et al., 2008). Es stellte sich heraus, dass es sich bei mBD14 um das Maus-Ortholog des hBD3 handelt, das im Jahr 2001 von Conejo-Garcia et al. beschrieben wurde. Die beiden Defensine besitzen eine 68%ige Homologie auf Proteinebene. MBD14 wird unter anderem in der Milz, dem Darm und den Atemwegen sowie von unreifen dendritischen Zellen und Keratinozyten exprimiert. Dabei ist die Expression durch verschiedene TLR-Liganden und Zytokine induzierbar. Des Weiteren wirkt mBD14 antimikrobiell gegen verschiedenen *E. coli*-Stämme und ist chemotaktisch über CCR6 wirksam. (Röhrl et al., 2008)

### **1.5. Antimikrobielle Aktivität von Defensinen**

Die erste beschriebene Aufgabe von Defensinen war ihre antimikrobielle Aktivität. In dem Zusammenhang spielen diese Peptide eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort, da sie innerhalb von Stunden gegen ein sehr breites Spektrum von Bakterien, Pilzen und behüllten Viren wirken (Hancock et al., 2006). Der genaue Wirkmechanismus konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Die geläufigste These beinhaltet eine elektrostatische Interaktion der positiv geladenen Defensine mit negativ geladenen Zellmembranen von Pathogenen. Die hydrophoben Bereiche der Defensine können sich anschließend in die Membran einlagern und so zu einer Porenbildung führen, was eine Zerstörung der Zelle induziert (Gazit et al., 1995). Da mikrobielle Membranen im Gegensatz zu eukaryotischen Zellmembranen eine negative Nettoladung aufweisen, ist dieser Mechanismus hoch spezifisch für Pathogene (Matsuzaki, 1999). Des Weiteren ist die Hemmung der Zellwandbiosynthese durch die Bindung von hBD3 an Lipid-II-reiche Bereiche des Syntheseapparates beschrieben. Dies führt ebenfalls zu Läsionen der Zellwand und somit zu einer Zerstörung (Sass et al., 2010). Zusätzlich existieren Hypothesen über eine fatale Depolarisation von Bakterienmembranen nach Defensinkontakt (Westerhoff et al., 1989) oder über die Induktion von Hydrolasen, die die Zellwand angreifen (Bierbaum et al., 1985). Defensine verfügen somit vermutlich über verschiedene antimikrobielle Mechanismen, vor denen sich nur wenige Pathogene wie *Klebsiella pneumoniae* schützen können, indem sie beispielsweise die Defensin-Expression hemmen (Moranta et al., 2010).

Die antimikrobielle Aktivität der Defensine ist dabei nicht von einer korrekten Faltung abhängig (Wu et al., 2003). HBD1 entwickelt seine volle Aktivität sogar erst nach Reduktion der Disulfidbrückenbindungen (Schroeder et al., 2011).

Am deutlichsten wird der Einfluss antimikrobieller Peptide in mBD1-defizienten Mäusen, die zum einen vermehrt *Staphylokokken* im Urin aufweisen (Morrison et al., 2002) und zum anderen eine *Haemophilus influenzae*-Infektion nicht effektiv bekämpfen können (Moser et al., 2002; Ryan et al., 2011). Dagegen besitzen Mäuse mit geringer mBD10-Expression eine eingeschränkte Abwehr intestinaler Mikrobiota (Peyrin-Biroulet et al., 2010). Unterschiedliche Defensine scheinen sich somit in ihrer antimikrobiellen Aktivität durch ihr spezifisches Wirkspektrum gegen verschiedene mikrobielle Spezies zu ergänzen.

## **1.6. Immunmodulatorische Funktionen von $\beta$ -Defensinen**

Nachdem zunächst die antimikrobielle Wirkung von Defensinen im Vordergrund des Interesses stand, erschienen in den letzten 15 Jahren vermehrt Veröffentlichungen über immunmodulatorische Fähigkeiten dieser Peptide. Zunächst wurden hauptsächlich proinflammatorische Eigenschaften der Defensine beschrieben, doch in den letzten Jahren konnten auch immunsupprimierende Effekte gezeigt werden. Defensine spielen somit eine vielfältige Rolle bei der Immunantwort gegen Pathogene. (Semple et al., 2012)

### **1.6.1. Pro-inflammatorische Wirkung von $\beta$ -Defensinen**

Im Jahr 1989 beschrieben Territo et al. erstmals eine chemotaktische Wirkung von  $\alpha$ -Defensinen (HNP1 und HNP2) auf humane Neutrophile. Diese chemotaktische Aktivität konnte 1996 sogar bei T-Zellen des adaptiven Immunsystems durch Chertov et al. dokumentiert werden. Seitdem konnte auch für  $\beta$ -Defensine gezeigt werden, dass sie verschiedene Zellen des Immunsystems zu einer Infektionsstelle locken können. So wirken z.B. HBD1 und hBD2 chemotaktisch auf unreife dendritische Zellen, T-Zellen und Neutrophile über den Chemokinrezeptor CCR6 (Yang et al., 1999; Niyonsaba et al., 2004). Des Weiteren können hBD2 und hBD3 ebenso wie ihre Maus-Orthologe mBD4 und mBD14 Monozyten, Makrophagen und Neutrophile über den Chemokinrezeptor CCR2 anlocken (Röhl et al., 2010b; Jin et al., 2010). Zusätzlich wirken Defensine auch chemotaktisch auf Mastzellen und Keratinozyten (Niyonsaba et al., 2002; Chen et al., 2007). Wahrscheinlich können Defensine auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten mit Chemokinen an deren Rezeptoren binden (Hoover et al., 2002). Diese Aussage wird von Wu et al. (2003) gestützt, die

zeigen konnten, dass die chemotaktische Aktivität von Defensinen stark von einer korrekten Tertiärstruktur und somit von ihren Disulfidbrückenbindungen abhängt.

Zusätzlich zu den chemotaktischen Eigenschaften wurde berichtet, dass Defensine in der Lage sind, über eine Interaktion mit *Toll like* Rezeptoren (TLRs) Immunzellen zu aktivieren. So scheint eine Interaktion von mBD2 mit TLR4 auf unreifen dendritischen Zellen zur vermehrten Expression kostimulatorischer Moleküle auf deren Oberfläche zu führen (Biragyn et al., 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass hBD3 über TLR1/2 eine verstärkte Expression von CD80, CD86 und CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Monozyten und Makrophagen induzieren kann (Funderburg et al., 2007).

Während einer Entzündung sind Zytokine und Chemokine wichtige Immunmediatoren, die eine Kommunikation zwischen unterschiedlichen Zellen des Immunsystems erlauben. Defensine sind in der Lage, eine Zytokinproduktion verschiedener Zellen hervorzurufen. Eine Stimulation von T-Zellen durch hBD2 führt so z.B. zur Ausschüttung von  $\text{IFN}\gamma$ , IL-10, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-22 (Kanda et al., 2011), wohingegen eine hBD3-Stimulierung von APCs über eine mögliche TLR1/2-Interaktion die Produktion von IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$  induziert (Funderburg et al., 2011). Auch Keratinozyten und periphere Monozyten aus dem Blut können zu einer Zytokinproduktion durch Defensine angeregt werden (Niyonsaba et al., 2007; Boniotti et al., 2006). Dabei induziert jedes Defensin ein unterschiedliches Zytokinprofil und moduliert so auf unterschiedliche Weise die Immunantwort (Boniotti et al., 2006).

Defensine können auch als Adjuvant bei Immunisierungen dienen. Brodgen et al. (2003) konnten zeigen, dass eine gleichzeitige Gabe von hBD3 und Ovalbumin im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit Ovalbumin zu einer höheren IgG-Konzentration gegen das Antigen im Serum führt.

### **1.6.2. Anti-inflammatorische Wirkung von $\beta$ -Defensinen**

Die am häufigsten beschriebene anti-inflammatorische Aktivität von antimikrobiellen Peptiden ist die Fähigkeit einiger Mitglieder dieser Familie, Lipopolysaccharide (LPS) zu neutralisieren. Defb123 bindet dabei direkt an LPS und verhindert damit die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF (Motzkus et al., 2006). HNP-1 und hBD2 verhindern die Bindung von LPS an das LPS-Bindeprotein (LBP) (Scott et al., 2000).

Neueste Daten zeigen, dass hBD3 und mBD14 darüber hinaus bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS die TNF- und IL-6-Konzentrationen sowohl *in vitro* von Makrophagen als auch *in vivo* reduzieren können (Semple et al., 2010). Dabei hemmen sie zusätzlich die Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD40 und CD86 auf der Oberfläche von Makrophagen. Dieser Effekt ist ebenso wie die chemotaktische Wirkung von einer korrekten Faltung des Defensins abhängig (Semple et al., 2011). Dabei sind die zellulären und molekularen Mechanismen, die zu einer anti-inflammatorischen Wirkung der  $\beta$ -Defensine führen noch nicht geklärt.

Defensine können somit zunächst aktivierend auf das Immunsystem wirken, tragen aber anschließend auch zu einer Gegenregulation bei, um eine überschießende Entzündungsreaktion zu kontrollieren.

### **1.7. Einfluss von $\beta$ -Defensinen auf das Tumorwachstum**

Interessanterweise belegen neueste Daten Hinweise für einen Einfluss von  $\beta$ -Defensinen auf das Tumorwachstum. So korreliert die Expression von hBD3 in prä-malignen Zellen von Oralkarzinom *in-situ*-Läsionen mit der spezifischen Rekrutierung von Tumorassoziierten Makrophagen (Kawsar et al., 2008).

Defensine können andererseits auch einen fördernden Einfluss auf das Tumorwachstum haben. MBD29 rekrutiert z.B. DC-Vorläufer in Tumoren und führt zu einer Vaskularisierung sowie Metastasierung bei erhöhter VEGF-A-Expression (Conejo-Garcia et al., 2004). MBD14-überexprimierende Tumorzellen führen ebenfalls zu einer verstärkten Vaskularisierung, der Expression von pro-angiogenem CXCL2 und vermehrten Tumorwachstum. Dabei induziert es die Rekrutierung von CCR6<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>-Lymphozyten (Röhrl et al., 2012).

### **1.8. Ziel der Arbeit**

$\beta$ -Defensine spielen in der angeborenen Immunantwort eines Organismus eine bedeutende Rolle. Neben der antimikrobiellen Aktivität gegen ein breites Spektrum von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, Pilzen und Viren zeichnen sie sich auch durch eine chemotaktische Wirkung auf verschiedene Zellen des Immunsystems aus und verbinden somit das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem. Darüber hinaus vermitteln sie eine Vielzahl immunmodulatorischer Funktionen. Dabei wurden sowohl pro-

---

inflammatorische als auch anti-inflammatorische Einflüsse der  $\beta$ -Defensine auf die Immunantwort beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle des Maus- $\beta$ -Defensin 14 (mBD14) in einer Entzündungsreaktion näher charakterisiert werden. Dafür diente zum einen eine mBD14:Ig transgene Mauslinie, die mBD14 ubiquitär überexprimieren sollte. Zunächst bestand die Aufgabe, die transgene DNA sowie die mRNA- und Proteinexpression des mBD14:Ig Transgens in verschiedenen Zellen und Organen nachzuweisen. Anschließend sollte der Einfluss einer transgenen mBD14-Expression in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Entzündungsmodellen charakterisiert werden.

In verschiedenen Veröffentlichungen konnte ein immunmodulatorischer Einfluss von  $\beta$ -Defensinen auf Antigen-präsentierende Zellen nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich widersprüchliche Resultate, da diese sowohl als aktivierend als auch als hemmend auf die Zytokinproduktion sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der Zellen beschrieben sind. Die Kenntnis einer regulatorischen Funktionen von  $\beta$ -Defensinen im Rahmen einer Immunantwort kann wichtige Hinweise auf die Regulation einer Entzündungsreaktion liefern.

Daher bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Charakterisierung des immunmodulatorischen Einflusses von mBD14 auf myeloide Zellen. Hierfür sollten Knochenmarkmakrophagen mit mBD14 und verschiedenen TLR-Liganden stimuliert werden, um mögliche pro- bzw. anti-inflammatorische Wirkungen nachzuweisen. Weiterhin wurden die verantwortlichen Rezeptoren und Signalwege näher untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Geräte**

Analysenwaage CP 224S	Sartorius, Göttingen
Assistant Counter AC-12	De Bruyne Instruments, Knokke-Heist, Belgien
Begasungsbrutschrank Cell Safe	Integra Biosciences, Heidelberg
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Emax ELISA Reader	Molecular Devices, München
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Fastblot B34	Biometra, Göttingen
Filmentwickler Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific, Karlsruhe
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach
Geldokumentation GeneGenius	Syngene, Cambridge, UK
Gelkammer Sub-Cell® GT	Bio-Rad, München
Hybridisierungsöfen GFL-7601	GFL, Burgwedel
ImageQuant LAS4000 mini	GE Healthcare, Freiburg
Inkubator BBD 6620	Heraeus, Hanau
iQ™ 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München
Kreisschüttler GFL-3015	Omnilab, Mettmenstetten
Kryostat CM3050S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Leitz Diaplan	Ernst Leitz Wetzlar, Wetzlar
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mini-PROTEAN® Electrophoresis System	Bio-Rad, München
Nanophotometer	Implen GmbH, München
Netzgerät PowerPac 300	Bio-Rad, München
Netzgerät PowerPack P25 T	Biometra, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Gerät iCycler	Bio-Rad, München

PCR-Gerät MyCycler	Bio-Rad, München
pH-Meter Inolab	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet pro <sup>®</sup>	Brand, Wertheim
Sterilbank HERAsafe <sup>®</sup> KS	Thermo Scientific, Karlsruhe
Stickstofftank MVE 810 Eterne/MVE Euro Cyl	German Cryo, Jüchen
Thermoblock Bio TDB-100	Biometra, Göttingen
ThermoShaker TS-100	A. Hartenstein, Würzburg
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin, Mörfelden-Walldorf
Ultra-Turrax T25	IKA, Staufen
Ultrazentrifuge Sorvall <sup>®</sup> RC6	Thermo Scientific, Langenselbold
UV-Statalinker 2400	Stratagene, Santa Clara, CA, USA
Vortex Genie 2 <sup>™</sup>	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 4	Thermo Scientific, Karlsruhe

### **2.1.2. Verbrauchsmaterialien**

Chromatography Paper 3mm Chr	Thermo Scientific, Karlsruhe
Dako Pen	Dako, Hamburg
Deckgläser (Automat Star)	Engelbrecht, Edermünde
Eppendorfcups (1,5 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen BD Falcon <sup>™</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier Whatman <sup>®</sup>	A. Hartenstein, Würzburg
Glas-Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Hyperfilm <sup>™</sup> MF	GE Healthcare, Freiburg
Immersionsöl Immersol 518 F	Zeiss, Oberkochen
Kanülen BD Microlance 3 <sup>™</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
Kryoröhrchen Cryo Tubes <sup>™</sup>	Nunc, Langenselbold
Kunststoffpistell	A. Hartenstein, Würzburg
MACS Separation Columns 25MS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Microwelltiterplatten MicroWell™ (96-Well)	Nunc, Langenselbold
Multi-Flask TC, 5layer 875cm <sup>2</sup> BD Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg
Multiwell-Platten (6, 12, 24, 48 und 96-Well)	BD Biosciences, Heidelberg
Objektträger (geschnitten, Matt-Rand)	Engelbrecht, Edermünde
Papierfilter für Cytospin	Labonord, Mönchengladbach
PCR Platte 96-Well (farblos, ultradünnwandig)	Peqlab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (100mm, quadratisch)	Sterilin Ltd, London, UK
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pure Nylon Neutral Transfer Membrane 0,22µm	AppliChem, Darmstadt
PVDF Transfermembran Immobilon-P	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäß (1, 1,5, 15 und 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rollerflaschen 850cm <sup>2</sup>	Corning, Lowell, MA, USA
Safe Seal-Tips professional	Biozym, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten (5 und 10ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Siebgewebe aus Polyamid	Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg
Spritzen BD Plastikpak™ (1, 2, 5, 10 und 20ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter (0,2µm)	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter Bottle Top 75mm Nalgene®	Nunc, Langenselbold
Trans-Blot® Transfer Medium Nitrozellulose- membran 0,2µm	Bio-Rad, München
UV-Küvette micro, Plastibrand®	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen (25, 75 und 175cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen BD Falcon™ (25, 75 und 175cm <sup>2</sup> )	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber (25 und 39cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb Cell Strainer BD Falcon (40µm)	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenbecher (300ml)	Thermo Scientific, Karlsruhe

### **2.1.3. Chemikalien, Medien und Reagenzien**

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel® 30	Roth, Karlsruhe
Agarose, <i>electrophoresis grade</i>	Bio&Sell, Nürnberg
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

---

ATP	InvivoGen, San Diego, CA, USA
BD OptEIA™ Substrat Reagent A und B	BD Biosciences, Heidelberg
BSA	PAA Laboratories, Cölbe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets EASYpack	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CuSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA Standard (100bp und 1kb Ladder)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
dNTP-Mix	Promega, Mannheim
ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
fMLP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin (Meyer's Hämalaun Lösung)	Merck, Darmstadt
human IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hybridisierungslösung Ultrahyb	Ambion, Kaufungen
Hygromycin B	PAA Laboratories, Cölbe
IFN $\gamma$ (rekombinant, Maus)	AbD Serotec, Kidlington, UK
Insect Express Prime	PAA Laboratories, Cölbe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LPS ( <i>E. coli</i> 0127:38)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ly294002	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
MACS MicroBeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Magermilchpulver	Granovita, Lüneburg
MCP-1	Invitrogen, Camarillo, CA, USA

---

MG132	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Naphtyl-ethylendiamin-Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neomycin (G418/G420)	PAN Biotech, Aidenbach
nukleasefreies H <sub>2</sub> O	Promega, Mannheim
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
PeqGold TriFast™	Peqlab, Erlangen
Perm/Wash-Puffer	BD Bioscience, Heidelberg
Pertussis-Toxin	List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
poly I:C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Protein Marker VI (10-245) prestained	AppliChem, Darmstadt
Restriktionspuffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
RNase AWAY	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
RNA later™ RNA Stabilisation Reagent	Qiagen, Hilden
RPMI 1640 Fertigmedium	PAN Biotech, Aidenbach
RS 102895	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zymosan	InvivoGen, San Diego, CA, USA
β-Mercaptoethanol	PAN Biotech, Aidenbach

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel und Feststoffe wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

**2.1.4. Puffer und Lösungen**

Abstopplösung für ELISA	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Blockierlösung für ELISA	1% BSA in PBS oder TBS
Blockierlösung für Western Blot	5% Magermilch in TBS-T
Blockpuffer für Histologie	3% FCS 10% Mausserum in TBS
Blotpuffer (10x)	2M Glycin 250mM Tris
Coomassie-Entfärbepuffer	10% Essigsäure 40% Ethanol
Coomassie-Färbepuffer	10% Essigsäure 40% Ethanol 0,2% Coomassie-Brillant Blue R250
Denaturierungslösung	1,5M NaCl 0,5M NaOH
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% DEPC
DNA-Ladepuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerol
Einfriermedium für Zellen (2x)	20% DMSO 80% FCS

---

Erythrozyten-Lysepuffer	0,17M $\text{NH}_4\text{Cl}$ 20mM HEPES
FACS-Puffer	1% FCS in PBS
Färbepuffer für Histologie	3% FCS in TBS
Glycin-Elutionspuffer (pH 2,3)	0,1M Glycin
Griess-Reagenz	1:1 Mischung aus: <ul style="list-style-type: none"><li>• 1% (w/v) Sulfanylamid 5% (v/v) <math>\text{H}_3\text{PO}_4</math></li><li>• 0,1% Naphtyl-Ethylendiamin-Dihydrochlorid (NEDD)</li></ul>
Kaliumphosphatpuffer 1M (pH6,0)	13,2% 1M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 86,8% 1M $\text{KH}_2\text{PO}_4$
Lämmli-Auftragungspuffer (4x)	0,5M Tris-HCl, pH 6,8 40% Glycerin 0,04% $\beta$ -Mercaptoethanol 4% SDS 0,05% Bromphenolblau
Lämmli-Elektrophorese-Puffer (5x)	120mM Tris-Base 0,95M Glycin 0,5% SDS
MACS-Puffer (entgast, pH 7,3)	0,5% BSA 2mM EDTA in PBS
Methylgrünlösung	0,1M NaAc pH 4,2 0,5% Methylgrün

---

Neutralisierungslösung (pH 7,0)	0,5M Tris-Base 1,5M NaCl
PBS (pH 7,3)	137mM NaCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7mM KCl
PBS-T	0,05% Tween <sup>®</sup> 20 in PBS
PCR-Puffer (10x)	500mM KCl 100mM Tris-HCl pH 9,0 1% Triton X-100 15mM MgCl <sub>2</sub>
Puffer A (MPO-Bestimmung)	13,7mM Hexadecyltrimethyl- ammoniumbromid (HTAB) in 0,05M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0)
Puffer B (MPO-Bestimmung)	0,53mM o-Dianisidin-Hydrochlorid 0,0005% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 0,05M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0)
RIPA-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 7,5 150mM NaCl 1% Nonidet P40 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS
Säulenregenerierungspuffer	6M Urea

---

SSC (20x) (pH 7,0)	3M NaCl 0,3M NaCitrat
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA
TBS (pH 7,4)	150mM NaCl 2,7mM KCl 25mM Tris-Base
TBS-T	0,05% Tween <sup>®</sup> 20 in TBS
Tris-Puffer für SDS-PAGE	1,5M Tris-HCl (pH 8,8) und 1,0M Tris-HCl (pH 6,8)
Tris-Puffer (Neutralisationspuffer)	1,0M Tris-HCl (pH 9,0)
Trypanblau-Lösung (pH 7,4)	0,16% (w/v) Trypanblau 150mM NaCl

### **2.1.5. Kits**

BCA <sup>™</sup> Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Diff-Quick Stainig Kit	Medion Diagnostics AG, Düdingen, Schweiz
DNase I Kit	Promega, Mannheim
ELISA Duo Sets	R&D Systems, Wiesbaden
NucleoSpin RNAII Kit	Macherey und Nagel, Düren
MicroSpin <sup>™</sup> S-200 HR Columns	GE Healthcare, Freiburg
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Santa Clara, CA, USA
Puregene Gentra DNA Purification Kit	Qiagen, Hilden
• Cell Lysis Solution	
• Protein Precipitation Solution	

Reverse Transkription System

Promega, Mannheim

**2.1.6. Enzyme**

BamHI (Restriktionsenzym)

New England Biolabs, Frankfurt a. M.

iQ™ SYBR® Green Supermix

Bio-Rad, München

M-MLV Reverse Transkriptase

Promega, Mannheim

Proteinase K

Promega, Mannheim

Taq-Polymerase

eigene Herstellung

**2.1.7. Oligonukleotide**

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) in einer Konzentration von 100µM bezogen. Für eine Standard-PCR wurden die Primer in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt, wohingegen für eine quantitative Real-Time PCR eine 1:20-Verdünnung zum Einsatz kam.

Die reverse Transkription erfolgte unter Verwendung der Oligo (dT)-Primer von Fermentas (St. Leon-Rot).

Für *in vitro*-Stimulierungen eingesetztes CpG-Oligonukleotid kam ebenfalls von Metabion (Martinsried), wohingegen für *in vivo*-Studien das der Firma InvivoGen (San Diego, CA, USA) verwendet wurde.

Oligonukleotid	Sequenz
PCR	
mBD14 genotyp. 1 5'	5' GCA GAA TAA GAG GTG GCC 3'
IgG genotyp. 1 3'	5' GGC CTC AGG GTC TTC CGT 3'
β-Aktin forw.	5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT 3'
β-Aktin rev.	5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC 3'
mBD14 RT kurz 5'	5' GTA TTC CTC ATC TTG TTC TTG G 3'
mBD14 RT kurz 3'	5' AAG TAC AGC ACA CCG GCC AC 3'
18S 5'	5' GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3'
18S 3'	5' CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG 3'
reverse Transkription	
Oligo (dT) 15 Primer	5' TTT TTT TTT TTT TTT 3'

Stimulierungen	
ODN 1668 (CpG Oligonukleotid) <i>in vitro</i>	5' TCC ATG ACG TTG CTG ATG CT 3'
ODN 1668 (CpG Oligonukleotid) <i>in vivo</i>	5' TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT 3'

### **2.1.8. Peptide**

Defensin:Ig-Fusionsproteine	eigene Herstellung
Synthetisches mBD14 Peptid lang	Metabion, Martinsried

### **2.1.9. Plasmide**

pMT Bip V5-His Hygro mBD14:Ig	eigene Herstellung
ubi mBD14 lang Ig #179	eigene Herstellung

### **2.1.10. Sonden**

ubi 14.7 Kpn/Xho (1000 Basen)	eigene Herstellung
-------------------------------	--------------------

### **2.1.11. Antikörper**

Anti-Hamster IgG2 biotin	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-human IgG (H+L) HRP (Esel)	Dianova, Hamburg
Anti-human IgG PE (Esel)	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus CD11b APC (Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus CD11b FITC (Ratte)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Anti-Maus CD11c PE (Hamster)	MorphoSys AbD, Düsseldorf
Anti-Maus CD45 biotin (Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus CD80 biotin (arm. Hamster)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus CD86 FITC (Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus F4/80 biotin (Ratte)	ebioscience, Frankfurt
Anti-Maus I-A <sup>b</sup> APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus p44/42 MAPK (Erk1/2) (Kaninchen)	Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)

Anti-Maus phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Kaninchen)	Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)
Anti-Maus TNF APC (Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus TLR4 APC (Ratte)	R&D System, Wiesbaden
Anti-Ratte IgG2a FITC	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Anti-Ratte IgG2a APC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Ratte IgG2b APC	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin PerCp	BD Biosciences, Heidelberg

### **2.1.12. Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung (ATCC-Nummer)</b>	<b>Kultur</b>
<i>Drosophila</i> -Schneider-2 Zellen	Insektenzelllinie, semi-adhärent (CRL-1963 <sup>TM</sup> )	Insect Express Prime
HEK 293 Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie, adhärent (CRL-1573 <sup>TM</sup> )	RPMI 1640 + 10% FCS

### **2.1.13. Versuchstiere**

B6D2F1	Charles River, Wilmington, MA, USA
B6D2F1-Tg(Defb14)	eigene Herstellung
C57BL/6 Wildtyp	Janvier, Le Genest, Frankreich bzw. Eigenzucht (D4)
B6-CCR2 <sup>-/-</sup>	Prof. Dr. M. Mack, Universitätsklinikum Regensburg bzw. Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA
B6-CCR6 <sup>-/-</sup>	Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA

### **2.1.14. Software und Internet-Ressourcen**

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2003 erstellt. Die Darstellung der Diagramme erfolgte mit Microsoft Office Excel 2003 oder mit GraphPad Prism Version 4.0a. Für die Auswertung von Western Blot-Analysen wurde das Programm ImageQuant TL 7.0 verwendet. Quantitative Real-Time PCRs wurden durch Bio-Rad iQ5 2.1 unterstützt. Für

die Auswertung durchflusszytometrischer Messungen kam die Software FlowJo 8.7.1. zum Einsatz. Die Archivierung von Literatur und das Erstellen des Literaturverzeichnisses erfolgte unter Zuhilfenahme von Zotero 3.0.7. Außerdem wurde Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) für die Literaturrecherche verwendet.

## **2.2. Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1. Isolation genomischer DNA**

Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus Zellpellets (bei -20°C gelagert), aus ebenso gelagerten Gewebestücken oder aus frischem Material. Dem zu verarbeitenden Material wurden 500µl Cell Lysis Solution (Qiagen), sowie 10µl Proteinase K (Promega) hinzugegeben und dies im Fall von Zellen 1h lang, im Fall von Gewebe über Nacht, bei 56°C im Wasserbad verdaut. Anschließend wurden 200µl Protein Precipitation Solution (Qiagen) zugegeben und mittels eines Vortex MS2 Minishakers (IKA) kräftig gemischt. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 4000rpm konnte der Überstand zu 700µl 100%igem Isopropanol gegeben und durch Invertieren gemischt werden. Daraufhin erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000rpm für 5min mit anschließendem Waschen des Pellets in 500µl 70%igem Ethanol. Nach erneutem Zentrifugieren konnte das Pellet getrocknet und die DNA daraufhin in 50µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei 4°C gelagert werden.

### **2.2.2. Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen**

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mittels des RNA-Isolationskits NucleoSpin RNAII (Macherey und Nagel). Die so gewonnene RNA wurde in 30µl nukleasefreiem H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -80°C gelagert. Um Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, wurden alle Oberflächen und verwendeten Gegenstände mit RNase AWAY (Molecular BioProducts) gereinigt und darüber hinaus ausschließlich gestopfte Spitzen (Biozym) verwendet. Alle Arbeiten mit isolierter RNA erfolgten auf Eis.

### **2.2.3. Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebe**

Für die RNA-Isolation bestimmtes Gewebe wurde in 500µl RNA later<sup>TM</sup> (Qiagen) bei -80°C gelagert. Zur Isolation wurde das Gewebe in 500µl PeqGold TriFast (Pepqlab) überführt und gemörsert. Eine weitere Zerkleinerung des Gewebes erfolgte durch das Ziehen

der Lösung durch eine 0,4mm-Kanüle mittels einer 5ml-Spritze. Nach Auffüllen auf 1ml mit PeqGold TriFast (Peqlab) wurden 200 $\mu$ l Chloroform zu der Suspension gegeben, durch Invertieren gemischt und für 8min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugieren für 15min bei 13400g und 4°C. Die so entstandene obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und durch Invertieren im Verhältnis 1:1 mit kaltem Isopropanol gemischt. Diese Mischung inkubierte bei -20°C mindestens 30min lang. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben, konnte das Pellet in 500 $\mu$ l eiskaltem Ethanol gewaschen und nach einer dritten Zentrifugation für 5min, 13400g und 4°C getrocknet und anschließend in 50 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert werden.

#### **2.2.4. Vermessung von DNA und RNA**

Die Vermessung erfolgte entweder mittels eines BioPhotometers (Eppendorf) oder eines Nanophotometers (Implen GmbH) bei einer Wellenlänge von 260nm. Anschließend berechnet sich die Nukleinsäurekonzentration folgendermaßen:

$$\text{Konzentration DNA} = 50\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Konzentration RNA} = 40\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Darüber hinaus gibt das Verhältnis von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> Auskunft über Proteinkontaminationen in der Lösung. Ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 spricht für eine saubere Nukleinsäureisolation.

#### **2.2.5. Reverse Transkription**

Das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgte durch die Methode der reversen Transkription. Hierfür wurde 1 $\mu$ g RNA mit nukleasefreiem H<sub>2</sub>O auf 12 $\mu$ l verdünnt und mit 1 $\mu$ l Oligo dT (Fermentas) versetzt. Nach einer Inkubation für 5min bei 70°C, in der die Oligonukleotide an die aufgeschmolzene DNA binden und einer weiteren Inkubation für 5min auf Eis wurde folgender Mastermix zugegeben:

Mastermix für die reverse Transkription	
5 $\mu$ l	MMLV-Puffer
1,25 $\mu$ l	dNTP-Mix
1 $\mu$ l	MMLV
4,75 $\mu$ l	nukleasefreies H <sub>2</sub> O

Die reverse Transkription erfolgte bei 39°C für 50min im Heizblock und wurde durch 5minütiges Erwärmen auf 70°C beendet. Anschließend konnte die cDNA bei 4°C gelagert werden.

Im Falle der reversen Transkription von aus Gewebe isolierter RNA erfolgte ein zusätzlicher DNase-Verdau. Hierbei wurde 1 $\mu$ g RNA nur auf ein Volumen von 8 $\mu$ l verdünnt, anschließend mit je 1 $\mu$ l DNase-Puffer und DNase (beides Promega) versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abbruch der Reaktion mit DNase-Stop (Promega) bei 65°C für 10min konnte anschließend wie oben beschrieben fortgefahren werden.

### **2.2.6. Restriktionsverdau**

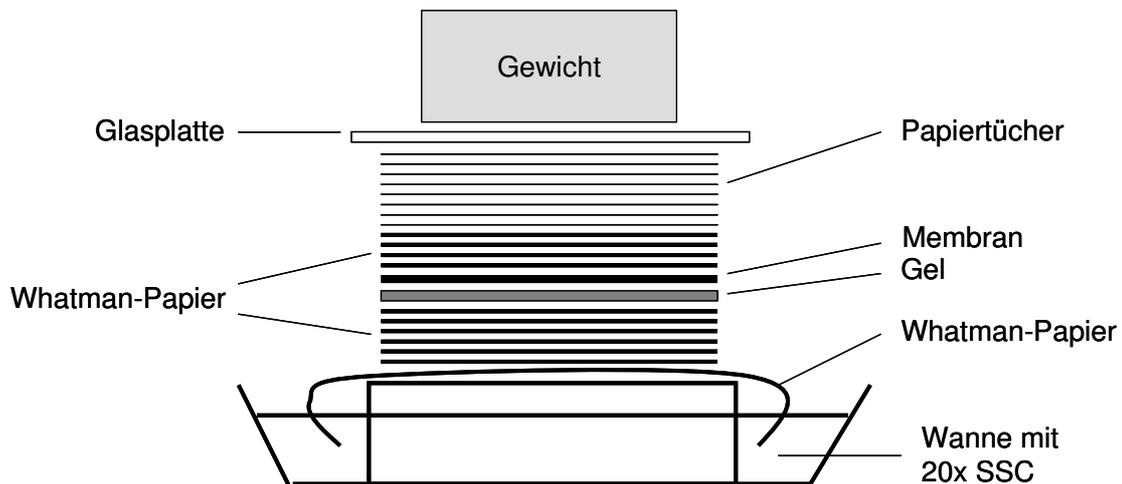
Für eine Southern Blot-Analyse genomischer DNA (siehe 2.2.7.) ist diese zunächst mittels eines Restriktionsverdaus vorzubereiten. Dabei wird die DNA mit einem Restriktionsenzym, dessen Schnittstellen häufig in der DNA vertreten sind, nach folgendem Ansatz geschnitten.

Ansatz für den Restriktionsverdau	
x $\mu$ l	DNA (10 $\mu$ g)
2 $\mu$ l	Restriktionsenzym
3 $\mu$ l	10x BSA
3 $\mu$ l	10x Puffer
ad 30 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Alle Bestandteile dieses Ansatzes, mit Ausnahme der DNA und des H<sub>2</sub>O, stammten von New England Biolabs. Diese Mischung wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung des Verdaus wurden anschließend 5 $\mu$ l davon auf ein Agarose-Gel aufgetragen (siehe 2.2.8.).

### **2.2.7. Southern Blot**

Die Methode des Southern Blot erlaubt einen sehr sensitiven Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen mittels radioaktiv markierter Sonden. Im Fall der mBD14:Ig transgenen Mauslinie wurde diese Methode zur Genotypisierung und zum Nachweis des Transgens genutzt. Dafür erfolgte zunächst ein Restriktionsverdau von 10µg genomischer DNA mit BamHI und NEB4-Puffer (beides New England Biolabs) wie unter 2.2.6. beschrieben. Anschließend konnte die gesamte DNA mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.8.) entsprechend der Fragmentlängen aufgetrennt werden. Für den Southern Blot musste das Gel dann für je 15min mit 0,2N HCl depuriniert, anschließend in Denaturierungslösung denaturiert und daraufhin in Neutralisierungslösung neutralisiert werden. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:



Dabei sorgte das Whatman-Papier in 20x SSC-Puffer für die Flüssigkeitszufuhr des Systems. Durch die Kapillarkräfte konnte die DNA aus dem Gel über Nacht auf eine Nylonmembran (AppliChem) transferiert werden. Anschließend wurde die DNA durch Quervernetzung mittels des UV Stratalinkers 2400 (Stratagene) auf der Nylonmembran fixiert. Vor der Hybridisierung erfolgte für eine Stunde die Inkubation der Membran in 10ml Hybridisierungslösung Ultrahyb (Ambion) mit 100µg/ml Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich). Parallel dazu konnte die Sonde gelabelt werden. Dafür wurden 25ng der ubi 14.7 Kpn/Xho-Sonde mit 10µl Random Primern (Stratagene) und 12µl H<sub>2</sub>O für 5min bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe von 10µl 10x dCTP Puffer, 1µl Exo Klenow und 5µl αP<sup>32</sup>dCTP (alles Stratagene) erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1h. Für die Aufreinigung der Sonde wurden MicroSpin<sup>TM</sup> S200 HR-Säulen nach Angaben des Herstellers verwendet (GE Healthcare). Nach 5minütiger Denaturierung der Sonde bei 95°C konnte diese mit der Ny-

Ionmembran in der Hybridisierungslösung über Nacht bei 45°C inkubiert werden. Alle Inkubationsschritte wurden im Hybridisierungssofen GFL-7601 (GFL) rollend durchgeführt. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Membran mit 2x SSC und 0,1% SDS bei 45°C für 15min. Dies wurde mit 0,1x SSC und 0,1% SDS für je 20min zunächst bei 45°C und anschließend mit frischem Puffer bei 65°C wiederholt. Daraufhin konnte die Membran in Frischhaltefolie verpackt, in eine Kassette geklebt und ein Film (Hyperfilm<sup>TM</sup> MF, GE Healthcare) aufgelegt werden. Nach 24h Inkubation erfolgte die Entwicklung mittels des Filmentwicklers Optimax Typ TR (MS Laborgeräte).

### **2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die Amplifikation von DNA kam die Technik der Polymerase-Kettenreaktion zum Einsatz. Hierfür wurden 200ng DNA auf ein Volumen von 5µl mit nukleasefreiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt und in einem PCR-Reaktionsgefäß mit folgendem Mastermix gemischt:

Mastermix für die Polymerase-Kettenreaktion	
5µl	5'-Primer 10µM
5µl	3'-Primer 10µM
5µl	10x Puffer
1µl	Taq-Polymerase
1µl	dNTP-Mix
28µl	nukleasefreies H <sub>2</sub> O

In dieser Arbeit wurde ausschließlich Taq-Polymerase verwendet, die am Institut für Immunologie kloniert, exprimiert und aufgereinigt wurde. Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm in einem PCR-Cycler:

Programm für eine Polymerase-Kettenreaktion			
Initiale Denaturierung	94°C	3min	
Denaturierung	94°C	30sek	35x
Primer-Annealing	54-60°C	30sek	
Elongation	72°C	1min/1kb	
Finale Elongation	72°C	5min	

Eine Überprüfung des Ergebnisses erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde das PCR-Produkt mit 6x Ladepuffer versetzt und 25µl hiervon auf ein angemess-

sen konzentriertes Agarosegel aufgetragen. Um Fragmentlängen von 0,5kb bis 7kb aufzutrennen, wurde ein 1%iges Gel verwendet, wohingegen mit einem 1,5%igen Gel eine Auftrennung von 0,2kb bis 3kb erreicht wurde. Die Agarose wurde in 0,5x TAE-Puffer aufgekocht und mit 1% Ethidiumbromid versetzt. Anschließend erfolgten der Gellauf bei 120V und die Geldokumentation mittels UV-Licht.

### **2.2.9. Quantitative Real-Time PCR (qPCR)**

Die quantitative Real-Time PCR erlaubt zusätzlich zu einer normalen PCR eine Quantifizierung. Das System beruht auf unspezifisch in die doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. SYBR Green. Nach Anregung bei einer Wellenlänge von 498nm emittiert dieser Licht bei einer Wellenlänge von 522nm. Da so die Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus entsprechend der DNA-Menge zunimmt, kann diese quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde der iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad) verwendet, der abgesehen von Primern und cDNA alle Bestandteile für eine PCR enthält. Entsprechend wurde folgender Ansatz zu, in 5µl verdünnten, 40ng cDNA pipettiert:

Ansatz für die quantitative Real-Time PCR	
12,5µl	iQ <sup>TM</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad)
1µl	5'-Primer
1µl	3'-Primer
5,5µl	nukleasefreies H <sub>2</sub> O

Die qPCR erfolgte in einer 96-Loch Platte, wobei alle Proben in Triplikaten aufgetragen waren. Es wurde folgendes Programm verwendet:

Programm für eine quantitative Real-Time PCR			
Initiale Denaturierung	95°C	10min	
Denaturierung	95°C	15-30sek	40x
Primer-Annealing und Elongation	60-63,5°C	1min	
Termination	95°C	1min	
Vorbereitung Schmelzkurve	55°C	1min	
Schmelzkurve	55°C – 95°C (in 0,5°C-Schritten)		

Die Schmelzkurve dient hierbei dem Nachweis einer spezifischen Amplifikation.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe des so genannten  $C_T$ -Wertes (*threshold cycle*) ermittelt. Dieser gibt an, ab welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA signifikant über die Hintergrundfluoreszenz hinausgeht. Bei Erreichen des  $C_T$ -Wertes befindet sich in allen Reaktionen die gleiche Menge neu synthetisierter DNA. Je früher der  $C_T$ -Wert demnach erreicht wird, desto mehr Ausgangsmaterial war in der Reaktion vorhanden. Zusätzlich zu dem zu analysierenden Gen wird ein so genanntes *housekeeping* Gen, in dieser Arbeit 18S ribosomale DNA, amplifiziert, bei dem es sich um ein ubiquitär exprimiertes und von Stimulierungen unbeeinflusstes Gen handelt. Relativ hierzu kann die Expression der jeweils untersuchten RNA berechnet werden. Zusätzlich wird die RNA-Expression relativ zu einem internen Kalibrator berechnet, z.B. der unstimulierten Kontrolle, die dazu auf 1 normiert wird. Alle Berechnungen beruhen auf der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001).

## **2.3. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.3.1. Isolation von Proteinextrakten**

Um die Proteinexpression verschiedener Zellen mittels Western Blot Analyse (siehe 2.3.5.) zu untersuchen, stellte man Zelllysate her. Hierfür wurden 50 $\mu$ l RIPA-Puffer entweder zu Zellpellets oder zu adhären in 24-Loch Platten sitzenden Zellen gegeben. Für die Stabilisierung der Proteine in dieser Lösung wurde zusätzlich ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) zugegeben. Im Fall der Isolation von phosphorylierten Proteinen wurden zusätzlich Phosphatase-Inhibitoren benötigt. In dieser Arbeit kamen dafür NaF sowie Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (beides Sigma-Aldrich) zum Einsatz. Die Lagerung der Zelllysate erfolgte bei -80°C.

### **2.3.2. Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose und Proteinaufreinigung**

Das in dieser Arbeit untersuchte mBD14 wurde in *Drosophila*-Schneider-2 Zellen als mBD14:Ig-Fusionsprotein exprimiert. Dabei ist das mBD14 an den F<sub>c</sub>-Teil des humanen IgG1 gekoppelt. Durch diesen kann es sowohl nachgewiesen, als auch aufgereinigt werden. Hierfür wurde der gesammelte, sterilfiltrierte Zellkulturüberstand in 50ml Reaktionsgefäße überführt und mit jeweils 100 $\mu$ l Protein G Sepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow (GE Healthcare) versetzt. Auf diese Weise erfolgte über Nacht bei 4°C rollend die Immunpräzipitation des Defensins. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000g für 10min und 4°C, wodurch die Sepharose-mBD14-Verbindungen pelletiert wurden. Für einen schnellen Nachweis des

Defensins wurde der Überstand vorsichtig verworfen, das Pellet in den verbleibenden ca. 40µl resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurde 4x Lämmli-Puffer in einem Verhältnis 1:4 zugegeben und die Mischung 5min bei 95°C denaturiert. Im Anschluss daran konnte eine SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.3.5) durchgeführt werden. Für die Proteinaufreinigung dagegen wurde die Sepharose-mBD14-Verbindung stattdessen mittels einer Pasteurpipette auf eine Glassäule übertragen, wobei die Sepharose das eigentliche Säulenmaterial bildete. Danach erfolgten fünf Waschschrte mit je 3ml PBS, die zur Überprüfung separat gesammelt wurden. Daraufhin konnte das Protein mittels 0,1M Glycin-Puffers pH 2,3 von der Säule eluiert werden. Das Elutionsvolumen entsprach jeweils dem halben eingesetzten Säulenvolumen, wobei mindestens zehn Elutionsfraktionen gesammelt wurden. Diese wurden nachfolgend mit 1M Tris pH 9,0 auf einen pH-Wert zwischen 6 und 7 neutralisiert und bei 4°C für kurze bzw. bei -20°C für längere Zeit gelagert. Um das Säulenmaterial zu regenerieren und für eine ähnliche Anwendung wiederzuverwenden, erfolgten drei Waschschrte mit je 3ml 6M Urea, wodurch potentiell noch gebundenes Protein abgespalten wurde, fünf Waschschrte mit ddH<sub>2</sub>O und dreimaliges Waschen mit 20% Ethanol. Anschließend konnte die Sepharose in halbem Säulenvolumen 20% Ethanol aufgenommen und bei 4°C gelagert werden.

### **2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Als Standard diente hierbei BSA in bekannten Konzentrationen. Die Farbreaktion wurde mittels des Emax ELISA Readers (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 540nm gemessen. Der Test beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Die Cu<sup>2+</sup>-Ionen werden dadurch reduziert und bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex (Smith et al., 1985).

### **2.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe kam die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Einsatz. Zum Vorbereiten der Proteine für eine SDS-PAGE wurden sie in einem Verhältnis von 1:4 mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und dann bei 95°C für 5min denaturiert. Anschließend konnten sie auf ein 12,5%iges SDS-Gel

aufgetragen werden, das nach folgendem Protokoll mittels des Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Electrophoresis System (Bio-Rad) gegossen wurde:

Zusammensetzung eines 12,5%igen SDS-Gels		
	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (4%)
Acrylamidstammlösung (37%)	3,125ml	0,425ml
Trispuffer pH 8,8	1,875ml	
Trispuffer pH 6,8		0,75ml
ddH <sub>2</sub> O	2,5ml	1,875ml
SDS (10%)	75µl	30µl
TEMED	5µl	2,5µl
APS (10%)	50µl	25µl

Als Größenstandard dienten 5µl des prestained Protein Marker VI (AppliChem). Anschließend ließ man dieses Gel bei 200V und 40mA in der Gelkammer Sub-Cell<sup>®</sup> GT (Bio-Rad) in Lämmli-Elektrophorese-Puffer laufen, bis die Laufbande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend konnte ein Western Blot (siehe 2.3.5.) durchgeführt werden.

### **2.3.5. Western Blot**

Mittels eines Western Blot ist es möglich, Proteine nach der Auftrennung durch eine SDS-PAGE (siehe 2.3.4.) spezifisch zu detektieren. Hierbei bedient man sich eines immunologischen Nachweises mittels spezifischer Antikörper. Zunächst mussten dafür die Proteine aus dem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran (Millipore) mit einer Porengröße von 0,45µm transferiert werden. Diese wurde zunächst in Methanol hydrophilisiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Transferpuffer äquilibriert. Für den Blotaufbau eines SemiDry Elektro-Blots folgten von Anode zu Kathode zunächst drei Lagen Whatman-Papier, die Membran, dann das Gel und anschließend wieder drei Lagen Whatman-Papier. Alle Bestandteile wurden zuvor in Transferpuffer äquilibriert. Luftblasenfrei erfolgte sodann der Transfer bei 24V und 400mA für 1h.

Anschließend konnte das Gel zur Kontrolle eines vollständigen Blotting-Ergebnisses mit Coomassie gefärbt werden (siehe 2.3.6.). Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden, wurde die Membran zunächst mit 5% Magermilch in TBS-T für 1h bei RT blockiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung in 2% Magermilchpulver in TBS-T schwenkend über Nacht bei 4°C. Nach

zweimaligem Waschen der Membran mit 2% Magermilchpulver in TBS-T und einmal mit TBS-T allein für je 10min, wurde der sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper in geeigneter Verdünnung in 3% Magermilchpulver in TBS-T zugegeben und der Ansatz 1h bei RT geschwenkt. Nach erneutem dreimaligem Waschen, konnten spezifische Banden mittels Chemilumineszenz detektiert werden. Hierzu wurde die Membran mit der proteingebundenen Seite nach unten in 1ml einer 1:1-Mischung der ECL<sup>TM</sup> Prime Reagenzien A und B (GE Healthcare) 1min inkubiert, luftblasenfrei zwischen zwei Folien gelegt, um ein Austrocknen zu vermeiden und anschließend mittels des ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare) entwickelt. Bei entsprechender Software-Einstellung konnte die Entwicklung des Signals in regelmäßigen Abständen visuell überprüft werden. Nach abgeschlossener Entwicklung wurde die Membran zur Kontrolle mit Coomassie-Färbepuffer gefärbt (siehe 2.3.6.). Eine Auswertung des Blots konnte mit der Software ImageQuant TL 7.0 durchgeführt werden.

Je nach Fragestellung wurde dieses Verfahren variiert. Im Fall der Detektion von mBD14:Ig war auf Grund der Kopplung des Defensins an den Ig-Tag ein direkter Nachweis mit einem HRP-gekoppelten anti-human IgG Antikörper möglich.

Bei der Verwendung der anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)- und anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)-Antikörper erfolgte die Inkubation nicht in 2% Magermilch, sondern in 5% BSA in TBS-T über Nacht. Dafür wurde die Membran nach dem Blockieren zunächst dreimal mit TBS-T gewaschen.

### **2.3.6. Coomassie-Färbung**

Mittels der Coomassie-Färbung erfolgte das Sichtbarmachen von Proteinen auf einem Gel oder einer Membran. Hierzu wurde die Membran oder das Gel für entsprechend 5min oder 20min mit Coomassie-Färbepuffer geschwenkt und anschließend zunächst mit Coomassie-Entfärbepuffer und dann mit ddH<sub>2</sub>O wieder entfärbt.

### **2.3.7. Dot Blot**

Ein Dot Blot dient ebenso wie ein Western Blot einem spezifischen Proteinnachweis. Anders als beim Western Blot werden die Proteine beim Dot Blot nicht zuvor nach ihrer Größe aufgetrennt, sondern 5µl des Gemischs in 1µl-Schritten auf eine Trans-Blot<sup>®</sup> Nitrozellulose-Membran (Bio-Rad) mit einer Porengröße von 0,2µm aufgetropft. Als Negativkontrolle diente 1µg BSA. Die Membranstreifen wurden anschließend über Nacht bei 4°C in

3ml TBS-T mit 10% Magermilchpulver blockiert und dann mit dem primären Antikörper in entsprechender Verdünnung in 3% Magermilchpulver in TBS-T für 2h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers in angemessener Verdünnung für 1h ebenfalls in 3% magermilchpulverhaltigem Puffer. Nach erneuten drei Waschschritten konnte der Dot Blot wie ein Western Blot analysiert werden (siehe 2.3.5.).

### **2.3.8. Bestimmung des Nitrit-Gehalts**

Die NO-Produktion durch Makrophagen kann in Zellkulturüberständen durch die Akkumulation von Nitrit unter Verwendung der so genannten Griess-Reaktion nachgewiesen werden (Green et al., 1982). Das gebildete Nitrit bildet mit dem Griess-Reagenz einen violetten, photometrisch messbaren, Azofarbstoff. Für die Messung wurden je 100µl der Proben in Triplikaten in eine 96-Loch Platte aufgetragen. Zusätzlich wurde zur späteren Quantifizierung der Proben ein Natrium-Nitrit ( $\text{NaNO}_2$ )-Standard mit einem Konzentrationsbereich von 100µM bis 1,6µM mitgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl frisch gemischtem Griess-Reagenz und die Messung der Proben bei einer Wellenlänge von 540nm im Emax ELISA Reader (Molecular Devices).

### **2.3.9. Bestimmung der MPO-Aktivität in Kolon-Gewebe**

Die myeloide Peroxidase (MPO) ist ein Indikator für die Einwanderung neutrophiler Zellen in das entzündete Gewebe nach einer Colitis (siehe 2.6.7.) und somit ein indirekter Entzündungsmarker. Zur Bestimmung der MPO-Aktivität (nach Bradley et al., 1982) wurde zunächst das stuhlfreie Gewebe in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und 1ml Puffer A zugegeben. In diesem Volumen erfolgte die Homogenisierung des Gewebes mittels des Ultra-Turrax-Stabs T25 (IKA) bei höchster Drehzahl für 1min. Die so gewonnene Suspension konnte in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 40°C im Wasserbad. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14000g und 4°C für 2min, konnte der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur längeren Lagerung bei -20°C eingefroren werden. Für die eigentliche Messung der MPO-Aktivität wurden jeweils 20µl der Proben in Triplikaten in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Eigenabsorption, der 0min-Wert, im Emax ELISA Reader (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 280µl frisch angesetztem Puffer

B pro Well und die minütliche Messung der OD für die Dauer von 10min. Die Berechnung der MPO-Aktivität ergibt sich aus der Änderung der optischen Dichte als Funktion der Zeit in Verbindung mit dem Lambert Beer'schen Gesetz gemäß folgender Formel:

$$U \text{ (MPO)} [\mu\text{mol}/\text{min}] = \frac{\Delta E \text{ (Endwert} - \text{Anfangswert)} \times \text{Volumen der Messlösung (300}\mu\text{l)}}{\text{Zeit} \times \epsilon \times d \times \text{Probenvolumen (20}\mu\text{l)}}$$

1U MPO ist definiert als die Menge des Enzyms, die 1 $\mu\text{mol}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 25°C in 1min hydrolysiert. Da die Enzymgeschwindigkeit anfangs am höchsten ist, verwendete man  $\Delta E$  nach 1min.  $\epsilon$  von o-Dianisidin bei einer Wellenlänge von 450nm beträgt 0,0113 $\mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Wilson et al., 2007), und die Schichtdicke  $d$  beträgt in diesem Fall 1cm. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung mittels eines BCA-Assays (siehe 2.3.3.) war es somit möglich, die MPO-Aktivität in U/mg Protein anzugeben.

### **2.3.10. „Enzyme linked immunosorbend assay“ (ELISA)**

Mittels eines ELISAs ist es möglich, auch geringe Antigen- oder Antikörperkonzentrationen in Lösungen wie Serum oder Zellkulturüberständen nachzuweisen. Es werden hauptsächlich zwei Methoden unterschieden: Bei der ersten wird das Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden, in der zweiten Antikörper. Weit verbreitet ist das System des „Sandwich-ELISAs“. Hier werden so genannte „Fang“-Antikörper an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden, die anschließend das entsprechende Antigen, z.B. ein spezielles Zytokin, aus der Probenlösung fangen und so gleichzeitig aufkonzentrieren. Unspezifische Antigene können auf diese Weise gewaschen werden. Anschließend erfolgt die Zugabe eines zweiten Antiköpers (Detektions-Antikörper), der ein anderes Epitop des gleichen Antigens erkennt. Die Auswertung eines ELISAs erfolgt mittels einer Enzymreaktion, die auf einer Peroxidase (HRP) beruht. Das Enzym kann direkt an den Detektions-Antikörper gebunden sein oder z.B. über eine Biotin-Streptavidin-Bindung zugegeben werden. Nach anschließender Inkubation mit einem entsprechenden chromogenen Substrat kann dieses umgesetzt und die Farbreaktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen werden.

In dieser Arbeit kamen verschiedene ELISA Duo Sets der Firma R&D Systems zum Einsatz. Die Zytokine aus Zellkulturüberständen oder Mausseren wurden entweder unverdünnt oder in einer 1:5-Verdünnung vermessen. Ansonsten erfolgte die Durchführung nach Angaben des Herstellers.

## **2.4. Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1. Zellkulturbedingungen**

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden ausschließlich mit sterilen Reagenzien und Arbeitsmaterialien unter Verwendung einer HERAsafe<sup>®</sup> KS Sterilbank (Thermo Scientific) durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien und primärer Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank Cell Safe (Integra Bioscience) in geeignetem Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. *Drosophila*-Schneider 2 Zellen wurden bei 28°C ohne CO<sub>2</sub>-Zugabe kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte zweimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:10.

### **2.4.2. Expression von mBD14:Ig mittels *Drosophila*-Schneider 2 Zellen**

Für alle Fragestellungen der vorliegenden Arbeit wurde ein mBD14:Ig-Fusionsprotein verwendet. mBD14 ist C-terminal an den F<sub>C</sub>-Teil des humanen IgG1 gekoppelt, was sowohl die Aufreinigung des Peptids als auch seine Detektion ermöglichte. Darüber hinaus hat der Ig-Tag weder einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität noch auf die chemotaktische Wirkung von mBD14 und weitere untersuchte Defensin:Ig-Fusionsproteinen (Röhrl et al., 2008).

Für die Expression von mBD14:Ig wurden mit pMT Bip V5-Hygro mBD14:Ig transfizierte *Drosophila*-Schneider 2 Zellen in Multi-Flasks (BD Biosciences) mit 100ml Insect Express Prime-Medium (PAA) mit 0,1mg/ml Kanamycin (Sigma-Aldrich) und 0,3mg/ml Hygromycin B (PAA) kultiviert und zweimal pro Woche in einem Verhältnis 1:10 geteilt. Dabei wurden die restlichen Zellen in 50ml Reaktionsgefäße überführt, bei 230g und 4°C 5min abzentrifugiert und in eine Rollerflasche (Corning) mit 200ml Medium mit Kanamycin und 0,5mM CuSO<sub>4</sub> für 3 bis 4d rollend bei RT inkubiert. Das CuSO<sub>4</sub> diente hierbei als Induktor der Expression, da das Defensin in dem verwendeten Plasmid unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promotors steht. Für die Gewinnung des Überstands erfolgte eine weitere Zentrifugation dieser Zellen in der Ultrazentrifuge Sorvall<sup>®</sup> RC6 (Thermo Scientific) bei 9000g und 4°C für 15min, wonach der Überstand in luftdicht verschlossene Flaschen überführt und bei 4°C gelagert werden konnte.

### **2.4.3. Expression des Kontrollpeptids SIg+ in HEK 293-Zellen**

Als Negativkontrolle für den Ig-Tag des mBD14:Ig diente jeweils das aus dem Leervektor exprimierte SIg+. Da hiervon geringere Mengen als von den Defensinen benötigt wurden, erfolgte die Expression in HEK 293-Zellen. Diese wurden hierfür in 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Sarstedt) überführt und in RPMI 1640 Medium ohne Zusatz von Antibiotika oder FCS eine Woche lang kultiviert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000g und 4°C für 10min, nach der der Überstand in eine luftdicht verschlossene Flasche überführt und bei 4°C gelagert wurde.

### **2.4.4. Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Die Aufbewahrung von Zellstocklösungen erfolgte stets in Kryoröhrchen (Nunc) in flüssigem Stickstoff. Um diese wieder in Lösung zu bringen, wurden sie möglichst schnell bei 37°C in einem Wasserbad TB12 (Julabo) aufgetaut, sofort in 9ml entsprechendes Zellkulturmedium überführt und anschließend bei 300g und 4°C für 5min zentrifugiert. Das Zellpellet konnte dann in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt werden.

Zum Einfrieren der Zellen erfolgte eine Zentrifugation der Zellen einer 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche, wonach diese in 1,6ml Medium resuspendiert wurden. Die Zellen konnten sodann auf zwei Kryoröhrchen (Nunc) zu je 800µl aufgeteilt und auf Eis vorgekühlt werden. Anschließend wurden je 800µl kaltes Einfriermedium zugegeben, durch Invertieren gemischt und die Zellen sofort bei -80°C eingefroren. Nach etwa einer Woche erfolgte dann die Überführung in flüssigen Stickstoff.

### **2.4.5. Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (Brand). Diese unterteilt sich in vier Großquadrate, die sich wiederum in 16 Kleinquadrate untergliedern lassen. Es wurde jeweils eine 1:10-Verdünnung der Zellsuspension ausgezählt, die zwischen Neubauer-Kammer und einem Deckgläschen eingefüllt wurde. Hierbei entsteht ein definiertes Volumen, wodurch sich in einem Großquadrat exakt 0,1µl Flüssigkeit befindet. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml Lösung}}$$

Es wurden die Zellen aller vier Großquadrate gezählt. Der Faktor  $10^4$  ist für eine Hochrechnung des analysierten Volumens von 0,1µl auf 1ml notwendig. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte unter Verwendung von Trypanblau für die 1:10-Verdünnung. Dieser Farbstoff färbt ausschließlich tote Zellen, da er von diesen nicht mehr aktiv nach draußen transportiert werden kann. Unter Ausschluss dieser Zellen erhält man die Anzahl lebender Zellen.

#### **2.4.6. Generierung von *bone marrow derived macrophages* (BMDM)**

Die Generierung von Knochenmarkmakrophagen erfolgte entsprechend dem Protokoll von M. Rehli (Rehli et al., 2005). Dafür wurden Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und ihnen sodann Tibia und Femur entnommen. Zur Vermeidung einer Schädigung der Zellen wurden die Knochen in Petrischalen mit etwas sterilem PBS auf Eis zwischengelagert. Anschließend erfolgte das Öffnen der Enden mit einer Schere und möglichst wenig Materialverlust. Danach konnte das Mark mit kaltem PBS unter Zuhilfenahme einer 10ml-Spritze mit 0,4mm-Kanüle ausgespült werden. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 300g und 4°C für 8min erfolgte die Vereinzelung der Zellen und Entfernung eventueller Knochensplitter über ein Zellsieb (BD Biosciences). Im Anschluss daran wurden die Zellen gezählt und  $10^7$  Zellen in 20ml RPMI 1640 mit 10% FCS, 10% M-CSF (konditionierter L929-Zell-Überstand aus eigener Herstellung), 100U/ml Penicillin, 100U/ml Streptomycin und 50µM β-Mercaptoethanol in einer quadratischen Zellkulturschale (Sterilin) ausgesät. Die Zugabe von M-CSF führte zu einer Ausdifferenzierung der unreifen Knochenmarkszellen zu Makrophagen. Am fünften Tag der Kultur erfolgte ein Mediumwechsel durch Ersetzen von 10ml Medium. Zum Ernten der Zellen wurde am Tag sechs das Medium in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und durch 10ml PBS ersetzt. Darin erfolgte eine Inkubation für 2 bis 3min auf Eis, während der sich die Verbindung der Zellen zum Boden der Zellkulturschale ein wenig löste. Zum vollständigen Ablösen der Zellen kamen Zellschaber (Sarstedt) zum Einsatz. Anschließend konnte die Zellsuspension zu dem zuvor gesammelten Medium gegeben werden. Dies wurde bei 300g und 4°C für 6min zentrifugiert, das Zellpellet in 5ml Medium resuspendiert und die Zellen daraufhin gezählt. Anschließend wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in einer 24-Loch Platte ausgesät. Die Stimulierung der Zellen erfolgte an Tag sieben der Kultur.

### **2.4.7. Generierung von *bone marrow derived dendritic cells* (BMDC)**

Auch für die Generierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark erfolgte zunächst die Entnahme von Femur und Tibia einer Maus nach zervikaler Dislokation. Nach Spülen und Zentrifugation wie unter 2.4.6. beschrieben, wurden die Zellen zu  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch in einer 24-Loch Platte in 1ml RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 30ng/ml GM-CSF (aus eigener Herstellung), 100U/ml Penicillin, 100U/ml Streptomycin und  $50\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol ausgesät. Am Tag zwei der Kultur erfolgte die Zugabe von 1ml frischem Medium und nachfolgend alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durch Austausch von je 1ml Medium. Am Tag zehn der Kultur konnten die Zellen stimuliert werden. Zum Ernten der BMDCs erfolgte eine Inkubation für 2 bis 3min auf Eis und anschließend ein vorsichtiges Abspülen der Zellen.

Alternativ wurden die BMDCs nicht in 24-Loch Platten, sondern  $2 \times 10^6$  Zellen in einer 10cm Petrischale (Sarstedt) ausgesät. Diese Methode kam vor allem für die Untersuchung des Zellkulturüberstandes (siehe 2.3.5.) sowie für RNA-Expressionsanalysen (siehe 2.2.2.) von BMDCs transgener Tiere zur Anwendung. Zum Testen der Zellkulturüberstände auf die Expression transgenen mBD14:Igs wurden die Zellen zuletzt einen Tag lang in FCS-freiem Medium inkubiert, um eine Bindung der im FCS enthaltenen Antikörper an die Protein G-Sepharose zu verhindern.

### **2.4.8. Isolierung von Milzzellen**

Für die Präparation von Milzzellen wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, nach Desinfektion mit 70% Ethanol geöffnet und jeweils die Milz entnommen. Diese wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 100U/ml Penicillin, 100U/ml Streptomycin und  $50\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol auf Eis überführt. Die Milzen konnten anschließend mittels des sterilen Stempels einer 5ml-Einmalspritze durch ein Zellsieb (beides BD Biosciences) passiert, die Zellen so vereinzelt und in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend wurden diese zweimal mit 25ml Medium mittels Zentrifugation bei 300g und  $4^\circ\text{C}$  für 5min gewaschen. Zum Entfernen von Erythrozyten aus der Lösung folgte eine Inkubation mit 5ml Erythrozyten-Lysepuffer für 10min bei  $37^\circ\text{C}$ . Diese Reaktion konnte durch die Zugabe von 40ml Medium gestoppt werden. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Brand) (siehe 2.4.5.).

### **2.4.9. Isolierung und Diff-Quick-Färbung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PECs)**

Für die Isolation von PECs aus Mäusen erfolgte eine Behandlung der Tiere entsprechend 2.6.3. Anschließend wurden die Mäuse dekapitiert, mit 70% Ethanol desinfiziert und das Peritoneum mit 10ml RPMI 1640 Medium mit 10% FCS gespült. Diese Lösung wurde dann in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 300g und 4°C für 5min pelletiert. Nach einmaligem Waschen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Brand) (siehe 2.4.5.). Nun konnten die Zellen entweder nach der Diff-Quick-Methode gefärbt oder zur Analyse der TNF- bzw. NO-Produktion ausgesät werden. Für letzteres wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 100U/ml Penicillin und 100U/ml Streptomycin in eine 48-Loch Platte gesät, wo sie 3h lang adhärerten. Anschließend erfolgte eine Stimulierung entsprechend 2.4.10.5. Für eine Diff-Quick-Färbung (Medion Diagnostics) wurden 1 bis  $2 \times 10^5$  Zellen in 100 $\mu$ l Medium resuspendiert und mittels der Zytozentrifuge Shandon Cytospin 4 (Thermo Scientific) bei 600rpm für 6min ohne Bremse auf einen Objektträger transferiert. Nach mindestens einstündiger Trocknung erfolgte die Färbung, indem die Objektträger zunächst fünfmal in Fixierlösung, anschließend achtmal in Eosin und zuletzt fünfmal in Methylenblau getaucht wurden. Überschüssige Farbreste konnten mit ddH<sub>2</sub>O entfernt und die Zellen anschließend unter Zuhilfenahme von Immersionsöl unter einem Mikroskop (Leitz Diaplan) betrachtet werden. Die einzelnen Populationen wurden mittels der Zellzählapparatur Counter AC-12 (De Bruyne Instruments) gezählt.

### **2.4.10. Stimulierungen**

Für alle Stimulierungen wurden, wenn nicht anders angegeben,  $5 \times 10^5$  Zellen pro Loch in einer 24-Loch Platte ausgesät. Nach Adhären über Nacht erfolgte ein Mediumswechsel. Alle Stimulierungen erfolgten in einem Volumen von 500 $\mu$ l.

#### **2.4.10.1. Stimulierungen zur Analyse der Zytokin-Produktion in der mBD14:Ig transgenen Maus**

Für die Analyse der Zytokinproduktion in mBD14:Ig transgenen Tieren kamen primäre Zellen zum Einsatz. Hierbei erfolgte eine Stimulierung für 4h, 8h, 18h oder 24h mit 100ng/ml LPS, 1 $\mu$ M CpG oder 25 $\mu$ g/ml poly I:C. Nach den angegebenen Zeiten wurden je

nach Fragestellung die Überstände für eine Zytokinanalyse mittels ELISA (siehe 2.3.10.) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder die Zellen in  $350\mu\text{l}$  RA1-Puffer mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Isolation der RNA gelagert (siehe 2.2.2.).

#### **2.4.10.2. Stimulierung des Inflammasoms**

Das Inflammasom beschreibt einen Proteinkomplex innerhalb der Zelle, bestehend aus verschiedenen Mediatoren und der Pro-Caspase-1, der die Produktion der Zytokine IL- $1\beta$  und IL-18 reguliert. Damit die reifen Zytokine aus der Zelle sekretiert werden können, sind zwei Stimuli nötig. Die Stimulierung eines TLRs führt zu einer Transkription von pro-IL- $1\beta$  sowie von pro-IL-18, wohingegen ein zweiter Stimulus, z.B. ATP, Kristalle oder dsDNA die Bildung des Inflammasom-Komplexes initiiert, der wiederum die Zytokine in ihre reife, funktionsfähige Form spaltet (Schroder et al., 2010).

Für die Stimulierung des Inflammasoms erfolgte zunächst eine Inkubation mit einem TLR-Liganden, hier  $100\text{ng/ml}$  LPS, für 2h. Alternativ wurden  $5\mu\text{g/ml}$  Defensin oder SIg+-Kontrollpeptid zugegeben. Nach dem Waschen der Zellen mit  $500\mu\text{l}$  Medium erfolgte die zweite Stimulierung durch Inkubation mit  $2\text{mM}$  ATP für 3h. Anschließend konnten die Überstände gesammelt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Durchführung eines entsprechenden ELISAs gelagert werden.

#### **2.4.10.3. Vorstimulierung mit Defensinen**

Viele Experimente dieser Arbeit beruhen auf einer Vorstimulierung von meist BMDM mit Defensinen, und einer anschließenden Restimulierung durch einen TLR-Liganden. Hierbei erfolgte eine Inkubation mit  $5\mu\text{g/ml}$  Ig-gekoppelten Defensins bzw. des SIg+-Kontrollpeptids oder hIgG für 4h. Zur Kontrolle fand auch eine, für die Dauer von 1h bei  $95^{\circ}\text{C}$ , inaktivierte Form des mBD14 Verwendung. Weitere Alternativen bildeten  $100\text{ng/ml}$  MCP-1 als Chemokin-Ligand für CCR2 sowie  $10\text{nM}$  fMLP. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese mit verschiedenen TLR-Liganden wie  $100\text{ng/ml}$  LPS,  $1\mu\text{M}$  CpG,  $25\mu\text{g/ml}$  poly I:C oder  $1\mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> für weitere 24h stimuliert. Anschließend konnten die Überstände bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Durchführung eines entsprechenden ELISAs (siehe 2.3.10.) gelagert werden oder die Zellen wurden mit  $50\mu\text{l}$  RIPA-Puffer lysiert und die Ly-sate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren (siehe 2.3.1.).

#### **2.4.10.4. Einsatz verschiedener Inhibitoren**

Für eine genauere Analyse potentieller Signalmechanismen von mBD14 kamen unterschiedliche Inhibitoren zum Einsatz. Als wichtigster für diese Arbeit sei hierbei das Pertussis Toxin (PTX) (List Biological Laboratories) genannt. Dieses inhibiert jegliche Signalweiterleitung G Protein-gekoppelter Rezeptoren, indem es die ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Einheit des  $G_i$ -Protein-Komplexes katalysiert und somit dessen Anlagerung an den Rezeptor unterbindet (Burns, 1988). Auf diese Weise hemmt es unter anderem alle Chemokinrezeptoren. Die Zellen wurden mit 100ng/ml PTX für 2h inkubiert, anschließend gewaschen und daraufhin wie unter 2.4.10.3. weiter stimuliert.

Ein weiterer Inhibitor war Ly294002 (Cayman Chemicals), ein Hemmer der Phosphatidyl-3-Kinase (PI3K). Unter anderem inhibiert dieser ebenfalls den Signalweg G Protein-gekoppelter Rezeptoren. Hierbei erfolgte eine gleichzeitige Stimulierung der Zellen mit 10 $\mu$ M Ly294002 (chemische Formel: C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>) und mBD14 für die angegebenen 4h. Darüber hinaus wurde RS 102895 (Sigma-Aldrich) (chemische Formel: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ein CCR2-Antagonist, verwendet. Der Einsatz desselben erfolgte in einer Konzentration von 10 $\mu$ M zeitgleich mit mBD14. Zusätzlich wurde DMSO als Vehikel-Kontrolle verwendet.

Ein Inhibitor kam auch in Verbindung mit der Charakterisierung der mBD14:Ig transgenen Maus zum Einsatz. In diesem Fall handelte es sich um den Proteasom-Inhibitor MG132 (Sigma-Aldrich), mit dessen Hilfe die vorzeitige Degradation des Defensins ausgeschlossen werden sollte. Hierfür wurden 4 x 10<sup>6</sup> Knochenmarkmakrophagen mit 20 $\mu$ M des Inhibitors für 1h bis 5h in 6-Loch Platten inkubiert, anschließend Zelllysate durch Zugabe von 150 $\mu$ l RIPA-Puffer generiert (siehe 2.3.1.) und für einen weiteren Nachweis des enthaltenen mBD14:Ig via Western Blot (siehe 2.3.5.) bei -80°C eingefroren.

#### **2.4.10.5. Stimulierung von PECs**

Für die Stimulierung von PECs wurden diese, wie unter 2.4.9. beschrieben, ausgesät und in 48-Loch Platten adhären gelassen. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit einer Mischung aus 100ng/ml LPS und 20ng/ml IFN $\gamma$  in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 100U/ml Streptomycin und 100U/ml Penicillin. Nach 48h wurden die Überstände für die weitere NO-Bestimmung (siehe 2.3.8.) bei -20°C eingefroren und zu den Zellen 350 $\mu$ l RA1-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol zur späteren RNA-Isolierung gegeben (siehe 2.2.2.).

Alternativ erfolgte eine Stimulierung, wie unter 2.4.10.1. beschrieben, mit LPS, CpG oder poly I:C für 24h.

#### **2.4.10.6. Stimulierung von Milzzellen für eine intrazelluläre TNF-Färbung**

Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  präparierte Milzzellen (siehe 2.4.8.) pro Loch in 500 $\mu$ l RPMI 1640 Medium mit 10%FCS, 100U/ml Penicillin und 100U/ml Streptomycin in eine 48-Loch Platte ausgesät. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 10 $\mu$ g/ml Brefeldin A pro Loch für 4h bei 37°C. Brefeldin A ist ein Zellgift, das die Sezernierung von Proteinen hemmt, indem es den Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) inhibiert und gleichzeitig den retrograden Transport der Proteine vom Golgi-Apparat zurück in das ER induziert (Klausner et al., 1992). Die weitere intrazelluläre TNF-Färbung erfolgte wie unter 2.4.13. beschrieben.

#### **2.4.11. MACS-Separation**

Zur Isolation von CD90 (Thy1.2)<sup>+</sup> T- und B220<sup>+</sup> B-Zellen aus präparierten Milzzellen (siehe 2.4.8.) wurde die Technik der magnetischen Zellsortierung (MACS) verwendet. Hierbei sind spezifische Antikörper an magnetische MicroBeads gekoppelt, die an entsprechende Zellen binden. Anschließend werden diese über magnetische Säulen separiert. Im Fall der T-Zellen erfolgte die Aufreinigung mittels direkt gelabelter Beads, während die B-Zellen zunächst mit einem biotinylierten Antikörper gegen B220 gefärbt und anschließend mit Streptavidin-gebundenen Beads isoliert wurden (jeweils nach Angaben des Herstellers, Miltenyi Biotech). Die so aufgereinigten Zellen wurden zum einen in 350 $\mu$ l RA1-Puffer + 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und für eine weitere RNA-Isolation (siehe 2.2.2.) gelagert oder zum anderen mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.4.12.) auf ihre Reinheit überprüft.

#### **2.4.12. Durchflusszytometrie**

Zellen können mittels spezifischer Antikörper bezüglich ihrer Oberflächenmarker charakterisiert werden. Hierfür wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in FACS-Röhrchen überführt, 2ml FACS-Puffer zugegeben, bei 300g und 4°C 5min lang zentrifugiert und anschließend der Überstand abdekantiert. Alle folgenden Waschschrte erfolgten nach dem gleichen Protokoll. Da die Antikörper für eine FACS-Analyse fluoreszenzmarkiert sind, wurden alle In-

kubationsschritte auf Eis und unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung durchgeführt. Zunächst erfolgte ein Blockierungsschritt für 20min mit 50 $\mu$ l einer entsprechenden Verdünnung eines Antikörpers gegen die F $_{c\gamma}$ -Rezeptoren II und III, der eine unspezifische Bindung der folgenden Antikörper an die Zellen verhinderte. Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper in einer zuvor austitrierten Verdünnung zugegeben. Die Färbung erfolgte in einem Volumen von 100 $\mu$ l für 20min. Die so gefärbten Zellen wurden dann wie beschrieben gewaschen und im Fall eines biotinylierten primären Antikörpers mit 50 $\mu$ l entsprechend verdünntem fluoreszenzmarkierten Streptavidin für 20min inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 400 $\mu$ l FACS-Puffer und vor jeder Messung ihre anschließende Filtration durch Siebgewebe aus Polyamid (Reichert Chemietechnik GmbH). Zusätzlich zu den Antikörpern gegen die zu untersuchenden Oberflächenmarker wurden auch generell exprimierte Marker verwendet, die an die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren, um eine Überstrahlung der einzelnen Fluorochrome in die Spektren anderer Fluoreszenzfarbstoffe zu kompensieren. Außerdem kamen Isotypkontrollen zur Feststellung einer unspezifischen Bindung des F $_{c}$ -Teils der Antikörper zum Einsatz. Alle Messungen erfolgten an einem FACS Calibur (BD Biosciences) mit einer Auswertung durch die Software FlowJo 8.7.1.

Im Fall der Bindungsstudien mit mBD14 wurden 0,1 bis 0,5 $\mu$ g/ml des Defensins anstatt des primären Antikörpers zugegeben und anschließend mittels eines fluoreszenzmarkierten anti-human-IgG-Antikörpers detektiert.

#### **2.4.13. Intrazelluläre TNF-Färbung**

Entsprechend 2.4.10.6. stimulierte Milzzellen wurden zunächst in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach dem Waschen der Zellen und Blockieren unspezifischer Bindungen (siehe 2.4.12.) erfolgte eine Färbung der Zellen mit einem anti-CD11b FITC und einem anti-CD11c PE konjugierten Antikörper für 20min in angemessener Verdünnung. Nach erneutem Waschen wurden diese in 100 $\mu$ l 2% Formaldehyd zur Fixierung und Lagerung über Nacht aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen durch Zugabe von 1ml Perm/Wash-Puffer (BD Biosciences), ein Zentrifugationsschritt und nachfolgend eine Inkubation mit 1ml Perm/Wash-Puffer pro Röhrchen für 15min. Alle weiteren Schritte erfolgten mit dem oben genannten Puffer, so auch die folgende Blockierung (siehe 2.4.12.). Intrazelluläres TNF wurde mit einem anti-TNF APC Antikörper nach 20minütiger Inkubation und anschließendem Waschen nachgewiesen. Die Analyse erfolgte in FACS-Puffer mittels des FACS Calibur (BD Biosciences).

## **2.5. Histologische Methoden**

### **2.5.1. Vorbereiten und Färben histologischer Schnitte**

Nach Beendigung einer Colitis (siehe 2.6.7.) wurde ca. 1cm des Dickdarms der Länge nach aufgeschnitten und über Nacht in einer Kunststoffkassette in 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte eine Entwässerung des Gewebes mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen, um dann die Darmstücke in Parafin einzubetten. Hiervon wurden drei Längsschnitte mit einer Dicke von 3µm in einem Abstand von 100µm angefertigt und mittels Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Dafür entfernte man zunächst mittels Xylol die Parafinreste und entwässerte dann in mehreren Schritten die Schnitte in Alkohol mit absteigenden Konzentrationen (100%, 90%, 70%). Anschließend folgte die Hämatoxylin-Färbung (Merck) für 2min. Hämatoxylin färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau, insbesondere den Zellkern mit der darin enthaltenen DNA sowie das endoplasmatische Retikulum. Nach 15minütigem Waschen mit H<sub>2</sub>O folgte die Inkubation mit 0,1% Eosin (Sigma) in H<sub>2</sub>O für 2min. Eosin färbt alle basischen Strukturen der Zelle rot, wobei hauptsächlich Zytoplasmaproteine betroffen sind. Nach einminütigem Waschen mit H<sub>2</sub>O folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit abschließendem Xylolschritt. Sodann konnte entsprechend 2.5.2. mit der Bestimmung des histologischen Scores fortgefahren werden.

### **2.5.2. Bestimmung des histologischen Scores**

Die Ermittlung des histologischen Scores erfolgte nach zwei Gesichtspunkten. Zum einen wurden der Epithelschaden und zum anderen die Menge der infiltrierenden Zellen bewertet. Pro Tier erfolgte die Bewertung von mindestens drei seriellen Schnitten (siehe 2.5.1.) nach folgendem Schema:

Score	Epithelschaden	Infiltrate
0	normale Morphologie	kein Infiltrat
1	Verlust einzelner Becherzellen	wenig Infiltrate, vereinzelt
2	flächenhafter Becherzellverlust, Krypten vorhanden	Infiltrate zwischen den Krypten und der Lamina musc. Mucosae, mild und vereinzelt
3	Kryptenverluste vereinzelt	mehrere, moderate Infiltrate, Ödeme
4	Kryptenverlust flächenhaft	Infiltrate durch die Lamina musc. mucosae bis in die Submucosa reichend, massiv und flächenhaft

Anhand dieser Tabelle wurden pro Tier mindesten drei Dickdarmabschnitte bewertet, der Mittelwert gerundet und die Summe aus den Werten beider Bereiche gebildet. Diese bildete den histologischen Score.

### **2.5.3. Histologische Färbung von mBD14:Ig**

Mittels des Kryostat CM3050S (Leica Microsystems) wurden serielle Gewebeschnitte von 8µm Dicke angefertigt und auf einen Objektträger übertragen. Hier erfolgte eine Entwässerung des Gewebes in Aceton bei -20°C für 10min. Nach jedem Schritt war zunächst das Trocknen der Schnitte abzuwarten. Anschließend wurde jeder Schnitt mit einer hydrophoben Emulsion (Dako Pen, Dako) umrandet, die eine Färbung in einem kleinen Volumen erlaubte. Daraufhin erfolgte eine Rehydrierung des Gewebes mit TBS-T für 10min und eine anschließende Blockierung unspezifischer Bindung mittels 50µl Blockpuffer für 30min in einer feuchten Kammer. Nach kurzem Waschen konnten die Schnitte für 30min in 50µl Färbepuffer mit einem anti-human IgG AP gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 gefärbt werden. Anschließend erfolgten drei Waschschritte für je 10min mit TBS-T, wonach eine Inkubation mit einer AP-Substrat-Lösung (Sigma-Aldrich) für 30min durchgeführt wurde. Diese konnte dann mit H<sub>2</sub>O abgespült und mit 50µl Methylgrün die Zellkerne 5min lang gefärbt werden. Abschließend folgte eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend mit 90% Ethanol und mit einem Xylol-Schritt endend. Dann konnten die Schnitte mit Entellan eingebettet und an einem Mikroskop (Leitz Diaplan) beurteilt werden.

## **2.6. Tierexperimentelle Methoden**

### **2.6.1. Tierhaltung**

Alle verwendeten Tiere waren entsprechend den Haltungsvorschriften (BGBI. II Nr.46) untergebracht, hatten einen 12h Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*. Die zu immunisierenden Ratten waren in konventioneller Haltung untergebracht, wohingegen alle verwendeten Mäuse unter SPF (spezifisch-pathogen-freien)-Bedingungen gehalten wurden. Für die Durchführung der Colitis-Experimente erfolgte eine Überführung der entsprechenden Tiere in eine IVC (*isolated ventilated cage*)-Haltung eines konventionellen Tierlaboratoriums.

Für alle hier beschriebenen Tierexperimente wurde ein Tierversuchsantrag bei der zuständigen Behörde gestellt (TVA: 54-2532.1-31/10).

### **2.6.2. Serumgewinnung**

Zur Gewinnung von Serum erfolgte die Blutentnahme unter Narkose *retrobulbär*. Das Vollblut von Mäusen wurde auf Eis gesammelt. Anschließend folgte eine Inkubation bei 37°C für 30min, gefolgt von weiteren 30min auf Eis. Danach wurden die Proben bei 21000g und 4°C 5min lang zentrifugiert, um den Überstand großzügig in ein neues Reaktionsgefäß überführen zu können. Diesen zentrifugierte man erneut, wonach das erhaltene Serum ebenfalls bei -20°C gelagert wurde.

### **2.6.3. Induktion von PECs**

Um die Einwanderung von Peritonealexsudat-Zellen zu induzieren, wurde Mäusen 1ml PBS *intraperitoneal* injiziert. Nach etwa 16h konnten die eingewanderten Zellen entsprechend 2.4.9. isoliert werden.

### **2.6.4. Intravenöse LPS-Gabe für die intrazelluläre TNF-Färbung**

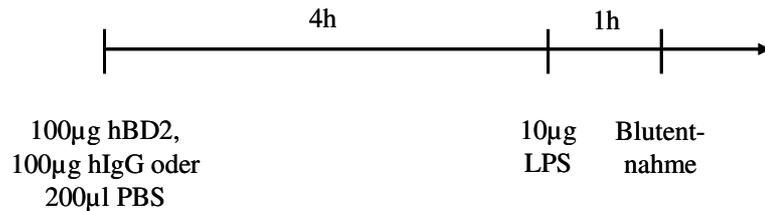
Für eine spätere intrazelluläre TNF-Färbung, wie unter 2.4.13. beschrieben, erfolgte die i.v. Injektion von 100µg LPS pro Maus in 100µl PBS in die laterale Schwanzvene von C57BL/6-Mäusen. Nach 1,5h wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Milz für die Isolation der Zellen (siehe 2.4.8.) entnommen.

### **2.6.5. In vivo-Stimulierung mit LPS oder CpG**

Bei dieser Methode erfolgte eine i.p. Injektion von 10µg LPS oder 20nmol CpG in 500µl PBS pro Maus. Nach 1h wurde den narkotisierten Mäusen *retrobulbär* Blut entnommen und diese anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Aufbereitung des Serums erfolgte wie unter 2.6.2. beschrieben.

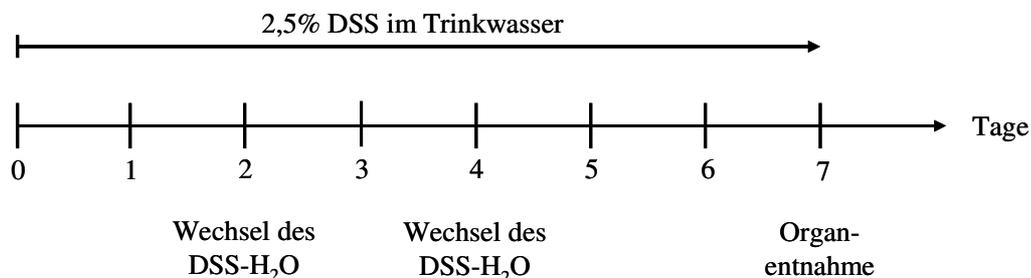
### **2.6.6. In vivo-Vorstimulierung mit hBD2**

Für eine Überprüfung der *in vitro*-Vorstimulierungsdaten *in vivo* wurde analog zu diesen Stimulierungen C57BL/6-Mäusen i.v. 100µg hBD2:Ig, 100µg hIgG oder nur 200µl PBS injiziert (siehe Schema). 4h später erfolgte die zweite Stimulierung mit 10µg LPS in 100µl PBS i.v. Nach einer weiteren Stunde wurde den narkotisierten Mäusen *retrobulbär* Blut entnommen und diese anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Gewinnung des Serums ist unter 2.6.2. beschrieben.



### **2.6.7. Induktion einer akuten DSS-induzierten Colitis**

Für die Induktion einer akuten Darmentzündung wurde den Mäusen 2,5% DSS im Trinkwasser über einen Zeitraum von sieben Tagen verabreicht, wobei nach zwei und vier Tagen jeweils ein Wechsel des Wassers erfolgte (siehe Schema). Über den gesamten Zeitraum wurde das Gewicht der Mäuse protokolliert und anschließend der Gewichtsverlauf graphisch dargestellt. Zur Beendigung der Colitis wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und das Kolon entnommen. Hier konnte zunächst dessen Länge gemessen werden, die ein Indikator für eine Dickdarmentzündung ist. Anschließend erfolgte die Probenahme. Es wurde jeweils ein Stück stuhlfreies Kolon für eine spätere RNA-Isolation (siehe 2.2.3.) in 500µl RNA later<sup>TM</sup> Puffer (Qiagen), ein Stück für die MPO-Messung (siehe 2.3.9.) in 1ml Puffer A und ein Stück für die Bestimmung des histologischen Scores (siehe 2.5.2.) in 4% Formaldehyd überführt.



## **2.7. Statistik**

Alle statistischen Analysen erfolgten mittels des Programms GraphPad Prism Version 4.0a. Im Fall eines Vergleichs zwischen ausschließlich zwei Gruppen wurde ein ungepaarter T-Test angewandt. In den meisten Fällen erfolgte jedoch ein Vergleich mehrerer Gruppen untereinander. Hier kam ein One-Way-ANOVA unter Zuhilfenahme eines Bonferroni-*Multiple-Comparison*-Posttests zum Einsatz, der alle Gruppen miteinander vergleicht. In den Abbildungen ist immer der Mittelwert mit der Standardabweichung dargestellt.

### **3. Ergebnisse**

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der funktionellen Charakterisierung des Maus  $\beta$ -Defensins 14 (mBD14) in entzündlichen Reaktionen. Die Arbeit lässt sich in zwei große Hauptthemen untergliedern: Zum einen erfolgte die Charakterisierung einer mBD14:Ig transgenen Mauslinie durch den Nachweis des Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene sowie ihr Einsatz in verschiedenen Entzündungsmodellen. Dabei wurde der Einfluss des mBD14:Ig-Transgens unter anderem auf die *in vitro* und *in vivo* TLR-Stimulierung sowie eine akute DSS-induzierte Colitis untersucht. Es konnte jedoch kein Phänotyp der mBD14:Ig transgenen Mauslinie nachgewiesen werden.

Zum anderen wurde die immunregulatorische Funktion von mBD14 auf Makrophagen näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine mBD14-Vorstimulierung einen verstärkenden Einfluss auf die TLR-induzierte TNF-Produktion hat. Diese Wirkung wird über einen G Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt und kann mit spezifischen Inhibitoren wie Pertussis Toxin gehemmt werden. Bei dem involvierten Rezeptor handelt es sich weder um CCR2 noch um CCR6.

#### **3.1. Charakterisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie**

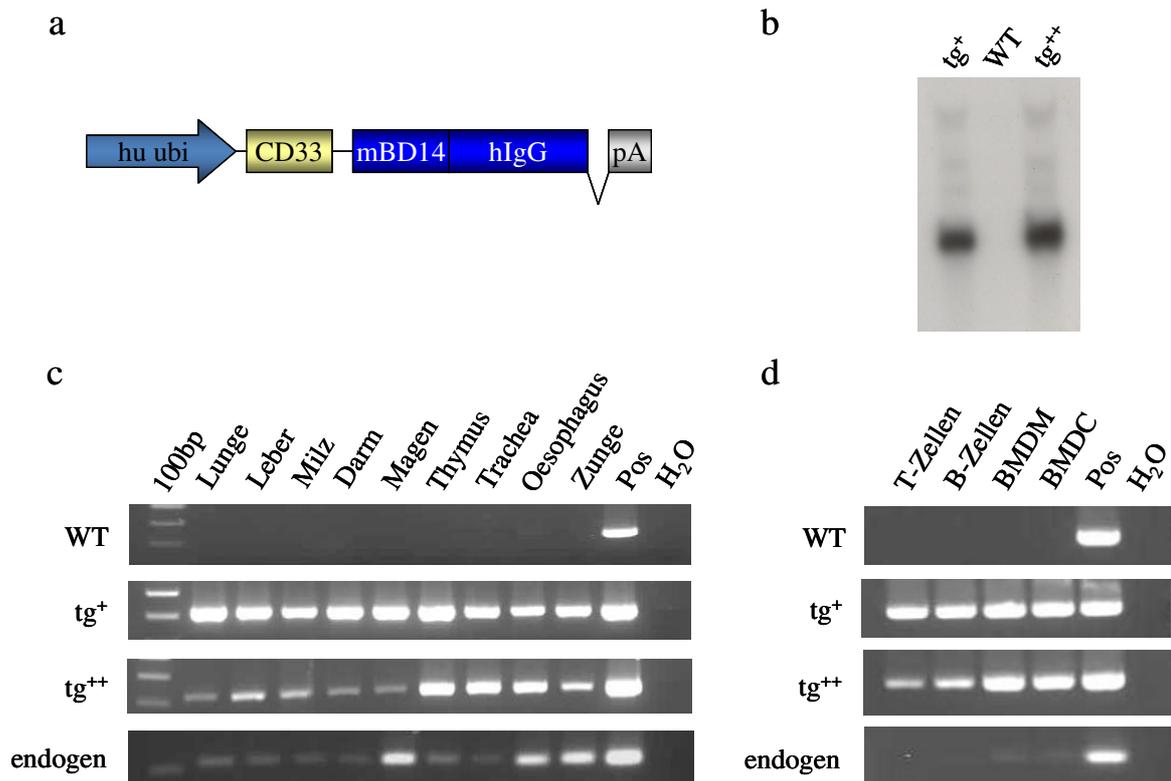
Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben einen immunmodulatorischen Effekt von Defensinen in unterschiedlichen Entzündungsmodellen. So sind sowohl humane als auch Maus- $\beta$ -Defensine in der Lage, unreife dendritische Zellen und T-Zellen über CCR6 (Yang et al., 1999) sowie Monozyten und Makrophagen über CCR2 (Röhrl et al., 2010b) chemotaktisch anzulocken. Das humane  $\beta$ -Defensin 3 (hBD3) kann zudem die Reifung Antigen-präsentierender Zellen über die Interaktion mit TLR1/2 induzieren (Funderburg et al., 2007). Dagegen können hBD3 und mBD14 jedoch auch anti-inflammatorisch wirken, indem sie nach LPS-Stimulierung von Makrophagen die TNF-Produktion hemmen (Semple et al., 2010). Vordaten aus dem eigenen Institut zeigten, dass im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis in Mäusen die mRNA-Expression von  $\beta$ -Defensinen wie mBD4 und mBD14 um das 10- bis sogar 30-fache erhöht ist. Darüber hinaus zeigten Mäuse mit einer mBD4:Ig-Behandlung während einer akuten Colitis verstärkte Anzeichen einer Entzündungsreaktion im Vergleich zu Kontrolltieren (Huber, unveröffentlichte Daten).

Vor diesem Hintergrund wurde zur Untersuchung der Wirkungsweise des mBD14 in entzündlichen Reaktionen *in vivo* eine mBD14:Ig transgene Mauslinie generiert, die das De-

fensin ubiquitär überexprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung dieser Mauslinie.

### **3.1.1. Nachweis des mBD14:Ig-Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene**

In Abb. 4a ist der Aufbau des mBD14:Ig-Transgens dargestellt. Der humane Ubiquitin-Promotor verursacht eine starke ubiquitäre Expression in allen Geweben und Zellen und die CD33-Leadersequenz sorgt für den Export des mBD14:Ig aus der Zelle. Anschließend folgt das mBD14:Ig-Fusionsprotein sowie ein polyA (pA)-Schwanz, der eine effektivere Expression der mRNA ermöglicht. Bei den im Folgenden meist als WT-Mäuse betitelten Tieren handelte es sich immer um *littermates* der mBD14:Ig transgenen Tiere, d.h. um Geschwistertiere, die jedoch das Transgen nicht tragen. Mittels einer Southern Blot Analyse erfolgte der Nachweis des Transgens in genomischer DNA, wobei zwei unterschiedliche Linien mBD14:Ig transgener Mäuse untersucht wurden. Die stärkere Bande in der Southern Blot Analyse deutet auf eine höhere Kopienzahl des transgenen mBD14:Ig in der genomischen DNA der  $tg^{++}$ -Linie im Vergleich zur  $tg^{+}$ -Linie hin (Abb. 4b). Darüber hinaus war es möglich, das Transgen auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Geweben sowie hämatopoetischen Zellen nachzuweisen (Abb. 4c und d), wobei jedoch die  $tg^{++}$ -Linie eine geringere und unterschiedlich ausgeprägte mRNA-Expression zeigte als die  $tg^{+}$ -Linie. Daher erfolgten alle weiteren Arbeiten mit der mBD14:Ig  $tg^{+}$ -Linie. Zur Kontrolle wurde parallel dazu auch die Expression des endogenen mBD14s gezeigt, das hauptsächlich in Magen, Ösophagus und Zunge zu finden war.



**Abb. 4: Nachweis des mBD14:Ig Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene.**

(a) Schematische Darstellung des mBD14:Ig Transgens mit humanem Ubiquitin-Promotor, CD33-Leadersequenz und polyA-Schwanz. (b) Nachweis der DNA des Transgens mittels Southern Blot Analyse. Unterscheidung in  $tg^+$ - und  $tg^{++}$ -Linie nach DNA-Menge des Transgens. (c+d) Nachweis des mBD14:Ig Transgens in verschiedenen Organen (c) und hämatopoetischen Zellen (d) auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR. Vergleich der mRNA-Expression in den beiden Linien sowie des endogenen mBD14. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

### **3.1.2. Nachweis des mBD14:Ig-Transgens auf Protein-Ebene**

Neben dem Nachweis des Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene wurde auch die Protein-Expression des mBD14:Ig-Transgens untersucht. Hierfür erfolgte zunächst eine Proteinextraktion aus BMDM und BMDC und anschließend der Nachweis des Proteins mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines anti-human IgG Antikörpers. In keiner der beiden Zellpopulationen konnte das Transgen auf Proteinebene detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Da die CD33-Leadersequenz zu einem Export des mBD14:Ig-Fusionsproteins aus der Zelle führt, wurden die Überstände der betreffenden Zellpopulationen auf das Vorhandensein des transgenen Proteins untersucht. Dabei erfolgte eine Immunpräzipitation des mBD14:Ig

mittels eines anti-human IgG Antikörpers, doch auch hier konnte das mBD14:Ig-Fusionsprotein nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die mRNA-Expression des Transgens konnte nicht nur in hämatopoetischen Zellen, sondern auch in allen untersuchten Geweben gezeigt werden. Daher erfolgte eine Analyse der Proteinexpression auch in Geweben wie dem Darm mittels Western Blot. Doch auch hier war kein Nachweis möglich (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde die mBD14:Ig-Proteinexpression im Serum der Tiere analysiert, wobei ebenfalls kein mBD14:Ig-Fusionsprotein detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Anschließend erfolgte die Untersuchung histologischer Schnitte verschiedener Organe, wie Darm, Lunge, Niere oder Leber. Diese wurden ebenfalls mit einem anti-human IgG Antikörper gefärbt, wobei sich jedoch auch hier keine Unterschiede zwischen mBD14:Ig transgenen und Wildtyp-Tieren ergaben (Daten nicht gezeigt).

Zum Ausschluss einer möglichen Degradation des Proteins nach der Translation erfolgte die Inkubation von BMDM mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (Sigma-Aldrich) und eine anschließende Überprüfung der Zellen sowie deren Überstände auf mBD14:Ig-Expression. Doch auch auf diesem Weg konnte kein transgenes Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine sofortige Degradation war deshalb unwahrscheinlich.

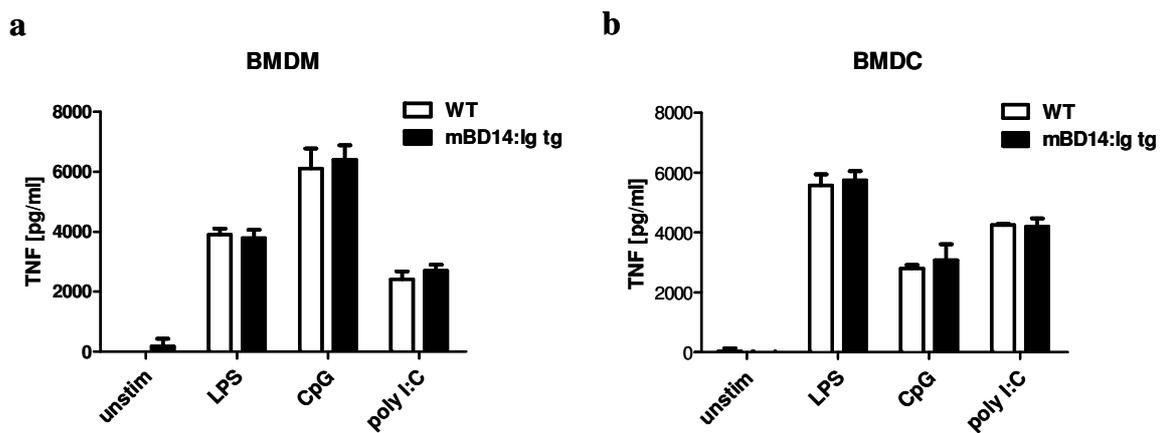
Vor diesem Hintergrund ergaben sich zwei Möglichkeiten: Entweder wurde die transgene mRNA trotz starker Expression nicht bzw. fehlerhaft translatiert oder das Protein in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers produziert. Da die letztere Möglichkeit nicht auszuschließen war, erfolgte die Untersuchung der transgenen Mauslinie hinsichtlich eines potentiellen Phänotyps.

### **3.1.3. In vitro-Phänotypisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie**

#### **3.1.3.1. Untersuchung der TNF-Produktion nach TLR-Stimulierung von BMDM sowie BMDC**

Semple et al. beschrieben im Jahr 2010 eine immunsuppressive Wirkung von hBD3 und mBD14. Dazu wurden Knochenmarkmakrophagen gleichzeitig mit hBD3 bzw. mBD14 und LPS für 18h stimuliert. Die anschließende Analyse der TNF-Produktion zeigte eine Reduktion der Zytokinexpression nach zeitgleicher Stimulierung mit Defensin im Vergleich zu einer alleinigen LPS-Gabe.

Die mBD14:Ig transgene Mauslinie bot ein viel versprechendes Modell, um ein vergleichbares Experiment unter anderen Bedingungen durchzuführen. Aus diesem Grund wurden aus transgenen und WT-Mäusen BMDM sowie BMDC generiert und anschließend für 18h mit LPS, CpG oder poly I:C stimuliert, wobei die transgenen Tiere der gleichzeitigen Defensin-Behandlung entsprachen. Wie in Abb. 5 gezeigt, produzierten die Zellen nach Stimulierung zwar TNF, jedoch waren weder bei Makrophagen (Abb. 5a) noch bei dendritischen Zellen (Abb. 5b) Unterschiede in der TNF-Produktion zwischen mBD14:Ig transgenen und WT-Tieren nachweisbar.



**Abb. 5: Kein Unterschied in der TNF-Produktion transgener und WT-BMDM sowie BMDC nach TLR-Stimulierung.**

(a+b) Stimulierung von BMDM (a) bzw. BMDC (b) mit 100ng/ml LPS, 1 $\mu$ M CpG oder 25 $\mu$ g/ml poly I:C für 18h. Die Messung der TNF-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Es wurden je 3 Tiere pro Gruppe verwendet. Exemplarisch ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

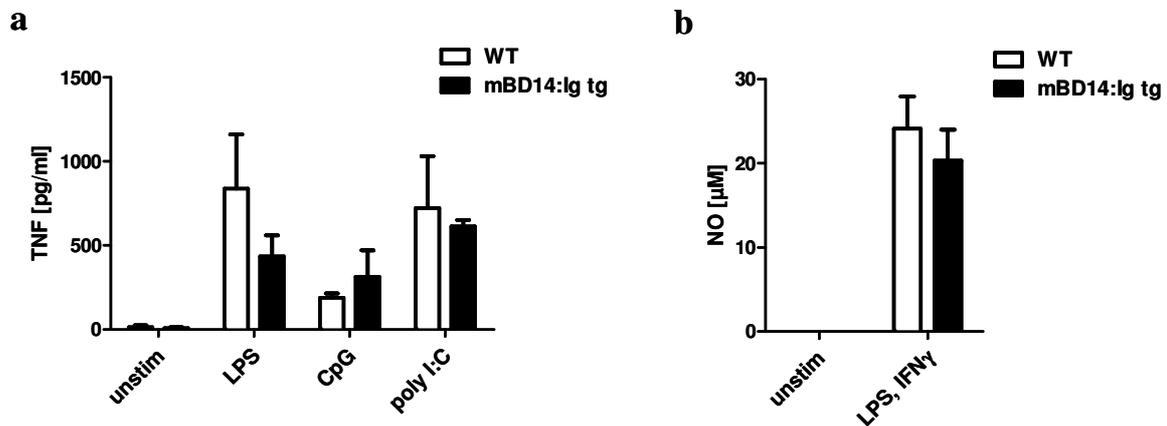
### 3.1.3.2. Untersuchung der TNF- und NO-Produktion von Peritonealexsudatzellen (PECs)

In dieser Arbeit wurden speziell PECs untersucht, da verschiedene Veröffentlichungen einen Einfluss der Defensine auf Makrophagen nachweisen konnten (z.B. Semple et al., 2010; Röhrle et al., 2010b). Bei PECs handelt es sich hauptsächlich um Monozyten und Makrophagen, die nach einer PBS-Injektion i.p. in das Peritoneum einwandern.

Zur Analyse wurden diese isoliert, mit LPS, CpG oder poly I:C stimuliert und anschließend die TNF-Produktion der Zellen gemessen. Jedoch konnte, wie bereits in BMDM und BMDC gezeigt (3.1.3.1.), auch hier kein Unterschied zwischen mBD14:Ig transgenen und WT-Tieren detektiert werden (Abb. 6a).

PECs können jedoch nicht nur zur TNF-Expression, sondern auch zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) angeregt werden. Hierbei gilt unter anderem IFN $\gamma$  als Aktivator

des Enzyms iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), das L-Arginin zu NO spalten kann (Knowles et al., 1994). Zur Messung der NO-Produktion wurden PECs mit LPS und IFN $\gamma$  stimuliert. Doch auch unter diesen experimentellen Bedingungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen mBD14:Ig transgenen und WT-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 6b).



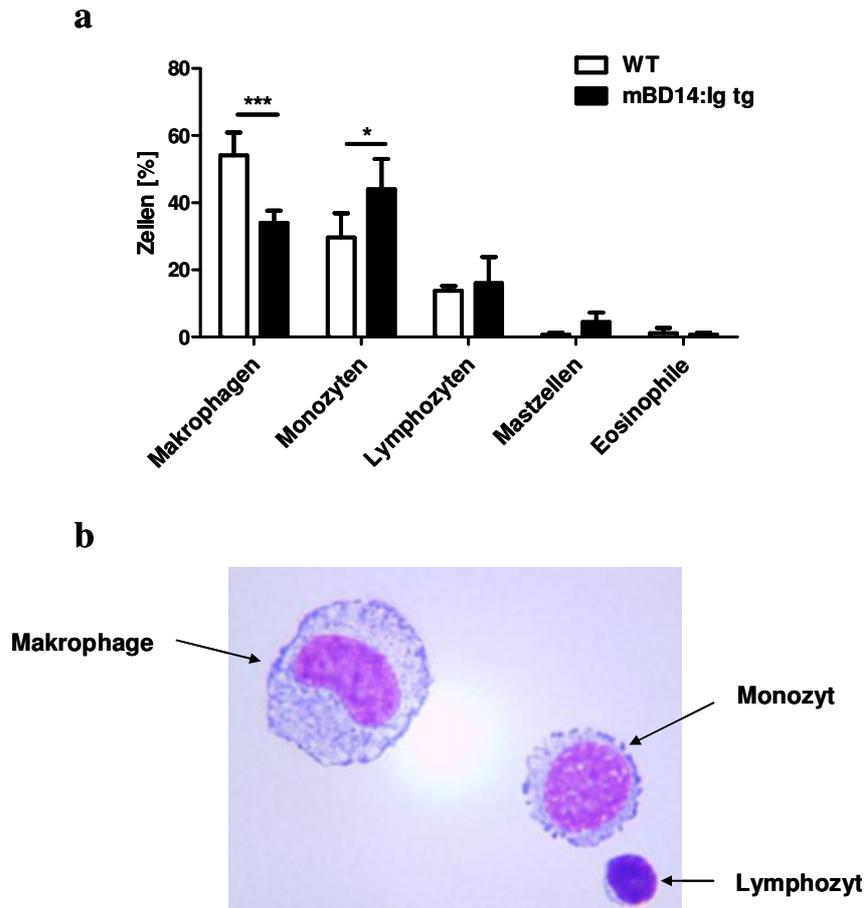
**Abb. 6: Kein Unterschied in der TNF- bzw. NO-Produktion von Peritonealexsudatzellen (PECs) mBD14:Ig transgener und WT-Tiere.**

Gewinnung der PECs durch Lavage des Peritoneums 16h nach i.p. PBS-Applikation in mBD14:Ig transgene oder WT-Tiere. (a) Stimulierung der PECs mit 100ng/ml LPS, 1 $\mu$ M CpG oder 25 $\mu$ g/ml poly I:C für 24h und anschließende Analyse der TNF-Produktion mittels ELISA. (b) Stimulierung mit 100ng/ml LPS und 20ng/ml IFN $\gamma$  für 48h zur Induktion der NO-Produktion und anschließender Analyse mittels der Griess-Reaktion. Es wurden je 3 Tiere pro Gruppe verwendet. Es ist eins von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

### 3.1.3.3. Analyse der Zellzusammensetzung von PECs

Die Analyse der Zellzusammensetzung der PECs (Abb. 7a) zeigte, dass im Vergleich zu WT-Mäusen in PECs transgener Tiere weniger reife Makrophagen, dagegen mehr Monozyten enthalten waren.

In Abb. 7b sind die häufigsten Zelltypen innerhalb der PECs abgebildet. Gezeigt sind dabei auch die morphologischen Unterschiede zwischen Makrophagen und Monozyten. Makrophagen sind größer als ihre Vorläufer, die Monozyten, und besitzen einen nierenförmigen Kern. Der Kern von Monozyten ist dagegen deutlich runder geformt. Beide zeichnen sich im Vergleich zu Lymphozyten durch ihre Größe, das voluminösere Zytoplasma sowie eine lockerere Kernstruktur aus.



**Abb. 7: Vermehrte Anlockung von Monozyten in das Peritoneum mBD14:Ig transgener Mäuse.**

Gewinnung der PECs durch Lavage des Peritoneums 16h nach i.p. PBS-Applikation in mBD14:Ig transgene oder WT-Tiere. (a) Ermittlung der Zellzusammensetzung nach Diff-Quick-Färbung. Unterscheidung je nach Morphologie in Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Mastzellen sowie Eosinophile. (b) Mikroskopische Abbildung der häufigsten Zellpopulationen innerhalb der PECs nach Diff-Quick-Färbung (100x). Es kamen je 3 Tiere pro Gruppe zum Einsatz. Statistischer Test: Two-way ANOVA mit Bonferroni Posttests. Es ist je ein repräsentatives Experiment von drei dargestellt.

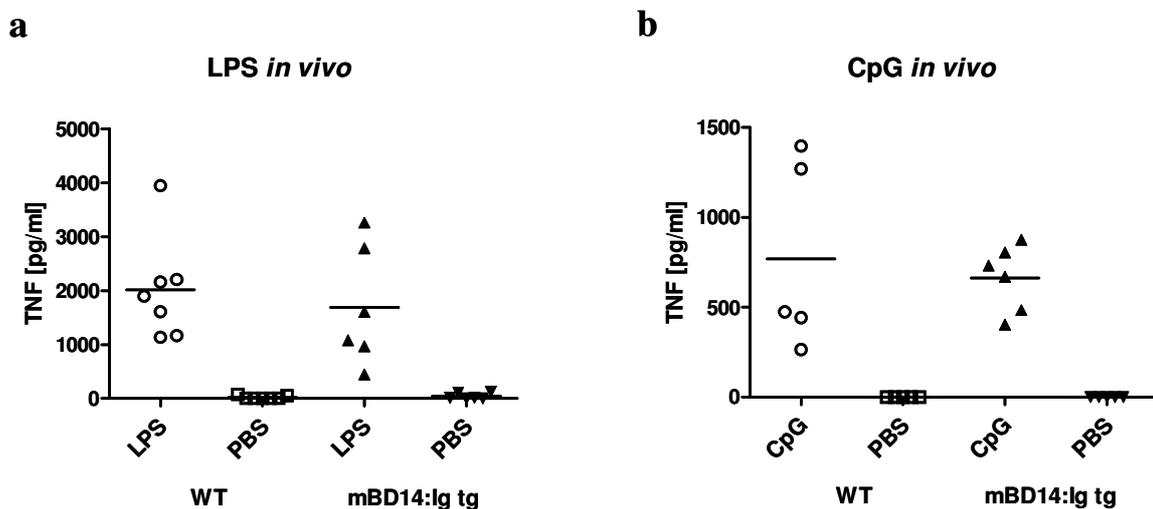
### **3.1.3.4. Analyse des Aktivierungsstatus von BMDM**

Die Unterschiede in der Zellzusammensetzung der PECs führten zu der Frage, ob BMDM der mBD14:Ig transgenen Mauslinie möglicherweise einen veränderten Aktivierungsstatus im Vergleich zu BMDM von WT-Tieren aufweisen. Darüber hinaus konnten Funderburg et al. (2007) einen Einfluss von Defensinen auf Aktivierungsmarker verschiedener Zellen zeigen. Deshalb wurden Knochenmarkmakrophagen beider Mauslinien bezüglich der Expression der Aktivierungsmarker MHC Klasse II sowie CD86 nach Stimulierung mit LPS getestet. Eine FACS Analyse dieser Zellen zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen transgenen und WT-Tieren (Daten nicht gezeigt).

### **3.1.4. In vivo-Phänotypisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie**

#### **3.1.4.1. Analyse der TNF-Produktion nach i.p. Injektion von LPS oder CpG**

Neben der Untersuchung verschiedener Zellpopulationen der transgenen Mauslinie erfolgte auch deren *in vivo*-Phänotypisierung. Hierfür wurde mBD14:Ig transgenen und WT-Mäusen entweder 10µg LPS (Abb. 8a) oder 20nmol CpG (Abb. 8b) i.p. injiziert, worauf ihnen 1h später Blut für die Analyse der TNF-Produktion entnommen wurde. Als Kontrolle diente die Applikation von PBS, die weder bei transgenen noch bei WT-Tieren eine Zytokinausschüttung bewirkte. Die TLR-Stimulierung führte in beiden Mauslinien zur TNF-Produktion, jedoch konnten weder nach LPS- noch nach CpG-Behandlung statistisch signifikante Unterschiede in der Menge des produzierten TNFs zwischen mBD14:Ig transgenen und WT-Tieren detektiert werden.



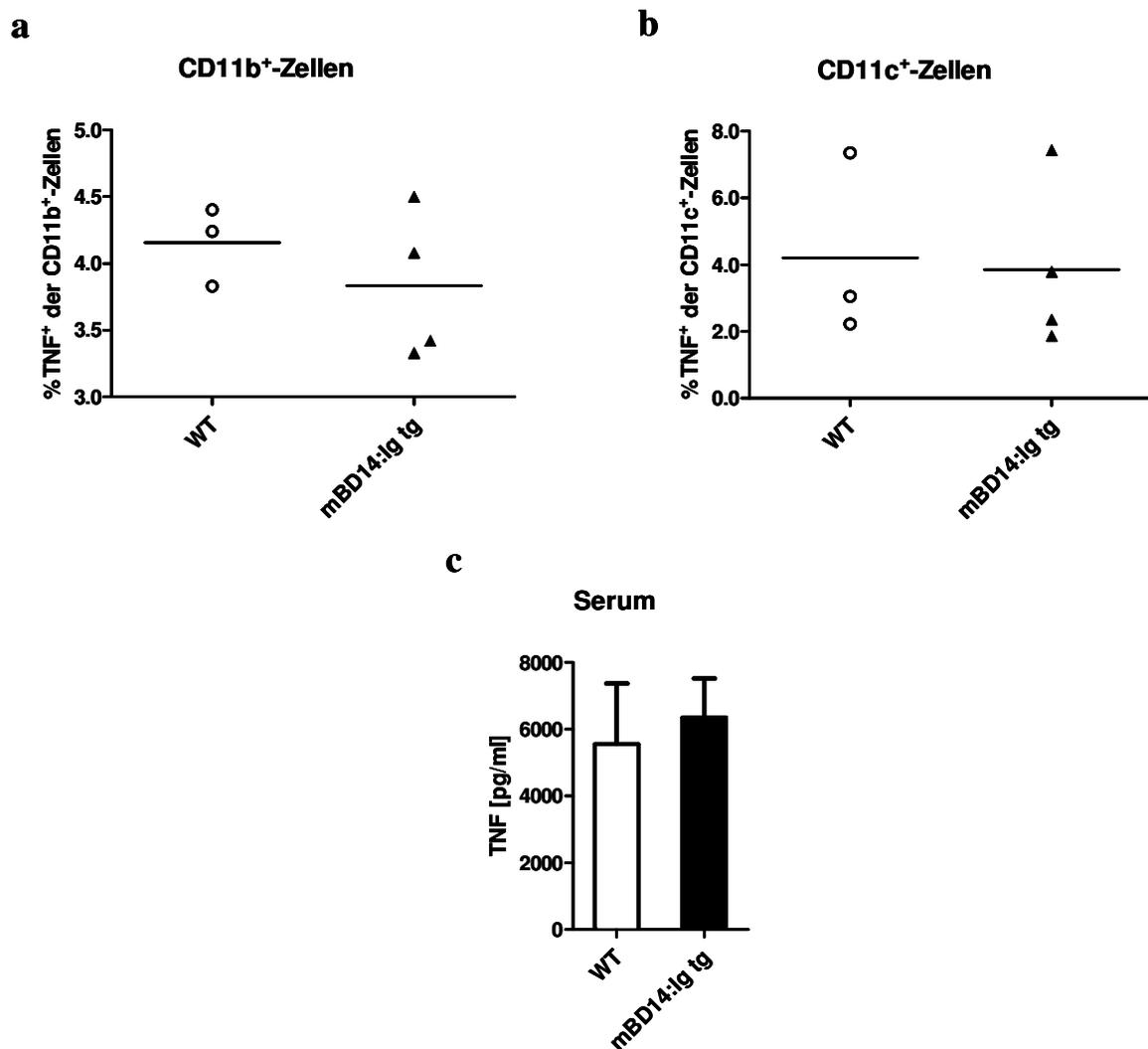
**Abb. 8: Keine Unterschiede in der TNF-Produktion im Serum mBD14:Ig transgener und WT-Tiere nach TLR-Stimulierung.**

(a+b) Behandlung mit je 10µg LPS (a), 20nmol CpG (b) in 500µl PBS oder PBS allein i.p. für 1h. Nach anschließender Blutentnahme erfolgte die Bestimmung der TNF-Konzentration im Serum mittels ELISA. Es wurden je 5 oder 6 Tiere pro Gruppe verwendet. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

#### **3.1.4.2. Bestimmung der intrazellulären TNF-Konzentration nach i.v. Injektion von LPS**

Zusätzlich zur Messung der TNF-Konzentration im Serum behandelter Mäuse wurden Milzzellen nach der LPS-Injektion isoliert, TNF intrazellulär gefärbt und anschließend die Anzahl der TNF-positiven Zellen bestimmt. Hierfür wurde den Mäusen 100µg LPS i.v. injiziert und nach 1,5h die Milz entnommen. Analysiert wurde der Prozentsatz der TNF-

positiven Zellen innerhalb der CD11b<sup>+</sup>- sowie CD11c<sup>+</sup>-Zellpopulationen mittels einer FACS-Analyse. Jedoch konnten auch hier weder innerhalb der CD11b<sup>+</sup>- (Abb. 9a) noch der CD11c<sup>+</sup>-Zellpopulationen (Abb. 9b) Unterschiede zwischen mBD14:Ig transgenen Mäusen und den WT-*littermates* nachgewiesen werden. Zur Kontrolle erfolgte eine Überprüfung der TNF-Serumkonzentration, in der sich die Mauslinien ebenfalls nicht unterschieden (Abb. 9c).



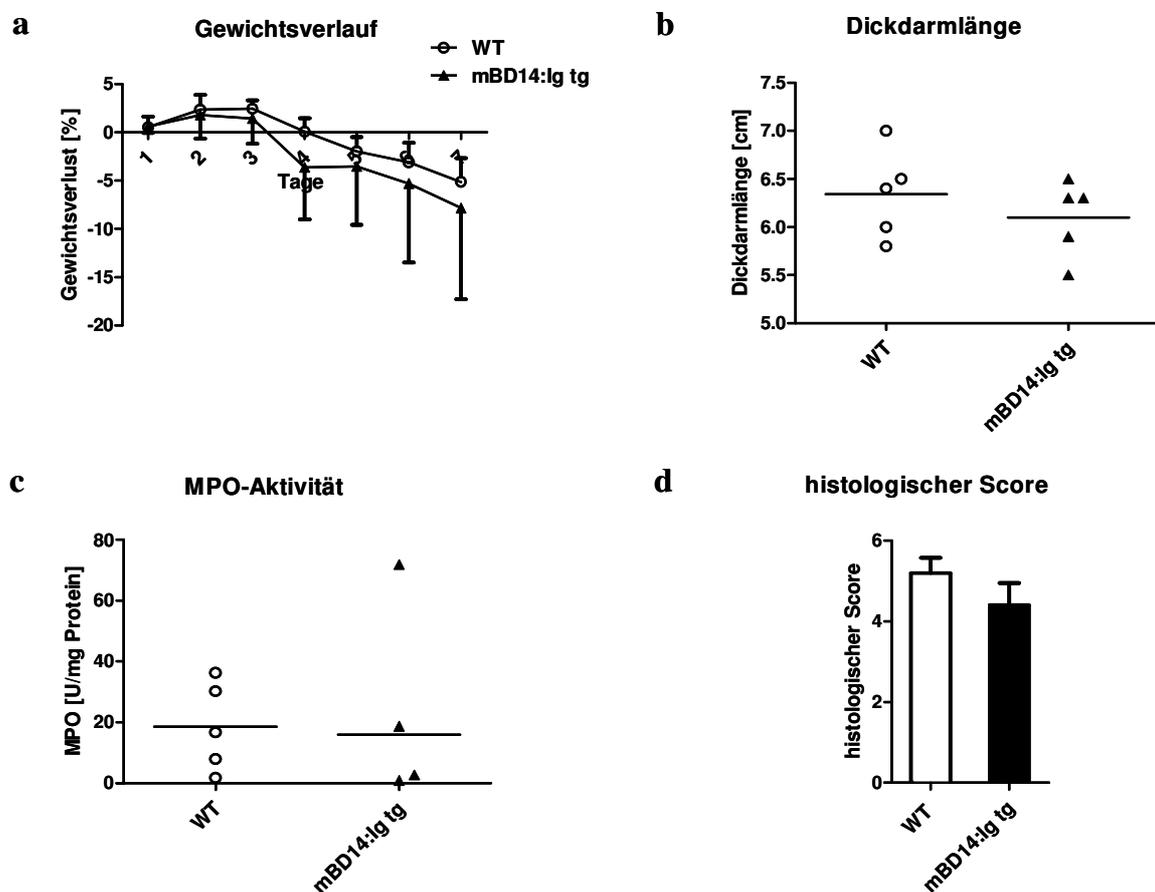
**Abb. 9: Keine Unterschiede in der intrazellulären TNF-Produktion in CD11b<sup>+</sup>- und CD11c<sup>+</sup>-Zellen der mBD14:Ig transgenen Maus im Vergleich zu WT-Tieren.**

(a+b) Isolation von Milzzellen 1,5h nach Injektion von 100µg LPS pro Maus i.v. mit anschließender intrazellulärer TNF-Färbung. Unterteilung der Zellen mittels FACS-Analyse in TNF<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> (a) oder TNF<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> (b). (c) Messung der TNF-Konzentration in Serum der Tiere mittels ELISA. Pro Gruppe kamen 3 oder 4 Tiere zum Einsatz. Es ist je ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

### 3.1.4.3. Untersuchung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis

Bei dem Modell der akuten DSS-induzierten Colitis handelt es sich um eine chemisch hervorgerufene Entzündung des Darms, die zu einem Verlust der Darmwandintegrität führt und diesen somit anfällig für Infektionen macht. Gleichzeitig wird durch die Zerstörung des Gewebes die entzündliche Reaktion des Immunsystems als Antwort auf eine Infektion verstärkt (Iwanaga et al., 1994).

Den Tieren wurde 2,5% DSS im Trinkwasser für sieben Tage verabreicht. Im Verlauf der Colitis erfolgte täglich das Protokollieren des Gewichts sowie abschließend die Analyse der Dickdarmlänge, der MPO-Aktivität und des histologischen Befundes.



**Abb. 10: Keine Unterschiede der mBD14:Ig transgenen Mauslinie zu WT-Tieren im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis.**

Gabe von 2,5% DSS im Trinkwasser über einen Zeitraum von 7d. (a) Darstellung des Gewichtsverlaufs der beiden Mauslinien über den Verlauf des Experiments. (b) Messung der Dickdarmlänge nach Abschluss der Colitis. (c) Bestimmung der MPO-Aktivität in stuhlfreiem Kolon-Gewebe. (d) Beurteilung des histologischen Scores an Hand histologischer Schnitte (HE-Färbung). Pro Gruppe wurden 5 Tiere verwendet. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

WT-Mäuse und mBD14:Ig transgene Tiere verloren im Verlauf der Colitis an Gewicht, wobei sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden ergab (Abb. 10a). Auch die Dickdarmlänge der WT- und mBD14:Ig transgenen Mäuse war vergleichbar, wobei an der reduzierten Kolonlänge die Manifestierung einer Entzündung gut erkennbar war (Abb. 10b). Die Bestimmung der MPO-Aktivität ist ein indirekter Marker für eine Entzündungsreaktion. Die myeloide Peroxidase (MPO) ist ein Enzym, das hauptsächlich von Neutrophilen gebildet wird und unter anderem zur Markierung von apoptotischen Zellen dient. Auf Grund seiner elektrostatischen Eigenschaften bindet es an Phosphatidylserin und kann dort aus  $H_2O_2$  und  $Cl^-$   $HClO$  bilden, das zu einer Erkennung der apoptotischen Zellen durch Phagozyten führt (Klebanoff, 2005). Somit kann es als Marker für die Einwanderung von Neutrophilen in das entzündete Gewebe verwendet werden. Die Bestimmung der MPO-Aktivität zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen WT-Tieren und mBD14:Ig transgenen Mäusen (Abb. 10c). Des Weiteren wurde der histologische Score bestimmt. Dieser setzt sich aus zwei Bewertungskriterien zusammen. Zum einen erfolgt die Bewertung des Epithelschadens, d. h. dem Fehlen von Becherzellen am Anfang einer Entzündung bis hin zum völligen Verlust der Gewebsintegrität durch Zerstörung der Krypten. Zum anderen wird das Einwandern von Zellen, der so genannten Infiltrate, beurteilt. Jeder der beiden Merkmale wird mit einer Note von 0 (gesund) bis 4 (sehr krank) bewertet. Nach Addition ergibt sich somit ein Score von 0 bis 8. Doch auch hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und mBD14:Ig transgenen Tieren (Abb. 10d). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen keinen Phänotyp in den untersuchten Versuchsmodellen erkennen, so dass die mBD14:Ig transgene Mauslinie als Modell zur funktionellen Untersuchung von mBD14 in entzündlichen Reaktionen ungeeignet scheint.

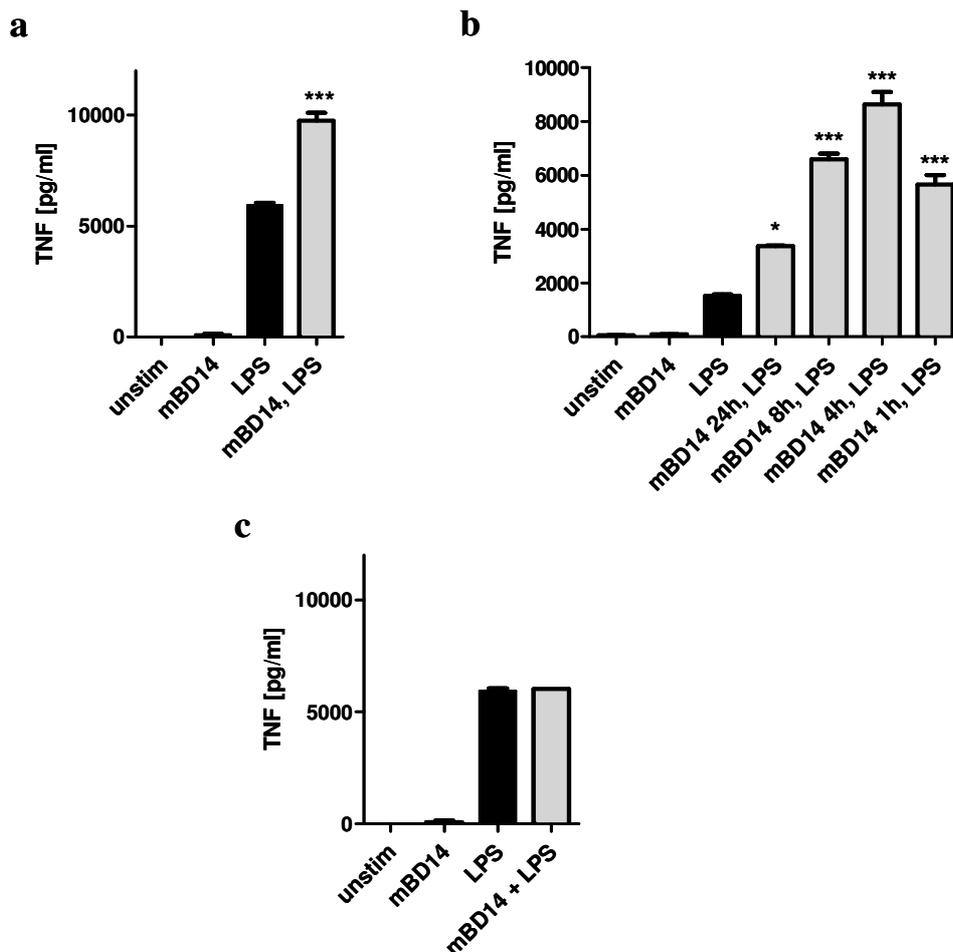
### **3.2. Immunregulatorische Funktion von mBD14**

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass Defensine nicht nur einen antimikrobiellen Effekt auf eindringende Pathogene haben (z.B. Röhl et al., 2008), sondern auch eine immunregulatorische Rolle spielen. Dazu zählt z.B. ihre chemotaktische Wirkung über CCR2 auf Monozyten und Makrophagen (Röhl et al., 2010b) oder über CCR6 auf T-Zellen und unreife dendritische Zellen (Yang et al., 1999) sowie auf B-Zellen (Röhl et al., 2012). Daneben wurde auch die Aktivierung von Zellen des Immunsystems über TLRs beschrieben (Biragyn et al., 2002; Funderburg et al., 2007). Auch ein immunsuppressiver Effekt einiger  $\beta$ -Defensine konnte kürzlich gezeigt werden (Semple et al.,

2010). Aus diesem Grund wurde in diesem Teil der Arbeit der immunmodulatorische Einfluss von mBD14 auf Immunzellen genauer untersucht.

### 3.2.1. Analyse des pro-inflammatorischen Effekts von mBD14

Die Vorstimulierung von BMDM aus C57BL/6-Mäusen mit mBD14:Ig gefolgt von einer anschließenden Restimulation mit LPS führten zu einer signifikanten Erhöhung der TNF-Produktion. (Abb. 11a). Eine Vorstimulierung scheint somit pro-inflammatorisch zu wirken. Anschließend wurde die Kinetik der Vorstimulierung untersucht, wonach eine vierstündige Vorbehandlung der Zellen mit mBD14 den größten Effekt bezüglich der TNF-Produktion zeigte (Abb. 11b). Bei längerer Vorstimulierung nahm die Zytokinproduktion wieder ab und auch kürzere Behandlung für nur 1h erzielte eine verminderte Wirkung (Abb. 11b). Eine gleichzeitige Stimulierung mit Defensin und LPS konnte keine vermehrte Zytokinproduktion induzieren (Abb. 11c).

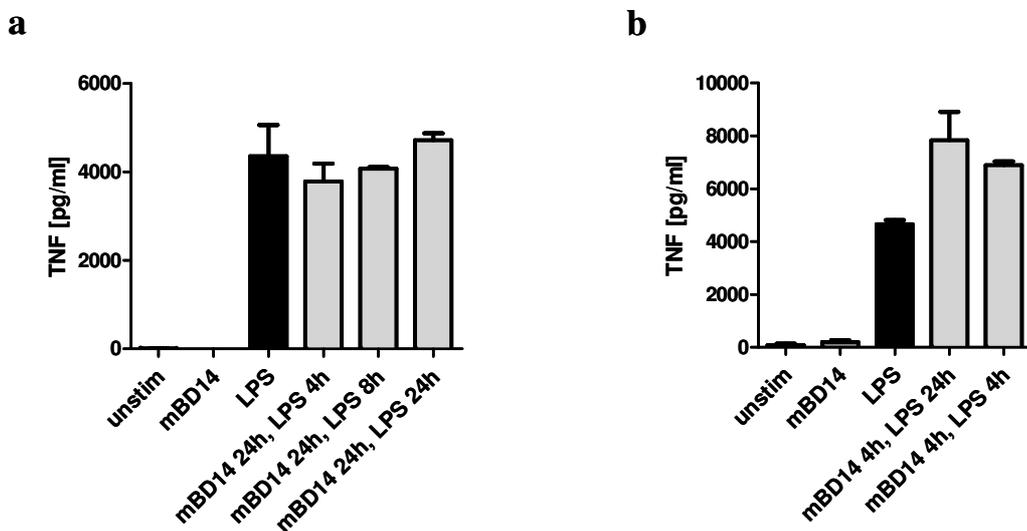


**Abb. 11: Pro-inflammatorischer Effekt von mBD14:Ig in BMDM.**

(a) Vorstimulierung mit 5µg/ml mBD14:Ig für 4h und anschließende Restimulation mit 100ng/ml LPS für 24h. (b) Vorstimulierung mit mBD14:Ig für die angegebenen Zeitspannen und anschlie-

bende LPS-Stimulierung für 24h. (c) Gleichzeitige Behandlung mit mBD14:Ig und LPS für 24h. Die TNF-Produktion wurde im Überstand mittels eines ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

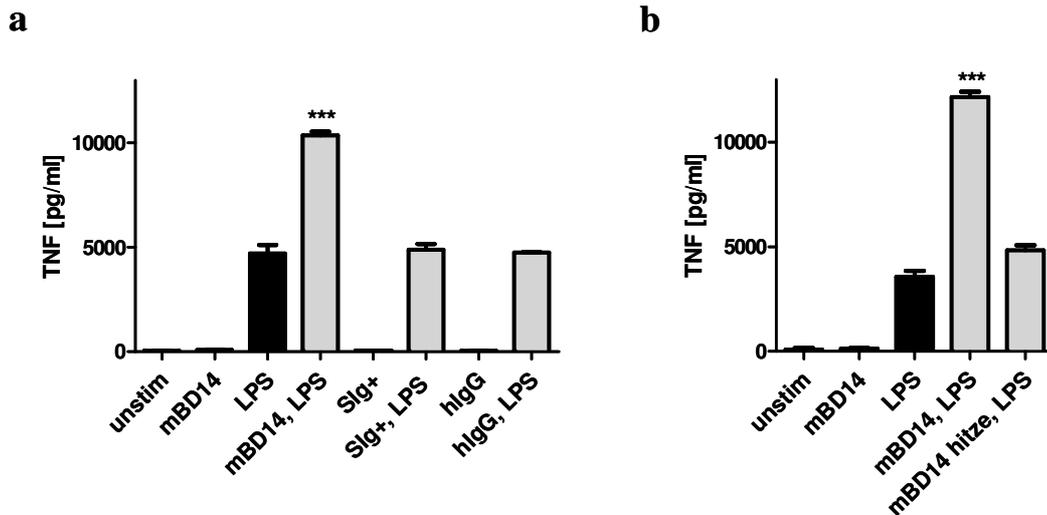
Des Weiteren wurde auch die Kinetik der LPS-Stimulierung untersucht. Hierbei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede nach einer Vorstimulierung mit mBD14 für 24h (Abb. 12a) und auch nach vierstündiger Vorbehandlung waren die Unterschiede der TNF-Produktion nach 4h bzw. 24h LPS-Gabe minimal (Abb. 12b). Da jedoch das beste Resultat mit einer 24stündigen Nachbehandlung erzielt wurde, erfolgten alle weiteren Experimente unter diesen Bedingungen.



**Abb. 12: Kein Einfluss der Dauer des LPS-Stimulus auf den pro-inflammatorischen Effekt von mBD14.**

(a) Gabe von 100ng/ml LPS für die angegebenen Zeiträume nach 24stündiger Vorstimulierung mit 5µg/ml mBD14:Ig. (b) Vorbehandlung der BMDM für 4h mit mBD14:Ig und anschließende Stimulierung mit LPS für 4h bzw. 24h. Die Messung der TNF-Produktion erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Exemplarisch ist je ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen durchgeführten Experimenten dargestellt.

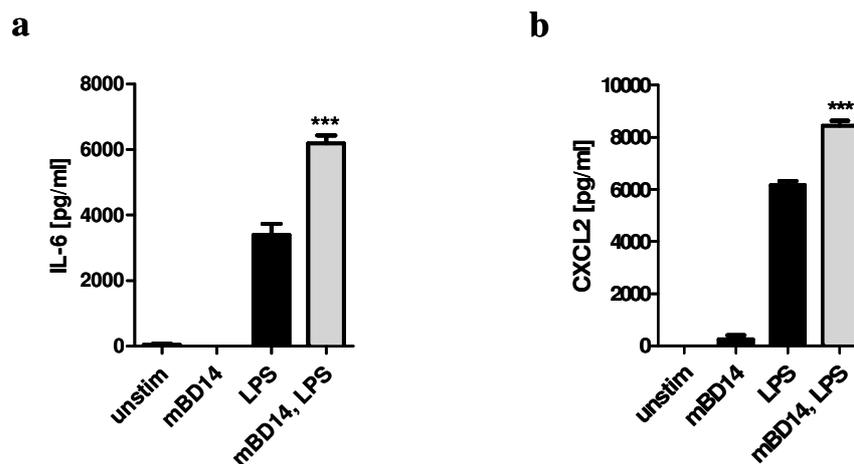
Zudem erfolgte eine Vorstimulierung mit nicht fusioniertem SIg+ und hIgG (Sigma-Aldrich) anstatt des mBD14:Ig-Fusionsproteins, um einen Effekt durch den Ig-Tag ausschließen zu können. In beiden Fällen produzierten die Knochenmarkmakrophagen nach Vorstimulierung nicht mehr TNF als nach alleiniger LPS-Gabe (Abb. 13a). Um zusätzlich eine Verunreinigung des mBD14 z.B. durch LPS auszuschließen, wurde ein hitzeinaktiviertes mBD14:Ig verwendet. Dieses induzierte keine vermehrte Zytokinausschüttung (Abb. 13b).



**Abb. 13: Kein Einfluss des Ig-Tags auf eine nachfolgende LPS-Stimulierung.**

(a) Vorstimulierung mit je 5  $\mu$ g/ml Sig+ bzw. hlgG (Sigma-Aldrich) für 4h mit anschließender LPS-Gabe (100ng/ml). (b) Vorstimulierung mit 5  $\mu$ g/ml hitzeinaktiviertem mBD14:Ig (1h bei 95°C) für 4h mit anschließender LPS-Gabe. Die Messung der TNF-Konzentration der Zellkulturüberstände erfolgte mittels ELISA. Es ist je ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

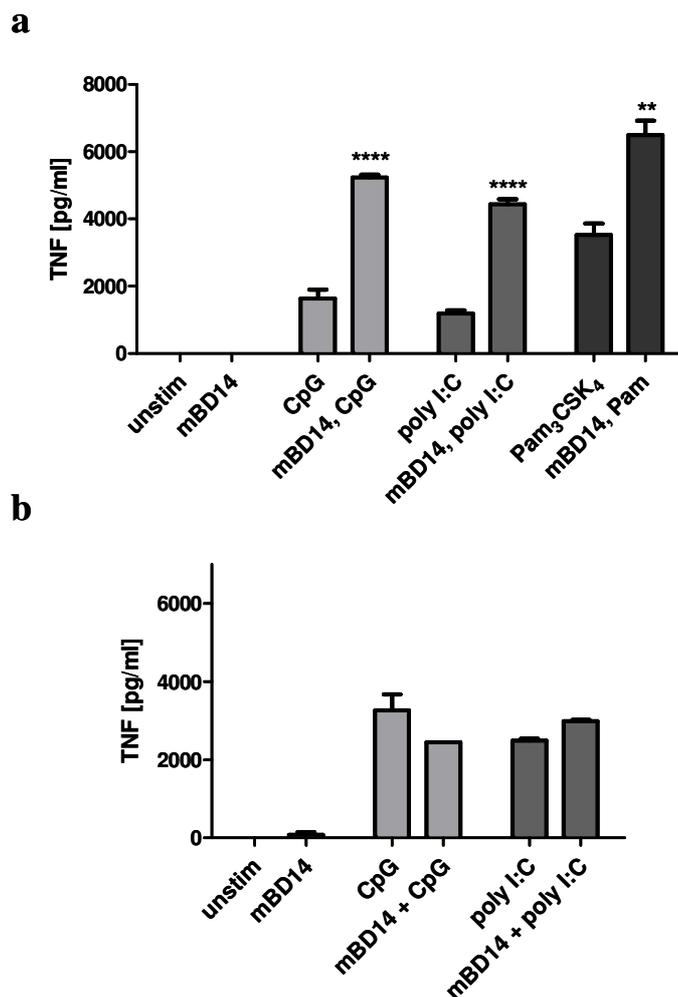
Die Auswertung aller bisherigen Experimente beruhte auf der Bestimmung des proinflammatorischen Zytokins TNF. Zusätzlich verstärkte mBD14 auch die Expression von IL-6 (Abb. 14a) und CXCL2 (Abb. 14b). Die Expression von IL-1 $\beta$  wurde dagegen nicht induziert (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 14: Expression von IL-6 und CXCL2 nach mBD14-Vorstimulierung von BMDM.**

(a+b) Produktion von IL-6 (a) bzw. CXCL2 (b) nach Vorbehandlung von BMDM mit 5  $\mu$ g/ml mBD14:Ig für 4h und anschließender LPS-Gabe (100ng/ml) für 24h. Die Zytokin- und Chemokin-konzentrationen der Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA gemessen. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test. Exemplarisch ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

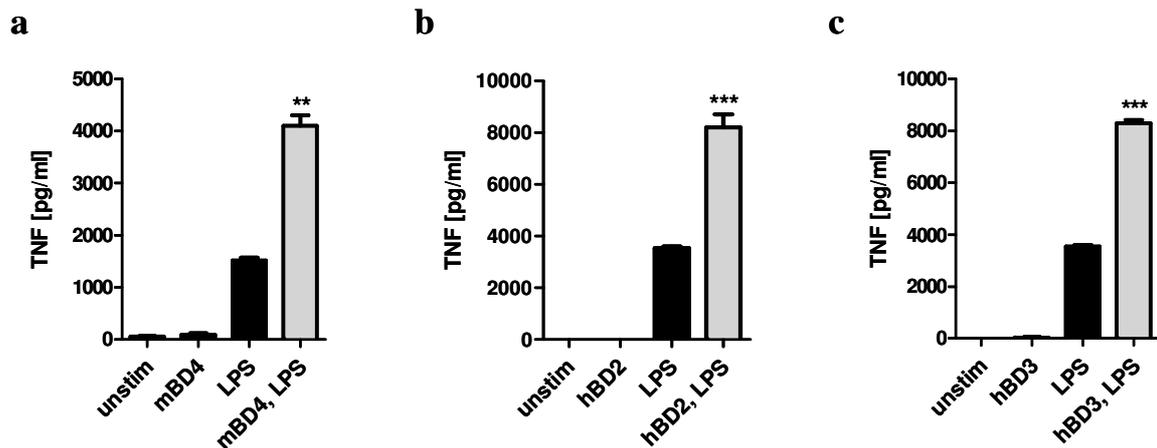
Um den pro-inflammatorischen Effekt von mBD14 in Verbindung mit weiteren TLR-Liganden zu untersuchen, wurden CpG, poly I:C oder Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> als weitere TLR-Agonisten eingesetzt. Während LPS an TLR4 bindet, handelt es sich bei CpG um den Liganden von TLR9, bei poly I:C um den von TLR3 und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> interagiert mit dem Heterodimer TLR1/2 (Abbas, 2005). Alle drei weiteren hier getesteten Liganden hatten die gleiche Wirkung wie LPS (Abb. 15a). Darüber hinaus konnte auch in diesen Experimenten bei einer gleichzeitigen Stimulierung mit mBD14 und CpG oder poly I:C keine synergistische Verstärkung der Zytokinproduktion nachgewiesen werden (Abb. 15b).



**Abb. 15: Pro-inflammatorischer Effekt einer mBD14-Vorbehandlung mit weiteren TLR-Liganden.**

(a+b) Vorbehandlung von BMDM mit 5µg/ml mBD14:Ig und anschließende Restimulierung (a) bzw. gleichzeitige Stimulierung (b) mit 1µM CpG, 25µg/ml poly I:C oder 1µg/ml Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>. Die Messung der TNF-Konzentration aus Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

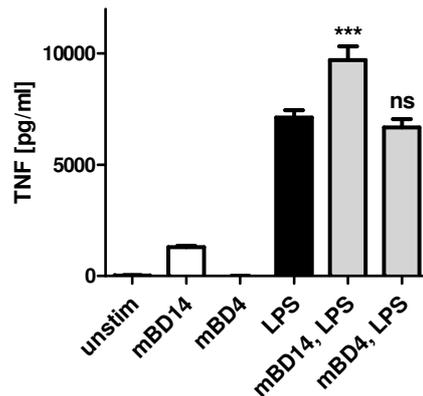
Nachdem der pro-inflammatorische Effekt von mBD14 unabhängig von den hier untersuchten TLR-Liganden war, wurde untersucht, ob neben mBD14 weitere Mitglieder der  $\beta$ -Defensin-Superfamilie diese Wirkung erzielen. Dafür erfolgte eine Vorbehandlung statt mit mBD14 mit dessen humanem Ortholog hBD3 sowie mit den beiden Orthologen mBD4 und hBD2. Alle untersuchten  $\beta$ -Defensine führten zu einer synergistischen Erhöhung der TNF-Produktion (Abb. 16a-c).



**Abb. 16: Pro-inflammatorischer Effekt der Vorstimulierung mit mBD4, hBD2 und hBD3.**

(a-c) Analyse der TNF-Produktion in BMDM nach Vorstimulierung mit je 5  $\mu$ g/ml mBD4:Ig (a), hBD2:Ig (b) oder hBD3:Ig (c) für 4h mit anschließender LPS-Gabe (100ng/ml) für 24h. Die TNF-Konzentration der Zellkulturüberstände wurde mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test. Exemplarisch ist je ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

Abschließend wurde überprüft, ob dieser Effekt auf Makrophagen beschränkt ist. Aus diesem Grund erfolgte die Durchführung des gleichen experimentellen Verfahrens mit dendritischen Zellen aus dem Knochenmark. Auch hier führten eine Vorbehandlung der Zellen mit mBD14 und eine anschließende LPS-Stimulierung zu erhöhter TNF-Produktion im Vergleich zu alleiniger LPS-Gabe (Abb. 17). Jedoch zeigte mBD4 in diesem Zusammenhang keine pro-inflammatorische Wirkung.



**Abb. 17: Pro-inflammatorischer Effekt von mBD14 jedoch nicht von mBD4 auf BMDC.**

Vorstimulierung von BMDC mit 5µg/ml mBD14:Ig oder mBD4:Ig für 4h und nachfolgende Gabe von 100ng/ml LPS für 24h. Die TNF-Messung erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test. Es ist ein Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

### **3.2.2. Analyse der mBD14-induzierten Signalwege**

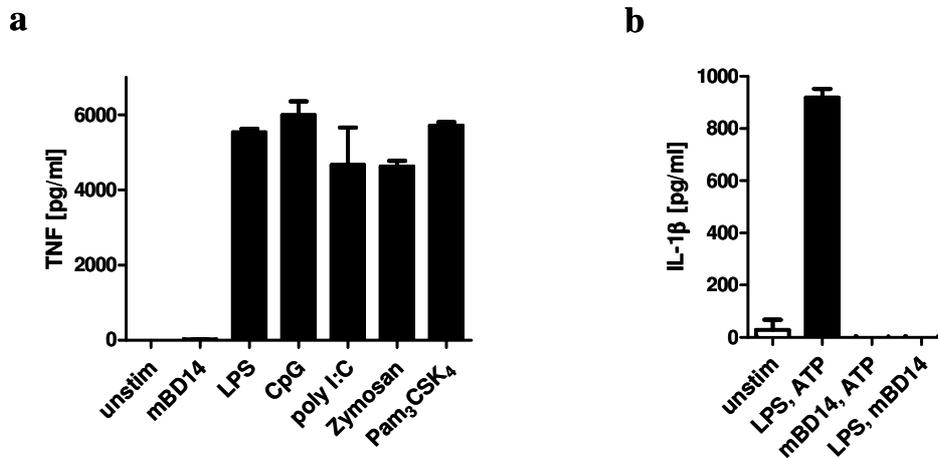
Basierend auf den bisherigen pro-inflammatorischen Ergebnissen einer β-Defensin-Vorstimulierung auf myeloide Zellen erfolgte die Analyse verschiedener möglicher Signalwege und Interaktionspartner.

#### **3.2.2.1. Untersuchung der Interaktion des mBD14 mit Toll like Rezeptoren (TLRs)**

Wie alle bisherigen Experimente zeigten, war mBD14 wie die anderen hier untersuchten Defensine nicht in der Lage, allein eine TNF-Produktion der Zellen zu induzieren. Dies wird in Abb. 18a zusätzlich im Vergleich zu verschiedenen TLR-Agonisten, wie LPS (TLR4), CpG (TLR9), poly I:C (TLR3), Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR1/2) oder Zymosan (TLR2) bestätigt.

Darüber hinaus wurde die Induktion der IL-1β-Produktion untersucht, um eine mögliche Defensin-induzierte Aktivierung der Zelle über einen TLR nachzuweisen. Für die Produktion des Zytokins IL-1β werden zwei Stimuli benötigt, wobei der erste die Transkription der pro-Form des Zytokins induziert. Der zweite Stimulus, z.B. durch ATP führt zur Aggregation des so genannten Inflammasom-Komplexes, zu dem unter anderem die Caspase 1 gehört. Dieser Proteinkomplex spaltet pro-IL-1β in die reife Form des Zytokins, das aus der Zelle entlassen wird (Schroder et al., 2010). Da es sich bei dem ersten Stimulus um einen TLR-Agonisten handelt, wurde dieser sowie zur Kontrolle auch der zweite Stimulus durch mBD14 ersetzt. Nach Stimulierung mit LPS als erstem und ATP als zweitem Stimu-

lus konnte eine IL-1 $\beta$ -Produktion der Zellen nachgewiesen werden. Das Ersetzen eines der beiden Stimuli durch mBD14 führte dagegen zu einem völligen Verlust der Zytokinausschüttung (Abb. 18b). MBD14 kann somit keinen TLR-Agonisten ersetzen.



**Abb. 18: Keine Aktivierung von BMDM durch mBD14.**

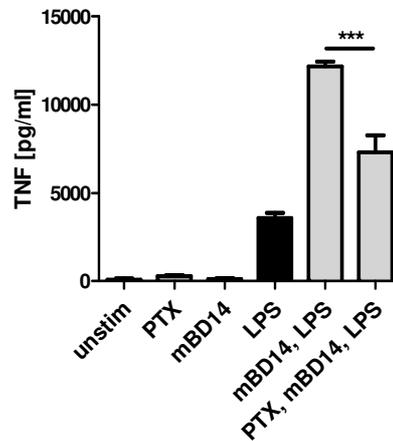
(a) Stimulierung mit 5 $\mu$ g/ml mBD14:Ig oder mit 100ng/ml LPS, 1 $\mu$ M CpG, 25 $\mu$ g/ml poly I:C, 1 $\mu$ g/ml Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> oder 1 $\mu$ g/ml Zymosan für 24h. (b) Stimulierung des Inflammasoms durch 100ng/ml LPS für 2h und anschließende ATP-Gabe (2mM) für 3h. Alternative Stimulierung mit 5 $\mu$ g/ml mBD14:Ig. Die Messung der Zytokinkonzentrationen erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

Nach unseren Daten ist eine Interaktion der Defensine mit TLRs nicht nachweisbar.

### 3.2.2.2. Untersuchung der Interaktion von mBD14 mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren

Weitere mögliche Interaktionspartner für  $\beta$ -Defensine sind G Protein-gekoppelte Rezeptoren. Einen Hinweis darauf liefern Daten von Röhl et al. (2010a und 2010b) und Yang et al. (1999), die einen chemotaktischen Effekt verschiedener Defensine über CCR2 und CCR6 belegen. Für die Untersuchung einer solchen Interaktion wurde das Exotoxin des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis* verwendet, das jegliche Signalweiterleitung G<sub>i</sub> Protein-gekoppelter Rezeptoren hemmt. Dabei katalysiert das Pertussis Toxin (PTX) die ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Einheit des G<sub>i</sub> Protein-Komplexes und verhindert somit dessen Anlagerung an den Rezeptor. Auf diese Weise inhibiert PTX nur eine der vier Gruppen G Protein-gekoppelter Rezeptoren (G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>12</sub>), zu der jedoch unter anderem alle Chemokinrezeptoren gehören (Burns, 1988).

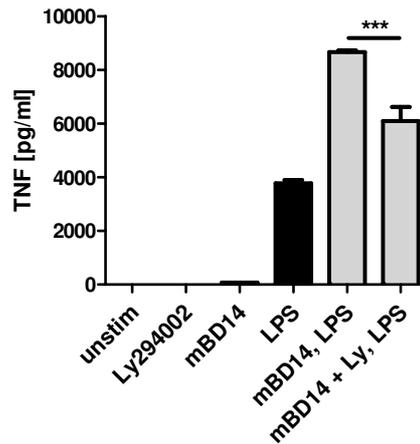
Für die Untersuchung einer möglichen Interaktion von mBD14 mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren erfolgte eine Vorinkubierung der Zellen mit PTX und eine anschließende  $\beta$ -Defensin-Gabe. Wie in Abb. 19 gezeigt, war nach Vorbehandlung der BMDM mit PTX die TNF-Produktion nach Vorstimulierung mit mBD14 signifikant reduziert.



**Abb. 19: Pertussis Toxin hemmt den pro-inflammatorischen Effekt von mBD14.**

Vorbehandlung von BMDM mit 100ng/ml PTX für 2h, anschließende Stimulierung zunächst mit 5 $\mu$ g/ml mBD14:Ig für 4h und dann mit 100ng/ml LPS für 24h. Die Messung der TNF-Konzentration erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Die Daten zeigen ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Da der Einsatz von PTX eine Beteiligung G Protein-gekoppelter Rezeptoren zeigte, folgte die Analyse verschiedener Signalwegskomponenten dieser Rezeptor-vermittelten Signalkaskade. Hierbei wurde zunächst der Einfluss der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) untersucht, die für die Produktion verschiedener Phosphoinositide verantwortlich ist, die wiederum ein weiterer Bestandteil der Signalkaskade sind. Es gibt drei Klassen von Phosphoinositol 3-Kinasen, wobei die der Klasse I für eine Signaltransduktion G Protein-gekoppelter Rezeptoren verantwortlich ist (Vlahos et al., 1994). In dieser Arbeit kam das synthetische Molekül Ly294002 zum Einsatz, das eine Inhibition aller drei Klassen an PI3K durch Interaktion mit der ATP-Bindestelle des Enzyms hervorruft. Ly294002 konnte wie PTX die synergistische Verstärkung der TNF-Produktion von mBD14 signifikant reduzieren (Abb. 20).

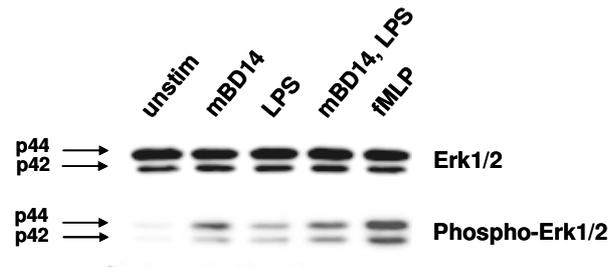


**Abb. 20: Ly294002 hemmt den pro-inflammatorischen Effekt von mBD14.**

Gleichzeitige Stimulierung mit 10mM Ly294002 und 5µg/ml mBD14:Ig mit anschließender Gabe von 100ng/ml LPS. Die Messung der TNF-Konzentration erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Die Daten zeigen ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Weiter *downstream* in der Signalkaskade G Protein-gekoppelter Rezeptoren steht die sogenannte MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskade. Diese wird durch die GTPase Ras in Gang gesetzt, die die MAP3K Raf aktiviert. Raf wiederum phosphoryliert und aktiviert damit die MAP2K Mek1/2, die daraufhin die MAPK Erk1/2 phosphoryliert. Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) kann anschließend in den Kern wandern und dort Transkriptionsfaktoren aktivieren (Seger et al., 1995).

Für die Untersuchung des möglichen Einflusses einer mBD14-Stimulierung auf diesen Signalweg erfolgte die Analyse der Erk1/2-Phosphorylierung, die als Zeichen für eine Aktivierung der Signalkaskade diente. Wie in Abb. 21 gezeigt ist, induzierte die Stimulierung von BMDM mit mBD14 die Phosphorylierung von Erk1/2, während in unstimulierten Zellen nahezu ausschließlich die nicht phosphorylierte Form detektiert werden konnte. Eine LPS-Behandlung der Zellen führte zu deutlich geringeren Mengen an phosphoryliertem Erk1/2 und auch die sowohl mit mBD14 als auch LPS stimulierten Zellen zeigten keine stärkere Phosphorylierung als nach alleiniger mBD14-Gabe. fMLP als Ligand des G Protein-gekoppelten Rezeptors FPRL-1 (*formyl peptide receptor-like 1*) diente in diesem Experiment als Positivkontrolle.



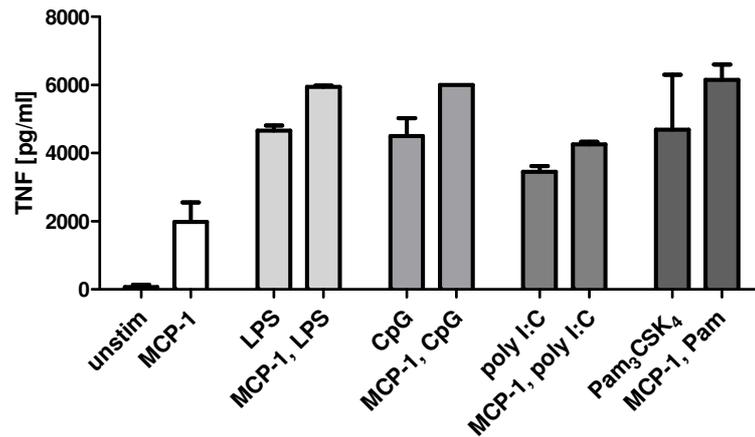
**Abb. 21: Analyse der Erk1/2-Phosphorylierung nach mBD14-Stimulierung von BMDM.**

Vorstimulierung von BMDM mit 5µg/ml mBD14:Ig für 4h und anschließende Gabe von 100ng/ml LPS für 24h. Als Kontrolle diente eine Stimulierung mit 10nM fMLP für 4h. Gewinnung der Proteinylysate nach den angegebenen Zeiten. Der Nachweis der phosphorylierten sowie der nicht modifizierten Form von Erk1/2 erfolgte mittels Western Blot-Analyse mit anti-Maus p44/42 MAPK (Erk1/2)- und anti-Maus phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)-Antikörpern. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die Ergebnisse dieser Experimente deuten wiederum auf eine Interaktion von mBD14 mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren hin.

### **3.2.2.3. Analyse möglicher Interaktionspartner von mBD14**

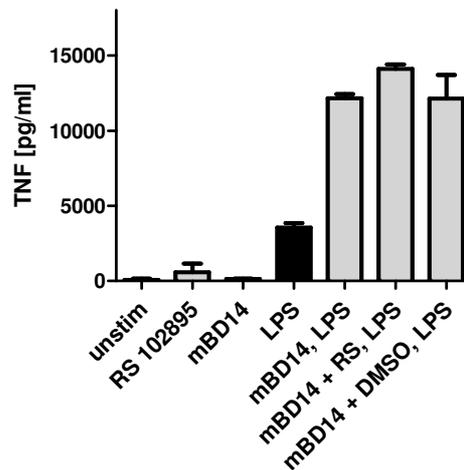
Nachdem der Interaktionspartner von mBD14 auf die Gruppe der G Protein-gekoppelten Rezeptoren eingeschränkt werden konnte, wurde untersucht, über welchen der ca. 800 verschiedenen Rezeptoren (Kroeze et al., 2003) der pro-inflammatorische Effekt der  $\beta$ -Defensine vermittelt wird. Da mBD14 über CCR2 und CCR6 chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems wirken kann (Röhl et al., 2010b; Yang et al., 1999), erfolgte zunächst eine Untersuchung dieser Rezeptoren. CCR2 ist darüber hinaus hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen exprimiert. Ein Chemokin-Ligand dieses Rezeptors ist MCP-1. Daher sollte die mBD14-Vorstimulierung der BMDM durch einen MCP-1-Stimulus ersetzt werden, um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt Defensin-spezifisch ist. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der TNF-Produktion zwischen der MCP-1-Vorbehandlung und einer TLR-Stimulierung allein nachgewiesen werden. Dies konnte nicht nur für LPS, sondern auch für CpG, poly I:C und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> gezeigt werden (Abb. 22). MCP-1 scheint somit keinen synergistischen, pro-inflammatorischen Effekt durch Vorstimulierung von BMDM vermitteln zu können.



**Abb. 22: MCP-1, ein Chemokin-Ligand von CCR2, vermittelt keine verstärkte Freisetzung von TNF.**

Vorstimulierung von BMDM mit 100ng/ml MCP-1 für 4h mit anschließender Gabe von 100ng/ml LPS, 1 $\mu$ M CpG, 25 $\mu$ g/ml poly I:C oder 1 $\mu$ g/ml Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> für 24h. Die Messung der TNF-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Exemplarisch ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

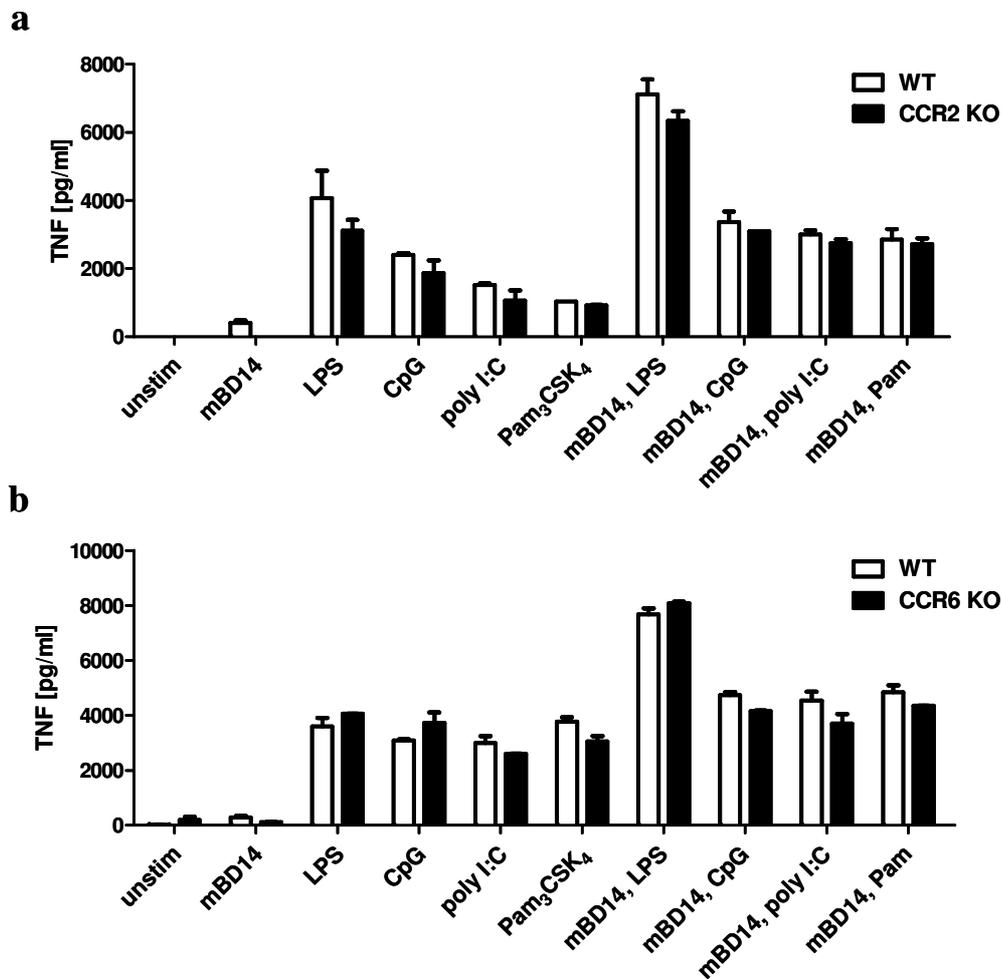
Darüber hinaus erfolgte der Einsatz des CCR2-Antagonisten RS 102895, um eine mögliche Interaktion von  $\beta$ -Defensinen mit diesem Rezeptor weiter zu untersuchen. Doch weder der CCR2-Antagonist RS 102895 noch DMSO als Vehikel-Kontrolle zeigten einen signifikanten Einfluss auf die TNF-Produktion nach mBD14-Vorstimulierung (Abb. 23).



**Abb. 23: Der CCR2-Antagonist RS 102895 hat keinen Einfluss auf die mBD14-verstärkte TNF-Produktion in BMDM.**

Gleichzeitige Stimulierung mit 5 $\mu$ g/ml mBD14:Ig und 10 $\mu$ M RS 102895 bzw. gleichem Volumen DMSO als Kontrolle für 4h. Anschließende Gabe von 100ng/ml LPS für 24h. Die Messung der TNF-Konzentration erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Es ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängig durchgeführten Experimenten gezeigt.

Um die oben gezeigten Ergebnisse zu belegen, wurden BMDM einer CCR2-defizienten Maus untersucht, die wie bisher beschrieben mit mBD14 und verschiedenen TLR-Liganden stimuliert wurden. Es konnte jedoch kein Unterschied in der induzierten TNF-Freisetzung zwischen stimulierten BMDM einer WT- und einer CCR2-defizienten Maus nachgewiesen werden (Abb. 24a).



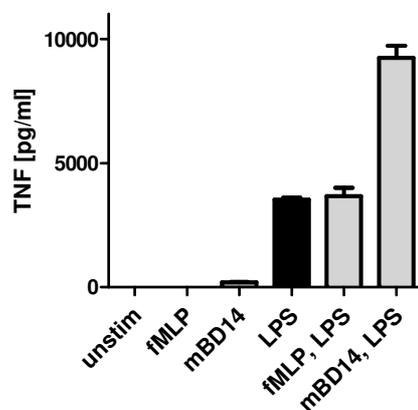
**Abb. 24: Keine Unterschiede in der TNF-Produktion von WT-BMDM zu CCR2<sup>-/-</sup>- bzw. CCR6<sup>-/-</sup>-BMDM nach mBD14-Vorstimulation.**

(a) Vergleich von WT- mit CCR2<sup>-/-</sup>-BMDM. (b) Vergleich von WT- mit CCR6<sup>-/-</sup>-BMDM. Vorstimulierung mit 5 µg/ml mBD14:Ig für 4h und anschließende Gabe von 100ng/ml LPS, 1 µM CpG, 25 µg/ml poly I:C oder 1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> für 24h. Die TNF-Konzentrationen wurden mittels ELISA aus Zellkulturüberständen bestimmt. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Auch BMDM von CCR6-defizienten Tieren wurden untersucht, für den Fall, dass dieser Chemokinrezeptor neben unreifen dendritischen und T-Zellen in geringen Mengen auch auf BMDM exprimiert ist. Doch wie in Abb. 24b gezeigt ist, konnten auch hier keine Unterschiede zwischen WT- und CCR6-defizienten Zellen nachgewiesen werden.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten können CCR2 und CCR6 als verantwortliche Rezeptoren für die mBD14-induzierte Erhöhung der TNF-Produktion ausgeschlossen werden.

Des Weiteren ist beschrieben, dass LL-37, ein weiteres antimikrobielles Peptid, chemotaktisch über den G Protein-gekoppelten Rezeptor FPRL-1 (*formyl peptide receptor-like 1*) wirken kann (Yang et al., 2000). Daher wurde der Defensin-Stimulus zusätzlich durch fMLP ersetzt, einen Liganden für FPRL-1. Bei fMLP handelt es sich um ein synthetisches Molekül bestehend aus den drei Aminosäuren, N-Formyl-Met-Leu-Phe. Wie in Abb. 25 gezeigt ist, konnte fMLP ebenso wie MCP-1 keine erhöhte TNF-Produktion in BMDM induzieren.



**Abb. 25: fMLP vermittelt keine erhöhte TNF-Produktion in BMDM.**

Vorstimulierung von BMDM mit 10nM fMLP oder 5µg/ml mBD14:Ig für 4h mit anschließender Gabe von 100ng/ml LPS für 24h. Die Messung der TNF-Konzentration erfolgte mittels ELISA aus Zellkulturüberständen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei.

### **3.2.3. Analyse der Aktivierung von BMDM durch mBD14**

Weiterhin wurde der Aktivierungsstatus der Knochenmarkmakrophagen nach mBD14-Stimulierung untersucht. Hierfür erfolgte eine FACS-Analyse verschiedener Oberflächenmarker der BMDM, darunter zelllinienspezifische Marker (CD11b), Reifungsmarker (F4/80) sowie Aktivierungsmarker (CD80, CD86 und MHC Klasse II).

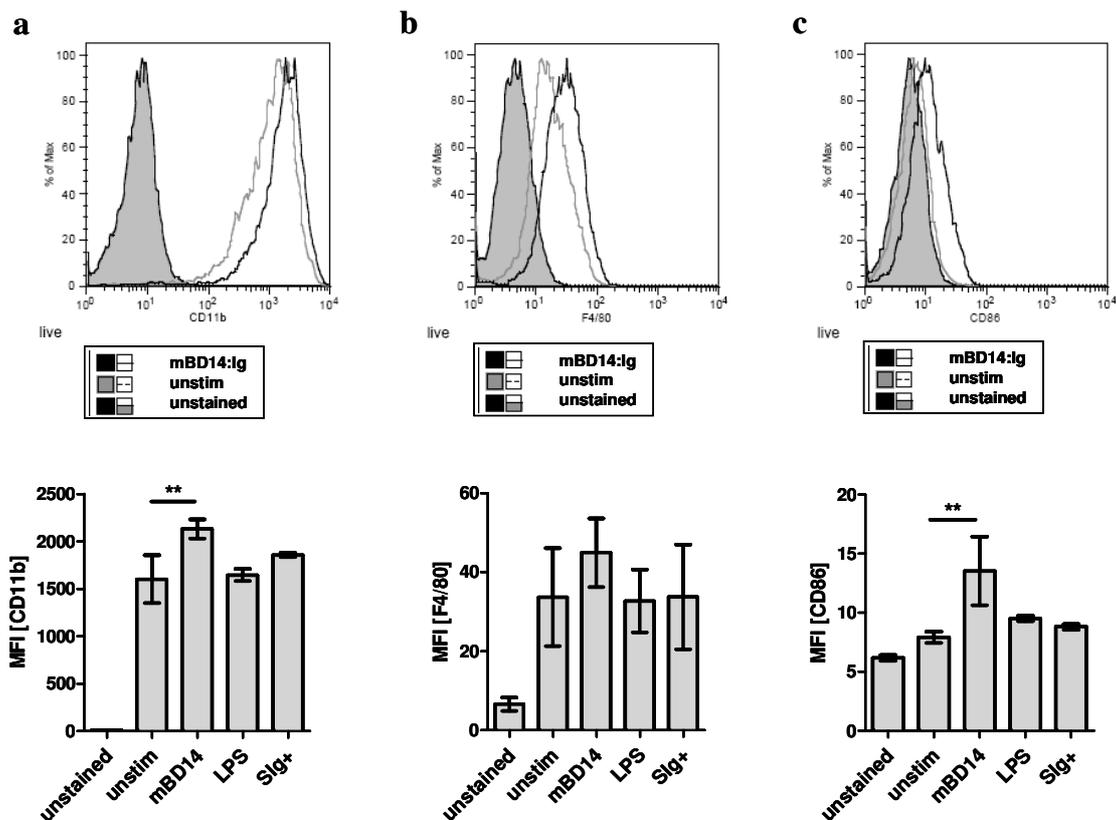
Nach der Kultur von Knochenmarkzellen in Anwesenheit von M-CSF kommt es zur Generierung von CD11b<sup>+</sup>-BMDM. Die FACS-Analyse ergab zum einen, dass alle Zellen positiv für diesen Marker waren und es sich somit, unter Berücksichtigung der eindeutigen Makrophagenmorphologie mit langen Ausläufern der Zellen und der Expression von F4/80 (Abb. 26b), um Makrophagen handelte. Zum anderen exprimierten mit mBD14 stimulierte Zellen signifikant mehr CD11b-Moleküle auf ihrer Oberfläche als unstimulierte oder mit

SIg+-Kontrollpeptid behandelte Knochenmarkmakrophagen. Auch eine vierstündige LPS-Stimulierung ergab eine niedrigere CD11b-Expression (Abb. 26a).

Die Analyse des Reifungsmarkers F4/80 ergab nach Stimulierung von BMDM mit mBD14 ebenfalls eine erhöhte Expression des Markers auf der Oberfläche von BMDM im Vergleich zu unstimulierten, SIg+-behandelten oder LPS-stimulierten Zellen (Abb. 26b).

Darüber hinaus wurden auch die Aktivierungsmarker CD80 und CD86 untersucht. Bezüglich der Expression von CD80 auf der Oberfläche von BMDM konnte kein Unterschied nach einer mBD14-Stimulierung oder auf unbehandelten Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurden signifikant mehr CD86-Moleküle auf den mit mBD14-stimulierten BMDM nachgewiesen verglichen mit den unstimulierten, SIg+- oder LPS-behandelten Zellen (Abb. 26c).

Bei der Untersuchung des Aktivierungsmarker MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse II konnten wiederum keine Unterschiede bezüglich der Expression nach Stimulierung mit mBD14 im Vergleich zu unstimulierten Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

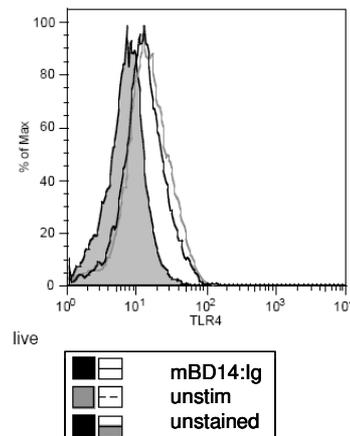


**Abb. 26:** Vermehrte Expression von CD11b, F4/80 und CD86 auf der Oberfläche stimulierter BMDM.

Stimulierung von BMDM mit 5µg/ml mBD14:Ig, 5µg/ml SIg+ oder 100ng/ml LPS für 4h. Anschließende FACS-Färbung mit Antikörpern gegen CD11b (a), F4/80 (b) und CD86 (c). Die Iso-

typkontrollen entsprachen den ungefärbten Kontrollen. In den oberen Graphen ist je ein repräsentatives Histogramm abgebildet, während die unteren Diagramme Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten zeigen. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte TNF-Produktion nach einer mBD14-Vorstimulierung mit anschließender LPS-Gabe könnte eine erhöhte Expression des *Toll like* Rezeptors (TLR) 4 sein. Daher erfolgte eine Analyse der Expression dieses Rezeptors. Jedoch wurde kein Unterschied der TLR4-Expression nach mBD14-Stimulierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gemessen (Abb. 27).



**Abb. 27: Keine vermehrte TLR4-Expression auf der Oberfläche stimulierter BMDM.**

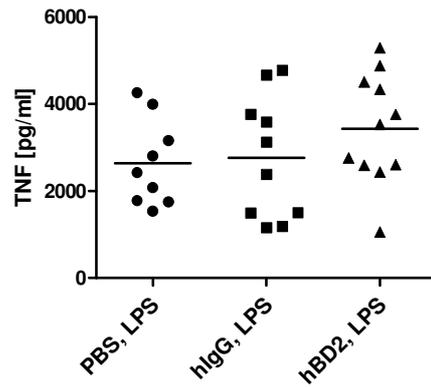
Stimulierung von BMDM mit 5 $\mu$ g/ml mBD14:Ig für 4h. Die Isotypkontrolle entsprach der ungefärbten Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei.

MBD14 führt somit zu einer Erhöhung der Reifungsmarker CD11b und F4/80 sowie des Aktivierungsmarkers CD86, jedoch nicht zu einer vermehrten Expression von TLR4 auf der Oberfläche von Makrophagen.

### **3.2.4. In vivo-Analyse des pro-inflammatorischen Effekts von Defensinen**

Da mBD14:Ig nur in geringer Menge zur Verfügung stand, erfolgten die *in vivo*-Studien mit dem humanen Defensin hBD2:Ig, das in den *in vitro*-Experimenten einen vergleichbaren pro-inflammatorischen Effekt aufwies.

Für dieses Experiment wurden C57BL/6 Mäuse i.v. mit hBD2:Ig, hIgG oder PBS behandelt. Nach 4h erfolgte die Gabe von 10 $\mu$ g LPS pro Maus ebenfalls i.v. Nach einer weiteren Stunde wurde den Mäusen Blut entnommen und die TNF-Konzentration im Serum gemessen. Auch *in vivo* konnte ein Anstieg der TNF-Menge im Serum der mit hBD2:Ig behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit PBS bzw. hIgG behandelten Tieren nachgewiesen werden, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 28).



**Abb. 28: *In vivo*-Vorstimulierung mit hBD2 führt zu einer erhöhten TNF-Produktion.**

I.v. Injektion von je 100µg hBD2 oder hIgG pro Maus in 200µl PBS oder PBS-Kontrollinjektion. Nach 4h i.v. Applikation von 10µg LPS pro Maus. Nach 1h folgte die Blutentnahme zur Serumgewinnung. Messung der TNF-Konzentration mittels ELISA. Pro Gruppe kamen 9 oder 10 Tiere zum Einsatz.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Charakterisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie**

#### **4.1.1. Nachweis des mBD14:Ig-Transgens**

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung einer mBD14:Ig transgenen Mauslinie und hierbei die funktionelle Analyse des Defensins in entzündlichen Reaktionen. Das Transgen wurde unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors in allen untersuchten Geweben und Zellen exprimiert. Eine CD33-*Leader*-Sequenz gewährleistete einen effektiven Export des Defensins aus der Zelle. Der hIgG1-Tag diente dem Nachweis des Transgens, das sowohl auf DNA- als auch auf mRNA-Ebene detektiert werden konnte. Zunächst erfolgte die Analyse zweier verschiedener Linien transgener Mäuse. Während in der tg<sup>+</sup>-Linie eine stets gleichmäßige mBD14:Ig mRNA-Expression in allen untersuchten Geweben und hämatopoetischen Zellen nachgewiesen wurde, war die Expression in der tg<sup>++</sup>-Linie ungleichmäßig ausgeprägt (Abb. 4). Dies ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Integration des Transgens in das Mausgenom zurückzuführen. Auf Grund dieser Unregelmäßigkeit erfolgte die weiterführende Charakterisierung mit der tg<sup>+</sup>-Linie.

Im Gegensatz zu DNA und mRNA des transgenen mBD14:Ig war ein Nachweis des Proteins weder in hämatopoetischen Zellen noch in deren Zellkulturüberständen möglich. Auch in den untersuchten Geweben oder im Serum der Tiere konnte mBD14:Ig nicht detektiert werden. Da der Einsatz eines Proteasehemmers nicht zum Nachweis des mBD14:Ig transgenen Proteins führte, erschien eine proteolytische Degradation des Proteins unwahrscheinlich. Daher kamen zwei Möglichkeiten in Betracht: Entweder erfolgte eine Translation der mRNA trotz starker Expression nicht bzw. fehlerhaft oder das Protein wurde in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze der Antikörper produziert.

#### **4.1.2. Phänotypisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie**

Die Phänotypisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie erfolgte unter anderem basierend auf Daten von Semple et al. (2010), die bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS einen anti-inflammatorischen Effekt für hBD3 und mBD14 zeigten. Nach einer solchen Kostimulation wurde sowohl *in vitro* von Makrophagen als auch *in vivo* weniger TNF produziert als nach einer alleinigen LPS-Stimulation. Die mBD14:Ig transgene Mauslinie diente im Folgenden als Modell einer gleichzeitigen Defensin- und TLR-Stimulation. Jedoch

konnten weder in BMDM noch in BMDC nach einer TLR-Stimulierung Unterschiede in der TNF-Expression zwischen transgenen und WT-Tieren gefunden werden (Abb. 5). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob diese Beobachtung auf eine unzureichende mBD14:Ig-Expression der untersuchten mBD14:Ig transgenen Mauslinie oder auf eine mangelnde Reproduzierbarkeit der Daten von Semple et al. zurückzuführen ist.

Die Charakterisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie erfolgte meist durch eine Analyse myeloider Zellpopulationen, da die Wirkung von  $\beta$ -Defensinen auf Antigen-präsentierende Zellen als besonders ausgeprägt beschrieben wurde (Funderburg et al., 2007; Röhl et al., 2010b; Semple et al., 2010).

In diesem Zusammenhang erfolgte die Analyse von Peritonealexsudatzellen, da es sich hierbei hauptsächlich um Monozyten und Makrophagen handelt. Darüber hinaus produzieren PECs nach einer Infektion vermehrt  $\beta$ -Defensine wie hBD3 (Sendt et al., 2001). Doch auch hier konnten nach Stimulierung weder Unterschiede in der TNF-Produktion noch in der NO-Ausschüttung zwischen mBD14:Ig transgenen Mäusen und WT-*littermates* nachgewiesen werden (Abb. 6).

Dagegen zeigte die Analyse der Zellzusammensetzung von PECs in den transgenen Tieren eine vermehrte Einwanderung von unreifen Monozyten im Vergleich zu WT-Tieren, in denen mehr Makrophagen zu finden waren (Abb. 7). In der Literatur sind zwar verschiedene Veröffentlichungen über immunsupprimierende Effekte von Defensinen zu finden (Semple et al., 2010), doch ist bisher keine verminderte Reifung von Immunzellen insbesondere von Makrophagen nach  $\beta$ -Defensin-Gabe beschrieben.

Ferner erfolgte auch die Analyse verschiedener Aktivierungsmarker auf der Oberfläche von BMDM in der mBD14:Ig transgenen Mauslinie. Funderburg et al. (2007) zeigte, dass eine Stimulierung mit  $\beta$ -Defensinen zu vermehrter Expression von Aktivierungsmarkern wie CD86 auf der Zelloberfläche von Monozyten führt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten dagegen keine Unterschiede bezüglich der MHC Klasse II- sowie der CD86-Expression auf Makrophagen zwischen der transgenen Mauslinie und WT-Tieren detektiert werden.

Neben der *in vitro*-Phänotypisierung wurde die transgene Mauslinie auch in entsprechende *in vivo*-Entzündungsmodelle eingesetzt. Analog zu Semple et al. (2010) erfolgte die Injektion von TLR-Liganden wie LPS oder CpG. Die anschließende TNF-Bestimmung aus dem Serum der Tiere zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den mBD14:Ig transgenen Mäusen und WT-*littermates* (Abb. 8). Eine intrazelluläre TNF-Bestimmung in CD11b<sup>+</sup>- sowie CD11c<sup>+</sup>-Milzzellen konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Linien aufzeigen (Abb. 9). Auch in diesem Zusammenhang konnte somit der beschriebene

anti-inflammatorische Effekt (Semple et al., 2010) im Modell der mBD14:Ig transgenen Maus nicht bestätigt werden.

Eine Untersuchung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie erfolgte auch im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis, da eine erhöhte Expression sowohl humaner  $\beta$ -Defensine (hBD2) in der ulzerativen Colitis, als auch  $\beta$ -Defensine aus der Maus (mBD3) in der DSS-induzierten Colitis (Hirota et al., 2010; Rahmann et al., 2010) beschrieben sind. Des Weiteren zeigten Vordaten unserer Arbeitsgruppe eine deutliche Erhöhung der mBD4- und mBD14-Expression sowie vermehrte Entzündungszeichen in den mit mBD4:Ig behandelten Tieren (Huber, unveröffentlichte Daten). Jedoch konnten im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis weder im Gewichtsverlust noch in der Länge des Dickdarms Unterschiede nachgewiesen werden. Auch die MPO-Aktivität und der histologische Score transgener Tiere unterschieden sich nicht von WT-Tieren (Abb. 10).

Zusammenfassend war es nicht möglich, in den bisherigen Untersuchungen einen Phänotyp der mBD14:Ig transgenen Maus nachzuweisen. Der potentiell unreifere Immunstatus, der sich aus der Zellzusammensetzung der PECs ergab, lässt sich nicht in Einklang mit veröffentlichten Daten oder mit dem im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen proinflammatorischen Effekt von mBD14 bringen. Darüber hinaus scheint die veränderte Zellzusammensetzung der PECs keinen Einfluss auf die Aktivierungseigenschaften des Immunsystems der transgenen Maus zu haben. Möglicherweise produziert die transgene Mauslinie unzureichende Mengen des mBD14:Ig, die die Nachweisgrenze der Antikörper mittels Western Blot unterschreiten. Es könnte dennoch einerseits genug Protein exprimiert werden, um einen Einfluss auf die Reifung der monozytären Zellen zu haben, andererseits zu wenig, um weitere Effekte zu vermitteln. Dies könnte zu einer Toleranz der mBD14:Ig transgenen Mauslinie gegenüber dem mBD14:Ig führen. Die Dauereexposition mit mBD14:Ig hat möglicherweise zu einer Desensibilisierung gegenüber dem transgenen mBD14 geführt, was wiederum den mangelnden Phänotyp erklären kann. Dabei könnte eine solche Desensibilisierung auch einen Einfluss auf Aufgaben des endogenen mBD14 haben. Unter Berücksichtigung späterer Daten dieser Arbeit, die eine verstärkte Reifung von Makrophagen nach mBD14-Stimulierung zeigen, stellt dies eine mögliche Begründung für die unterschiedliche Zellzusammensetzung der PECs in mBD14:Ig transgenen und WT-Mäusen dar.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die mBD14:Ig transgene Mauslinie auf Grund des mangelnden Phänotyps kein geeignetes Modell für eine funktionelle Charakterisierung des mBD14 in entzündlichen Reaktionen ist.

## **4.2. Immunregulatorische Funktion von mBD14**

### **4.2.1. mBD14-vermittelter pro-inflammatorischer Effekt**

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung des Einflusses einer  $\beta$ -Defensin-Stimulierung auf Makrophagen. Während eine zeitgleiche Stimulation von BMDM mit mBD14 und LPS keine Veränderung der TNF-Produktion ergab, produzierten die Zellen nach vierstündiger  $\beta$ -Defensin-Vorstimulierung signifikant höhere TNF-Mengen verglichen mit einer alleinigen LPS-Stimulierung (Abb. 11). Diese pro-inflammatorische Wirkung von mBD14 steht im Gegensatz zu den Daten von Semple et al. (2010), die einen immunsuppressiven Effekt auf myeloide Zellen zeigten. Eine mögliche Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse in dieser Arbeit liegt in der Art der verwendeten Defensine. Während in der vorliegenden Arbeit das *Drosophila*-Schneider 2 Zell-exprimierte Defensin:Ig-Fusionsprotein zur Anwendung kam, nutzten Semple et al. (2010) chemisch synthetisierte Peptide. Möglicherweise bestehen hier Unterschiede in der Zusammensetzung der Disulfidbrückenbindungen oder andere Peptidmodifikationen.

In bisherigen Veröffentlichungen wurden hauptsächlich pro-inflammatorischer Effekte von Defensinen beschrieben, wobei neben Semple et al. (2010) auch Navid et al. (2012) eine mBD14-vermittelte Induktion regulatorischer T-Zellen nachwiesen, die auf eine anti-inflammatorische Funktion des mBD14 hindeuten.

Der in dieser Arbeit beschriebene pro-inflammatorische Effekt erreicht seine optimale Wirkung nach einer vierstündigen Vorstimulierung und einer anschließenden 24stündigen LPS-Gabe (Abb. 11 und 12). Die verminderte Erhöhung der TNF-Produktion nach einer längeren Defensin-Stimulierung von BMDM ist möglicherweise auf die Desensibilisierung eines Rezeptors zurückzuführen (Ferguson, 2001). Neben der verstärkten TNF-Expression wurde auch vermehrt das Zytokin IL-6 und das Chemokin CXCL2 gebildet (Abb. 14). MBD14 induziert somit mehrere pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine. Dagegen konnte keine Expression von IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Zur Produktion des reifen IL-1 $\beta$  sind zwei Stimuli nötig: Ein TLR-Agonist führt zur Transkription unreifen IL-1 $\beta$ , wohingegen der zweite Stimulus, z.B. ATP die Ausbildung des so genannten Inflammasoms hervorruft. Die darin enthaltene Caspase 1 spaltet dann die pro-Form von IL-1 $\beta$  in ihre reife Form, die dann aus der Zelle exportiert werden kann (Schroder et al., 2010). Die Kombination aus Defensin und TLR-Agonist scheint nicht in der Lage zu sein, das Inflammasom zu induzieren.

Des Weiteren kann der LPS-Stimulus gegen andere TLR-Liganden ausgetauscht werden ohne dass mBD14 seine pro-inflammatorische Wirkung verliert (Abb. 15). Somit scheint nicht ein spezifischer *Toll like* Rezeptor für die Signalvermittlung entscheidend zu sein, sondern der gemeinsame Signalweg. Möglicherweise vermittelt eine mBD14-Stimulierung die Produktion oder Aktivierung verstärkender Mediatoren der TLR-Signaltransduktion. Andererseits könnte eine mBD14-Stimulierung auch negative Regulatoren des TLR-Signalwegs wie MyD88S (Janssen et al., 2003) oder TRIM30 (Shi et al., 2008) hemmen.

Neben den TLR-Agonisten ist auch ein Austausch des Defensin-Stimulus möglich (Abb. 16). Da die Defensine trotz der Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz eine sehr ähnliche Tertiärstruktur aufweisen, lässt dies auf einen gemeinsamen Rezeptor schließen. Auf die gleiche Weise können mehrere bisher näher untersuchte  $\beta$ -Defensine mit den Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR6 interagieren (Röhl et al., 2010b; Yang et al., 1999).

Die vermehrte TNF-Produktion nach einer mBD14-Vorstimulierung konnte nicht nur in BMDM sondern auch in BMDC nachgewiesen werden (Abb. 17), wobei jedoch nur mBD14 und nicht mBD4 diesen pro-inflammatorischen Effekt vermitteln konnte. Dies könnte auf die generell erhöhte TNF-Produktion der BMDC im Vergleich zu BMDM nach einer LPS-Stimulierung zurückzuführen sein. Da die Zellen in der Zytokinproduktionsfähigkeit begrenzt sind, ist auch die Verstärkung der TNF-Expression nach einer Vorstimulierung limitiert. Im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Defensinen vermittelte mBD4 in BMDM eine geringere pro-inflammatorische Wirkung (Abb. 16), die möglicherweise in BMDC keine weitere Erhöhung der TNF-Ausschüttung induzieren kann.

Ein Einfluss des Ig-Tags auf die TNF-Produktion der Zellen konnte mittels der SIg<sup>+</sup>- und hIgG-Kontrolle ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde eine LPS-Kontamination ausgeschlossen, da weder eine Aktivierung der Zellen durch alleinige Defensin-Stimulierung noch ein pro-inflammatorischer Effekt mit hitzeinaktiviertem mBD14 nachgewiesen wurde (Abb. 13).

Analog zu dem *in vitro* nachgewiesenen pro-inflammatorischen Effekt konnte auch *in vivo* eine Erhöhung der TNF-Konzentration im Serum hBD2-behandelter Tiere im Vergleich zu Kontroll-behandelten Mäusen detektiert werden, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 28). Die Voraktivierung von Makrophagen durch Defensine könnte somit auch *in vivo* relevant sein.

#### **4.2.2. Induktion des G Protein-gekoppelten Signalwegs durch mBD14**

Zur Analyse möglicher Signalwege des mBD14 wurde zunächst die Interaktion von mBD14 mit TLRs untersucht. Bisher ist die  $\beta$ -Defensin-vermittelte Aktivierung von dendritischen Zellen über TLR4 (Biragyn et al., 2002) und von Monozyten über TLR1/2 (Funderburg et al., 2007) beschrieben. Jedoch konnte mBD14 alleine keine Expression von TNF oder IL-6 induzieren (Abb. 14 und 18a), obwohl es sich dabei um klassische, TLR-vermittelte Zytokine handelt. Auch eine Induktion des Inflammasoms und somit die Produktion von reifem IL-1 $\beta$  war weder durch Ersetzen des ersten noch des zweiten Stimulus durch mBD14 möglich (Abb. 18b). Da der erste Stimulus üblicherweise durch einen TLR-Agonisten vermittelt wird, scheint mBD14 nicht mit einem TLR zu interagieren. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass eine LPS-Kontamination in den  $\beta$ -Defensinpräparationen ausgeschlossen werden kann.

Die Vermittlung des synergistischen, pro-inflammatorischen Effekts von mBD14 scheint somit nicht von der Interaktion mit einem TLR abhängig zu sein.

Neben einer Interaktion mit *Toll like* Rezeptoren ist auch eine  $\beta$ -Defensin-vermittelte Chemotaxis verschiedener Zellpopulationen über Chemokinrezeptoren wie CCR2 und CCR6 beschrieben (Röhrl et al., 2010b; Yang et al., 1999). Darüber hinaus bewirkt eine Interaktion von Defensinen mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren die Ausschüttung von Zytokinen durch T-Zellen (Kanda et al., 2011) und Keratinozyten (Niyonsaba et al., 2007) sowie die Degranulation von Mastzellen (Chen et al., 2007).

Die Vorbehandlung von BMDM mit Pertussis Toxin, einem ubiquitären Inhibitor G Protein-gekoppelter Rezeptoren, führte zu einer signifikanten Reduktion des mBD14-vermittelten synergistischen, pro-inflammatorischen Effekts (Abb. 19). Auch die Inhibition der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) durch Ly294002 konnte die vermehrte TNF-Produktion durch mBD14 signifikant reduzieren (Abb. 20). Zusätzlich erfolgte nach Stimulierung der BMDM eine Phosphorylierung der MAPK Erk1/2, die jedoch durch eine Restimulierung der Zellen mit LPS nicht weiter verstärkt werden konnte (Abb. 21).

Die PI3K ebenso wie die MAPK-Signalkaskade sind unter anderem Bestandteile des Signalwegs G Protein-gekoppelter Rezeptoren. Zusammen mit der PTX-vermittelten Inhibition der mBD14-induzierten Verstärkung der TNF-Produktion bilden sie deutliche Hinweise auf eine Interaktion der Defensine mit einem G Protein-gekoppelten Rezeptor.

Bisher sind in der Literatur verschiedene G Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben, mit denen antimikrobielle Peptide wechselwirken können. Mehrfach erwähnt wurden in

dieser Arbeit bereits die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR6, aber auch die Interaktion des antimikrobiellen Peptids LL-37 mit FPRL-1 (Yang et al., 2000) konnte nachgewiesen werden.

Zunächst erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung der Interaktion mit CCR2, da dieser Rezeptor auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Der Austausch des mBD14-Stimulus durch MCP-1, einem Chemokinliganden für CCR2, ergab keine signifikante Erhöhung der TNF-Produktion (Abb. 22). Jedoch vermittelte MCP-1 alleine bereits die Expression von TNF in BMDM, obwohl TNF nicht zu den MCP-1-induzierten Zytokinen zählt (Jiang et al., 1992). Der tendenzielle Anstieg der TNF-Produktion basiert somit wahrscheinlich auf einer LPS-Kontamination des käuflich erworbenen und in *E. coli* exprimierten Chemokins.

Die Stimulierung eines Rezeptors durch unterschiedliche Liganden kann in einigen Fällen zu einer unterschiedlichen Signaltransduktion führen. Die Stimulierung von TLR1/2 mit Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> führt z.B. unter anderem zur Produktion von IL-10, während die Stimulierung des gleichen Rezeptors mit hBD3 keine IL-10-Ausschüttung induziert (Funderburg et al., 2011). Somit war die Vermittlung eines pro-inflammatorischen Effekts von mBD14 über CCR2 nicht auszuschließen, obwohl MCP-1 keine Erhöhung der TNF-Produktion induzierte. Allerdings wurde die vermehrte Zytokin-Ausschüttung weder durch den CCR2-Antagonisten RS 102895 beeinflusst (Abb. 23) noch konnten Unterschiede in der Zytokinexpression von CCR2-defizienten und WT-Mäusen detektiert werden (Abb. 22). Diese Resultate legen nahe, dass CCR2 als Rezeptor für den mBD14-vermittelten synergistischen, pro-inflammatorischen Effekt ausgeschlossen werden kann.

Die Untersuchung bezüglich einer Interaktion mit CCR6 ergab ebenfalls keine Unterschiede in der mBD14-induzierten synergistischen TNF-Produktion zwischen BMDM aus CCR6-defizienten und WT-Tieren (Abb. 24). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass auch dieser Rezeptor als Interaktionspartner für die pro-inflammatorische, synergistische Wirkung von mBD14 ausgeschlossen werden kann.

Für die Untersuchung von FPRL-1 als potentiellen Rezeptor für mBD14 erfolgte der Austausch des Defensin-Stimulus durch fMLP, einen Liganden des FPRL-1. Wie MCP-1 konnte jedoch auch fMLP keine vermehrte TNF-Produktion in BMDM induzieren (Abb. 25), wodurch auch dieser Rezeptor als Interaktionspartner für die mBD14-vermittelte synergistische Wirkung unwahrscheinlich erscheint.

Die Daten dieser Arbeit werden zusätzlich durch eine Veröffentlichung von Kanda et al. (2011) unterstützt, die eine vermehrte Zytokinproduktion von T-Zellen bei gleichzeitiger

Stimulation mit CD3/CD28 und hBD2 zeigen konnten. Dieser Effekt wird über einen G Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt, bei dem es sich weder um CCR2 noch um CCR6 handelt. Mastzellen wiederum exprimieren mindestens zwei G Protein-gekoppelte Rezeptoren für hBD2, von denen einer eine hohe und der andere eine niedrige Affinität für das Defensin besitzt. Da es sich bei keinem der beiden um CCR6 handelt (Niyonsaba et al., 2002), scheint hBD2 neben CCR2 mit mindestens einem weiteren Rezeptor interagieren zu können. Yang et al. (2000) stellten die These auf, dass die Zellen mittels eines hoch affinen Rezeptors angelockt werden, dieser jedoch durch Desensibilisierung deaktiviert wird. Die nachfolgende Interaktion mit einem niedrig affinen Rezeptor führt zu einer exakteren Anlockung und zusätzlich zu einer Aktivierung der Zellen. Nach den Daten dieser Arbeit könnten Makrophagen somit über eine hoch affine Interaktion zwischen mBD14 und CCR2 angelockt und anschließend über einen zweiten möglicherweise niedrig affinen Rezeptor aktiviert werden.

Kürzlich konnten Nijnik et al. (2012) einen ebenfalls synergistischen Effekt einer LL-37- und Flagellin-Stimulierung auf die Chemokinproduktion von Keratinozyten nachweisen. Dabei interagierte LL-37 mit einem G Protein-gekoppelten Rezeptor während Flagellin an TLR5 bindet. Somit scheinen verschiedene antimikrobielle Peptide über G Protein-gekoppelte Rezeptoren Einfluss auf TLR-vermittelte Effekte auszuüben.

Nachdem CCR2 und CCR6 als Interaktionspartner für mBD14 ausgeschlossen werden konnten und FPRL-1 als unwahrscheinlicher Kandidat gelten kann, stellt sich weiterhin die Frage nach dem Interaktionspartner des Defensins. In der Literatur sind CXCR4 und MC1R als weitere Rezeptoren für  $\beta$ -Defensine beschrieben. Im Fall von CXCR4 konnte bisher jedoch ausschließlich eine Internalisierung des Rezeptors nach Kontakt mit einem  $\beta$ -Defensin gezeigt werden (Feng et al., 2006), jedoch keine Aktivierung oder Chemotaxis (Röhrl et al., 2010b). Die Interaktion von Defensinen mit MC1R (*melanocortin 1 receptor*) ist nach bisherigem Kenntnisstand nur für die Fellfärbung des Hundes verantwortlich (Candille et al., 2007). Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass dieser Rezeptor auch eine immunologische Rolle spielt.

#### **4.2.3. Aktivierung von Makrophagen durch mBD14**

Neben der Analyse möglicher Rezeptoren von mBD14, erfolgte auch eine Untersuchung des Aktivierungsstatus mBD14-stimulierter Zellen, da in mehreren Veröffentlichungen ein Einfluss von  $\beta$ -Defensinen auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker beschrie-

ben ist (z.B. Biragyn et al., 2002; Funderburg, et al., 2007). Die vermehrte Expression von CD11b und F4/80 auf der Oberfläche von mBD14-stimulierten BMDM deutet auf einen erhöhten Reifungsgrad der Zellen hin (Abb. 26). Während das Defensin chemotaktisch auf Makrophagen wirkt, könnte es so zusätzlich zu deren weiteren Reifung beitragen, um eine folgende Immunantwort zu verstärken. Zusätzlich war die CD86-, jedoch nicht die CD80-Expression, auf mBD14-stimulierten BMDM höher als auf unstimulierten Zellen. Da CD86 ein besserer Induktor der T-Zell-Funktion ist als CD80 (Mitra et al., 1995; Makrigiannis et al., 1999), trägt mBD14 möglicherweise auch zu einer effektiveren adaptiven T-Zell-Antwort bei.

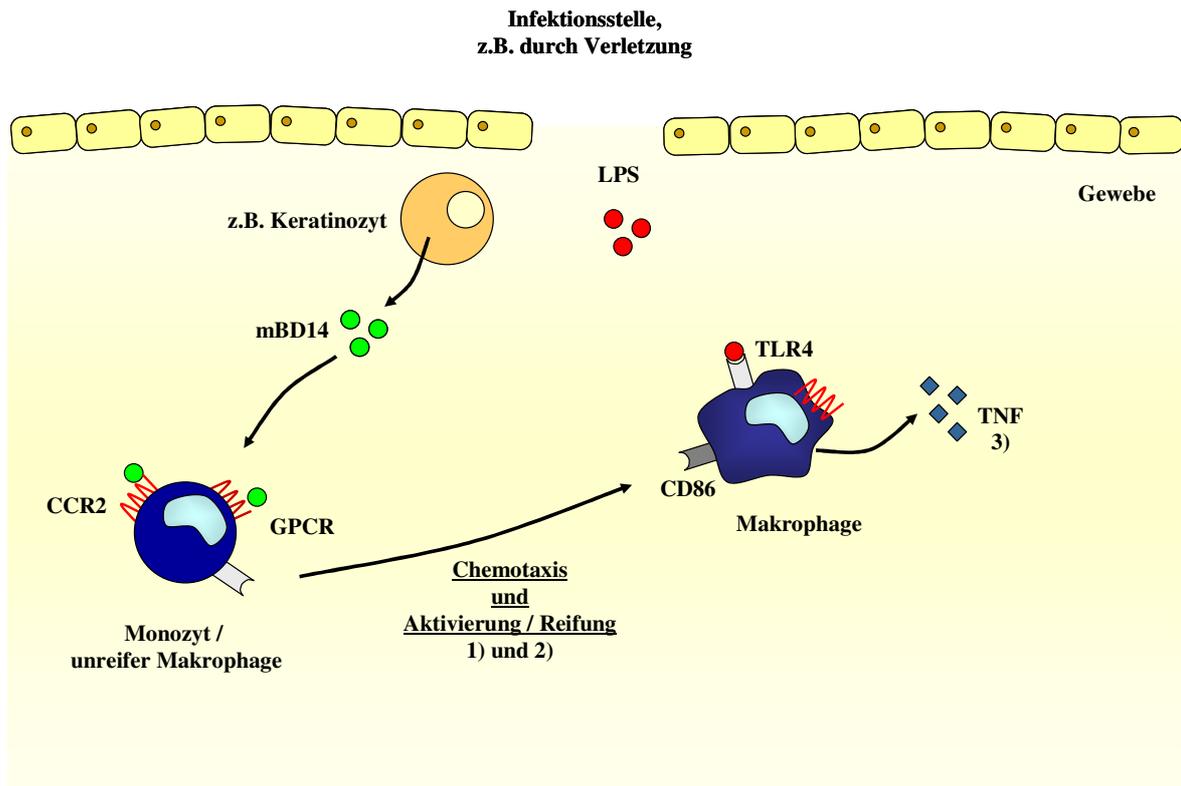
Die TLR4-Expression auf BMDM wurde durch eine Stimulierung mit mBD14 nicht beeinflusst (Abb. 27). Die vermehrte TNF-Produktion nach mBD14-Vorstimulierung ist somit nicht auf eine erhöhte Expression des *Toll like* Rezeptors für LPS zurückzuführen.

#### **4.2.4. Modell der pro-inflammatorischen Wirkung von mBD14**

Nach einem Kontakt des Organismus mit Pathogenen werden unter anderem  $\beta$ -Defensine z.B. von Epithelzellen wie Keratinozyten, aber auch von Zellen des Immunsystems induziert und exprimiert (Ishikawa et al., 2009). Neben ihrer direkten antimikrobiellen Aktivität wirken die Defensine auch chemotaktisch unter anderem auf Monozyten und Makrophagen über den Chemokinrezeptor CCR2 (Röhl et al., 2010b). Die Daten der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass mBD14 dabei zusätzlich mit einem weiteren G Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) interagiert. Aus den Resultaten dieser Arbeit lässt sich folgendes Modell ableiten:

- 1) Durch Interaktion von mBD14 mit dem Chemokinrezeptor CCR2 werden Makrophagen chemotaktisch an den Ort der Infektion gelockt.
- 2) Durch Interaktion mit einem weiteren GPCR induziert mBD14 über eine MAPK-Signalkaskade unter anderem eine weitere Reifung und Aktivierung durch erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD11b, F4/80 und CD86.
- 3) Die so angelockten und vorstimulierten Makrophagen können nach Kontakt mit einem Pathogen verstärkt pro-inflammatorische Zytokine wie TNF oder IL-6 produzieren.

Auf diese Weise könnte mBD14 zu einer effizienten Induktion der Entzündungsantwort beitragen. Dieses Modell ist in Abb. 29 schematisch dargestellt.



**Abb. 29: Modell des pro-inflammatorischen Effekts von mBD14.**  
Schematische Darstellung.

## **5. Zusammenfassung**

$\beta$ -Defensine sind wichtige Mediatoren der angeborenen Immunantwort. Neben den antimikrobiellen Eigenschaften sind sie in der Lage eine Immunantwort während einer Entzündungsreaktion zu modulieren. In der Literatur sind dabei sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen verschiedener  $\beta$ -Defensine beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Maus- $\beta$ -Defensin 14 (mBD14) auf eine Entzündungsreaktion genauer charakterisiert.

Zunächst erfolgte die Untersuchung einer mBD14:Ig transgenen Mauslinie, mit deren Hilfe die immunmodulatorischen Eigenschaften des mBD14 *in vivo* analysiert werden sollten. Es konnte sowohl die transgene DNA als auch die mRNA des ubiquitär exprimierten mBD14:Ig in allen untersuchten Geweben und hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden. Jedoch war es nicht möglich, das mBD14:Ig transgene Protein zu detektieren. Die Untersuchung der transgenen Mauslinie in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Entzündungsmodellen ergab zudem keinen nachweisbaren Phänotyp. So wurde weder ein Unterschied in der Zytokinproduktion von TLR-stimulierten Makrophagen, von dendritischen Zellen noch von Peritonealexsudatzellen der mBD14:Ig transgenen Mauslinie im Vergleich zu WT-Tieren detektiert. Auch die TLR-Stimulierung *in vivo* konnte keinen Unterschied in der Zytokinkonzentration im Serum transgener Tiere oder im Prozentsatz TNF-positiver CD11b<sup>-</sup>- bzw. CD11c<sup>+</sup>-Milzzellen im Vergleich zu WT-Mäusen zeigen. Die Charakterisierung der mBD14:Ig transgenen Mauslinie erfolgte zusätzlich im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis, in dem jedoch ebenfalls keine Unterschiede im Krankheitsverlauf zu WT-*littermates* detektiert wurden. Die mBD14:Ig transgene Mauslinie bot somit kein geeignetes Modell, um den Einfluss von mBD14 auf die Immunantwort *in vivo* zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte auch die Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkung von mBD14 auf myeloide Zellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine vierstündige Vorstimulierung von Knochenmarkmakrophagen (BMDM) mit mBD14 zu einer signifikanten und synergistischen Erhöhung der TLR-induzierten TNF-Produktion führt. Dieser proinflammatorische Effekt wurde neben mBD14 auch von mBD4 sowie den humanen Orthologen hBD3 und hBD2 hervorgerufen. Die erhöhte Zytokinexpression nach einer Defensin-Vorbehandlung der Zellen konnte neben LPS, dem Liganden von TLR4, auch mit CpG, poly I:C und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, den Liganden von TLR9, TLR3 bzw. TLR1/2 beobach-

tet werden. Die Art des TLR-Stimulus spielte somit ebenfalls keine Rolle. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass auch die LPS-induzierte Produktion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-6 oder CXCL2 durch eine Defensin-Vorstimulierung verstärkt wird. Neben BMDM ließ sich auch in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark eine vermehrte TNF-Expression durch eine entsprechende Vorbehandlung induzieren. Die Defensin-Vorstimulierung zeigte zudem ihre *in vivo*-Relevanz durch die erhöhte TNF-Konzentration im Serum vorbehandelter Tiere im Vergleich zu einer alleinigen LPS-Stimulierung. Hierbei konnte jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden.

Durch die Inhibition G Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) mit Pertussis Toxin konnte gezeigt werden, dass der synergistische Effekt von mBD14 auf die Zytokinproduktion von Makrophagen über einen G Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt wird. Dies konnte durch den Einsatz eines Inhibitors der Phosphatidylinositol 3-Kinase und die Phosphorylierung der MAPK Erk1/2 bestätigt werden. Dabei handelte es sich bei dem involvierten GPCR weder um den Chemokinrezeptor CCR2 noch um CCR6, die für eine  $\beta$ -Defensin-vermittelte Chemotaxis hämatopoetischer Zellen verantwortlich sind. Entsprechend den gewonnenen Daten scheint es auch unwahrscheinlich, dass FPRL-1 als korrespondierender Rezeptor für mBD14 dient.

Neben der vermehrten Zytokinproduktion nach einer TLR-Stimulierung induzierte mBD14 auch die verstärkte Expression von Reifungsmarkern wie CD11b und F4/80 sowie von Aktivierungsmarkern wie CD86 auf der Oberfläche von BMDM.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass mBD14 neben den bisher beschriebenen Rezeptoren mit einem weiteren bislang nicht identifizierten G Protein-gekoppelten Rezeptor interagiert. Eine mBD14-Vorstimulierung myeloider Zellen über diesen GPCR ist in der Lage, synergistisch und pro-inflammatorisch auf die TLR-induzierte Zytokinproduktion zu wirken. Zusätzlich fördert die mBD14-Stimulierung eine vermehrte Reifung und Aktivierung der Zellen.

## **6. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: <i>Toll like</i> Rezeptor-vermittelter Signalweg.....	4
Abb. 2: G Protein-gekoppelter Rezeptor-vermittelter Signalweg. ....	6
Abb. 3: Struktur des Maus- $\beta$ -Defensins 14 (mBD14).....	8
Abb. 4: Nachweis des mBD14:Ig Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene.....	54
Abb. 5: Kein Unterschied in der TNF-Produktion transgener und WT-BMDM sowie BMDC nach TLR-Stimulierung. ....	56
Abb. 6: Kein Unterschied in der TNF- bzw. NO-Produktion von Peritonealexsudatzellen (PECs) mBD14:Ig transgener und WT-Tiere.....	57
Abb. 7: Vermehrte Anlockung von Monozyten in das Peritoneum mBD14:Ig transgener Mäuse. ....	58
Abb. 8: Keine Unterschiede in der TNF-Produktion im Serum mBD14:Ig transgener und WT-Tiere nach TLR-Stimulierung.....	59
Abb. 9: Keine Unterschiede in der intrazellulären TNF-Produktion in CD11b <sup>+</sup> - und CD11c <sup>+</sup> -Zellen der mBD14:Ig transgenen Maus im Vergleich zu WT-Tieren.....	60
Abb. 10: Keine Unterschiede der mBD14:Ig transgenen Mauslinie zu WT-Tieren im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis. ....	61
Abb. 11: Pro-inflammatorischer Effekt von mBD14:Ig in BMDM. ....	63
Abb. 12: Kein Einfluss der Dauer des LPS-Stimulus auf den pro-inflammatorischen Effekt von mBD14. ....	64
Abb. 13: Kein Einfluss des Ig-Tags auf eine nachfolgende LPS-Stimulierung.....	65
Abb. 14: Expression von IL-6 und CXCL2 nach mBD14-Vorstimulierung von BMDM..	65
Abb. 15: Pro-inflammatorischer Effekt einer mBD14-Vorbehandlung mit weiteren TLR-Liganden. ....	66
Abb. 16: Pro-inflammatorischer Effekt der Vorstimulierung mit mBD4, hBD2 und hBD3. ....	67
Abb. 17: Pro-inflammatorischer Effekt von mBD14 jedoch nicht von mBD4 auf BMDC.	68
Abb. 18: Keine Aktivierung von BMDM durch mBD14.....	69
Abb. 19: Pertussis Toxin hemmt den pro-inflammatorischen Effekt von mBD14. ....	70
Abb. 20: Ly294002 hemmt den pro-inflammatorischen Effekt von mBD14.....	71
Abb. 21: Analyse der Erk1/2-Phosphorylierung nach mBD14-Stimulierung von BMDM.	72
Abb. 22: MCP-1, ein Chemokin-Ligand von CCR2, vermittelt keine verstärkte Freisetzung von TNF.....	73

---

Abb. 23: Der CCR2-Antagonist RS 102895 hat keinen Einfluss auf die mBD14-verstärkte TNF-Produktion in BMDM.....	73
Abb. 24: Keine Unterschiede in der TNF-Produktion von WT-BMDM zu CCR2 <sup>-/-</sup> - bzw. CCR6 <sup>-/-</sup> -BMDM nach mBD14-Vorstimulierung.....	74
Abb. 25: fMLP vermittelt keine erhöhte TNF-Produktion in BMDM.....	75
Abb. 26: Vermehrte Expression von CD11b, F4/80 und CD86 auf der Oberfläche stimulierter BMDM. ....	76
Abb. 27: Keine vermehrte TLR4-Expression auf der Oberfläche stimulierter BMDM.....	77
Abb. 28: <i>In vivo</i> -Vorstimulierung mit hBD2 führt zu einer erhöhten TNF-Produktion. ....	78
Abb. 29: Modell des pro-inflammatorischen Effekts von mBD14. ....	88

## **7. Literaturverzeichnis**

Abbas, A. K. and Lichtman, A. H. (2005). Cellular and molecular immunology. *Saunders 5th Edition*

Ahrens, K., Schunck, M., Podda, G.-F., Meingasser, J., Stuetz, A., Schröder, J.-M., Harder, J. and Proksch, E. (2011). Mechanical and metabolic injury to the skin barrier leads to increased expression of murine  $\beta$ -defensin-1, -3, and -14. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 443-452

Aldhous, M. C., Noble, C. L. and Satsangi, J. (2009). Dysregulation of human  $\beta$ -defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* **4**(7), e6285

Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**(8), 257-263

Bierbaum, G. and Sahl, H.-G. (1985). Induction of autolysis of *Staphylococci* by the basic peptide antibiotics pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* **141**, 249-254

Biragyn A., Adelchi Ruffini, P., Leifer, C. A., Klyushnenkovy, E., Shakhov, A., Chertov, O., Shirakawa, A. K., Farber, J. M., Segal, D. M., Oppenheim, J. J. and Kwak, J. W. (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by  $\beta$ -defensin 2. *Science* **298**, 1025-1029

Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D. and Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* **78**(3), 206-209

Brodgen, K. A., Heidari, M., Sacco, R. E., Palmquist, D., Guthmiller, J. M., Johnson, G. K., Jia, H. P., Tack, B. F. and McCray, P. B. Jr. (2003). Defensin-induced adaptive immunity in mice and its potential in preventing periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**, 95-99

Burns, D. L. (1988). Subunit structure and enzymatic activity of pertussis toxin. *Micobiol. Sci.* **5**(9), 285-287

Candille, S. I., Kaelin, C. B., Cattanach, B. M., Yu., B., Thompson, D. A., Nix, M. A., Kerns, J. A., Schmutz, S. M., Millhauser, G. L. and Barsh, G. S. (2007). A  $\beta$ -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science* **318**(5855), 1418-1423

Chen, X., Niyonsaba, F., Ushio, H., Hara, M., Yokoi, H., Matsumoto, K., Saito, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K. and Ogawa, H. (2007). Antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur. J. Immunol.* **37**, 434-444

Chertov, O., Michiel, D. F., Xu, L., Ming Wang, J., Tani, K., Murphy, W. J., Longo, D. L., Taub, D. D. and Oppenheim, J. J. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271**(6), 2935-2940

Conejo-Garcia, J.-R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodríguez-Jiménez, J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W.-G. and Bals, R. (2001). Identification of a novel, multifunctional  $\beta$ -defensin (human  $\beta$ -defensin 3) with specific antimicrobial activity. *Cell Tissue Res.* **306**, 257-264

Conejo-Garcia, J.-R., Benencia, F., Courreges, M.-C., Kang, E., Mohamed-Hadley, A., Buckanovich, R. J., Holtz, D. O., Kenkins, A., Na, H., Zhang, L., Wagner, D. S., Katsaros, D., Carroll, R. and Coukos, G. (2004). Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a  $\beta$ -defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature Medicine* **10**(9), 950-958

Fellermann, K., Stange, D. E., Schaeffeler, E., Schmalzl, H., Wehkamp, J., Bevins, C. L., Reinisch, W., Teml, A., Schwab, M., Lichter, P., Radlswimmer, B. and Stange, E. F. (2006). A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn Disease of the colon. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 439-448

- Feng, Z., Dubyak, G. R., Lederman, M. M. and Weinberg, A. (2006). Cutting Edge: Human  $\beta$ -defensin 3 – A novel antagonist of HIV-1 coreceptor CXCR4. *J. Immunol.* **177**, 782-786
- Ferguson, S. S. G. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**(1), 1-24
- Funderburg, N., Lederman, M. M., Feng, Z., Drage, M. G., Jadowsky, J., Harding, C. V., Weinberg, A. and Sieg, S. F. (2007). Human  $\beta$ -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *PNAS* **104**(47), 18631-18635
- Funderburg, N. T., Jadowsky, J. K., Lederman, M. M., Feng, Z., Weinberg, A. and Sieg, S. F. (2011). The Toll like receptor 1/2 agonists Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> and human  $\beta$ -defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor- $\kappa$ B signalling patterns in human monocytes. *Immunology* **134**, 151-160
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F. and Lehrer, R. I. (1985). Natural peptide antibodies of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**, 1427-1435
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G. and Shai, Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles *Biochemistry* **34**, 11479-11488
- Gläser, R., Navid, F., Schuller, W., Jantschitsch, C., Harder, J., Schröder, J. M., Schwarz, A. and Schwarz T. (2009). UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**(5), 1117-1123
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.

Gutkind, J. S. (2000). Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci. STKE* **40**, re1

Hancock, R. E., Brown, K. L. and Mookherjee, N. (2006). Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* **4**, 315-322

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schröder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861

Henson, P. M. (2005). Dampening inflammation. *Nature Immunology* **6**(12), 1179-1181

Hinrichson, K., Podschun, R., Schubert, S., Schröder, J. M., Harder, J. and Proksch, E. (2008). Mouse beta-defensin-14, an antimicrobial ortholog of human beta-defensin-3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**(5), 1876-1879

Hirota, S. A., Ng, J., Lueng, A., Khajah, M., Parhar, K., Li, Y., Lam, V., Potentier, M. S., Ng, K., Bawa, M., McCafferty, D.-M., Rioux, K. P., Ghosh, S., Xavier, R. J., Colgan, S. P., Tschopp, J., Muruve, D., MacDonald, J. A. and Beck, P. L. (2010). NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**(6), 1359-1372

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318

Hollox, E. J., Huffmeier, U., Zeeuwen, P. L., Palla, R., Lascorz, J., Rodijk-Olthuis, D., van de Kerkhof, P. C., Traupe, H., de Jongh, G., den Heijer, M., Reis, A., Armour, J. A. and Schalkwijk, J. (2008). Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat. Genet.* **40**(1), 23-25

Hoover, D. M., Boulègue, C., Yang, D., Oppenheim, J. J., Tucker, K., Lu, W. and Lubkowski, J. (2002). The structure of human macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ /CCL20. *J. Biol. Chem.* **227**(40), 37647-37654

[http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK\\_G\\_Protein.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK_G_Protein.html), 20.09.2012

---

[http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Toll\\_Like.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Toll_Like.html), 20.09.2012

Ishikawa, T., Kanda, N., Hau, C. S., Tada, Y. and Watanabe, S. (2009). Histamine induces human  $\beta$ -defensin-3 production in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **56**, 121-127

Iwanaga, T., Hoshi, O., Han, H. and Fujita, T. (1994). Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: some possible mechanisms of cecal ulceration. *J. Gastroenterol.* **29**(4), 430-438

Janssen, S., Burns, K., Vercammen, E., Tschopp, J. and Bevaert, R. (2003). MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and Ap-1-dependent gene expression. *FEBS lett.* **548**(1-3), 103-107

Jiang, Y., Beller, D. I., Frenzl, G. and Graves, D. T. (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* **148**(8), 2423-2428

Kanda, N., Kamata, M., Tada, Y., Ishikawa, T., Sato, S. and Watanabe, S. (2011). Human  $\beta$ -defensin-2 enhances IFN- $\gamma$  and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 935-944

Kawsar, H. I., Weinberg, A., Hirsch, S. A., Venizelos, A., Howell, S., Jiang B. and Jin, G. (2008). Overexpression of human  $\beta$ -defensin-3 in oral dysplasia: Potential role in macrophage trafficking. *Oral Oncology* **45**, 696-702

Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell. Biol.* **116**(5), 1071-1080

Klebanoff, S.J. (2005). Myeloperoxidase: friend or foe. *J. Leukoc. Biol.* **77**(5), 598-625

Knippers, R. (2006). Molekulare Genetik. *Thieme 9th Edition*

- Knowles, R. G. and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249-258
- Kroeze, W. K., Sheffler, D. J. and Roth, B. J. (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *J. Cell Science* **116**, 4867-4869
- Lehrer, R. I. (2004). Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 727-738
- Linzmeier, R., Ho, C. H., Hoang, B. V. and Ganz, T. (1999). A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* **233**, 205-211
- Makrigiannis, A. P., Musgrave, B. L. and Hoskin, D. W. (1999). Differential effects of B7-1 and B7-2 on the costimulation of mouse nonspecific cytotoxic T lymphocyte development in response to anti-CD3 antibody. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 792-802
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochem. Biophys. Acta* **1462**, 1-10
- McCormick, T. C. and Weinberg, A. (2000). Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontology* **54**, 195-206
- Mitra, R. S., Judge, T. A., Nestle, F. O., Turka, L. A. and Nickoloff, B. J. (1995). Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J. Immunol.* **154**, 2668-1674
- Moranta, D., Regueiro, V., March, C., Llobet, E., Margareto, J., Larrate, E., Garmendia, J. and Bengoechea, J. A. (2010). *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of  $\beta$ -defensins by airway epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**(3), 1135-1146
- Morrison, G., Kilanowski, F., Davidson, D. and Dorin, J. (2002). Characterization of the mouse beta defensin1, defb1, mutant mouse model. *Infect. Immun.* **70**, 3053-3060

- Moser, C., Weiner, D. J., Lysenko, E., Bals, R., Weiser, J. N. and Wilson, J. M. (2002). Beta-defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect. Immun.* **70**, 3068-3072
- Motzkus, D., Schulz-Maronde, S., Heitland, A., Schulz, A., Forssmann, W.-G., Jübner, M. and Maronde, E. (2006). The novel  $\beta$ -defensin DEFB123 prevents lipopolysaccharide-mediated effects *in vitro* and *in vivo*. *FASEB J.* **20**, E997-1702
- Nava, G. M., Escorcía, M. and Castañeda, M. P. (2009). Molecular diversity of the antimicrobial domain of beta-defensin 3 and homologous peptides. *Comp. Funct. Genomics* **2009**:983636
- Navid F., Boniotti, M., Walker, C., Ahrens, K., Proksch, E., Sparwasser, T., Müller, W., Schwarz, T. and Schwarz, A. (2012). Induction of regulatory T cells by a murine  $\beta$ -defensin. *J. Immunol.* **188**, 735-743
- Nijnik, A., Pistollic, J., Filewood, N., C., J. and Hancock, R., E., W. (2012). Signaling pathways mediating chemokine induction in keratinocytes by cathelicidin LL-37 and flagellin. *J. Innate Immun.* **4**, 377-386
- Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Matsuda, H., Ogawa, H. and Nagaoka, I. (2002). Epithelial cell-derived human  $\beta$ -defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int. Immunol.* **14**(4), 421-426
- Niyonsaba, F., Ogawa, H. and Nagaoka, I. (2004). Human  $\beta$ -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor- $\alpha$ -treated human neutrophils. *Immunology* **111**, 273-281
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okamura, K. and Ogawa, H. (2007). Antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 594-604

Ouellette, A. J. and Bevins, C. L. (2001). Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflam. Bowel Dis.* **7**, 43-50

Peyrin-Biroulet, L., Beisner, J., Wang, G., Nuding, S., Oommen, S. T., Kelly, D., Parmentier-Decrucq, E., Dessein, R., Merour, E., Chavatte, P., Grandjean, T., Bressenot, A., Desreumaux, P., Colombel, J. F., Desvergne, B., Stange, E. F., Wehkamp, J. and Chamaillard, M. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8772-8777

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45

Rahmann, A., Fahlgren, A., Sunstedt, C., Hammarström, S., Danielsson, Å. and Hammarström, M.-L. (2010). Chronic colitis induces expression of  $\beta$ -defensins in murine intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **163**, 123-130

Rehli, M., Sulzbacher, S., Pape, S., Ravasi, T., Wells, C. A., Heinz, S., Sollner, L., El Chartouni, C., Krause, S. W., Steingrimsson, E., Hume, D. A. and Andreesen, R. (2005). Transcription factor Tfec contributes to the IL-4-inducible expression of a small group of genes in mouse macrophages including the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J.Immunol.* **174**, 7111-7122.

Röhrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J. and Hehlhans, T. (2008). Identification and biological characterization of mouse  $\beta$ -defensin 14, the orthologue of human  $\beta$ -defensin 3. *J. Biol. Chem.* **283**(9), 5414-5419

Röhrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J. and Hehlhans, T. (2010a). Specific binding and chemotactic activity of mBD4 and its functional orthologue hBD2 to CCR6-expressing cells. *J. Biol. Chem.* **285**(10), 7028-7034

Röhrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J. and Hehlhans, T. (2010b). Human  $\beta$ -defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J. Immunol.* **184**, 6688-6694

Röhl, J., Huber, B., Koehl, G. E., Geissler, E. K. and Hehlhans, T. (2012). Mouse  $\beta$ -defensin 14 (*Defb14*) promotes tumor growth by inducing angiogenesis in a CCR6-dependent manner. *J. Immunol.* **188**(10), 4931-4939

Ryan, L. K., Dai, J., Yin, Z., Megjugorac, N., Uhlhorn, V., Yim, S., Schwartz, K. D., Abrahams, J. M., Diamond, G. and Fitzgerald-Bocarsley, P. (2011). Modulation of human  $\beta$ -defensin-1 (hBD-1) in plasmacytoid dendritic cells (PDC), monocytes, and epithelial cells by influenza virus, Herpes simplex virus, and Sendai virus and its possible role in innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* **90**(2), 343-356

Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Körner, C., Tossi, A., Nivikova, N., Sharnova, O. and Sahl, H. (2010). Human  $\beta$ -defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. *Infect. Immun.* **78**(6), 2793-2800

Schroder, K. and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* **140**, 821-832

Schroeder, B. O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E. F. and Wehkamp, J. (2011). Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human  $\beta$ -defensin 1. *Nature* **469**, 419-423

Schutte, B. C., Mitros, J. P., Bartlett, J. A., Walters, J. D., Jia, H. P., Welsh, M. J., Casavant, T. L. and McCray, P. B. Jr. (2002). Discovery of five conserved  $\beta$ -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2129-2133

Scott, M. G., Vreugdenhil, A. C. E., Buurman, W. A., Hancock, R. E. W. and Gold, M. R. (2000). Cutting edge: Cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J. Immunol.* **164**, 549-553

Seger, R. and Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735

Semple, F., Webb, S., Li, H., Patel, H., Peretti, M., Jackson, I. J., Gray, M., Davidson, D. J. and Dorin, J. R. (2010). Human  $\beta$ -defensin 3 has immunosuppressive activity *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* **40**(4), 1073-1078

Semple, F., MacPherson, H., Webb, S., Cox, S. L., Mallin, L. J., Tyrrell, C., Grimes, G. R., Semple, C. A., Nix, M. A., Millhauser, G. L. and Dorin, J. R. (2011). Human  $\beta$ -defensin 3 affects the activity of pro-inflammatory pathways associated with MyD88 and TRIF. *Eur. J. Immunol.* **41**(11), 3291-3300

Semple, F. and Dorin, J. R. (2012).  $\beta$ -defensins: Multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J. Innate Immun.* **4**, 337-348

Sendt, W., Amberg, R., Hassan, A., von Specht, B.U. and Schöffel, U. (2001). Secondary peritonitis: Severity of disease and activation of peritoneal cells. *Eur. J. Surg.* **167**(6), 426-432

Shi, M., Deng, W., Bi, E., Mao, K., Ji, Y., Lin, G., Wu, X., Tao, Z., Li, Z., Cai, X., Sun, S., Xiang, C. and Sun, B. (2008). TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat. Immunol.* **9**(4), 369-377

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Malia, A.K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**(1), 76-85

Sparkes, R. S., Kronenberg, M., Heinzmann, C., Daher, K. A., Klisak, I., Ganz, T. and Mohandas, T. (1989). Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23. *Genomics* **5**(2), 240-244

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H. and Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-248

Tang, Y.-Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J. and Selstedt, M. E. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated  $\alpha$ -defensins. *Science* **286**(5439), 498-502

Taylor, K., Clarke, D. J., McCullough, B., Chin, W., Seo, E., Yang, D., Oppenheim, J., Uhrin, D., Govan, J. R. W., Campopiano, D. J., MacMillan, D., Barran, P. and Dorin, J. (2008). Analysis and separation of residues important for the chemoattractant and antimicrobial activities of  $\beta$ -defensin 3. *J. Biol. Chem.* **283**(11), 6631-6639

Territo, M. C., Ganz, T., Selstedt, M. E. and Lehrer, R. (1989). Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84**, 2017-2020

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (Ly294002). *J. Biol. Chem.* **269**(7), 5241-5248

Weinberg, A., Krisanaprakornkit, S. and Dale, B. A. (1998). Epithelial antimicrobial peptides: Review and significance for oral applications. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **9**(4), 399-414

Westerhoff, H. V., Juretic, D., Hendler, R. W. and Zasloff, M. (1989). Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6597-6601

Wilson, K. R., Napper, J. M., Denvir, J., Sollars, V. E. and Yu, H. D. (2007). Defect in early lung defense against *Pseudomonas aeruginosa* in DBA/2 mice is associated with acute lung injury and reduced bactericidal activity in naive macrophages. *Microbiology* **153**(4), 968-979

Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boulègue, C., Santamaria, F., Oppenheim, J. J., Lubkowski, J. and Lu, W. (2003). Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human  $\beta$ -defensin 3. *PNAS* **100**(15), 8880-8885

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M. and Oppenheim, J. J. (1999).  $\beta$ -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-527

---

Yang D., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Ming Wang, J., Wooters, J., Oppenheim, J. J. and Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL-1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes and T cells. *J. Exp. Med.* **192**(7), 1069-1074

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

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**(24), 389-395

## **8. Anhang**

**Manuskripte, die im Rahmen dieser Promotion entstanden sind:**

**Lymphotoxin  $\beta$  receptor activation on macrophages induces cross-tolerance to TLR4 and TLR9 ligands.** Wimmer, N., Huber, B., Barabas, N., Röhl, J., Pfeffer, K. and Hehl-gans, T. (2012) *J. Immunol.* 188(7), 3426-33

**Lymphotoxin-beta receptor activation on macrophages ameliorates acute DSS-induced intestinal inflammation in a TRIM30 $\alpha$ -dependent manner.** Wimmer, N., Hu-ber, B., Wege, A. K., Barabas, N., Röhl, J., Pfeffer, K. and Hehl-gans, T. (2012) *Mol. Im-munol.* 51(2), 128-35

**Beta-defensins activate macrophages and synergize in pro-inflammatory cytokine expression induced by TLR ligands.** Barabas, N., Röhl, J., Holler, E. and Hehl-gans, T. (Manuskript eingereicht)

**Vortrag:**

“Functional characterization of mouse  $\beta$ -defensin 14 (mBD14) in inflammation“, Biomed-ical Symposium for Graduate Students, 4.-5. Nov. 2011, Regen

**Poster:**

“Functional characterization of mouse  $\beta$ -defensin 14 (mBD14) in inflammation“, Summer School “From molecules to disease“, 12.-13. Nov. 2010, Regen

“The functional role of mouse  $\beta$ -defensin 14 (mBD14) in inflammation“, 2011 Joint annual meeting, Deutsche Gesellschaft für Immunologie, 29. Sept. 2011, Riccione, Italien

## **9. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mir bei dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Thomas Hehlhans, der mir dieses überaus interessante Thema zu Verfügung gestellt hat und mich in den letzten drei Jahren immer unterstützt und gefördert hat. Vielen Dank auch für das allzeit offene Ohr bei Problemen und Fragen sowie die vielen Vorschläge und Anregungen. Unsere gemeinsamen Besprechungen waren stets von konstruktiven Diskussionen begleitet.

Ein großer Dank gilt auch Frau Professorin Dr. Daniela Männel, für die konstruktive Kritik, wertvollen Ratschläge und die Diskussionsbereitschaft auch während der Seminare.

Herrn PD Dr. Wulf Schneider möchte ich besonders für die stets freundliche Kommunikation, für das großzügige Bereitstellen von Mitarbeitern und Ressourcen sowie für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Arbeit danken.

Ebenso möchte ich Dr. Bernd Echtenacher, Dr. Uwe Ritter, Dr. Anja Lechner und Dr. Sven Mostböck für die Bereitstellung ihres Wissens und die Unterstützung danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an unsere Arbeitsgruppe:

- Nadin Wimmer und Johann Röhr, für die bereitwillige Beantwortung aller Fragen, die tatkräftige Unterstützung im Labor sowie bei der kritischen Durchsicht dieses Manuskripts. Dank auch für das stets offene Ohr und die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Sabine Laberer, für die ständige Hilfsbereitschaft, die Unterstützung im Laboralltag und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Karin Holz, Doro Weber-Steffens und Anne Pietryger-Krieger danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und die Unterstützung im Labor.

Unserer Sekretärin Luise Kroher danke ich für die Unterstützung in allen organisatorischen Fragen.

Dank auch an Maria Kurz und die Arbeitsgruppe von PD Dr. Wulf Schneider für die vielen Transduktionen.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Benedikt, der mich während der gesamten Arbeit stets unterstützte, immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir den Rücken gestärkt hat.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Vater bedanken, der mich Zeit meines Lebens gefördert und unterstützt hat. Danke für den Rückhalt, das Interesse an meiner Arbeit und die konstruktive Durchsicht dieses Manuskripts.

