

**AUS DEM INSTITUT
FÜR IMMUNOLOGIE**

Lehrstuhlinhaberin: Frau Prof. Dr. Männel

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Rolle von hBD2 und hBD3 im
entzündlichen und malignen Kontext**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

vorgelegt von
Venelina Zlateva Yovcheva

2013

Dekan: **Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert**
1. Berichterstatter: **Prof. Dr. Thomas Hehlgans**
2. Berichterstatter: **PD Dr. Wulf Schneider**
Tag der mündlichen Prüfung: **03.07.2013**

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Antimikrobielle Peptide	5
1.2 Familie der Defensine	5
1.2.1 α-Defensine	7
1.2.2 β-Defensine	8
1.2.3 θ-Defensine	9
1.3 HBD2 und hBD3.....	10
1.3.1 Antimikrobielle Aktivität.....	10
1.3.2 Expression.....	13
1.3.3 Chemotaxis	14
1.3.4 Klinische Bedeutung von hBD2 und hBD3	15
1.4 Ziel der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien	20
2.1.2 Verbrauchsmaterial	21
2.1.3 Plasmide.....	22
2.1.4 Kits	22
2.1.5 Puffer und Lösungen	22
2.1.6 Geräte	23
2.1.7 Bakterienstämme	24
2.1.8 Eukaryontische Zelllinien.....	25
2.1.9 Software und Internet-Ressourcen.....	25
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.1 Luciferase Reporter-Gen-Assay	26
2.2.2 Herstellung von Bakterien-Lysaten	28
2.3 Zellbiologische Methoden	28
2.3.1 Zellkulturbedingungen	28
2.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	29
2.3.3 Mycoplasmentest	29
2.3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl	29
2.3.5 Transfektion.....	30
2.4 Immunologische Methoden	32
2.4.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	32
2.5 Humane Seren	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Analyse der hBD2- und hBD3-Konzentration in Humanseren.....	36
3.1.1 hBD2-Spiegel bei Patienten mit MRSA-Infektionen der Haut	36
3.1.2 hBD2- und hBD3-Konzentration im Serum von knochenmarktransplantierten Patienten	38

3.1.3 hBD2- und hBD3-Konzentrationen bei bronchopulmonalen Infekten	46
3.2 Regulation der Expression von hBD2 auf Promotorebene.....	49
3.2.1 Einfluss von mikrobiellen Bestandteilen auf den hBD2-Promotor.....	49
3.2.2 Einfluss von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien auf den hBD2-Promotor.....	52
4 Diskussion	57
4.1 Nachweis von hBD2 im Serum von MRSA-Patienten.....	57
4.2 Nachweis von hBD2 und hBD3 im Serum von knochenmarktransplantierten Patienten	58
4.3 Nachweis von hBD2 und hBD3 im Serum bei bronchopulmonalen Infekten 61	
4.4 Einfluss von proinflammatorischen Substanzen auf die Expression von hBD2 auf Promotorebene	63
4.5 Einfluss von verschiedenen Bakterien auf die Expression von hBD2 auf Promotorebene	66
4.5.1 Gram-negative Bakterien.....	66
4.5.2 Gram-positive Bakterien	68
5 Ausblick: mögliche therapeutische Bedeutung von antimikrobiellen Peptiden	70
6 Zusammenfassung.....	71
7 Danksagung.....	73
8 Abkürzungsverzeichnis	74
9 Literaturverzeichnis	76

1 Einleitung

1.1 Antimikrobielle Peptide

Die antimikrobiellen Peptide (AMP) stellen einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar [1, 2]. AMPs sind kationische Polypeptide mit einer Größe von unter 100 Aminosäuren, die antibakteriell, antifungiell und antiviral wirken. Außerdem beeinflussen sie Entzündungsprozesse, Wundheilung, Zytokinfreisetzung sowie Chemotaxis und Homöostase [3-5].

Vertreter der inzwischen über 800 bekannten AMPs lassen sich in sehr unterschiedlichen Organismen wie Pflanzen, Insekten, Vögeln, Säugetieren und beim Menschen nachweisen [5, 6]. Die Hauptklassen dieser Peptide beim Menschen sind Cathelicidine und Defensine [1, 7, 8].

1.2 Familie der Defensine

Defensine sind endogene, positiv geladene Peptide mit einer Molekulmasse von 3 bis 5 kDa [8, 9]. Sie sind durch einen charakteristischen Aufbau gekennzeichnet: Defensine besitzen sechs Cysteinreste, die untereinander drei intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Die Tertiärstruktur eines für alle Defensine typischen dreisträngigen antiparallelen β -Faltblattes wird durch diese Disulfidbrücken geformt und die räumliche Faltung der Moleküle stabilisiert [1, 10]. Die Position der sechs Cysteinreste in der Aminosäuresequenz der Peptide variiert innerhalb der Defensine. Auf Grund ihrer Größe und der Verknüpfung der Cysteinreste lassen sich Defensine in drei Hauptklassen einteilen - α - , β - und θ -Defensine [11-13]. α -Defensine zeigen folgende Anordnung der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten: Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys5, während für β -Defensine die Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys6 Reihenfolge charakteristisch ist [12, 14]. Abgesehen von dem unterschiedlichen Bindungsmuster der Disulfidbrücken weisen α -und β -Defensine sehr ähnliche Tertiärstrukturen auf [8].

Die θ -Defensine dagegen zeigen eine zyklische Struktur und unterscheiden sich dadurch strukturell von den α - und β -Defensinen [15, 16]. Die räumliche Struktur der humanen α -, β - und θ -Defensine zeigt Abbildung 1.

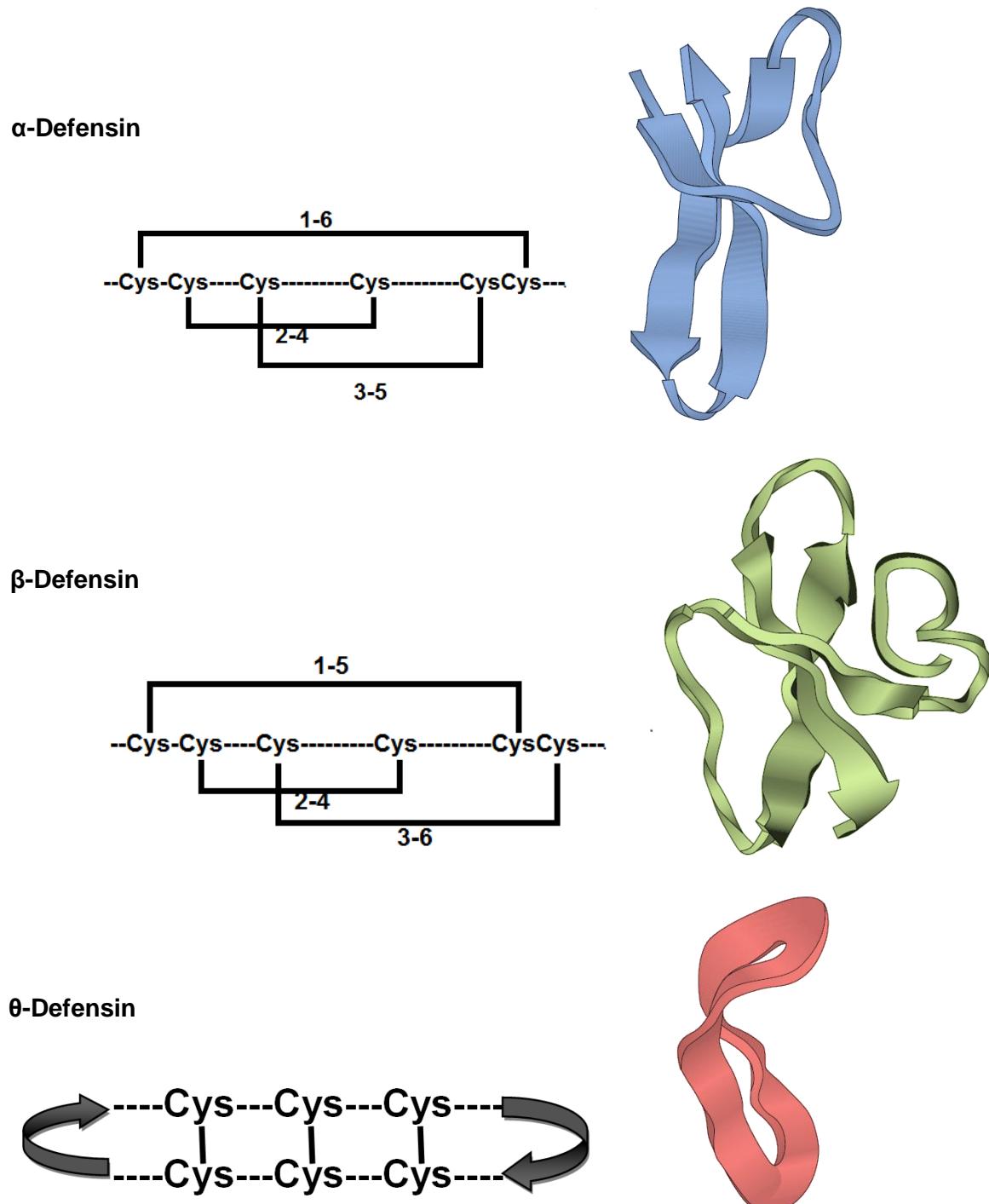


Abbildung 1: Räumliche Struktur von α - , β - und θ -Defensinen

Die Abbildung zeigt die räumliche Struktur der humanen α - , β - und θ -Defensine. Dabei ist auf der jeweils linken Seite die Anordnung der Cysteinreste und die daraus resultierende Verknüpfung der Disulfidbrücken gezeigt. Auf der rechten Seite ist die dreidimensionale Struktur des gesamten Moleküls schematisch abgebildet.

Modifiziert nach [1].

Die Defensin-Gene sind in Clustern im menschlichen Genom organisiert. Die Gene aller α - und θ -Defensine, sowie vieler β -Defensine (hBD1 bis hBD6) sind in einem Cluster auf dem Chromosom 8p23.1 angeordnet. Andere β -Defensin- Gene befinden sich in Clustern auf den Chromosomen 6p12, 20p13 und 20q11.1 [14, 17, 18].

Als wichtige Hauptklasse der AMPs zeigen Defensine antimikrobielle, antivirale, immunmodulatorische und toxin-neutralisierende Eigenschaften [8, 12]. Die Defensin-vermittelte antimikrobielle Aktivität beruht hauptsächlich auf der Permeabilisierung der Zellmembran von Zielzellen [19]. Defensine verfügen zum einen über hydrophobe und zum anderen über davon entfernte meist positiv geladene Regionen, welche das Eindringen von Defensin-Molekülen durch die mikrobielle Zellmembran ermöglichen. Sie interagieren mit den amphiphilen Phospholipiden (aus einer hydrophoben Schwanzgruppe und einer hydrophilen Kopfgruppe bestehend), die die Lipiddoppelschicht der Zellmembran aufbauen. Die Defensinmoleküle häufen sich dann über elektrostatische Anziehungskräfte an der Membranoberfläche an, was die Bildung von einem Peptid-Teppich („carpet-like“) und „channel like“ Membranporen zur Folge hat. Diese Permeabilisierung führt letztendlich zur Zerstörung der mikrobiellen Zellwand [1, 12, 20].

1.2.1 α -Defensine

Beim Menschen konnten bis jetzt sechs verschiedene α -Defensine nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um kurze Peptide mit einer Länge von 29 bis 35 Aminosäuren [21]. Die initiale Isolation von human α -Defensin 1 bis 4 erfolgte aus neutrophilen Granulozyten; diese Defensine werden deswegen auch als human neutrophil peptides (HNP) bezeichnet [22, 23]. Sie werden vornehmlich in Promyelozyten (Vorläuferzellen von Granulozyten) gebildet und in den azuropilen Granula der Neutrophilen gelagert [22]. Deswegen wird eine Neutropenie als Hauptgrund für einen HNP- Mangel angesehen [10]. Weitere HNP-Expressionsorte sind Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, B- und T-Zellen, sowie unreife dendritische Zellen [24, 25]. Die reifen HNPs sind etwa 3 kDa groß. Ihre Konzentration im Blut gesunder Probanden beträgt 50–100 ng/ml [24]. Am kleinsten

ist HNP2, das mit 29 Aminosäuren als das kleinste identifizierte human Defensin bezeichnet wird [26].

Die α -Defensine 5 und 6 werden als HD 5 (human α -defensin 5) und HD 6 (human α -defensin 6) bezeichnet. Sie kommen hauptsächlich in intestinalen Paneth Zellen des Darms vor. Außerdem findet man sie auch in den Epithelzellen des Urogenitaltrakts, im Gastrointestinaltrakt, sowie in der Placenta, dem Amnion und Chorion [27] [28]. Als inestinale α -Defensine dienen sie vor allem der Aufrechterhaltung der Mukosa Barriere [29, 30]. Nach einem Kontakt mit pathogenen Organismen werden HD5 und HD6 aus den Paneth Zellen in den intestinalen Krypten freigesetzt. Auch cholinerge Stimuli bewirken ihre Sekretion [31].

Alle humanen α -Defensine besitzen antibakterielle, antivirale und antiparasitäre Aktivitäten. Sie sind gegen zahlreiche pathogene Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus* (Gram positiv), *E. coli* (Gram negativ), *Enterobacter aerogenes* (Gram negativ) und *Mycobacterium tuberculosis* (Gram positiv) wirksam. [32, 33]. HNP1–3 hemmen die HIV-1 Replikation [34, 35], inhibieren Papillomaviren [36] und inaktivieren die bakteriellen Exotoxine *Bacillus anthracis* Lethal Faktor, *Corynebacterium diphthiae* Diphtheria Toxin und *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A [8, 37]. α -Defensine sind außerdem gegen die Parasiten *Toxoplasma gondii* [38] und *Trypanosoma cruzi* aktiv [39].

1.2.2 β -Defensine

β -Defensine sind phylogenetisch älter als die α -Defensine. Außerdem sind ihre Peptidketten etwas länger und basischer [26]. Das erste β -Defensin wurde 1991 aus trachealer Mukosa von Rindern isoliert. Dieses 38 Aminosäuren lange Peptid trägt den Namen TAP (tracheal antimicrobial peptide) [40].

Die bisher am besten erforschten humanen β -Defensine (hBDs) sind hBD1 bis hBD4 [5]. Das erste humane beta-Defensin, das hBD1, wurde erstmals 1995 aus Humanserum isoliert [41]. Human-beta-Defensin-2 wurde 1997 entdeckt, gefolgt von hBD3 und HBD4 im Jahre 2001 [42-44]. Zusätzlich konnten mit Hilfe von Genomanalysen 28 neue humane β -Defensine identifiziert und beschrieben werden [18]. HBD1 bis hBD3 werden hauptsächlich im Epithelgewebe exprimiert, hBD4 findet sich dagegen vornehmlich in den Testes und im Uterus [8, 44, 45].

Den humanen Defensinen hBD1 – hBD4 ist eine breite antimikrobielle Aktivität sowie die Eigenschaft der Chemotaxis gemeinsam [14, 44].

Das Wirkungsspektrum von hBD1 umfasst u.a. Bakterien wie *Escherichia coli* (Gram negativ), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativ), *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativ) und *Staphylococcus aureus* (Gram positiv) [46, 47]. Interessanterweise konnte für hBD4 die stärkste bakterizide Aktivität unter allen β -Defensinen gegen *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativ) festgestellt werden [44]. Auf die beiden Defensine hBD2 und hBD3, welche im Zentrum der Experimente dieser Arbeit stehen, wird unter Abschnitt 1.3 näher eingegangen.

1.2.3 θ -Defensine

θ -Defensine (*Rhesus macaque* defensins 1-3- RTDs), die dritte Subfamilie der Defensine, sind makrozyklische Peptide. Damit bilden sie das einzige Beispiel für zyklische Polypeptide, das man im gesamten tierischen Proteom kennt. Sie finden sich bei Affen wie Makaken oder Pavianen, konnten aber bei Schimpansen oder Gorillas, sowie beim Menschen nicht nachgewiesen werden [15, 16].

θ -Defensine leiten sich von zwei α -Defensin-Vorstufen ab und sind durch das frühzeitige Abspalten mittels eines Stopcodons zwischen den Cysteinresten vier und fünf entstanden [22]. Dabei trägt jedes α -Defensin-Derivat je 3 Zysteinreste für das reife θ -Defensin mit sich. θ -Defensine wurden erstmals aus Leukozyten des *Rhesus* Affen *Macacca mulatta* isoliert. Die makrozyklischen Peptide zeigen eine breite antimikrobielle Aktivität: beispielsweise ist RTD1 gegen verschiedene Bakterien wie *Staphylococcus aureus* (Gram positiv), *Listeria monocytogenes* (Gram Positiv), *Escherichia coli* (Gram-negativ) oder *Salmonella typhimurium* (Gram negativ) sowie Pilze (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) wirksam [15].

1.3 HBD2 und hBD3

Human β -Defensin 2 (hBD2) wurde erstmalig 1997 aus an Psoriasis erkrankter Haut isoliert und identifiziert. Das antimikrobiell aktive Peptid besteht aus 41 Aminosäuren und ist auf Grund des hohen Gehalts an den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin kationisch bei neutralem PH Wert [42, 48].

Auch hBD3 wurde initial aus Psoriasis Schuppen aufgereinigt [49]. Gleichzeitig konnte es zusätzlich mit Hilfe bioinformatischer Analysen identifiziert werden [50]. HBD3 ist ein kationisches Peptid aus 45 Aminosäuren mit einer asymmetrischen Anordnung der geladenen Aminosäurereste [18, 43, 49]. Es ist in der Lage, symmetrische, amphiphatische Dimere zu bilden und verfügt dadurch über eine größere positiv geladene Oberfläche als hBD2. Außerdem hat hBD3 sechs positiv geladene Aminosäuren mehr als hBD2, so dass die positive Ladung eine große Rolle für die hBD3-Aktivität zu spielen scheint [50].

1.3.1 Antimikrobielle Aktivität

HBD2 und hBD3 konnten inzwischen in vielen Zellen und Geweben nachgewiesen werden. HBD2 findet sich hauptsächlich im Epithelgewebe und wurde z.B in der Haut, im Respirations- und Gastrointestinaltrakt, sowie in der Cornea, Konjunktiva, in Astrozyten und in vielen anderen Geweben entdeckt [51-55]. HBD3 wurde sowohl in vielen Epithelien als auch in einigen nicht-epithelialen Geweben nachgewiesen, wie z.B. im Herzen, in der Plazenta, im Muskelgewebe und im Thymus [43, 50].

Die weite Verbreitung dieser beiden Defensine in mehreren Geweben und Organen verdeutlicht ihre wichtige Rolle für das angeborene Immunsystem. Als antimikrobielle Peptide erfüllen hBD2 und hBD3 eine wichtige Schutzfunktion bei der Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen - sie zeigen eine breite antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, Pilzen und Viren [43, 48, 56, 57].

hBD2 weist eine Wirksamkeit vornehmlich gegenüber Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *E. coli* auf [48]. Außerdem ist HBD2 gegen andere Bakterien wie *Acinetobacter baumanii* (Gram negativ), *Klebsiella pneumoniae* (Gram

negativ), *Staphylococcus aureus* (Gram positiv), *Streptococcus pneumoniae* (Gram positiv) und *Enterococcus faecalis* (Gram positiv) aktiv [51, 58, 59]. Zu dem Wirkspektrum von hBD3 gehören unter anderem multi-resistente Keime wie Vancomycin-restistentes *Enterococcus faecium* (VREF)(Gram positiv), multiresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Gram positiv), multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativ), *Stenotrophomonas maltophilia* (Gram negativ), und *Acinetobacter baumannii* (Gram negativ) [43, 49, 57]. Diese Keime gehören zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen und besitzen eine ausgeprägte Resistenz gegen Breitspektrum-Antibiotika, Methicillin- und Glykopeptiden, so dass die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung begrenzt sind.

HBD2 und hBD3 unterscheiden sich in ihrer Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien [14]. Während hBD3 eine Vielzahl von Gram-positiven Bakterien wie z.B. *E. faecium*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus pneumoniae* inhibiert, bewirkt hBD2 eine schwächere Hemmung Gram-positiver Bakterien [42, 43, 49, 60]. So ist HBD2 beispielweise nur bakteriostatisch gegen *S. aureus* [42] [61]. HBD3 zeigt im Vergleich eine vier- bis achtfach stärkere Wirkung gegen den gleichen Gram-positiven Keim [62].

Ein weiterer Unterschied zwischen hBD2 und hBD3 ist in ihrer Salzsensitivität zu finden [14]. Die Wirkung von hBD2 ist stark von der Salz (Natriumchlorid) Konzentration der Umgebung abhängig; das heißt, dass die antimikrobielle Aktivität von hBD2 mit steigenden Salzkonzentrationen gehemmt wird [47, 48, 51]. Diese Feststellung unterstützt die Hypothese, dass die durch hohe Natriumchloridkonzentrationen herabgesetzte hBD2-Aktivität zur Beeinträchtigung der Mukosaabwehr führt und somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie z.B. Cystischer Fibrose spielt [51] [48]. Im Gegensatz zu hBD2 und anderen β -Defensinen, bleibt die antibakterielle Aktivität von hBD3 durch hohe Mediensalzkonzentrationen unbeeinflusst, so dass hBD3 als nicht Salz-sensitiv gilt [49].

HBD2 und hBD3 zeichnen sich auch durch ihre antivirale Aktivität aus. hBD2 und hBD3 zeigen eine dosisabhängige Hemmung von HIV-Replikation in Oralepithelien, ohne auf die humanen Zellen toxisch zu wirken [63-65]. Die beiden antimikrobiellen Peptide besitzen auch eine vergleichbare antifungale Aktivität; beide Defensine sind gegen *Candida* Spezies aktiv und hemmen *Candida albicans*, *Candida krusei* und

Candida parapsilosis [66] [67]. Eine Übersicht der antimikrobiellen Aktivität von hBD2 und hBD3 bietet Tabelle 1.

Defensin	Expressions-ort	Referenzen	Aktivität	Referenzen
hBD2	Haut, Respirations- trakt, Gastrointestina l-takt, Cornea, Konjunktiva, Astrozyten	[51-55].	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , HIV, <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i>	[48], [51, 58, 59], [63, 64] [66] [67]
hBD3	Epithelien, Herz, Plazenta, Muskelgewebe , Thymus	[43, 50].	VREF, MRSA, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , HIV, <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i>	[49], [43], [57] [60], [42], [63, 64], [66] [67]

Tabelle 1: Expressionsorte und antimikrobielle Aktivität von hBD2 und hBD3

Die Tabelle bietet einen Vergleich der Expressionsorte und der antimikrobielle Aktivität von hBD2 und hBD3. Weiterhin sind die entsprechenden Literaturstellen angegeben.

VREF = Vancomycin-restistentes *Enterococcus faecium*

MRSA = multiresistente *Staphylococcus aureus*

1.3.2 Expression

Beta-Defensine weisen verschiedene Expressionsmuster auf. Im Gegensatz zu hBD1, welches konstitutiv exprimiert wird, wird die hBD2- und hBD3-Expression als Antwort auf eine Stimulation mit proinflammatorischen Substanzen induziert [23, 42, 49]. Die Expression von hBD2 und hBD3 wird auf Transkriptionsebene reguliert [50, 68, 69]. So hat der hBD2-Promotor Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie NF-κB (Nuclear Factor „Kappa-Light-Chain-Enhancer“), NF-IL-6 (Nuclear Factor Interleukin-6), STAT (Signal Transducer And Activator Of Transcription), und AP-1 (Aktivator Protein-1) [68, 70]. Der hBD3-Promotor enthält keine NF-κB- Bindungsstelle, kann aber AP-1, NF-IL-6 und STAT binden [50, 68]. Eine Induktion der hBD2- und hBD3-Expression konnte bislang in den Epithelien der Atemwege, des Magens, in den Dendritischen Zellen und Keratinozyten, sowie im peripheren Blut festgestellt werden [47, 70-72].

Die Genexpression von hBD2 und hBD3 lässt sich von mehreren proinflammatorischen Stimuli induzieren [43, 49, 50, 73]. So induzieren LPS und IFN-γ die hBD2-Expression in Monozyten und Alveolarmakrophagen [74]. Im peripheren Blut erfolgt die hBD2-Induktion nach Stimulation mit LPS und hitzeinaktiviertem *Pseudomonas aeruginosa* [70]. Ein weiteres Beispiel ist der stimulierende Effekt von IL-1β und TNF-α auf die hBD2-Expression in Pulmonalzellen, sowie von *H. pylori* und IL-1 in den Epithelzellen der Magenschleimhaut [68, 72].

Weiterhin wird die Induktion der hBD2-Expression in vielen Geweben durch TLRs (Toll-like Receptors) vermittelt. Diese Rezeptoren sind wichtige Immunmediatoren und sind an die Erkennung von PAMP (pathogenassociated molecular patterns) beteiligt. So erfolgt die Induktion der hBD2-Expression in den Epithelzellen der Luftwege über eine Aktivierung von TLR2 mit bakteriellen Lipopeptiden oder von TLR9 mit bakterieller DNS und synthetischen CpG Oligonukleotiden [75-77]. Weiterhin induzieren TLR2 und TLR4 nach einer Stimulation mit Peptidoglykan und LPS die hBD2-Expression in der Darmschleimhaut und der TLR3-Agonist poly I:C bewirkt eine Steigerung der Expression von hBD2 in uterinen Epithelzellen [78, 79].

Die Genexpression von hBD3 lässt sich in ähnlicher Weise induzieren und erfolgt in Keratinozyten und im Respirationstrakt nach Stimulation mit TNF-α, IL-1β sowie nach dem Kontakt mit vielen Bakterien und Pilzen [43, 49, 50]. Außerdem bewirkt INF-γ eine Hochregulation der hBD3-Expression, was durch das Vorhandensein von einer

Bindungsstelle für signal transducer and activator of transcription (STAT) erklärbar ist [43, 80, 81]. Im Unterschied zu hBD2 führen auch Insulin-like growth Factor-1 (IGF-1), Epithelial growth factor-1 (EGF-1) und Transforming growth factor alpha (TGF- α) zu einer hBD3-Expression in Keratinozyten. Diese Substanzen gelten als die wichtigsten Wachstumsfaktoren, die gegen Wundinfektionen präventiv sind und die Wundheilung fördern. Bei der Induktion von antimikrobiellen Peptiden wirken sie sowohl individuell, als auch synergistisch [23, 82].

1.3.3 Chemotaxis

Auf Grund ihrer vielfältigen antimikrobiellen Aktivität und der Eigenschaft, Immunzellen zu aktivieren, sind hBD2 und hBD3 ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Neben diesen Wirkungen verfügen sie auch über chemotaktische Eigenschaften und rekrutieren so wichtige Immunzellen an den Ort der Entzündung. Durch diese Funktion als Lockstoffe vernetzen die Defensine das angeborene Immunsystem mit der adaptiven humoralen und zellulären Immunabwehr. Interessanterweise werden die chemotaktischen Eigenschaften der β -Defensine im Gegensatz zu ihrer antimikrobieller Wirkung durch physiologische Salzkonzentrationen nicht beeinflusst [14, 83].

hBD2 und hBD3 vermitteln ihre chemotaktische Wirkung auf unreife dendritische Zellen und T-Gedächtniszellen über den CC chemokine receptor CCR6 [83, 84], ein Chemokin-Rezeptor aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Chemokin-Rezeptoren werden durch die Bindung an ihren Liganden aktiviert. Der Chemokin-Ligand des CCR6 ist der sog. Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20), der auch als macrophage inflammatory protein-3a (MIP-3a) bezeichnet wird [85, 86]. CCL20 ist ein kleines Zytokin, welches im Thymus und in entzündeten Epithelien des Intestinums und der Haut exprimiert wird und Langerhans Zellen und Lymphozyten rekrutieren kann [85, 87, 88]. CCL20 und hBD2 zeigen strukturelle Ähnlichkeiten wie z.B. die Ausbildung von Disulfidbrücken und das Vorhandensein von einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt, einer α -Helix, sowie mehreren kationischen Resten, was eine mögliche Erklärung für die vergleichbare chemotaktische und antimikrobielle Aktivität beider Peptide darstellt [86, 88]. Die Arbeitsgruppe von Pernet et al. geht sogar von einer Koexpression beider Peptide in vivo, sowie von

einer Konkurrenz um den CCR 6 aus [85]. Bei hBD3 scheint die exakte Verknüpfung der Disulfidbrücken von entscheidender Bedeutung für das Binden an den Chemokin Rezeptor CCR6 und dessen Aktivieren zu sein. So unterbleibt die Aktivierung des Rezeptors wenn hBD3 fehlerhafte Disulfidbrückenbildungen aufweist [89].

1.3.4 Klinische Bedeutung von hBD2 und hBD3

Einige Krankheitsbilder werden mit veränderten hBD2- und hBD3-Konzentrationen in Verbindung gebracht. Eine Assoziation der beiden Defensine konnte unter anderem mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Haut- und Lungenkrankheiten festgestellt werden. Außerdem inhibieren hBD2 und hBD3 die HIV-Replikation in Oralepithelien. Auf die einzelnen Erkrankungen wird im Folgenden näher eingegangen [7, 63, 90, 91].

1.3.4.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Eine im Vergleich zu gesunden Probanden veränderte hBD2- und hBD3-Expression findet sich bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Colitis ulcerosa und M. Crohn [92-94]. Beide Erkrankungen gehen mit einer Entzündung des Darms einher; bei Colitis ulcerosa verläuft diese kontinuierlich und betrifft die lumennahen Schleimhautschichten; bei Morbus Crohn ist die Entzündung segmental, diskontinuierlich und kann alle Wandschichten umfassen. Die definitive Ätiologie der CED ist bisher unklar: es werden sowohl eine genetische Prädisposition, als auch Umweltfaktoren diskutiert [90, 93]. Auch der genaue Zusammenhang zwischen CED und Defensinen bleibt ungeklärt – es konnte aber in einigen Studien gezeigt werden, dass Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa erhöhte Spiegel sowohl von hBD2 als auch von hBD3 zeigen [92, 95, 96]. Andererseits finden sich bei Colitis ulcerosa ohne Entzündungszeichen Kontrollgruppen-ähnliche hBD2-Werte, so dass hier nur von einer Induktion des Defensins im Rahmen der entzündlichen Reaktion ausgegangen wird und die hBD2-Rolle für die Pathogenese der ulzerativen Colitis in Frage gestellt wird [90, 97]. Bei M. Crohn ist die antimikrobielle Aktivität gegen pathogene Keime im Vergleich zu Colitis ulcerosa reduziert [98]. Es konnte festgestellt werden, dass bei

M.Crohn die Induktion von hBD2 und hBD3 im Gegensatz zu Colitis ulcerosa herabgesetzt ist [92, 94]. Eine mögliche Erklärung für die verminderten hBD2-Spiegel sind Veränderungen in der intrazellulären Transkription von hBD2 infolge Mutationen in NF- κ B und NOD2 [93, 99]. Außerdem wird M. Crohn mit einer verminderten hBD2-DNA Kopiezahlf auf Chromosom 8 in Verbindung gebracht. Dabei ist die Bildung von hBD2 auf Grund weniger Gen Kopienzahlen herabgesetzt [100]. Die Arbeitsgruppe von Wehkamp et al. konnte bei Patienten mit M. Crohn eine mittlere hBD2 Genkopiezahlf von 3 Kopien pro Genom feststellen, während die Kopien pro diploidem Genom bei gesunden Probanden und Patienten mit Colitis ulcerosa im Schnitt bei 4 (2 bis 10) lagen. Es wird davon ausgegangen, dass die niedrigen Kopienzahlen der hBD2 Gene im Gencluster auf Chromosom 8p23.1 durch die verminderte Defensinbildung für die Entwicklung von M. Crohn des Colons prädisponierend wirkt. Da sich die Gene für hBD3 auf demselben Genlokus befinden, könnte der gleiche Mechanismus für das veränderte Expressionsmuster von hBD3 in Betracht gezogen werden [101].

Der Defensinmangel im Darm führt zu einer verminderten antibakteriellen Aktivität und einer Dysfunktion der epithelialen Barriere [93, 101]. Diese Feststellung unterstützt die Hypothese, dass der Pathogenese von M.Crohn eine bakterielle Infektion zu Grunde liegt, die zu einer Entzündung der Darmmukosa führt und sich dann als intestinale Entzündung fortsetzt [101] [7].

1.3.4.2 Hauterkrankungen

hBD2 und hBD3 spielen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Hautbarriere gegen pathogenen Mikroorganismen und die Prävention kutaner Infektionen [14, 42, 48, 49, 102]. Die Rolle von hBD2 und hBD3 in der Pathogenese von Hauterkrankungen konnte bisher hauptsächlich bei Psoriasis und atopischer Dermatitis geklärt werden [103, 104]. Psoriasis Patienten zeigen höhere hBD2-Konzentrationen im Blut als gesunde Probanden [103, 105]. Wie bei M. Crohn (siehe Abschnitt 1.3.3.1) werden auch hier die variierenden Kopienzahlen von β -Defensin-Genen auf Chromosom 8 als eine mögliche Ursache für die Entstehung der Erkrankung angesehen. So konnte gezeigt werden, dass eine lineare Abhängigkeit

zwischen den steigenden Defensin-Kopiezahlen und dem Risiko, an Psoriasis zu erkranken, besteht [106, 107].

Im Gegensatz zu Psoriasis Patienten oder Kontrollpersonen finden sich bei Atopischer Dermatitis sowohl in der akuten Phase, als auch bei chronischen Hautekzemen deutlich reduzierte hBD2- und hBD3-Spiegel [8, 80, 103, 108]. In atopisch veränderter Haut sind die Zytokine IL-4, IL-10, und IL-13 überexprimiert [108-110]. Diese Substanzen haben einen hemmenden Effekt auf die Genexpression von hBD2 und hBD3 [80, 102, 103]. Andererseits ist bei atopischer Dermatitis die Expression der AMP-induzierenden Zytokine IL-1, IL-17 und IL-22 reduziert [111]. Das Vorhandensein von den AMP-inhibierenden und der Mangel an den AMP-induzierenden Zytokinen in den atopischen Hautarealen könnte die niedrigen hBD2 und hBD3 -Konzentrationen (im Vergleich zu Psoriasis-Läsionen) erklären [108, 112].

Bei Atopischer Dermatitis besteht eine Neigung zu bakteriellen, viralen und Pilz-Infektionen der betroffenen Hautpartien [113]. Hautinfektionen mit *Staphylococcus aureus* sind häufig und zeigen sich bei 90% der Patienten mit Atopie [114, 115]. Im Vergleich dazu ist die gesunde Haut dagegen nur selten mit dem pathologischen Keim kolonisiert [116, 117]. Eine Besiedlung der Haut mit pathologischen Keimen im Allgemeinen zeigen insgesamt ca.30 % der Patienten mit atopischer Dermatitis und nur 7% der Patienten mit Psoriasis [118]. Folglich könnte der Defensinmangel bei atopischer Dermatitis die Infektfälligkeit mit *Staphylococcus aureus* begünstigen, bzw. werden die erhöhten hBD2-Spiegel bei Psoriasis als mögliche Erklärung für die nur selten auftretenden Hautinfektionen angesehen [103, 104, 119].

1.3.4.3 Lungenerkrankungen

Verändert zeigen sich die Defensin-Konzentrationen auch bei vielen Erkrankungen der Lunge und des Respirationssystems. Erhöhte Defensinspiegel finden sich z.B bei idiopathischer pulmonalen Fibrose, ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), Panbronchiolitis, Alveolarproteinose und Lungentransplantation. Die genaue Rolle der Defensine ist nicht ganz verstanden, jedoch wird eine Modulation der entzündlichen Reaktion vermutet [120, 121]. hBD2 im Speziellen ist bei diffuser Panbronchiolitis, Bronchiolitis obliterans, bakterieller Pneumonie, TB und Sepsis

erhöht. Dabei korreliert die hBD2- Konzentration mit dem Entzündungsgrad bei der jeweiligen Erkrankung [122-124] [125-127].

hBD2 ist an den Abwehrprozessen der Lunge beteiligt. Das antimikrobielle Peptid hat beispielsweise eine anitvirale Wirkung gegen Influenza A Virus in der Mukosa der Atemwege [128]. Außerdem lässt sich die hBD-2 Expression nach einer Infektion mit pathogenen Erregern, die eine Präferenz für die Lunge aufweisen wie *M. tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Aspergillus fumigatus* induzieren [58, 129, 130].

Als Salz-sensitives Defensin spielt hBD2 eine Rolle in der Pathogenese der zystischen Fibrose (CF). Cystische Fibrose, oder auch Mukoviszidose genannt, ist die häufigste autosomal-rezessive Erkrankung in Mitteleuropa. Die Pathogenese beruht auf einer Mutation des CFTR-Gens (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene). Folge ist eine erhöhte NaCl-Sekretion der exokrinen Drüsen bzw. die Produktion von wasserarmen und hochviskosen Sekreten. Dadurch kommt es unter anderem zu einer Dehydratation des Bronchalsekrets, hohe Sputumviskosität, Atemwegsobstruktion, reduzierte mukoziliäre Clearance, sowie zu rezidivierenden Lungeninfektionen und einer chronischen Keimbesiedlung der Lunge.

Die initial normale Lungenfunktion bei Patienten mit CF verschlechtert sich dauerhaft in Folge von rezidivierenden respiratorischen Infektionen bakterieller oder viraler Genese. Eine zentrale Bedeutung für die Pathogenese der CF haben die chronischen Lungeninfektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cenocepacia* [91]. Es konnte gezeigt werden, dass die bronchoalveoläre Spülflüssigkeit von Patienten mit CF nur eine reduzierte antibakterielle Aktivität aufweist. Hohe Salzkonzentrationen (NaCl) in der Mukosa der Luftwege inaktivieren die Salz-sensitiven β -Defensine, darunter hBD2 [46, 131]. Diese Salz-Inaktivierung von hBD2 könnte die rezidivierenden bakteriellen Lungeninfektionen bei CF Patienten erklären [51].

1.3.4.4 HIV in Oralepithelien

β -Defensine sind weit verbreitet in den Oralepithelien [52, 132] und finden sich im Gegensatz zu anderen Geweben, wo hBD2 und hBD3 erst nach einer Entzündung

oder nach einer Stimulation mit proinflamatorischen Substanzen induzierbar sind, auch in der gesunden, nicht-entzündeten Mundschleimhaut [65].

In Oralepithelien sind hBD2 und hBD3 in der Lage, die HIV-Replikation zu hemmen [63-65]. Der genaue Wirkungsmechanismus der hBD2 und hBD3-vermittelten antiviralen Aktivität gegen HIV ist noch unklar [5]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass HIV-1 (genauer gesagt Phänotypen X4 und X5) die Expression von hBD2 und hBD3 in den Oralepithelien induzieren [63, 65]. In einer Studie konnte bewiesen werden, dass die antivirale Wirkung von hBD2 und hBD3 gegen HIV zum einen auf der direkten Wechselwirkung zwischen Defensin und Virion und zum anderen auf der Modulation von dem HIV-1- Corezeptor CXCR4 beruht [63]. In einer anderen Studie wurde die Inaktivierung von HIV durch hBD2 auch in 2 Schritten beschrieben. Auch hier konnte eine direkte Hemmung des Virions durch das Defensin festgestellt werden; eine Downregulation der HIV-Rezeptoren wurde aber ausgeschlossen. Stattdessen wurde eine intrazelluläre, Post-Entry-Inhibition der HIV-Replikation angenommen [64].

1.4 Ziel der Arbeit

Defensine sind antimikrobielle Peptide, die eine wichtige Schutzfunktion bei der Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen erfüllen. Sie zeigen eine breite antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, Pilzen und Viren und sind außerdem durch die Eigenschaft der Chemotaxis gekennzeichnet. Darüber hinaus werden mehrere Krankheitsbilder mit veränderten Defensin-Konzentrationen assoziiert.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die humanen Defensine hBD2 und hBD3. Zunächst sollte neben der Etablierung von Enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) für hBD2 und hBD3 überprüft werden, in welcher Konzentration die beiden Defensine im Serum von Patienten mit verschiedenen klinisch relevanten Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden vorliegen.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass hBD2 eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Haut- und Schleimhautbarriere spielt. Diesbezüglich sollte analysiert werden, ob sich die hBD2-Serumkonzentration bei einer vorliegenden

MRSA-Infektion der Haut verändert. Weiterhin sollten die hBD2- und hBD3-Konzentrationen im Serum einer 42-jährigen Patientin, die an rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten leidet, bestimmt werden.

Um die Bedeutung der beiden humanen β -Defensine im malignen Kontext zu untersuchen, sollten die hBD2- und hBD3-Konzentrationen im Humanserum von Patienten mit verschiedenen bösartigen hämatologischen Erkrankungen und Zustand nach Knochenmarktransplantation bestimmt werden. Als zusätzlicher Faktor bei der Bestimmung der hBD2- und hBD3-Spiegel sollte die Entwicklung einer Graft-versus-Host-Reaktion untersucht werden.

Die Expression von hBD2 und hBD3 wird auf Transkriptionsebene reguliert. In diesem Zusammenhang sollte mit Hilfe eines Luciferase Reporteren-Assays die Auswirkung verschiedener proinflammatorischer Substanzen auf die Aktivierung des hBD2-Promotors näher untersucht werden. Außerdem sollte überprüft werden, in wie weit Lysate verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien in der Lage sind, den hBD2-Promotor zu aktivieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach
NOWA Solution A und B	MoBiTec, Göttingen
Rinderserum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

LPS (<i>Salmonella enterica</i> Serotyp abortus equi)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver Frema Reform	Granovita, Lüneburg
Muramyldipeptid (MDP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paneticin G 420	PAN Biotech, Aidenbach

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Eppendorfcups (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen BD Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg
Immersionsöl Immersol 518 F	Zeiss, Oberkochen
Kryoröhrchen Cryo Tubes™	Nunc, Langenselbold
Kulturschalen	Greiner BIO-ONE, Frickenhausen
Mikrotiterplatten MicroWell™ (96-Well)	Nunc, Langenselbold
Multiwell-Platten (6, 12, 24, 48 und 96-Well)	BD Biosciences, Heidelberg
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (15 und 50 ml)	Greiner BIO-ONE, Frickenhausen
Sterile Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
sterile Spitzen	BD Biosciences, Heidelberg
UV-Küvette micro, Plastibrand®	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen BD Falcon™ (25 und 75 cm ²)	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.3 Plasmide

pGL2-NFkB, Firefly-Luciferase-Reporter-Vektor Mitchell et al., 1995

2.1.4 Kits

Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
ELISA BD-2 ELISA Development Kit	Pepro Tech, New Jersey, USA
ELISA BD-3 ELISA Development Kit	Pepro Tech, New Jersey, USA
Mycoplasma Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.5 Puffer und Lösungen

Abstopplösung für ELISA	2 N H ₂ SO ₄ 1% bovine Serumalbumin-Lösung (BSA) in PBS
Einfriermedium für Zellen	20 % DMSO 80 % FKS
HBS-Puffer	20 mM HEPES 150 mM NaCl
Lysepuffer für Bakterien	10 mg/ml Lysozym 50 mM TRIS 1 mM EDTA
MT-Puffer, PH 7, 0	30 mM HEPES 15 mM KCl 5 mM EGTA

PBS	137 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
Reaktionspuffer für ELISA	0,05% Tween-20, 0,1% BSA in PBS
Substrat-Lösung für ELISA	4.5ml Aqua dest. 4.5ml Citrat-P - Puffer 1 Tablette Tetramethylbenzidine (TMB) 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO) 30 µl 1M H ₂ O ₂
Trypanblau-Lösung	0,16 % (w/v) Trypan-Blau 150 mM NaCl pH 7,4
Waschpuffer für ELISA	0,05% Tween-20 in PBS

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde ausschließlich zweifach entsalztes Wasser aus der Millipore-Anlage MilliQ® (Millipore, Schwalbach) verwendet.

Der Block-Puffer und der Reaktionspuffer wurden steril filtriert und bis zu einer Woche bei 4°C aufbewahrt (nach Angaben des Herstellers).

2.1.6 Geräte

Analysenwaage CP 224S	Sartorius, Göttingen
Emax Microplate Reader	Molecular Devices, München
Inkubatoren	Heraeus, Hanau

Kreisschüttler GFL-3015	Omnilab, Mettmenstetten
Luminometer Fusion™	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Luminometer Glomax®	Promega, Mannheim
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipettensatz (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Accu-Jet® Pro	Brand, Wertheim
Sterilbank HERAsafe® KS	Thermo Scientific, Karlsruhe
Stickstofftank	German Cryo, Jüchen
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin, Mörfelden-Walldorf
Vortex MS2 Minishaker	IKA®, Staufen
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.1.7 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Gram-Färbung	Nummer
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positiv	ATCC 6633
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativ	ATCC 25922

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-negativ	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positiv	ATCC 43300
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram-positiv	ATCC 29212
<i>Neisseria lactamica</i>	Gram-negativ	DSM 4691

2.1.8 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kultur
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie, adhären	RPMI 1640, 10 % FKS

2.1.9 Software und Internet-Ressourcen

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2007 angefertigt. Die Erstellung der Graphen und Diagramme erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007 oder mit GraphPad Prism Version 5.0. Das Literaturverzeichnis wurde mit Hilfe des Programms Endnote X erstellt. Weiterhin fanden folgende Internet-Ressourcen Verwendung:

Entrez Pubmed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Luciferase Reporter-Gen-Assay

Der Luciferase Reporterassay gibt Aufschluss über die Promotoraktivität der zu untersuchenden Gene.

Um die Funktionsweise eines Promotors bei Interaktion mit unterschiedlichen Stimulationsfaktoren und unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zu überprüfen, ist es sinnvoll, die Promotoreigenschaften eines Gens direkt in Säugerzellen zu untersuchen. Dazu muss der Promotor in einen Reportervektor eingebracht werden. Dieser Vektor wird dann in die entsprechende Zelle transfiziert und die Promotoraktivität mithilfe geeigneter Nachweis-Systeme bestimmt.

Zunächst kloniert man den zu untersuchenden Promotorbereich vor die kodierende Sequenz eines sog. Reportergens, dessen Promotor fehlt. Als Reportergene verwendet man Gene, deren Genprodukte biochemisch einfach nachweisbar sind. Die Expressionsstärke des Reportergenprodukts wird so durch den zu untersuchenden Promotor reguliert, d.h. dass die Quantifizierung des Reporterproteins Informationen über die Transkriptionsaktivität des Promotors liefert. Beim Luciferasesystem wird ein biolumineszierendes Protein, die Luciferase als Reporter eingesetzt. Der Nachweis der Luciferase-Aktivität erfolgt mit Hilfe eines enzymatischen Tests. Der verwendete hBD2 Promotor entspricht 1,7 kb der 5' untranslatierten Region des hBD2 Gens.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Reportergen die Firefly-Luciferase verwendet. Firefly-Luciferase setzt Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} in Oxyluciferin und CO_2 um. Das dabei emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm kann in einem Luminometer gemessen werden. Diese Lichtemission ist zur Menge an Luciferase im Zellsatz proportional. Die enzymatische Aktivität der Luciferase wird in relativen Lichteinheiten ($rlu \times s^{-1}$) ausgedrückt. In den entsprechenden Experimenten wurde mit Hilfe des Luciferase Assays die Aktivität des hBD-2 Promotors (pGL2-NFkB, Firefly-Luciferase-Reporter-Vektor) in humanen HEK-293 Zellen untersucht.

Zur Bestimmung der Reporteraktivität wurde das Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die

Zellkultivierung der HEK-293 Zellen erfolgte unter Standardzellkulturbedingungen (siehe 2.3.1). Es wurden die unter 2.3.5 beschriebenen Transfektionsmethoden durchgeführt und deren Effektivität mittels entsprechender Luciferase Assays überprüft. Die Transfektion mittels DOTAP LiposomalTransfection Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde im Weiteren bevorzugt und bei allen LuciferaseAssays angewandt. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde Paneticin (G 420) in einer Konzentration von 200 µg/ml zum Medium zugegeben.

Zunächst wurden die stabil transfizierten HEK-293 Zellen in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 50 µl pro Well ausgesät. Nach einer zuvor erfolgten genauen Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer (siehe 2.3.4) entsprachen diese 25 000 Zellen pro Well. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die transfizierten HEK-293 Zellen mit Peptidoglykan (PG), Lipopolysaccharid (LPS), Muramyldipeptid (MDP), Pam3Cys und Zymosan (siehe Tabelle 4) stimuliert.

In einem weiteren Versuch wurden die angewachsenen stabil transfizierten HEK-293 Zellen für weitere 24 Stunden mit Lysaten von sechs unterschiedlichen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienstämmen inkubiert. Folgende Bakterien kamen dabei zum Einsatz: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Neisseria lactamica* (DSM 4691), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) (siehe 2.1.7).

Alle Proben wurden in Triplikate ausgesät, zur Kontrolle wurden transfizierte HEK-293 Zellen unbehandelt belassen.

Nach 24 Stunden wurde mittels Luziferase Reporteren-Assays überprüft, welche dieser Stimuli einen Einfluss auf die Induktion der *hBD2*-Promotoraktivität ausüben.

Die Luciferaseaktivität wurde mit Hilfe des Luminometers Glomax™ (Promega, Mannheim) gemessen.

2.2.2 Herrstellung von Bakterien-Lysaten

Zunächst wurde 1 ml der Bakteriensuspension (Bakterienstämme wie unter 2.1.7 beschrieben) bei 6000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde dann in 1ml Lysepuffer (siehe 2.1.5) resuspendiert und danach 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 Minuten im Ultraschalbad Sonorex RK100H (Bandelin, Mörfelden-Walldorf) behandelt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in der Sterilbank HERAsafe®KS (Thermo Scientific, Langenselbold) mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten, Reagenzien und Kulturgefäßen (Zellkulturflaschen oder Gewebekulturschalen) durchgeführt.

Es wurden adhärente humane embryonale Nierenzellen der Reihe HEK-293 verwendet. Sie wurden in RPMI 1640 Medium mit Zusätzen von 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin im Begasungsbrutschrank Cell Safe (Integra Biosciences, Fernwald) bei 37°C, 5 % CO2-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die HEK-293 Zellen wurden zwei- bis dreimal pro Woche im Verhältnis 1:10 in frisches Kulturmedium gesplittet. Zum Splitten der HEK-293 Zellen wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt. Die Zellen konnten dann mit 5ml PBS gewaschen werden. Durch vorsichtiges Schwenken der Kulturflasche und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von PBS wurden die adhärenten Zellen vom Flaschenboden abgelöst. 1ml der entstanden Zellsuspension wurde dann in eine neue 75cm² Kulturflasche überführt. Je nach Verwendungszweck wurden die HEK-293 Zellen auch in Multiwell-Platten ausgesät.

2.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die HEK-293 Zellen kryokonserviert. Zunächst wurden die HEK-293 Zellen wie unter 2.3.1 beschrieben vom Flaschenboden abgelöst. Die suspendierten Zellen wurden dann für fünf Minuten mit 300g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml Kulturmedium resuspendiert. Je 500 µl der Zellsuspension wurden mit 500 µl zuvor auf Eis vorbereitetem Kryomedium (80% FCS, 20% DMSO) vermischt und in Kryotubes bei -80 °C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196° C eingefroren.

Die kryokonservierten Hek-293 Zellen wurden zuerst im Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um DMSO zu entfernen, wurde der Inhalt, zusammen mit 10ml Kulturmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und sieben Minuten lang bei 300rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 10ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm²-Kulturflasche überführt.

2.3.3 Mycoplasmentest

Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Zeitabständen auf Bakterienbefall mit Mycoplasmen untersucht. Hierfür wurde der Mycoplasma Detection Kit (Roche Diagnostics) verwendet.

2.3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zahl der lebenden HEK-293 Zellen konnte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Gießen) bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mit dem Farbstoff Trypanblau im Verhältnis von 1:10 vermischt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der den selektiven Lebend-tot-Nachweis von Zellen im Mikroskop ermöglicht. Er wird von abgestorbenen Zellen aufgenommen und lässt sie tiefblau erscheinen. Da Trypanblau nur die Zellmembranen avitaler Zellen passieren

kann, bleiben lebende Zellen ungefärbt. (Sabine Schmitz, Der Experimentator Zellkultur, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2011)

Für eine genaue Zellzahlbestimmung lebender HEK-293 Zellen wurden 10 μ l des Zellen-Tryptanblau-Gemisches auf die Neubauer- Zählkammer aufgetragen. Die vitalen Zellen wurden dann im Mikroskop in vier großen Quadranten mit jeweils 16 kleinen Feldern ausgezählt. Ihre Zellzahl konnte anhand folgender Formel errechnet werden:

Zellzahl/ml = Mittelwert der ausgezählten Zellen pro Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴

2.3.5 Transfektion

Im Rahmen dieser Arbeit war es erforderlich, Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Dafür wurden drei unterschiedliche Transfektionsmethoden verwendet welche im Folgenden beschrieben werden.

2.3.5.1 DOTAP Liposomal Transfection Reagent

DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate) ist ein liposomales Transfektionsreagenz, das die Aufnahme von negativ geladenen Biomolekülen (wie DNA, RNA, Oligonukleotide und Proteine) in eukaryotische Zellen ermöglicht. So kann das Reagenz unter anderem für die hocheffiziente Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen eingesetzt werden.

Transfektionen mittels DOTAP wurden nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Zu den HEK-293 Zellen wurde ein Transfektionsgemisch aus 110 μ L HBS Puffer, 10 μ g Plasmid DNA (PGL2 hBD-2 Plasmid, 0,95 μ g/ μ L) und 30 μ L DOTAP Liposomal Transfection Reagent gegeben.

2.3.5.2 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden Zellen, die sich in einer DNA-haltigen Lösung befinden, einem kurzen Stromimpuls ausgesetzt. Dadurch werden in ihrer Zytoplasmamembran temporäre Poren erzeugt. Die Plasmid DNA kann dann durch diese Poren sowohl passiv durch Diffusion als auch elektrophoretisch in die Zelle gelangen (Sukhsrev 1994)(Neumann 1982, Potter 1984).

Die HEK-293 Zellen wurden mit sterilem PBS-Puffer vom Boden der Kulturflasche abgelöst und bei 280 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 800 µl MT-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt. Dazu wurden 10 µg Plasmid DNA in die Küvette pipettiert. Die Elektroporationsküvette wurde anschließend in den Inkubator gestellt und konnte nach 5 Min. einem elektrischen Puls ausgesetzt werden. Die Elektroporation erfolgte bei einer Kapazität von 960 µFD und einer Spannung von 0,28 mV.

Die Zellsuspension wurde dann in eine 5 ml 5m Kulturflasche (mit 4,5 ml Kulturmedium vorgefüllt) gegeben und unter Kulturbedingungen inkubiert.

2.3.5.3 Calciumphosphat-Präzipitation

Säugerzellen sind in der Lage, Calciumphosphatkristalle zu phagozytieren. Diese Fähigkeit der Zellen nutzt man bei der Transfektion mittels Calciumphosphat aus. Kopräzipitierte Plasmid DNA kann dadurch in die Zellen eingebracht werden.

Die HEK-293 Zellen wurden am Vortag in drei 10cm Schalen ausgesät. Eine Stunde vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Anschließend wurden 10 µg Plasmid DNA (pGL 2 hBD-2 Plasmid) mit Aqua dest. auf 500 µl aufgefüllt. Diese DNA-Mischung wurde zu 50 µl Ca₃(PO₄)₂ gegeben und schließlich zu 500 µl 2x HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) langsam unter ständigem leichtem Mischen auf dem Vortex eingetropft. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die HEK-293 Zellen gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken der Schale wurde für die gleichmäßige Verteilung des Gemisches gesorgt. Die

transfizierten HEK-Zellen wurden fünf Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Daraufhin wurde ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ist eine immunologische Methode, die dem Nachweis gebundener Antigene oder Antikörper dient. Der ELISA beruht auf einer enzymatischen Reaktion, die durch die Umwandlung eines farblosen Substrats in ein farbiges Produkt gekennzeichnet ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sogenannte Sandwich-ELISA-Tests durchgeführt. Mithilfe dieses Verfahrens lassen sich sezernierte Proteine nachweisen. Diese werden von immobilisierten antigenspezifischen Antikörpern mit hoher Affinität gebunden, indem die Antikörper ein Epitop des Proteins erkennen. Ein zweiter enzymgebundener Antikörper, der ein anderes Epitop auf dem Protein detektiert, wird dann zum Nachweis des Proteins eingesetzt. Der ELISA ist durch eine hohe Spezifität gekennzeichnet. Damit lassen sich Proteine nachweisen, auch wenn diese in dem ursprünglichen Gemisch in nur sehr geringer Konzentration zu finden sind. Die in dieser Arbeit verwendeten Humanbeta Defensin-2 bzw. Human beta Defensin-3 ELISA Kits (Pepro Tech, New Jersey, USA) ermöglichen die quantitative Messung von natürlichem und/oder rekombinantem hBD-2 bzw. hBD-3 in einem Sandwich-ELISA im Bereich von 8 pg/ml bis 1000 pg/ml bei hBD-2 und von 62 pg/ml bis 4000 pg/ml bei hBD-3.

2.4.1.1 hBD2 ELISA

Zum Coaten der 96-Well ELISA Platte (Polysorb, Nunc) wurde der gereinigte, antigenspezifische hBD-2 Capture Antikörper mit der Anfangskonzentration von 25 µg/ml mit PBS auf 0,25 µg/ml verdünnt. Anschließend wurden alle Löcher der Platte

mit jeweils 100 µL Capture Antibody beschichtet, mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am zweiten Tag wurde nicht gebundener Capture Antikörper entfernt und die ELISA-Platte 4 Mal gewaschen. Zum Waschen der Platte wurden jeweils 300µL Waschpuffer zu jedem Well gegeben. Nach dem vollständigen Entfernen des Waschpuffers durch wiederholtes Ausklopfen der Platte auf Papiertüchern nach jedem Waschgang, wurde die ELISA-Platte mit 300 µL pro Well Block Puffer inkubiert. Dieser Vorgang diente der Blockierung frei gebliebener Bindungsstellen der Plattenoberfläche, um eventuelle unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Inkubation erfolgte auf dem Kreisschüttler (30 U/min) bei Raumtemperatur über eine Stunde.

Nach einem erneuten Waschschritt wurden je 100 µL des hBD2 Standards pro Well zugegeben. Dazu wurde folgende Verdünnungsreihe des in einer Anfangskonzentration von 1 ng/ml vorliegenden Standards mit Reaktionspuffer hergestellt:

1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15, 625 pg/ml und Blank.

Als Blank Wert wurden 100 µL Reaktionspuffer eingesetzt. Diese Proben wurden immer in Triplikaten eingesetzt. Die zu testenden Humanseren wurden immer in Duplikaten pipettiert. Alle Proben wurden dann 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde zu den Capture Antikörper-Antigen-Komplexen ein zweiter Antikörper zugegeben, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet. Dieser biotinylierte antigenspezifische Detection Antibody (Anti-hBD2) wurde mit Reaktionspuffer zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml verdünnt und in einer Menge von 100 µL pro Well eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde die ELISA Platte vier Mal mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden 6 µl Avidin Peroxidase in einer 1:2000 Verdünnung in 12 ml Diluent gelöst und in alle Wells der Platte appliziert (je 100 µl pro Well). Danach wurde die Platte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das jetzt im Assay enthaltene Avidin bindet mit hoher Affinität an den biotinylierten Detection-Antikörper. Nach einem letzten Waschschritt erfolgte die Zugabe von 100 µl pro Well Substrat-Lösung, die in Anwesenheit von Peroxidase zur einer Blaufärbung führt. Die Entwicklungszeit betrug 8-10 Minuten im Dunkeln. Die Reaktion konnte dann mit 50

μ l pro Well Stopplösung beendet werden. Dabei konnte ein sofortiger Farbumschlag von blau nach gelb beobachtet werden. Nun wurden die hBD-2 Konzentrationen photometrisch bei einer Messwellenlänge von 450 nm am Luminometer Fusion™ (Perkin Elmar, Waltham, MA, USA) ELISA-Plattenlesegerät gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve, die sich nach Auftragen der Absorptionswerte (linear) gegen die Standardkonzentrationen (logarithmisch) ergibt. Die ermittelte optische Dichte der Proben ist proportional zur Menge an gebundenem Defensin.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ELISAs wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (Pepro Tech, New Jersey, USA) durchgeführt. Es wurden drei ELISAs als voneinander unabhängige Wiederholungsexperimente durchgeführt. Von den einzelnen Messwerten wurden Mittelwerte gebildet, weiterhin wurde daraus eine Standardabweichung (SD) abgeleitet.

2.4.1.2 hBD3 ELISA

Bei dem zur quantitativen Bestimmung von hBD-3 verwendeten ELISA wurde analog zum hBD-2 ELISA verfahren. Wie bei dem hBD-2 ELISA wurden auch hier alle Empfehlungen des Herstellers (Pepro Tech, New Jersey, USA) zur Durchführung der Versuche befolgt. Auf die hBD-3 ELISA Besonderheiten sowie auf abweichende Parameter und Vorgehen wird im Folgenden eingegangen.

1. Zum Beschichten der ELISA Platte wurde der gereinigte, antigenspezifische Anti-hBD-3 Capture Antikörper in einer Konzentration von 3.0 μ g/ml eingesetzt.
2. Der hBD-3 Standard fand in einer Verdünnung von 1:2, ausgehend von 4 ng/ml, Anwendung. Der hier verwendete human BD-3 ELISA Development Kit ist durch eine Messbreite von 62 pg/ml hBD-3 bis 4000 pg/ml hBD3 gekennzeichnet. Es wurde folgende Verdünnungsreihe erstellt:

4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und Blank.

3. Zunächst wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit 1:2 Verdünnungsstufen von 2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml erstellt und je 100 µl der Standards, einer Negativkontrolle (Verdünnungslösung) und der Proben in zwei aufeinander folgende Wells aufgetragen.

2.5 Humane Seren

Alle hier getesteten Patientenserien wurden freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte jeweils eine Blutabnahme pro Patient. Diese fand während des stationären Aufenthalts der Patienten unter deren Einverständnis statt. Bis zur Untersuchung der Seren mittels ELISA wurden die Serumproben aliquotiert bei - 80°C gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der hBD2- und hBD3-Konzentration in Humanseren

Zur Quantifizierung von hBD2 und hBD3 in Humanseren wurden Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) durchgeführt. Ziel dieser Experimente war neben der Etablierung des ELISAs für hBD2 und hBD3 die Konzentrationsbestimmung beider Defensine im Kontext von klinisch relevanten Erkrankungen.

3.1.1 hBD2-Spiegel bei Patienten mit MRSA-Infektionen der Haut

In den folgenden Versuchen sollte mittels ELISA analysiert werden, in welcher Konzentration hBD2 im Serum von Patienten mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Infektionen der Haut im Vergleich zu gesunden Probanden vorliegt. Ziel war es, die hBD2-Konzentrationen im Blut der Patienten und Probanden zu bestimmen, diese untereinander zu vergleichen und zu prüfen, ob sich die hBD2-Expression bei einer vorliegenden MRSA-Infektion verändert. Dazu wurden vier Gruppen von Patienten und gesunden Probanden analysiert. Diese wurden nach folgenden anamnestischen Angaben systematisiert:

1. In die erste Untersuchungsgruppe wurden Patienten mit dem klinischen Bild einer Hautinfektion mit MRSA ohne Aufhebung der Hautbarriere eingeschlossen (n=10).
2. Patienten mit zusätzlichen Hautulzerationen wurden in einer zweiten Gruppe zusammengefasst (n=6).
3. Als Kontrollgruppe dienten Serumproben von gesunden Mitarbeitern des Universitätsklinikums Regensburg. Die Proben wurden freundlicherweise von dem betriebsärztlichen Dienst des Universitätsklinikums Regensburg bereitgestellt (n=10).
4. Eine zweite Kontrollgruppe bildeten nicht erkrankte Kontaktpersonen der jeweiligen Patienten (n=8).

Zur Bestimmung der hBD2-Konzentrationen wurden mit jeder Blutprobe drei Messungen mittels ELISA in Abstand von jeweils 7 Tagen, wie unter 2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Aus den dabei ermittelten Ergebnissen wurden die Mittelwerte gebildet. Diese sind in der Abb. 2 graphisch dargestellt.

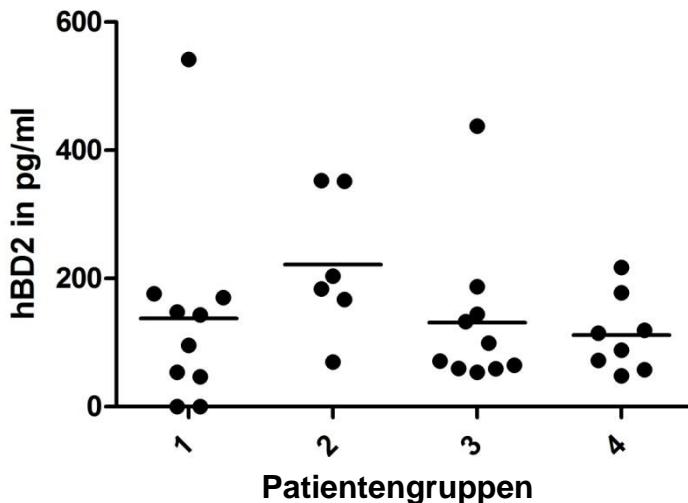


Abbildung 2: hBD2-Konzentration in den Blutseren MRSA-positiver Patienten.

1. Patienten mit Hautinfektion ohne Ulzera (n=10), 2. Patienten mit Hautinfektionen mit Ulzera (n=6), 3. Kontrollgruppe 1 (n=10), 4. Kontrollgruppe 2 (n=8). Blutseren von Patienten mit MRSA-Infektionen der Haut wurden mittels ELISA auf hBD2 untersucht. Als Kontrolle wurden Blutseren von gesunden Probanden (Kontrollgruppe 1) sowie Blutseren von Kontaktpersonen der Patienten (Kontrollgruppe 2) verwendet. Die Abbildung zeigt die hBD2-Messwerte der vier untersuchten Patientengruppen in pg/ml. Jeder Punkt beschreibt den Mittelwert aller Konzentrationsbestimmungen eines Patienten. Die horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte aller Messungen der jeweiligen Gruppe.

Die hBD2-Konzentrationen in den Blutseren beider Kontrollgruppen (Gruppe 3 und 4) sind vergleichbar hoch, d.h. zwischen den gesunden Probanden und den Kontaktpersonen der MRSA-positiven Patienten ist kein Unterschied bezüglich der Sekretion von hBD2 nachzuweisen.

Weiterhin konnte ein deutlicher Anstieg in der zweiten Patientengruppe im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen beobachtet werden. Gruppen 1 und 2 umfassten die MRSA-positiven Patienten. Dabei wies Gruppe 1 nur oberflächliche Infektionen mit intakter Hautbarriere auf, während es bei Gruppe 2 zu Ulzerationen gekommen war. Dabei zeigte sich in der ersten Patientengruppe ein mittlerer hBD2-Spiegel von

knapp 138 pg/ml, während die hBD2-Konzentrationen in der zweiten Gruppe im Mittel bei 305 pg/ml lagen. Damit kam der hBD2-Spiegel der Gruppe 1 dem der Kontrollgruppen (Gruppe 3 und 4) sehr nahe. Dagegen zeigte sich bei der Gruppe 2 (Patienten mit tiefen Ulcera) ein zu den Kontrollgruppen deutlich gesteigerter Serum-hBD2-Spiegel. Wegen der bereits beschriebenen hohen Streuung der Werte der einzelnen Patienten konnte hier eine statistische Signifikanz nicht erreicht werden.

3.1.2 hBD2- und hBD3-Konzentration im Serum von knochenmarktransplantierten Patienten

Im Folgenden wurden die hBD2- und hBD3-Konzentrationen im Humanserum von knochenmarktransplantierten Patienten gemessen. Das Vorhandensein und die genaue Konzentration beider Defensine in den Serumproben wurde mittels ELISA ermittelt.

Für den Versuch standen 21 Patienten unterschiedlichen Alters und Geschlechts zur Verfügung. Dabei setzte sich das Patientenkollektiv aus sieben Frauen und vierzehn Männern zusammen (der Altersdurchschnitt lag bei 46 Jahren). Alle in der Studie eingeschlossenen Patienten haben aus verschiedenen Indikationen eine allogene Knochenmarktransplantation (KmTX) an dem Universitätsklinikum Regensburg erhalten.

Um die Expression von hBD2 und hBD3 im zeitlichen Verlauf vor und nach der allogenen Knochenmarktransplantation beobachten zu können, erfolgten insgesamt fünf Blutabnahmen pro Patient zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Alle Blutseren für die Durchführung des ELISAs wurden mit dem Einverständnis der Patienten abgenommen. Als Kontrolle dienten Blutproben, die acht Tage vor der Knochenmarktransplantation (d-8) abgenommen wurden.

d-8	acht Tage vor der Knochenmarktransplantation
d 0	am Tag der Knochenmarktransplantation
d+ 7	sieben Tage nach der Knochenmarktransplantation
d+14	vierzehn Tage nach der Knochenmarktransplantation
d+21	einundzwanzig Tage nach der Knochenmarktransplantation

Als zusätzlicher Faktor bei der Bestimmung der hBD2- und hBD3-Spiegel wurde die Entwicklung einer Graft-versus-Host-Reaktion berücksichtigt. Die Patienten konnte man entsprechend dem Krankheitsverlauf in die folgenden 2 Gruppen aufteilen:

1. In der Patientengruppe 1 wurden Patienten eingeschlossen, die nach der allogenen KmTX eine Graft-versus-Host-Reaktion (GvH-Reaktion) entwickelt haben.
2. Für die Patientengruppe 2 wurden knochenmarktransplantierte Patienten gewählt, bei denen keine GvH-Reaktion beobachtet wurde.

Anamnestische Daten zu den einzelnen Patienten über Geschlecht, Alter, klinische Diagnose und KmTX sind in der Tabelle 2 und der Tabelle 3 zusammengefasst. Dabei enthält Tabelle 2 die Angaben zu Patientengruppe 1 und Tabelle 3 die Angaben zu Patientengruppe 2.

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	TX-Datum
1.1	f	34	AML	01.04.2008
1.2	f	61	IgG- Plasmozytom	20.03.2008
1.3	m	56	Plasmozytom	30.10.2007
1.4	f	50	Plasmozytom	25.09.2007
1.5	m	28	Prä-T-ALL	09.01.2008
1.6	m	37	AML	21.12.2007
1.7	m	36	MM	21.08.2007
1.8	m	52	AML	10.09.2008
1.9	m	63	sek. AML aus MDS	19.02.2008
1.10	m	55	AML aus MDS	08.08.2007

Tabelle 2: Anamnestische Daten der Patientengruppe 1 (ohne GvH-Reaktion)

Die Tabelle zeigt die anamnestischen Daten der Patientengruppe 1. Diese haben im Verlauf nach der allogenen KmTX keine Graft-versus-Host-Reaktion (GvH-Reaktion) entwickelt.

Gezeigt werden neben den anonymisierten Patientennummern das Geschlecht, das Alter, die klinische Diagnose sowie das Datum der Knochenmarktransplantation (TX-Datum).

ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, Foll. Lymphom: folliculäres Lymphom, MDS: myelodysplastisches Syndrom, MM: multiples Myelom.

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	klinische Diagnose	TX-Datum
2.1	m	59	CML- Blastenschub	14.12.2006
2.2	f	54	AML	19.09.2008
2.3	m	52	Foll. Lymphom	04.05.2007
2.4	m	59	Plasmozytom	06.06.2008
2.5	f	51	AML aus MDS	03.08.2005
2.6	m	60	MDS	27.06.2008
2.7	m	25	AML	14.03.2008
2.8	f	39	Plasmozytom	30.09.2008
2.9	m	41	AML	05.02.2008
2.10	f	34	AML	12.02.2008
2.11	m	26	CML	30.09.2008

Tabelle 3: Anamnestische Daten der Patientengruppe 2 (mit GvH-Reaktion)

Die Tabelle zeigt die anamnestischen Daten der Patientengruppe 2. Bei diesen wurde im Verlauf nach der allogenen KmTX eine Graft-versus-Host-Reaktion (GvH-Reaktion) beobachtet.

Gezeigt werden neben den anonymisierten Patientennummern das Geschlecht, das Alter, die klinische Diagnose sowie das Datum der Knochenmarktransplantation (TX-Datum).

AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronisch myeloische Leukämie, Foll. Lymphom: folliculäres Lymphom, MDS: myelodysplastisches Syndrom.

3.1.2.1 Regulation der Expression von hBD2 in der frühen Phase nach allogener Knochenmarktransplantation

Im Rahmen der Konzentrationsbestimmungen von hBD2 in den Seren der Patientengruppe 1 (ohne GvHD) konnte eine leichte anfängliche Erhöhung der hBD2-Konzentrationen am Tag der allogenen Knochenmarktransplantation (d 0) im Vergleich zu den Vorwerten (d-8) festgestellt werden. So stieg der gemessene hBD2-Wert von $156,89 \pm 55,94$ pg/ml am Tag d-8 auf $207,96 \pm 96,42$ pg/ml am Tag d 0 (Abb. 3). Weiterhin ergab sich ein signifikanter ($p=0,0172$) Unterschied zwischen den hBD2-Spiegeln am Tag der Knochenmarktransplantation (d 0) mit $207,96 \pm 96,42$ pg/ml und eine Woche danach (d+7) mit $115,73 \pm 30,38$ pg/ml. Im weiteren Verlauf blieben die hBD2-Konzentrationen annähernd konstant, es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den gemessenen Defensin-Konzentrationen am Tag d+7, d+14 und d+21.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also eine signifikante Herunterregulation von hBD2 in der frühen Phase nach der allogenen Knochenmarktransplantation. Die hBD2-Spiegel von allen in der Patientengruppe 1 getesteten Patienten ($n=10$) sind als Mittelwerte \pm SD in Abb. 3 dargestellt. Zusätzlich zeigt Abb. 4 exemplarisch die Daten des Patienten 1.2. Bei ihm zeigte sich ein typischer Verlauf der hBD2-Serumspiegel im Zeitverlauf. So lag der Wert am Tag der Transplantation (d 0) mit $276,98 \pm 36,81$ pg/ml signifikant ($p=0,0022$) höher als am Tag d-8 mit $151,95 \pm 32,03$ pg/ml. Daraufhin kam es zu einem signifikanten Abfall der hBD2-Werte bis zum Tag d+7 auf $86,69 \pm 22,11$ pg/ml ($p=0,0022$).

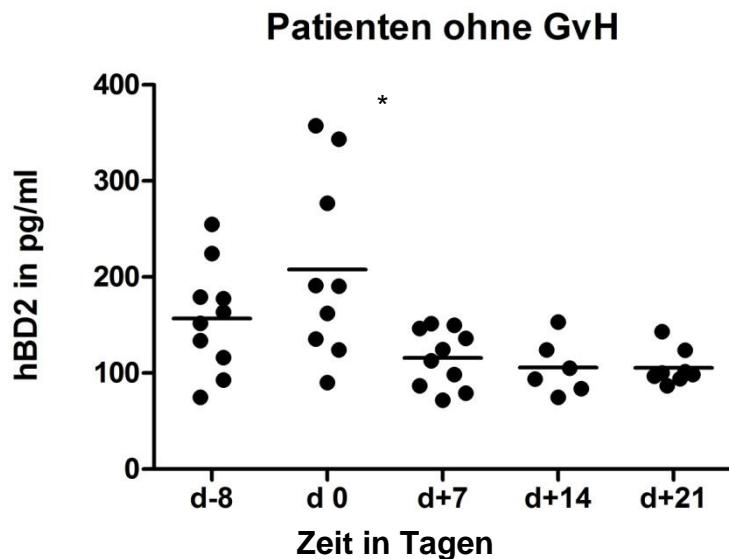


Abbildung 3: hBD2-Konzentration in den Blutseren KM-transplantiert Patienten ohne GvH

Humanseren von Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation (KM-Transplantation) wurden mittels ELISA auf hBD2 untersucht. Dargestellt sind die Daten von 10 Patienten, bei denen sich im Verlauf keine GvH-Reaktion zeigte. Die Blutentnahmen für die hBD2 Bestimmungen erfolgten 8 Tage vor der KM-Transplantation (d-8), am Tag der Transplantation (d 0), 7 Tage nach der Transplantation (d+7) sowie 14 und 21 Tage nach der KM-Transplantation (d+14 und d+21). Die Abbildung zeigt die hBD2-Messwerte der Patienten zu den fünf untersuchten Zeitpunkten in pg/ml. Jeder Punkt beschreibt den Mittelwert aller Konzentrationsbestimmungen eines Patienten. Die horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte aller untersuchten Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Dabei ist der Unterschied der Mittelwerte zwischen Tag d 0 und Tag d+7 statistisch signifikant ($p=0,0172$).

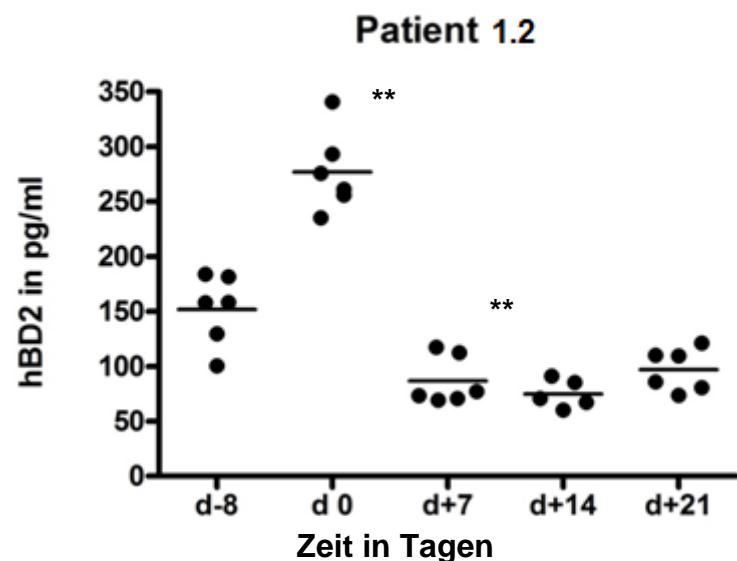


Abbildung 4: hBD2-Konzentration im Blutserum eines KM-transplantierten Patienten ohne GvH

Der hBD2-Konzentrationsverlauf des Patienten 1.2, bei dem keine GvH-Reaktion nach der allogenen KM-Transplantation auftrat, ist exemplarisch dargestellt. Das Serum des Patienten wurde mittels ELISA auf hBD2 untersucht. Je eine Blutentnahme erfolgte 8 Tage vor der KM-Transplantation (d-8), am Tag der Transplantation (d 0), 7 Tage nach der Transplantation (d+7) sowie 14 und 21 Tage nach der KM-Transplantation (d+14 und d+21). Die Abbildung zeigt die hBD2-Messwerte des Patienten GF zu den fünf untersuchten Zeitpunkten in pg/ml. Jeder Punkt beschreibt eine einzelne hBD2 Konzentrationsbestimmung. Die horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte aller Einzelmessungen aus einer zum jeweiligen Zeitpunkt entnommenen Blutprobe. Dabei ist der Unterschied der Mittelwerte zwischen dem Tag d-8 und dem Tag d 0 ($p=0,0022$) sowie zwischen dem Tag d 0 und dem Tag d+7 ($p=0,0022$) statistisch signifikant.

Bei den Patienten mit GvH-Reaktion (Patientengruppe 2) fand sich bei der hBD2-Konzentrationsbestimmung eine ähnliche Verteilung der hBD2-Spiegel im zeitlichen Verlauf wie in der ersten Patientengruppe (ohne GvHD), wie Abb. 5 zeigt. Auch hier zeigten sich am Tag der allogenen Knochenmarktransplantation (d 0) die höchsten hBD2-Konzentrationen im Blutserum der Patienten. Dabei lag die hBD2-Konzentration etwas höher ($hBD2=148,39 \pm 40,16$ pg/ml) als die Kontrolle am Tag d-8 ($hBD2 = 113,35 \pm 21,86$ pg/ml) oder als Tag d+7 ($hBD2=130,93 \pm 28,26$ pg/ml), so dass kein signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte. Die hBD2-Konzentrationen im Patientenserum am Tag d+14 (115,58 pg/ml) und d+21 (112,99 $\pm 27,61$ pg/ml) lagen nahezu gleich hoch und waren im Mittel vergleichbar mit den Werten vor der KmTX ($113,35 \pm 21,86$ pg/ml).

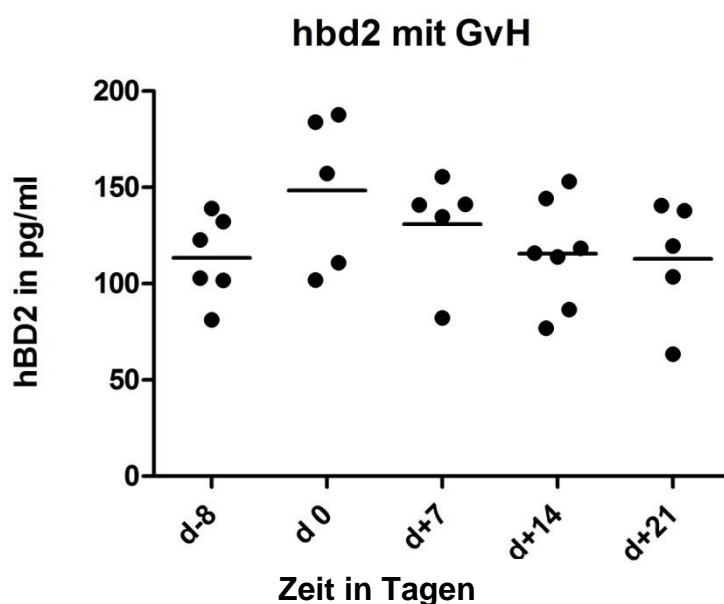


Abbildung 5: hBD2-Konzentration in den Blutseren KM-transplantiert Patienten mit GvH

Humanseren von Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation (KM-Transplantation) wurden mittels ELISA auf hBD2 untersucht. Dargestellt sind die Daten von Patienten, bei denen es im Verlauf zu einer GvH-Reaktion kam. Die Blutentnahmen für die hBD2 Bestimmungen erfolgten 8 Tage vor der KM-Transplantation (d-8), am Tag der Transplantation (d 0), 7 Tage nach der Transplantation (d+7) sowie 14 und 21 Tage nach der KM-Transplantation (d+14 und d+21). Die Abbildung zeigt die hBD2-Messwerte der Patienten zu den fünf untersuchten Zeitpunkten in pg/ml. Jeder Punkt beschreibt den Mittelwert aller Konzentrationsbestimmungen eines Patienten. Die Horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte aller untersuchten Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Die gemessenen Unterschiede erreichen nicht das statistische Signifikanzniveau.

3.1.2.2 Regulation der Expression von hBD3 in der frühen Phase nach allogener Knochenmarktransplantationen

Neben hBD2 wurde in den Serumproben beider Patientengruppen auch die hBD3-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 gezeigt.

Bei den Patienten ohne GvH wurden am Tag d-8 und am Tag d+21 annähernd gleich hohe hBD3-Spiegel gemessen. Im Vergleich dazu waren die an den Tagen d 0, d+7 und d+14 ermittelten hBD3-Werte um ca. 20% reduziert. Das heißt, dass eine leichte, nicht signifikante Abnahme der hBD3-Konzentration nach der KmTX (ab d 0) mit den geringsten hBD3-Werten am Tag d+7 festgestellt werden konnte. Im weiteren Verlauf (ab d+14) stiegen die Konzentrationen wieder und erreichten am Tag d+21 die ursprünglichen hBD3-Werte vor der KmTX.

Bei den Patienten 2.9, 2.10 und 2.11 aus der Patientengruppe 2 lagen sowohl hBD2 als auch hBD3 unter der Nachweisgrenze. Aus diesem Grund mussten diese drei Patienten bei der Auswertung des Assays ausgeschlossen werden.

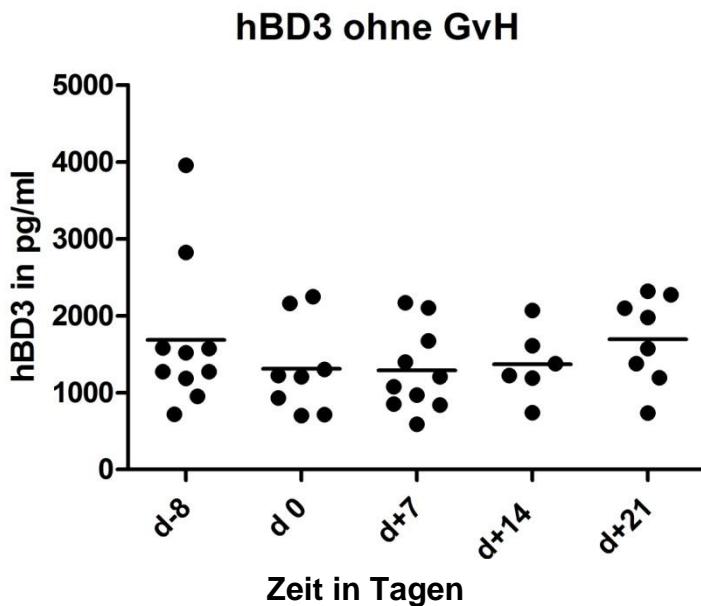


Abbildung 6: hBD3-Konzentration in den Blutseren KM-transplantiert Patienten ohne GvH

Humanseren von Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation (KM-Transplantation) wurden mittels ELISA auf hBD3 untersucht. Dargestellt sind die Daten von Patienten, bei denen sich im Verlauf keine GvH-Reaktion zeigte. Die Blutentnahmen für die hBD2 Bestimmungen erfolgten 8 Tage vor der KM-Transplantation (d-8), am Tag der Transplantation (d 0), 7 Tage nach der Transplantation (d+7) sowie 14 und 21 Tage nach der KM-Transplantation (d+14 und d+21). Die Abbildung zeigt die hBD3-Messwerte der Patienten zu den fünf untersuchten Zeitpunkten in pg/ml. Jeder Punkt beschreibt den Mittelwert aller Konzentrationsbestimmungen eines Patienten. Die horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte aller untersuchten Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt.

Die hBD3-Spiegel in der Patientengruppe mit GvH-Reaktion sind der Abb. 7 zu entnehmen. Zu allen untersuchten Zeitpunkten wurden annähernd gleiche Konzentrationen an hBD3 ermittelt. So lagen die Mittelwerte aller Patienten jeweils im Bereich von 2000 pg/ml. Es ließ sich daher kein Zusammenhang zwischen der allogenen Knochenmarktransplantation und den hBD3-Konzentrationen in dieser Patientengruppe feststellen.

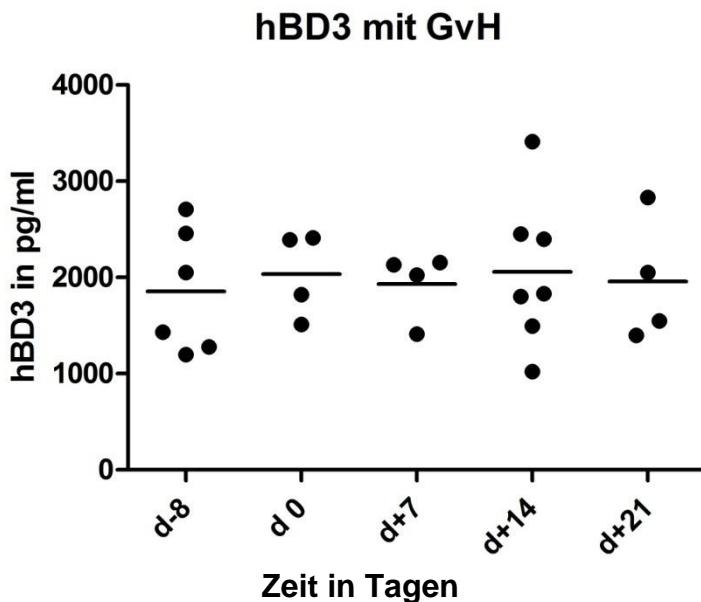


Abbildung 7: hBD3-Konzentration in den Blutseren KM-transplantiert Patienten mit GvH

Humanseren von Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation (KM-Transplantation) wurden mittels ELISA auf hBD3 untersucht. Dargestellt sind die Daten von Patienten, bei denen es im Verlauf zu einer GvH-Reaktion kam. Die Blutentnahmen für die hBD3 Bestimmungen erfolgten 8 Tage vor der KM-Transplantation (d-8), am Tag der Transplantation (d 0), 7 Tage nach der Transplantation (d+7) sowie 14 und 21 Tage nach der KM-Transplantation (d+14 und d+21). Die Abbildung zeigt die hBD3-Messwerte der Patienten zu den fünf untersuchten Zeitpunkten in pg/ml. Jeder Punkt beschreibt den Mittelwert aller Konzentrationsbestimmungen eines Patienten. Die horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte aller untersuchten Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt.

3.1.3 hBD2- und hBD3-Konzentrationen bei bronchopulmonalen Infekten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unsere Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Salzberger aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Infektiologie der Universitätsklinik Regensburg gebeten, in einem klinischen Fall eine hBD2- und hBD3-Bestimmung bei einer Patientin durchzuführen.

Zur Zeit dieser Defensin-Bestimmungen befand sich die Patientin in der ambulanten Betreuung. Aus den klinisch-anamnestischen Daten war bekannt, dass die 42-jährige Patientin seit 1998 an rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten leidet. In diesem Zusammenhang sollte eine Messung von den hBD2- und hBD3- Konzentrationen im Blutplasma der Patientin durchgeführt werden.

Es konnte bereits in mehreren Studien festgestellt werden, dass sowohl hBD2 als auch hBD3 eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr des Respirationstrakts spielen [133, 134].

hBD2 wird von den Typ 2 alveolären Zellen exprimiert, während sich hBD3 in den Epithelzellen von Bronchien und Bronchiolen findet. Beide Peptide haben eine breite antimikrobielle Wirkung und erfüllen eine wichtige Funktion als Teil der angeborenen Immunabwehr in der Lunge [124]. Eine eventuelle Defensindefizienz könnte daher die Infektionen der Lunge begünstigen und eine mögliche Ursache für die rezidivierenden Infektionen des Atmungssystems in diesem klinischen Fall sein.

Zu der quantitativen Bestimmung von endogenem hBD2 und hBD3 im Blutplasma der Patientin wurde ein weiterer ELISA Assay durchgeführt. Die labortechnischen Methoden waren identisch mit den oben beschriebenen ELISA Versuchen und wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt.

Für die Auswertung der hBD2- und hBD3-Spiegel wurden jeweils die Mittelwerte aus sechs Messungen und die jeweiligen Standardabweichungen ermittelt.

Dabei zeigte sich bei der Patientin eine hBD2-Serumkonzentration von $101,03 \pm 12,59 \text{ pg/ml}$ (Abb. 8).

Weiterhin wurde auch bei den beiden Kindern der Patientin eine Defensinbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 8 zu entnehmen. So zeigte sich bei der Patientin eine Serum-hBD2-Konzentration von $101,03 \pm 12,59 \text{ pg/ml}$. Bei Kind 1 lag der hBD2-Wert mit $171,1 \pm 40,71 \text{ pg/ml}$ um ca. 170 % signifikant höher ($p=0,0044$). Bei Kind 2 lag die hBD2- Konzentration mit $228,1 \pm 30,75 \text{ pg/ml}$ mehr als doppelt so hoch wie bei der Mutter ($p=0,0044$).

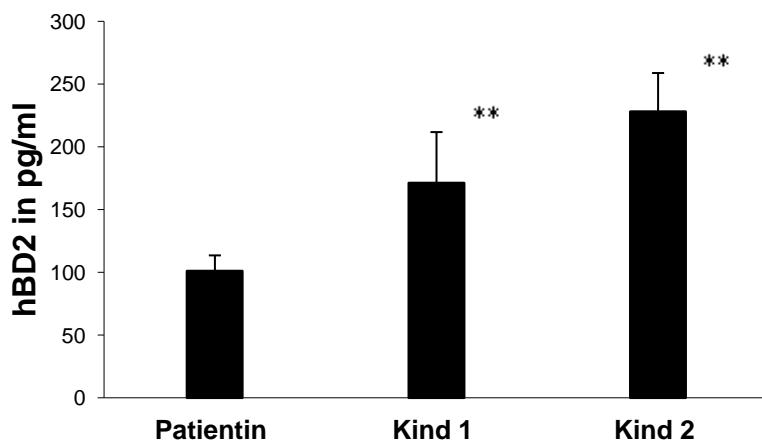


Abbildung 8: hBD2-Konzentration im Blutserum der Patientin und ihrer Kinder

Die Seren der 42-jährigen Patientin, die an rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten litt sowie die Seren ihrer beiden Kinder wurden mittels ELISA auf hBD2 untersucht. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus je 6 Einzelmessungen in pg/ml sowie die jeweilige Standardabweichung. Die hBD2 Werte der Patientin unterscheiden sich signifikant von den bei Kind 1 ($p=0,0044$) und Kind 2 ($p=0,0044$) gemessenen.

Neben den hBD2-Bestimmungen wurde bei der Familie auch hBD3 im Serum gemessen. (Abb. 9) Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hBD2-Messung zeigte sich hier mit $4154,86 \pm 66,59$ pg/ml bei der Patientin der höchste Wert. Die hBD3-Konzentrationen von Kind 1 mit $1163,25 \pm 26,11$ pg/ml und von Kind 2 mit $2143,5 \pm 77,83$ pg/ml lagen 3,5- bzw. 2-fach niedriger. ($p=0,0139$ bzw. $p=0,0095$)

Ebenso wie bei hBD2 ist die Festlegung eines Normwertes für die hBD3-Konzentration aus der bis jetzt erschienenen Literatur kaum möglich.

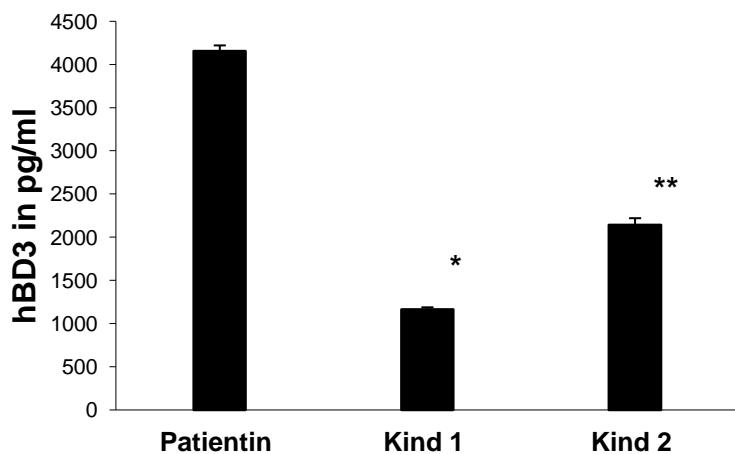


Abbildung 9: hBD3-Konzentration im Blutserum der Patientin und ihrer Kinder

Die Seren der 42-jährigen Patientin, die an rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten litt sowie die Seren ihrer beiden Kinder wurden mittels ELISA auf hBD3 untersucht. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus je 6 Einzelmessungen in pg/ml sowie die jeweilige Standardabweichung. Die hBD2 Werte der Patientin unterscheiden sich signifikant von den bei Kind 1 ($p=0,0139$) und Kind 2 ($p=0,0095$) gemessenen.

3.2 Regulation der Expression von hBD2 auf Promotorebene

3.2.1 Einfluss von mikrobiellen Bestandteilen auf den hBD2-Promotor

Mit Hilfe eines Luciferase Reporter-Gen-Assays wurde der Einfluss verschiedener proinflammatorischer Substanzen auf die Aktivierung des hBD2-Promotors untersucht.

Dazu wurden HEK-293 Zellen mit dem hBD2-Promotor/Firefly Luciferase Reporter Vektorkonstrukt mittels DOTAP Liposomal Transfection Reagent stabil transfiziert (siehe 2.3.5.1) und anschließend 24 Stunden mit Peptidoglykan (PG), Lipopolysaccharid (LPS), Muramylpeptid (MDP), Pam3Cys und Zymosan stimuliert. Sollten die oben aufgezählten Substanzen den hBD2 Promotor beeinflussen, wird er entweder aktiviert oder reprimiert. In unbehandelten Zellen führt die Aktivierung des hBD2- Promotors zur Transkription des entsprechenden Gens. In den transfizierten HEK-293 Zellen wird aber stattdessen das Luc-Reporter-Gen transkribiert. Das führt zur Expression der Firefly-Luciferase, die proportional zur

Aktivierung des Promoters ist und deren Aktivität im Luciferase Reportergen-Assay luminometrisch gemessen werden kann.

Tabelle 4 bietet eine Übersicht der eingesetzten Substanzen und ihrer im Versuch verwendeten Konzentrationen.

Substanz	Definition	Eingesetzte Konzentration
Peptidoglykan (PG)	Polysaccharid-Peptide; Bestandteil der Zellwand Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien.	10 µg/ml
Lipopolsaccharid (LPS)	Verbindung in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Besitzt ein stark toxisches, pyrogenes und proinflammatorisches Potential im Wirt nach Bakteriumzerfall.	100 ng/ml
Muramylpeptid (MDP)	Bauteil von Peptidoglykan. Die kleinste Untereinheit, die in der Lage ist, die PGN-vermittelte Entzündungsreaktion auszulösen.	50 µg/ml
Pam3Cys	Synthetisches Analogon von bakteriellen Lipopeptiden	1 µg/ml
Zymosan	Polysaccharid-reicher Zellwandbestandteil von der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Nicht abbaubar, daher führt seine Phagozytose in den Makrophagen zu einer ausgedehnten Entzündung.	10 µg/ml

Tabelle 4: Proinflammatorische Substanzen zur Stimulation des hBD2-Promotors

Die Tabelle zeigt verschiedene proinflammatorische Substanzen, die zur Stimulation der mit dem hBD2-Promotor transfizierten HEK-293 Zellen verwendet wurden.

Aufgezählt sind die Substanznamen, gefolgt von einer kurzen Definition sowie von der in den Versuchen eingesetzten Konzentration. 50

Die Ergebnisse sind in Abb. 10 repräsentativ für vier voneinander unabhängige Experimente zusammengefasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der Triplikate und die Standardabweichung. Diese Ergebnisse zeigten, dass es nach der Stimulierung der transfizierten HEK-293 Zellen mit PG, Pam3Cys und Zym zu nahezu identischen Luciferasewerten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle kam. Es konnten also keine bedeutende Veränderung in der Promotoraktivität des hBD2-Promotors beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu waren LPS und MDP in der Lage, bei Konzentrationen von 100 ng/ml, bzw. 50 µg/ml eine deutliche Luciferaseaktivitätsteigerung zu induzieren.

Während die Stimulierung mit Peptidoglykan zu keiner Erhöhung der Luciferase-Expression verglichen mit der Kontrolle führte, konnten bei der Inkubation mit MDP, einer Untereinheit von PG, die höchste Luciferaseverstärkung beobachtet werden. Dabei bewirkte MDP einen beträchtlichen Anstieg (etwa sechs-fach) der Luciferase-Aktivität. Trotzdem wurde eine statistische Signifikanz nicht erreicht ($p=0,1$).

Ein starkes Luciferasesignal war auch bei LPS messbar, es zeigten sich etwa dreifach höhere Werte im Vergleich zu der unstimulierten transfizierten Zellen.

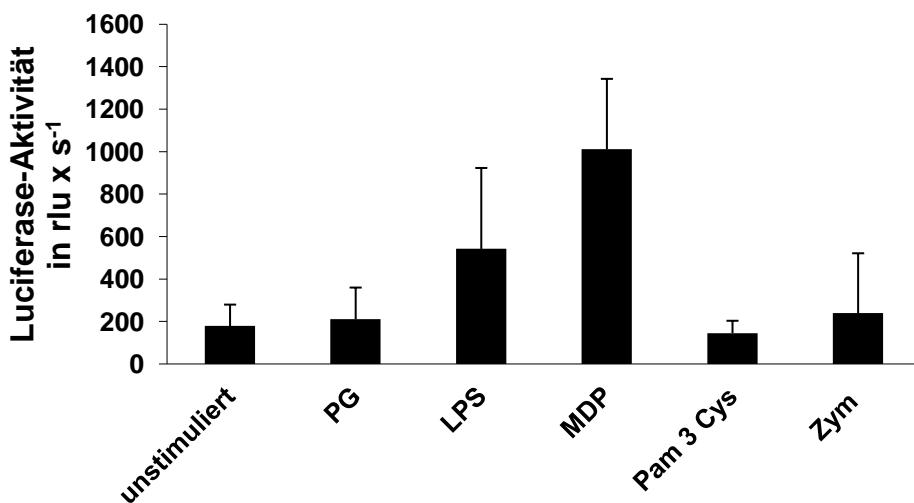


Abbildung 10: Einfluss proinflammatorischer Substanzen auf den hBD2-Promotor

Mit Hilfe eines Luciferase Reporteren-Assays wurde der Einfluss verschiedener proinflammatorischer Substanzen auf die Aktivierung des hBD2-Promotors in HEK-293 Zellen untersucht. Es wurden jeweils 25.000 Zellen HEK-293 Zellen pro Well ausgesät.

Diese wurden mit folgenden proinflammatorischen Substanzen stimuliert: 10 µg/ml Peptidoglykan (PG), 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS), 50 µg/ml Muramylpeptid (MDP), 1 µg/ml Pam3Cys und 10 µg/ml Zymosan (Zym) (siehe Tabelle 4). Als Kontrollgruppe dienten unstimulierte HEK-293 Zellen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Luciferaseaktivität aus drei Einzelmessungen in $\text{rlu} \times \text{s}^{-1}$, sowie die jeweilige Standardabweichung.

3.2.2 Einfluss von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien auf den hBD2-Promotor

Um die oben analysierte Fragestellung über die Induktion der hBD2-Promotoraktivität durch verschiedene Substanzen auch im bakteriellen Kontext zu untersuchen, wurde ein weiterer Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt.

Hierfür wurden mit dem hBD2-Promotorkonstrukt transfizierte HEK-293 Zellen mit verschiedenen Bakterienstämmen stimuliert. Der Effekt dieser Stimulierung auf den hBD2-Promotor wurde dann im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle untersucht.

Bei der Durchführung dieses Versuches wurde analog zum oben beschriebenen Experiment (siehe 3.2.1) verfahren. Auch hier erfolgte die Bestimmung der Reportergenaktivität mit Hilfe des Dual-Glo Luciferase Assay Systems (Promega, Mannheim).

Zur Stimulierung der transfizierten HEK-293 Zellen wurden aus den jeweiligen Bakterienstämmen zunächst Bakterienlysate, wie unter 2.2.2 beschrieben, hergestellt. Um festzustellen, inwieweit die eingesetzte Menge der Bakterienlysate eine Rolle bei der Promotoraktivierung spielt, wurden die Bakterienlysate in unterschiedlichen Mengen (jeweils 1µl, 5µl und 10 µl zu jedem Well) zu den HEK-293 Zellen gegeben. Tabelle 5 bietet eine Übersicht.

Bakterienstämme	1µl/Well	5µl/Well	10µl/Well
Bacillus subtilis (ATCC 6633)	✓	✓	
Enterococcus faecalis (ATCC 29212)		✓	✓
Escherichia coli (ATCC 25922)	✓	✓	✓
Neisseria lactamica (DSM 4691)	✓	✓	
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)		✓	✓
Staphylococcus aureus (ATCC 43300)	✓	✓	✓

Tabelle 5: Bakterienstämme zur Stimulation des hBD2-Promotors

Die Tabelle zeigt verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme, deren Lysate zur Stimulation der mit dem hBD2-Promotor transfizierten HEK-293 Zellen verwendet wurden. Aufgezählt sind die Bakterienstämme sowie die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen der entsprechenden Lysate.

Die Reportergenanalyse erfolgte, wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Pro Bakterienstamm wurden Triplikate gemessen, als Kontrolle dienten unstimulierte, mit dem pGL2 hBD2-Promotorkonstrukt transfizierte HEK-293 Zellen.

Es stellte sich heraus, dass der hBD2-Promotor in den unterschiedlich stimulierten Zellen unterschiedlich stark aktiviert wurde. Demzufolge war auch die im Assay gemessene Firefly-Luciferase-Aktivität, die unter der Kontrolle des hBD2-Promotors steht, bei der Stimulierung mit den einzelnen Bakterienstämmen von unterschiedlicher Intensität.

Bei der Auswertung der Luciferase Reporterassays wurden die eingesetzten Bakterien je nach ihrer Gramfärbung systematisiert. Auf die dabei ermittelten Ergebnisse wird in den folgenden Abschnitten (3.2.2.1 bzw 3.2.2.2) näher eingegangen.

3.2.2.1 hBD2-Promotoraktivität nach Stimulierung mit *Pseudomonas aurigenosa*, *Escherichia coli* und *Neisseria lactamica*

Nach der Stimulierung der transfizierten HEK-293 Zellen mit den Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aurigenosa*, *Escherichia coli* und *Neisseria lactamica* veränderte sich die dabei ermittelte Luciferase-Aktivität mit steigenden, bzw. sinkenden Konzentrationen der eingesetzten Stimuli. So konnte nach der Stimulierung der Zellen mit 5 µl *Pseudomonas aeruginosa* Lysat/Well die größte Steigerung (3-fach) der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden ($p=0,057$). Die Inkubation mit dem doppelten Volumen (10µl/Well) des gleichen Bakteriums zeigte mit einer 1,9-fachen Erhöhung hingegen eine schwächere Induktion der Reportergen-Expression (Abb. 11).

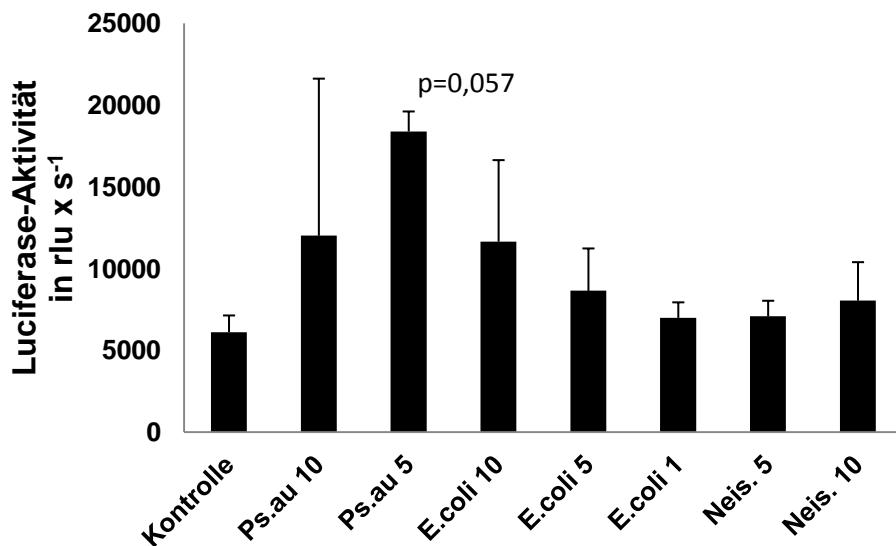


Abbildung 11: Einfluss Gram-negativer Bakterien auf den hBD2-Promotor

Mit Hilfe eines Luciferase Reportergen-Assays wurde der Einfluss verschiedener Gram-negativer Bakterienstämme auf die Aktivierung des hBD2-Promotors in HEK-293 Zellen untersucht. Es wurden jeweils 25.000 Zellen HEK-293 Zellen pro Well ausgesät.

Diese wurden mit folgenden Bakterienlysaten stimuliert: 10 μ l/Well Pseudomonas aeruginosa Lysat (Ps.au 10), 5 μ l/Well Pseudomonas aeruginosa Lysat (Ps.au 5), 10 μ l/Well E.coli Lysat (E.coli 10), 5 μ l/Well E.coli Lysat (E.coli 5), 1 μ l/Well E.coli Lysat (E.coli 1), 5 μ l/Well Neisseria lactamica Lysat (Neis. 5), 1 μ l/Well Neisseria lactamica Lysat (Neis. 1) (siehe Tabelle xx). Als Kontrollgruppe dienten unstimulierte HEK-293 Zellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Luciferaseaktivität aus 4 Einzelmessungen in $rlu \times s^{-1}$ sowie die jeweilige Standardabweichung.

Lysat von Pseudomonas aeruginosa (Ps.au 5) führte zur stärksten Luciferase-Expressionssteigerung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($p=0,057$).

Erhöht zeigte sich die Luciferaseaktivität auch nach der Inkubation der transfizierten HEK-293 Zellen mit *Escherichia coli*. Hier konnte man eine dosisabhängige Stimulierung feststellen. Mit steigender Dosis an *Escherichia coli* Lysat stieg auch die Reportergen-Aktivität - so führte die Stimulierung mit 1 μ l/Well *E.coli* zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität um 114% des Ausgangswertes (unstimulierte Kontrolle), bei 5 μ l/Well waren das 141%, während es bei 10 μ l/Well *E.coli* beinahe zu einer Verdoppelung des Wertes mit 190% kam.

Wie in Abb. 11 zu sehen ist, führte die Behandlung der transfizierten HEK-293 Zellen mit *Neisseria lactamica* nur zu einer schwächeren Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zu den anderen Gram-negativen Bakterienstämmen. Trotzdem lagen die

Luciferase-Werte sowohl bei 5μ *Neisseria lactamica* Lysat/Well, als auch bei 10μ des Bakteriumlysats/ Well höher als die der unstimulierten Kontrolle.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung der transfizierten HEK-293 Zellen mit den Lysaten aus allen eingesetzten Gram-negativen Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Neisseria lactamica*) zu einer Steigerung der Reportergen-Aktivität führte. Diese im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle erhöhte Luciferase-Aktivität konnte nach der Inkubation mit den Bakterienlysaten in allen in diesem Versuch getesteten Konzentrationen erzielt werden.

3.2.2.2 hBD2-Promotoraktivität nach Stimulierung mit *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Bacillus subtilis*

Die Wirkung der drei Gram-positiven Bakterien auf den hBD2 Promotor wird in Abb. 12 deutlich. Es sind jeweils die Mittelwerte der Luciferase-Aktivität aus vier voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichungen angegeben. Während die Stimulierung der HEK-293 Zellen mit den Gram-negativen *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Neisseria lactamica* zu einer erhöhten Induktion der hBD2-Promotoraktivität führte, konnte nach der Inkubation mit den Gram-positiven *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis* in den behandelten Zellen keine verstärkte Promotoraktivität im Vergleich zu unbehandelten gemessen werden. Der Effekt der Stimulierung zeigte sich in allen getesteten Bakterien-Konzentrationen annähernd gleich niedrig, so dass hier kein Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge der Bakterienlysate und der Reportergen-Aktivität gefunden wurde.

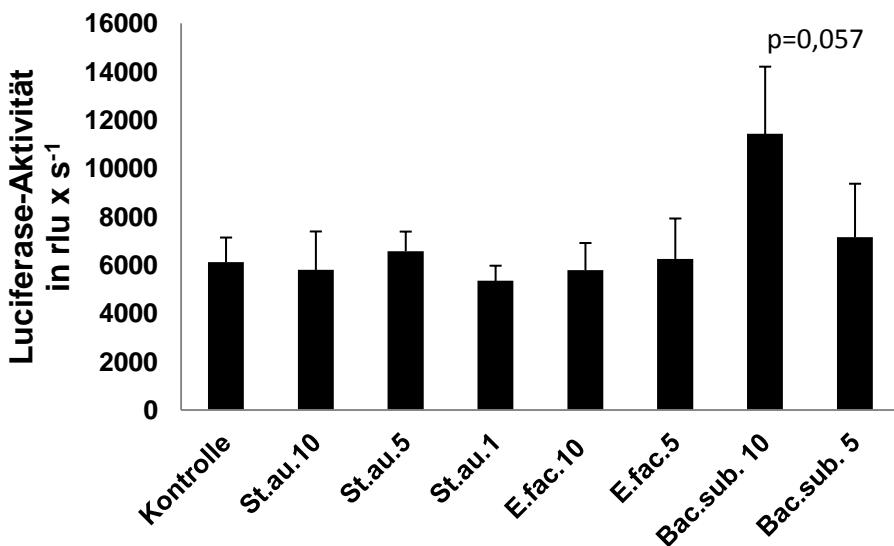


Abbildung 12: Einfluss Gram-positiver Bakterien auf den hBD2-Promotor

Mit Hilfe eines Luciferase Reportergen-Assays wurde der Einfluss verschiedener Gram-positiver Bakterienstämme auf die Aktivierung des hBD2-Promotors in HEK-293 Zellen untersucht. Es wurden jeweils 25.000 Zellen HEK-293 Zellen pro Well ausgesät.

Diese wurden mit folgenden Bakterienlysaten stimuliert: 10 µl/Well *Staphylococcus aureus* Lysat (St.au. 10), 5 µl/Well *Staphylococcus aureus* Lysat (St.au. 5), 1 µl/Well *Staphylococcus aureus* Lysat (St.au. 1), 10 µl/Well *Enterococcus faecalis* Lysat (E.fac. 10), 5 µl/Well *Enterococcus faecalis* Lysat (E.fac. 5), 10 µl/Well *Bacillus subtilis* Lysat (Bac.sub. 10), 5 µl/Well *Bacillus subtilis* Lysat (Bac.sub. 5) (siehe Tabelle 5). Als Kontrollgruppe dienten unstimulierte HEK-293 Zellen.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Luciferaseaktivität aus 4 Einzelmessungen in rlu x s⁻¹, sowie die jeweilige Standardabweichung.

Lysat von *Bacillus subtilis* Lysat (Bac.sub. 10) führte zur stärksten Luciferase-Expressionssteigerung im Vergleich zur unsimulierten Kontrolle (p=0,057).

Im Unterschied zu den anderen beiden Gram-positiven Bakterien, zeigte sich bei der Stimulierung der HEK-293 Zellen mit Lysat von *Bacillus subtilis* dass die Behandlung mit 5 µl/Well zu einem schwachen Anstieg der Luciferaseaktivität um 117% der Kontrolle führt. Die Stimulierung der Zellen mit demselben Erreger in einer Konzentration von 10 µl/Well beeinflusste die hBD2-Promotor-vermittelte Luciferaseaktivität sogar stärker. Hier wurden Werte von 187% der Kontrolle gemessen (p=0,057).

4 Diskussion

4.1 Nachweis von hBD2 im Serum von MRSA-Patienten

hBD2 wurde erstmals bei Patienten mit Hautveränderungen isoliert. Die ursprüngliche Isolierung und Charakterisierung des Defensins erfolgte aus psoriatischen Hautläsionen [42, 48]. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass sich eine veränderte Expression von hBD2 bei entzündlichen Hautveränderungen wie Psoriasis, atopischer Dermatitis oder Akne inversa beobachten lässt [135].

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von hBD2 bei Patienten mit Hauterkrankungen überprüft. Dazu wurden die hBD2-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Infektionen der Haut mittels ELISA bestimmt. Zum einen wurde anhand der gemessenen Konzentration die Hochregulierung von hBD2 nach Kontakt mit MRSA, zum anderen konnte die Rolle des antimikrobiellen Peptids für die Aufrechterhaltung der Hautbarriere bei Hautinfektionen demonstriert werden.

MRSA ist ein ubiquitär vorkommender, pathogener Keim, der multiple Antibiotika-Resistenzen aufweist. Er ist von besonderer klinischer Bedeutung wegen seiner Häufigkeit als Infektionserreger und seiner Resistenz gegenüber β -Lactam Antibiotika und anderen Chemotherapeutika [136, 137]. Studien zeigen, dass bis zu 50% der Erwachsenen sporadische oder persistierende Infektionen mit MRSA aufweisen [138]. Eine Kolonisierung des Nasenvorhofs oder der perianalen Haut mit *S. aureus* findet sich immer häufiger bei einzelnen Personen, außerdem ist eine weitere Ausbreitung von MRSA auf andere Hautareale möglich [139, 140]. Die von MRSA verursachten Erkrankungen reichen von Haut- und Muskelinfektionen, bis zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie nosokomiale Pneumonie und Endokarditis, sowie Sepsis [139].

In entzündlichen Veränderungen der Haut konnte nach Kontakt mit *Staph aureus* bereits eine verstärkte Genexpression von hBD-2 in den Keratinozyten gezeigt werden [141]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die hBD2-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Infektionen der Haut im Vergleich zu gesunden Probanden mittels ELISA bestimmt.

Dafür wurden vier Patientengruppen miteinander verglichen - in der Gruppe 1 und 2 wurden MRSA- positive Patienten eingeschlossen, die zwei weiteren (gesunde Mitarbeitern des Universitätsklinikums Regensburg und nicht erkrankte Kontaktpersonen der jeweiligen Patienten) wurden als Kontrollgruppen definiert. Eine zusätzliche Unterscheidung erfolgte nach der Integrität der Hautbarriere – die Seren von den MRSA-positiven Patienten mit Hautulzera wurden mit denen von den Patienten mit intaktem Integument verglichen. Bei den gesunden Probanden und den Kontaktpersonen der MRSA-positiven Patienten konnten ähnlich hohe Konzentrationen an hBD2 gemessen werden. Somit scheint der Kontakt zu den in den ersten zwei Gruppen eingeschlossenen Patienten keine Rolle für die hBD2-Expression zu spielen. Bei den MRSA- Patienten ohne Hautulzera war keine hBD2- Hochregulation im Vergleich zu den Kontrollgruppen festzustellen. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Patienten mit Hautulzera deutlich höhere hBD2 - Serumspiegel als bei den Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis unterstützt die Tatsache, dass der Kontakt mit pathogenen Keimen bei intakter epidermaler Barriere nicht oder sehr selten zu Infektionen führt [140].

4.2 Nachweis von hBD2 und hBD3 im Serum von knochenmarktransplantierten Patienten

Die Bedeutung der β -Defensine für die Pathogenese von soliden Tumoren ist bereits in zahlreichen Studien untersucht worden. So findet sich beispielsweise eine erhöhte hBD1-Expression in Nierenzellkarzinomen [142]. Ferner haben immunhistochemische Analysen ergeben, dass alle Adenocarcinome der Lunge, unabhängig von ihrer histologischen Zuordnung, hBD2 Peptide exprimieren. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen dem Grading der Tumore und der hBD2- Konzentration festgestellt werden – niedrig differenzierte Adenokarzinome zeigten eine signifikant niedrigere Zahl hBD2 exprimierender Zellen als mäßig differenzierte Tumore [143]. Weiterhin konnte eine signifikant erhöhte hBD3-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) mit positiver Korrelation zwischen der hBD3 Konzentration und dem Auftreten von lymphogenen Metastasen beobachtet werden [144, 145].

Während die Rolle von hBD2 und hBD3 für solide Tumore gut untersucht ist, ist die Bedeutung der beiden humanen β -Defensine für hämatologische Neoplasien bis jetzt in der Literatur kaum beschrieben. Diese Fragestellung wurde bislang nur im Mausmodell diskutiert. So konnten Xu et al. zeigen, dass Maus β -Defensin 2 (mBD2) in Kombination mit IL-18 einen Antileukämie-Effekt bewirkt [146]. Das Defensin fungiert als Ligand des toll like receptor 4 (TLR4) und kann durch dessen Aktivierung eine Maturation von Dendritischen Zellen (DC) bewirken [146]. Dies ist in so fern von Bedeutung, da die Maturationshemmung von DCs im immunologischen Milieu von Neoplasien als ein wichtiger Grund für das Ausbleiben einer effektiven Anti-Tumor-Immunantwort gesehen wird [147]. Somit könnten Defensine dieser Maturationshemmung entgegenwirken. Weiterhin zeigte sich in den Untersuchungen von Xu et al. eine verstärkte IL12 und IFN- γ Produktion bei den mit mBD2 transfizierten Zellen. IFN- γ führt zu einer M1-Polarisation von Makrophagen, während IL-12 zu den Effektorzytokinen von M1-Makrophagen gehört [148]. Da in Tumoren häufig M2 polarisierte, Toleranz induzierende Makrophagen vorherrschen, hätte eine Veränderung in Richtung M1 wahrscheinlich positive Effekte auf die Tumorimmunologie [149, 150].

In dieser Arbeit wurden die hBD2- und hBD3-Konzentrationen im Humanserum von 21 Patienten mit verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen wie AML (10 Patienten), ALL (1 Patient), CML (2 Patienten), Plasmozytom (6 Patienten), Follikuläres Lymphom (1 Patient) und MDS (1 Patient) mittels ELISA bestimmt. Allen Patienten war der Zustand nach einer therapeutischen allogenen Knochenmarktransplantation (KmT) gemeinsam.

Die allogene KMT ist eine intensive und potente Therapiemethode bei hämatologischen Malignomen [151]. Dabei ist der wesentliche Limitationsfaktor die Häufigkeit des Auftretens einer akuten Graft-versus-Host-Reaktion (GvH-Reaktion) [152]. Ursache der akuten GVHD ist eine komplexe Interaktion zwischen den Immunzellen des Empfängers und des Spenders [152]. Im Jahre 1966 formulierten Billingham et al. drei Voraussetzungen für das Auftreten einer GvHD: 1. Die Anwesenheit von immunkompetenten Zellen im Transplantat, 2. die Unfähigkeit des Empfängers diese Zellen abzustoßen und 3. unterschiedliche Histokompatibilitätsantigene zwischen Spender und Empfänger [152, 153]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass von den erwähnten immunkompetenten

Zellen des Spenders vor allem T-Zellen und antigen-präsentierende Zellen (APCs) von Bedeutung sind. Antigene des Empfängers (MHC Strukturen und Peptide) werden über die verschiedenen APCs den T-Zellen des Spenders präsentiert und führen so zu deren Aktivierung und der Einleitung einer Immunantwort der Zellen des Spenders gegen den Empfänger und damit einer akuten GVHD [152]. Letztendlich handelt es sich also bei den Vorgängen, die zum Auftreten einer akuten GVHD führen, um die gleichen Vorgänge, die jeder adaptiven Immunantwort zugrundeliegen [152]. Die Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung und damit Chronifizierung einer GVHD führen, sind bis heute größtenteils unbekannt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt. Bei Gruppe 1 kam es nach der allogenen KmTX zu einer GvH-Reaktion, während bei Gruppe 2 diese Komplikation nicht zu beobachten war.

In der Patientengruppe 1 (ohne GvH-Reaktion) zeigte sich zunächst ein Anstieg der hBD2 Werte von $156,89 \pm 55,94$ pg/ml 8 Tage vor der Transplantation (d-8) auf $207,96 \pm 96,42$ pg/ml am Tag der Transplantation (d0). Daraufhin kam es vom Tag d0 bis zum Zeitpunkt einer Woche nach KmTX (d+7) zu einem signifikanten ($p=0,0172$) Rückgang der hBD2 Konzentration im Serum auf $115,73 \pm 30,38$ pg/ml (siehe Abb.3). Im weiteren Beobachtungszeitraum blieben die hBD2-Konzentrationen annähernd konstant, es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den gemessenen hBD2-Konzentrationen am Tag d+7, d+14 und d+21.

Bei den Patienten mit GvH-Reaktion (Patientengruppe 2) fand sich bei der hBD2-Konzentrationsbestimmung eine ähnliche Verteilung der hBD2-Spiegel im zeitlichen Verlauf wie in der ersten Patientengruppe (ohne GvHD). Auch hier zeigten sich am Tag der allogenen Knochenmarktransplantation (d 0) die höchsten hBD2-Konzentrationen im Blutserum der Patienten, welche im Verlauf der ersten Woche bis zum Tag d7 abfielen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also in beiden Patientengruppen (mit und ohne GvH-Reaktion) nach einem initialen Anstieg am Tag der KmTX einen Rückgang der hBD2-Werte in der frühen Phase nach der Transplantation. Ob das am Tag d0 gemessene erhöhte hBD2 von Zellen des Spenders oder des Empfängers gebildet wird, ist weiterhin unbekannt. Es ist vorstellbar, dass immunkompetente Zellen im Transplantat eine hBD2 Produktion und damit die Serumkonzentration erhöhen. Außerdem ist denkbar, dass Zellen des Empfängers durch die Interaktion mit dem allogegenen Transplantat zur hBD2 Produktion veranlasst werden.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten keinen Unterschied im Verlauf der hBD2-Konzentration zwischen Patientengruppe 1 und Patientengruppe 2 feststellen. Es kommt also unabhängig vom Auftreten einer GvHD nach einem initialen hBD2 Anstieg am Tag d0 zu einem Rückgang der hBD2- Konzentration im Serum bis zum Tag d+7. Im untersuchten Patientenkollektiv konnten keine Hinweise dafür gefunden werden, dass die hBD2-Konzentration als prognostischer bzw. prädiktiver Faktor für das Auftreten einer GvHD herangezogen werden kann.

Im Gegensatz zu hBD2 zeigte sich bei hBD3 kein signifikanter Zusammenhang zwischen den gemessenen Serumwerten und dem Untersuchungszeitraum. Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 1 (mit GvH-Reaktion) und der Gruppe 2 (ohne GvH-Reaktion). Die KMT führte also im untersuchten Patientenkollektiv zu keiner Veränderung der hBD3 Konzentration im Serum.

Anhand der aktuellen Daten wird deutlich, dass die Wirkung der humanen Defensine im malignen Kontext genauer untersucht werden muss.

4.3 Nachweis von hBD2 und hBD3 im Serum bei bronchopulmonalen Infekten

Von respiratorischen Epithelzellen gebildete humane β -Defensine können zum einen Pathogene direkt inaktivieren, zum anderen als chemotaktische Faktoren verscheidene Immunzellen, wie etwa T-Zellen oder Dendritische Zellen rekrutieren. [5, 14]. β -Defensine haben das Potential, eine Infektion in ihrem Beginn zu verhindern, ohne dass dazu eine gewebeschädigende Entzündungsreaktion erforderlich wäre, was bei inhalierten Pathogenen, die schnell und effektiv unschädlich gemacht werden müssen, von besonderer Bedeutung ist [91].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die hBD2- und hBD3-Konzentrationen im Serum einer 42-jährigen Patientin, die an rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten leidet, bestimmt werden. Die Messung erfolgte mittels ELISA und ergab eine hBD2-

Serumkonzentration von $101,03 \pm 12,59$ pg/ml. Die Einschätzung dieses Wertes im Vergleich zu einem Normwert für die hBD2-Konzentration im Humanserum hat sich als ausgesprochen schwierig erwiesen, da die gemessenen hBD2-Werte in allen bisher publizierten Studien stark voneinander abweichen. So zeigte sich in einer aktuellen Studie, die die hBD2 Konzentration im Sputum von Patienten mit einer community acquired pneumonia (CAP) untersuchte, eine mittlere hBD2 Konzentration von 189 pg/ml. Das Alter der Patienten, ihr Rauchverhalten oder ihr Ernährungsstatus hatten keinen Einfluss auf die gemessenen Defensinwerte [133]. In einer Studie von Jansen et al. wurden vergleichbare hBD2-Serumkonzentrationen (von 210 ± 170 pg/ml) bei gesunden Probanden gemessen [154]. Andere Studien von Lippross et al. bzw. Hiratsuka et al. sahen $0,93 \pm 0,53$ ng/ml bzw. $47,6 \pm 52$ pg/ml als Normwert im Serum an, so dass einheitliche Normwerte für hBD2 im Humanserum fehlen [122, 155].

Aus diesem Grund wurden zum Vergleich die hBD2-Werte der beiden Kinder der Patientin gemessen, die keine vergleichbare Symptomatik zeigten. Dabei fanden sich bei den Kindern mit $171,1 \pm 40,71$ pg/ml bzw. $228,1 \pm 30,75$ pg/ml eine signifikant höhere hBD2-Serumkonzentration als bei ihrer Mutter.

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung von hBD3 im Serum der Familie. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hBD2-Messung zeigte sich hier mit $4154,86 \pm 66,59$ pg/ml bei der Patientin der höchste Wert. Die hBD3-Konzentrationen der Kinder lagen mit $1163,25 \pm 26,11$ pg/ml bzw. $2143,5 \pm 77,83$ pg/ml signifikant niedriger. Auch hier war die Festlegung eines Normwertes der Serumkonzentration aus der bis jetzt erschienenen Literatur kaum möglich.

Eine mögliche Hypothese für die Unterscheide in den gemessenen hBD2- und hBD3-Konzentrationen bei der Familie könnte in der unterschiedlichen Zahl der Genkopien der entsprechenden Defensine liegen. Es ist aus früheren Studien bekannt, dass die Genkopiezahlen mit der Menge an gebildetem α -Defensin korrelieren [91]. Die Beobachtung, dass hBD2 in der Lunge die höchsten Expressionswerte zeigt [91], unterstützt die Hypothese, dass die niedrigen hBD2 Werte bei der in dieser Arbeit untersuchten Patientin ihre erhöhte pulmonale Infektanfälligkeit mit bedingen.

Insgesamt ist das vorhandene Wissen über die Defensine und insbesondere ihre Bedeutung für die Pathogenese der verschiedenen Lungenerkrankungen nicht ausreichend, um die Bedeutung der gemessenen hBD2 und hBD3 Konzentrationen abschließend zu werten. Auch ist die Frage bis jetzt ungeklärt, ob bei Verdacht auf

einen bestimmten Defensinmangel die basale Konzentration dieses Defensins im Alveolarsekret bzw. Serum zu messen ist, oder ob vielmehr die möglicherweise inadäquate Hochregulation von Defensinen unter inflammatorischen Stimuli von pathophysiologischer Bedeutung ist. Dies ist insofern wichtig, da bekannt ist, dass die Defensinexpression durch Stimulation der Zellen mit bestimmten Pathogenen oder Zytokinen deutlich hochreguliert werden kann [91].

4.4 Einfluss von proinflammatorischen Substanzen auf die Expression von hBD2 auf Promotorebene

Mit Hilfe des Luciferase Reporteren-Assays sollte die Aktivierung des hBD2-Promotors und damit die Induktion der hBD2 Genexpression durch unterschiedliche Stimuli untersucht werden. Dazu wurden mit dem hBD2-Promotor/Firefly Luciferase Reporter Vektorkonstrukt stabil transfizierte HEK-293 Zellen mit unterschiedlichen proinflammatorischen Substanzen stimuliert. Hierfür wurden Peptidoglykan (PG), Lipopolysaccharid (LPS), Muramylpeptid (MDP), Pam3Cys und Zymosan verwendet.

Das Muramyl-Dipeptid (MDP) ist ein Bestandteil von Peptidoglykanen der bakteriellen Zellwand vor allem von Gram-positiven Bakterien [156]. MDP kann den zytoplasmatisch exprimierten NOD2 Rezeptor verschiedener Zellen aktivieren [156]. Durch eine NOD2-Aktivierung wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B angeregt, welcher wiederum unter anderem die Transkription von antimikrobiellen Peptiden regulieren kann [156, 157]. So fanden sich beispielsweise bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, bei denen eine Mutation im NOD2 Gen nachgewiesen werden konnte, stark erniedrigte alpha-Defensin Konzentrationen [157]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Expression von Human neutrophil peptide 1 (HNP1) in humanen Colon Epithelzellen durch MDP induziert werden kann [156]. Dabei war die Sekretionssteigerung von HNP1 an die Expression des NOD2 Rezeptors in den stimulierten Zellen gebunden [156].

Bei den in dieser Arbeit untersuchten HEK-293 Zellen führte die Stimulation mit MDP in einer Konzentration von 50 µg/ml zu der stärksten hBD2 Expressionssteigerung im Vergleich zu allen angesetzten Stimuli. Die Luciferase Aktivität steigerte sich in den im Rahmen der Arbeit durchgeföhrten Untersuchungen von $179 \text{ rlu} \times \text{s}^{-1}$ bei den unstimulierten HEK-293 Zellen auf $1012 \text{ rlu} \times \text{s}^{-1}$ nach Stimulation mit MDP. Analog zu diesen Ergebnissen konnte auch in anderen Studien gezeigt werden, dass eine Stimulation durch MDP zu einer NOD2 vermittelten Steigerung der Transkription des hBD2 Gens führt [99].

Die Ergebnisse zeigen, dass sich HEK-Zellen als Reporterzellen zum Nachweis der NOD2-induzierten hBD2-Promotoraktivität eignen.

Peptidoglykane sind immunogene Bestandteile der Zellwand, vor allem von Gram-positiven Bakterien. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Pleura Mesothelzellen durch eine Stimulation mit Peptidoglykanen des Gram- positiven Bakteriums *Staphylokokkus aureus* zu einer verstärkten mBD2 Sekretion angeregt werden konnten [158]. Diese PG indizierte mBD2 Sekretionssteigerung konnte durch eine Blockade der TLR-2 Expression durch die entsprechende si-RNA verhindert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass PG zu einer TLR-2 vermittelten Steigerung der mBD2 Expression führt [158].

Die Luciferase Aktivität als Maß für die hBD2-Expression steigerte sich in den hier durchgeföhrten Untersuchungen von $179 \text{ rlu} \times \text{s}^{-1}$ bei den unstimulierten HEK-293 Zellen auf $211 \text{ rlu} \times \text{s}^{-1}$ bei Stimulation mit PG. Interessant ist dabei, dass MDP, welches einen Bestandteil der Peptidoglykane darstellt, zu einer stärkeren hBD2 Expressionssteigerung führt als die alleinige Stimulation mit Peptidoglykanen. Diese Tatsache lässt sich eventuell mit einer unterschiedlichen Aktivierung der untersuchten Zellen erklären. Während bei PG von einer Aktivierung des TLR-2 ausgegangen werden kann [158], führt MDP zu einer Aktivierung des intrazellulären NOD2 Rezeptors [99, 156].

Zymosan besteht hauptsächlich aus Polysacchariden und ist ein Bestandteil der Zellwand von Hefen. Es führt durch Aktivierung des TLR-2 von Immunzellen zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen [159].

Zymosan in einer Konzentration von 10 µg/ml führte bei den in dieser Arbeit untersuchten HEK-293 Zellen nur zu einer schwachen hBD2 Expressionssteigerung. So steigerte sich die Luciferase Aktivität von 179 rlu x s⁻¹ bei den unstimulierten Zellen auf 239 rlu x s⁻¹ bei Stimulation mit Zymosan.

Pam3Cys ist ein synthetisches Analogon von bakteriellen Lipopeptiden. In Versuchen mit humanen Kornea Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit Pam3Cys in einer Konzentration von 10 µg/ml zu einer Hochregulation der hBD2 Expression führt, die mit der hBD2 Expressionssteigerung durch *S. aureus* vergleichbar ist [160]. Eine Steigerung der Bildung von hBD1 und hBD3 konnte jedoch nicht beobachtet werden [160]. Eine Behandlung der untersuchten Zellen mit einem TLR-2 neutralisierenden Antikörper oder einem NF-κB Antagonisten führte zu einem signifikanten Rückgang der Pam3Cys induzierten hBD2 Expressionssteigerung [160]. Somit scheint der TLR-2 – NF-κB Signalweg für die Pam3Cys induzierte hBD2 Expressionssteigerung eine wichtige Rolle zu spielen. Interessanterweise konnte bei den in diesem Versuch untersuchten HEK-293 Zellen durch die Stimulation mit Pam3Cys in einer Konzentration von 1 µg/ml keine hBD2 Expressionssteigerung hervorgerufen werden. Die Luciferase Aktivität sank sogar von 179 rlu x s⁻¹ bei den unstimulierten HEK-293 Zellen auf 145 rlu x s⁻¹ nach Stimulation mit Pam3Cys. Ob die aubleibende hBD2 Expressionssteigerung im Zusammenhang mit der eingesetzten Pam3Cys Konzentration steht, oder ob andere Faktoren dafür verantwortlich sind, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

LPS ist einer der am meisten untersuchten immunogenen Bestandteile von Bakterien. Seine pathophysiologische Bedeutung wird besonders beim Krankheitsbild der Sepsis durch Gram- Erreger deutlich [161]. LPS besteht aus drei Teilen und ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Wand Gram- Bakterien [161]. An der Stimulation von Säuger-Zellen durch LPS sind zahlreiche Moleküle beteiligt. So erleichtert das lösliche LPS binding protein (LBP) die Anlagerung von LPS an den CD14 Rezeptor [161]. CD14 wiederum erleichtert die Assoziation von LPS mit dem TLR-4/MD-2 Rezeptorkomplex. Schließlich erfolgt über TLR4 die Signaltransduktion in die Zelle und damit unter anderem die Aktivierung von NF-κB [161]. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an HEK-293 Zellen steigerte

sich die Luciferase Aktivität, als Maß für die hBD2 Expression, von 145 rlu x s⁻¹ bei den unstimulierten Zellen auf 542 rlu x s⁻¹ bei Stimulation mit LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml.

Dies korreliert mit den Ergebnissen einer früheren Studie, die zeigt, dass eine *in vitro* Stimulation von humanen Keratinozyten durch LPS zu einer Hochregulation der hBD2 m-RNA Expression führt, die Expression von hBD1 und hBD3 aber unverändert bleibt [162]. Eine Steigerung der hBD2 Sekretion als Reaktion auf den Kontakt mit Gram- Erregern ist auch *in vivo* ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunreaktion, um die Integrität der epithelialen Barriere gegenüber bakteriellen Eindringlingen zu gewährleisten.

4.5 Einfluss von verschiedenen Bakterien auf die Expression von hBD2 auf Promotorebene

Neben der Stimulation mit proinflammatorischen mikrobiellen Bestandteilen wurden die transfizierten HEK-293 Zellen zusätzlich mit bakteriellen Lysaten inkubiert. Dabei wurden Lysate von *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Neisseria lactamica* (DSM 4691), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

Nach Zugabe des jeweiligen Lysates in das Kulturmedium wurde mit Hilfe eines Reportergen-Assays die Luciferaseaktivität als Maß für die hBD2 Transkription gemessen.

4.5.1 Gram-negative Bakterien

Folgende Gram-negative Bakterien kamen zum Einsatz: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Neisseria lactamica*.

Die Stimulierung der transfizierten HEK-293 Zellen mit 5 µl *Pseudomonas aeruginosa* Lysat/Well führte zu der größten in diesem Versuch gemessenen Steigerung (3-fach) der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

(p=0,057). *Pseudomonas aeruginosa* ist ein wichtiger pathogener Vertreter der Familie der Pseudomonaden. Dies sind obligat aerobe, Gram-negative Stäbchenbakterien, die fast immer beweglich sind. Neben der Otitis externa, Harnwegs- und Atemwegsinfektionen sind vor allem nosokomiale Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* medizinisch relevant [163].

Interessanterweise ließ sich nach Inkubation mit dem doppelten Volumen Lysat (10 μ l/Well) des gleichen Bakteriums lediglich eine 1,9-fache Steigerung der Luciferaseaktivität und damit eine schwächere Induktion der Reportergen-Expression feststellen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in einem Überschuss an Ligand liegen, der zu einer Desensibilisierung des entsprechenden Rezeptors führt, so dass dieser nicht mehr so effektiv aktiviert werden kann.

Erhöht zeigte sich die Luciferaseaktivität auch nach der Inkubation der Zellen mit *Escherichia coli* Lysat. Die Gattung Escherichia mit seinem bekanntesten Vertreter *Escherichia coli* gehört zur Bakterienfamilie der Enterobacteriaceae. Dies sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. *Escherichia coli* ist peritrich begeißelt und dadurch auch beweglich. Klinisch bedeutend ist vor allem die Stellung von *E. coli* als häufigster Erreger nosokomialer Infektionen [163].

Nach Inkubation der HEK-Zellen mit *Escherichia coli* zeigte sich die hBD2 Expressionssteigerung dosisabhängig. So führte die Stimulierung mit 1 μ l/Well *E.coli* zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität um 114% des Ausgangswertes (unstimulierte Kontrolle), bei 5 μ l/Well waren das 141%, während es bei 10 μ l/Well *E.coli* beinahe zu einer Verdoppelung des Wertes mit 190% auf eine Aktivität von 11653 rlu x s⁻¹ kam.

Lysat des Bakteriums *Neisseria lactamica* führte bei den transfizierten HEK-293 Zellen nur zu einer schwächeren Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zu den anderen Gram-negativen Bakterienstämmen.

Neisseria lactamica gehört zur Bakteriengattung der Neisserien. Dies sind Garm-positive, aerobe Kokken. *Neisseria lactamica* ist Teil der physiologischen Flora des Nasopharynx und ist nur fakultativ pathogen [163]. Dabei lagen die Luciferase-Werte sowohl bei 5 μ *Neisseria lactamica* Lysat/Well mit 7079 rlu x s⁻¹, als auch bei 10 μ l des Bakteriumlysats/Well mit 8046 rlu x s⁻¹ höher als die der unstimulierten Kontrolle.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung der transfizierten HEK-293 Zellen mit den Lysaten aus allen eingesetzten Gram-negativen Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Neisseria lactamica*) zu einer Steigerung der Reportergen-Aktivität führte. Diese im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle erhöhte Luciferase-Aktivität konnte nach der Inkubation mit den Bakterienlysaten in allen in diesem Versuch getesteten Konzentrationen erzielt werden. In den meisten Versuchen zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Luciferase-Aktivität.

4.5.2 Gram-positive Bakterien

Um den Effekt einer Stimulierung mit Gram-positiven Bakterien auf die Induktion der hBD2-Promotoraktivität zu überprüfen, wurden die transfizierten HEK-293 Zellen mit Lysaten aus *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Bacillus subtilis* inkubiert.

Während die Stimulierung der HEK-293 Zellen mit den Gram-negativen *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Neisseria lactamica* zu einer erhöhten Induktion der hBD2-Promotoraktivität führte, konnte nach der Inkubation mit den Gram-positiven *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis* in den behandelten Zellen keine verstärkte Promotoraktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen werden.

Enterokokken sind Gram-positive Streptokokken. *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* machen unter physiologischen Bedingungen etwa 50% der aeroben humanen Darmflora aus. Enterokokken sind häufig an Harnwegsinfektionen beteiligt und zeigen eine breite natürliche Resistenz gegenüber Antibiotika aus den Klassen der Penicilline und Cephalosporine [163].

Staphylokokken sind Gram-positive Kokken, die sich aufgrund ihrer Unbeweglichkeit in Haufen anordnen. Unterteilt werden diese klinisch hochrelevanten Bakterien in koagulasepositive und koagulasenegative Spezies. *Staphylokokkus aureus* ist der wichtigste koagulasepositive Vertreter der Staphylokokken. Neben lokalen Hautinfektionen, Osteomyelitiden und Infektionen der inneren Organe kommen auch diverse, durch Toxine der Staphylokokken verursachte Erkrankungen vor. Außerdem

spielen noskomiale Infektionen mit *Staphylokokkus aureus* eine wichtige klinische Rolle [163].

Der Effekt der Stimulierung der HEK-293 Zellen mit *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis* zeigte sich in diesem Versuch in allen getesteten Bakterien-Konzentrationen annähernd gleich niedrig, so dass hier kein Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge der Bakterienlysate und der Reportergen-Aktivität gefunden wurde.

Lediglich die Stimulierung der HEK-293 Zellen mit Lysat von *Bacillus subtilis* beeinflusste die hBD2-Promotor-vermittelte Luciferaseaktivität und führte zu einem schwachen Anstieg (in einer Konzentration von 5 µl/Well um 117% der Kontrolle, in einer Konzentration von 10 µl/Well um 187% der Kontrolle ($p=0,057$)). *Bacillus subtilis* ist ein Vertreter der Bakteriengattung der Bazillen. Dabei handelt es sich um ubiquitär vorkommende, aerobe, Endosporen bildende Stäbchenbakterien, die sich in der Gram-Färbung meist positiv darstellen. Bis auf den obligat pathogenen *Bacillus anthracis* handelt es sich bei den Bazillen um für den Menschen fakultativ pathogene Erreger [163].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vor allem die Lysate Gram-negativer Bakterien einen dosisabhängigen, stimulierenden Effekt auf die Aktivität des hBD2 Promoters und somit auch auf die hBD2 Transkription haben. Eine mögliche Ursache dafür könnte im Lipopolysaccharid (LPS) als Bestandteil der Gram-negativen Bakterien liegen. LPS ist eine wichtige Komponente der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und einer der am besten untersuchten immunogenen bakteriellen Bestandteile [161].

Von den zahlreichen Rezeptoren, die LPS binden können, wird dem membranständigen TLR-4 die größte Bedeutung zugeschrieben. Unter LPS Bindung ist TLR-4 in der Lage, zu Oligomerisieren und eine intrazelluläre Signaltransduktion zu initiieren. Dadurch kommt es unter anderem zur Aktivierung von NF-κB [161]. NF-κB ist wiederum essentiell für die Regulation der Transkription von hBD2 [68]. TLR-4 kommt neben Immunzellen auch auf epithelialen Zellen vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der epithelialen Barriere gegenüber bakteriellen Infektionen [145]. Da TLR-4 neben LPS auch durch endogenes hBD2 aktiviert werden kann [161], erscheint hier auch eine endogene positive Feedback

Schleife vorstellbar. Dass LPS *in vitro* die hBD2 m-RNA Expression erhöht, ist bereits bekannt [162]. Außerdem kann die hBD3 Expression epithelialer Zellen *in vitro* durch LPS Stimulation gesteigert werden [145].

5 **Ausblick: mögliche therapeutische Bedeutung von antimikrobiellen Peptiden**

Aufgrund der zunehmenden Problematik von Antibiotikaresistenzen und multiresistenten Krankheitserregern stellt sich die Frage nach alternativen antibiotischen Substanzen. Defensine haben ein sehr breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität und zeigen auch bei antibiotikaresistenten Erregern Wirkung. Zusätzlich zeigen Defensine auch eine Wirksamkeit gegen Viren und Pilze [1, 5, 14]. Es wäre vorstellbar, durch relativ kleine Modifikationen an synthetisch erzeugten Defensinen ihre Aktivität weiter zu steigern [91]. Eine mögliche Limitation des therapeutischen Einsatzes der Defensine stellen jedoch ihre chemotaktischen und proinflammatorischen Wirkungen dar [91]. Auch konnte eine direkte cytotoxische Wirkung von Defensinen in hoher Konzentration beschrieben werden, die eventuell die therapeutische Dosis limitieren könnte [91]. Weiterhin müsste die Frage geklärt werden, ob eine systemisch Applikation möglich ist, oder ob eine lokale, eventuell inhalative Anwendung zu bevorzugen ist [91].

Gerade in Regionen der Welt mit unzureichender medizinischer Versorgung und einem Mangel an hochspezialisierten diagnostischen Möglichkeiten wäre ein Präparat, das gegen bakterielle und virale Infektionen gleichzeitig Wirkung zeigt, von besonderem Interesse. Solche Teile der Welt sind gekennzeichnet von einem hohen Einfluss der Infektionskrankheiten auf die Morbidität und Mortalität der Bevölkerung. Deswegen sollte der Suche nach neuen antiinfektiösen Wirkstoffen ein höherer Stellenwert beigemessen werden. Die Erforschung der genauen Wirkungsweise der Defensine dient somit nicht nur der immunologischen Grundlagenforschung, sondern könnte in mittlerer Zukunft auch neue Medikamente im Kampf gegen Infektionskrankheiten hervorbringen.

6 Zusammenfassung

Die humanen β -Defensine hBD2 und hBD3 spielen als antimikrobielle Peptide eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen. Das Wirkspektrum von den beiden Defensinen umfasst zahlreiche Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Weiterhin ist ihnen die Eigenschaft der Chemotaxis sowie der Induktion gemeinsam. hBD2 und hBD3 werden außerdem in Verbindung mit mehreren klinisch relevanten Erkrankungen gebracht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Rolle der humanen beta Defensine 2 und 3 im entzündlichen und malignen klinischen Kontext. Um die hBD2- und hBD3-Konzentrationen im Patientenserum genau quantifizieren zu können, erfolgte zunächst die Etablierung von ELISAs für die beiden Defensine.

In diesem Zusammenhang wurden zunächst Messungen der Defensinkonzentrationen im Serum von Patienten mit einer vorliegenden MRSA-Infektion der Haut durchgeführt. Dabei zeigten sich bei Patienten mit tiefen MRSA-positiven Hautulcera im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöhte hBD2 Serum Spiegel.

Zudem wurden die hBD2- und hBD3-Konzentrationen im Serum einer 42-jährigen Patientin, die an rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten leidet, bestimmt. Da einheitliche Normwerte für die Serum Defensinspiegel in der Literatur fehlen, wurden die Serum-Defensinkonzentrationen der Patientin mit denen ihrer Kinder verglichen. Dabei zeigten sich bei der Indexpatientin hochsignifikant niedrigere hBD2- und signifikant höhere hBD3-Spiegel als bei ihren Kindern.

Weiterhin erfolgte die hBD2- und hBD3-Konzentrationsbestimmung im Humanserum von knochenmarktransplantierten Patienten, die verschiedene maligne hämatologische Erkrankungen aufwiesen. Ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal bei der Bestimmung der hBD2- und hBD3-Spiegel war die Entwicklung einer Graft-versus-Host-Reaktion. Dabei konnte nach einem initialen hBD2-Anstieg am Tag der Knochenmarktransplantation ein signifikanter Abfall der Defensinkonzentration in der frühen Phase nach allogener KMTx beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ließen

sich bei der hBD3-Bestimmung keine signifikanten Konzentrationsänderungen im Zusammenhang mit der Transplantation feststellen.

Im Rahmen einer Zellkultur mit stabil transfizierten HEK-293 Zellen (hBD2-Promotor/Firefly Luciferase Reporter Vektorkonstrukt) wurde mit Hilfe eines Luciferase Reporteren-Assays die Wirkung verschiedener proinflammatorischer Stimuli auf die Aktivierung des hBD2 Promotors untersucht. Dabei führten die bakteriellen Bestandteile MDP und LPS zu einer deutlichen Steigerung der Luciferase Aktivität als Maß für die hBD2-Expression, während bei PG, Pam 3 Cys und Zym Aktivitätswerte im Bereich der unstimulierten Kontrollen gemessen wurden.

In einem weiteren Versuch erfolgte die Stimulation der transfizierten HEK-293 Zellen mit Lysaten verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Um festzustellen, inwieweit die eingesetzte Menge der Bakterienlysate eine Rolle bei der Promotoraktivierung spielt, wurden die Bakterienlysate in unterschiedlichen Mengen eingesetzt.

So konnte nach der Stimulierung der HEK-293-Zellen mit Lysaten aus allen eingesetzten Gram-negativen Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Neisseria lactamica*) eine Steigerung der Reporteren-Aktivität dokumentiert werden. Diese im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle erhöhte Luciferase-Aktivität konnte nach der Inkubation mit den Bakterienlysaten in allen in diesem Versuch getesteten Konzentrationen erzielt werden.

Unter allen eingesetzten Gram-positiven Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Enterococcus faecalis*) konnte dagegen nur bei *Bacillus subtilis* Lysat in einer Konzentration von 10 µl/Well eine signifikante Steigerung der hBD2 Expression beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen/mikrobiellen Bestandteilen zu einer Erhöhung der hBD2 und hBD3 Konzentrationen sowohl im Patientenserum, als auch auf Promotorebene führt. Damit konnte die wichtige Rolle der beiden β-Defensine für die adäquate Immunantwort gezeigt werden.

7 Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlgans für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas und die andauernde fachliche und menschliche Unterstützung. Unsere gemeinsamen Besprechungen waren stets produktiv und von konstruktiven Diskussionen begleitet.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Johannes Röhrl für die exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit, die Unterstützung und die Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung der Versuche sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlgans für ihre Hilfe sowie für die angenehme Atmosphäre im Labor bedanken.

Ein großer Dank richtet sich auch an alle Spender, die sich zum Abnehmen von Blut für die Durchführung der ELISAs zur Verfügung gestellt haben.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung aussprechen. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

8 Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielle Peptide
Abb.	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
AP-1	Aktivator Protein 1
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CAP	community acquired pneumonia
CCR6	CC chemokine receptor 6
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CF	cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembran conductance regulator
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	N-(1-(2,3-Dioleyloxy)Propyl)-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate
E. coli	Escherichia coli
E. faecium	Enterococcus faecium
EGF-1	epithelial growth factor 1
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FKS	Fötales Kälberserum
GvH	Graft versus Host
hBD	human beta Defensin
HD	human Defensin
HEK-293	humane embryonale Nierenzelllinie
HIV	human imunodeficiency virus
HNP	human neutrophil peptides
IFN- γ	Interferon gamma
IGF-1	Insulin like growth factor 1

IL	Interleukin
KmTX	Knochenmarktransplantation
LBP	LPS binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
M. Crohn	Morbus Crohn
M. tuberculosis	Mycobakterium tuberculosis
MDP	Muramylpeptid
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MIP-3a	macrophage inflammatory protein 3a
MM	Multiples Myelom
MRSA	Methicillin resistentes Staphylococcus aureus
NF-IL6	nuclear factor Interleukin 6
NF-κ B	nuclear factor "Kappa-light chain-enhancer"
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NOD-2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OSCC	orales Plattenepithelkarzinom
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PG	Peptidoglykan
RNA	Ribonukleinsäure
RTD	rhesus macaque defensins
S. Aureus	Staphylococcus aureus
SD	Standardabweichung
STAT	signal transductor and activator of transcription
TAP	tracheal antimicrobial peptide
TB	Tuberkulose
TGF-α	transforming growth factor alpha
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
VREF	Vancomycin resistentes Enterococcus faecium

9 Literaturverzeichnis

1. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 710-20.
2. Weinberg, A., S. Krisanaprakornkit, and B.A. Dale, *Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications*. Crit Rev Oral Biol Med, 1998. **9**(4): p. 399-414.
3. Bals, R., *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*. Respir Res, 2000. **1**(3): p. 141-50.
4. De Smet, K. and R. Contreras, *Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins*. Biotechnol Lett, 2005. **27**(18): p. 1337-47.
5. Hazlett, L. and M. Wu, *Defensins in innate immunity*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 175-88.
6. Lehrer, R.I. and T. Ganz, *Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(1): p. 23-7.
7. Guani-Guerra, E., et al., *Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease*. Clin Immunol, 2010. **135**(1): p. 1-11.
8. Selsted, M.E. and A.J. Ouellette, *Mammalian defensins in the antimicrobial immune response*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 551-7.
9. Verma, C., et al., *Defensins: antimicrobial peptides for therapeutic development*. Biotechnol J, 2007. **2**(11): p. 1353-9.
10. Lehrer, R.I., *Multispecific myeloid defensins*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(1): p. 16-21.
11. Ganz, T. and R.I. Lehrer, *Defensins*. Pharmacol Ther, 1995. **66**(2): p. 191-205.
12. Yang, D., et al., *Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal*. Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 291-6.
13. Oppenheim, J.J., et al., *Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity*. Ann Rheum Dis, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii17-21.
14. Pazgier, M., et al., *Human beta-defensins*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(11): p. 1294-313.
15. Tang, Y.Q., et al., *A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins*. Science, 1999. **286**(5439): p. 498-502.
16. Tongaonkar, P., et al., *Rhesus macaque theta-defensin isoforms: expression, antimicrobial activities, and demonstration of a prominent role in neutrophil granule microbicidal activities*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(2): p. 283-90.
17. Hollox, E.J., J.A. Armour, and J.C. Barber, *Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(3): p. 591-600.
18. Schutte, B.C., et al., *Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2129-33.
19. Lehrer, R.I., et al., *Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity*. J Clin Invest, 1989. **84**(2): p. 553-61.
20. Hoover, D.M., et al., *The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32911-8.
21. Lehrer, R.I., *Primate defensins*. Nature Reviews Microbiology, 2004. **2**(9): p. 727-738.

22. Yang, D., et al., *Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 181-215.

23. Harder, J., R. Glaser, and J.M. Schroder, *Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity*. J Endotoxin Res, 2007. **13**(6): p. 317-38.

24. Quinn, K., et al., *Human neutrophil peptides: a novel potential mediator of inflammatory cardiovascular diseases*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(5): p. H1817-24.

25. Agerberth, B., et al., *The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3086-93.

26. Droin, N., et al., *Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules*. J Proteomics, 2009. **72**(6): p. 918-27.

27. Svinarich, D.M., R. Gomez, and R. Romero, *Detection of human defensins in the placenta*. Am J Reprod Immunol, 1997. **38**(4): p. 252-5.

28. Jones, D.E. and C.L. Bevins, *Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene*. J Biol Chem, 1992. **267**(32): p. 23216-25.

29. Cunliffe, R.N., *Alpha-defensins in the gastrointestinal tract*. Mol Immunol, 2003. **40**(7): p. 463-7.

30. Wehkamp, J., et al., *Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues*. FEBS Lett, 2006. **580**(22): p. 5344-50.

31. Ayabe, T., et al., *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 113-8.

32. Erickson, B., et al., *Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(1): p. 269-75.

33. Sharma, S., I. Verma, and G.K. Khuller, *Therapeutic potential of human neutrophil peptide 1 against experimental tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(2): p. 639-40.

34. Klotman, M.E. and T.L. Chang, *Defensins in innate antiviral immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 447-56.

35. Chang, T.L., et al., *Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 765-73.

36. Buck, C.B., et al., *Human alpha-defensins block papillomavirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1516-21.

37. Kim, C., et al., *Human alpha-defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(13): p. 4830-5.

38. Tanaka, T., et al., *Parasiticidal activity of human alpha-defensin-5 against Toxoplasma gondii*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(6): p. 560-5.

39. Madison, M.N., et al., *Human defensin alpha-1 causes Trypanosoma cruzi membrane pore formation and induces DNA fragmentation, which leads to trypanosome destruction*. Infect Immun, 2007. **75**(10): p. 4780-91.

40. Diamond, G., et al., *Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3952-6.

41. Bensch, K.W., et al., *hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma*. FEBS Lett, 1995. **368**(2): p. 331-5.

42. Harder, J., et al., *A peptide antibiotic from human skin*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 861.

43. Garcia, J.R., et al., *Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction*. Cell Tissue Res, 2001. **306**(2): p. 257-64.

44. Garcia, J.R., et al., *Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity*. FASEB J, 2001. **15**(10): p. 1819-21.

45. Dhople, V., A. Krukemeyer, and A. Ramamoorthy, *The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(9): p. 1499-512.

46. Goldman, M.J., et al., *Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis*. Cell, 1997. **88**(4): p. 553-60.

47. Singh, P.K., et al., *Production of beta-defensins by human airway epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14961-6.

48. Schroder, J.M. and J. Harder, *Human beta-defensin-2*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(6): p. 645-51.

49. Harder, J., et al., *Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5707-13.

50. Jia, H.P., et al., *Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 211-8.

51. Bals, R., et al., *Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung*. J Clin Invest, 1998. **102**(5): p. 874-80.

52. Dunsche, A., et al., *Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues*. J Oral Pathol Med, 2001. **30**(3): p. 154-8.

53. Haynes, R.J., P.J. Tighe, and H.S. Dua, *Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface*. Br J Ophthalmol, 1999. **83**(6): p. 737-41.

54. Hattenbach, L.O., H. Gumbel, and S. Kippenberger, *Identification of beta-defensins in human conjunctiva*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(12): p. 3332.

55. Hao, H.N., et al., *Induction of human beta-defensin-2 expression in human astrocytes by lipopolysaccharide and cytokines*. J Neurochem, 2001. **77**(4): p. 1027-35.

56. Schneider, J.J., et al., *Human defensins*. J Mol Med (Berl), 2005. **83**(8): p. 587-95.

57. Maisetta, G., et al., *In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(2): p. 806-9.

58. Lee, H.Y., et al., *Antimicrobial activity of innate immune molecules against Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis and nontypeable Haemophilus influenzae*. BMC Infect Dis, 2004. **4**: p. 12.

59. Routsias, J.G., et al., *In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains*. Peptides, 2010. **31**(9): p. 1654-60.

60. Kluver, E., et al., *Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity*. Biochemistry, 2005. **44**(28): p. 9804-16.

61. Harder, J., et al., *Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(6): p. 714-21.
62. Jung, S., et al., *Human beta-defensin 2 and beta-defensin 3 chimeric peptides reveal the structural basis of the pathogen specificity of their parent molecules*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(3): p. 954-60.
63. Quinones-Mateu, M.E., et al., *Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication*. AIDS, 2003. **17**(16): p. F39-48.
64. Sun, L., et al., *Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14318-29.
65. Weinberg, A., M.E. Quinones-Mateu, and M.M. Lederman, *Role of human beta-defensins in HIV infection*. Adv Dent Res, 2006. **19**(1): p. 42-8.
66. Feng, Z., et al., *Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by Candida albicans*. J Dent Res, 2005. **84**(5): p. 445-50.
67. Joly, S., et al., *Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes*. Mol Immunol, 2005. **42**(9): p. 1073-84.
68. Tsutsumi-Ishii, Y. and I. Nagaoka, *NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(1): p. 154-62.
69. Schutte, B.C. and P.B. McCray, Jr., *[beta]-defensins in lung host defense*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 709-48.
70. Fang, X.M., et al., *Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood*. Eur J Clin Invest, 2003. **33**(1): p. 82-7.
71. Harder, J. and J.M. Schroder, *Antimicrobial peptides in human skin*. Chem Immunol Allergy, 2005. **86**: p. 22-41.
72. O'Neil, D.A., et al., *Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with Helicobacter pylori or stimulation with interleukin-1*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5412-5.
73. Jang, B.C., et al., *Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(3): p. 1026-33.
74. Duits, L.A., et al., *Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells*. Immunology, 2002. **106**(4): p. 517-25.
75. Hertz, C.J., et al., *Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6820-6.
76. Wang, X., et al., *Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2*. FASEB J, 2003. **17**(12): p. 1727-9.
77. Platz, J., et al., *Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1219-23.
78. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5398-405.
79. Schaefer, T.M., et al., *Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C)*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 992-1002.

80. Nomura, I., et al., *Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3262-9.

81. Harder, J., et al., *Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(3): p. 522-9.

82. Sorensen, O.E., et al., *Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5583-9.

83. Yang, D., et al., *Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6*. Science, 1999. **286**(5439): p. 525-8.

84. Biragyn, A., et al., *Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6644-53.

85. Pernet, I., et al., *Calcium triggers beta-defensin (hBD-2 and hBD-3) and chemokine macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3alpha/CCL20) expression in monolayers of activated human keratinocytes*. Exp Dermatol, 2003. **12**(6): p. 755-60.

86. Hoover, D.M., et al., *The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37647-54.

87. Dieu-Nosjean, M.C., et al., *Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 705-18.

88. Perez-Canadillas, J.M., et al., *NMR solution structure of murine CCL20/MIP-3alpha, a chemokine that specifically chemoattracts immature dendritic cells and lymphocytes through its highly specific interaction with the beta-chemokine receptor CCR6*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28372-9.

89. Wu, Z., et al., *Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8880-5.

90. Ramasundara, M., et al., *Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(2): p. 202-8.

91. Tecle, T., S. Tripathi, and K.L. Hartshorn, *Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity*. Innate Immun, 2010. **16**(3): p. 151-9.

92. Fahlgren, A., et al., *Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**(1): p. 90-101.

93. Fellermann, K., et al., *Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2003. **15**(6): p. 627-34.

94. Fahlgren, A., et al., *beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis*. Clin Exp Immunol, 2004. **137**(2): p. 379-85.

95. Wehkamp, J., et al., *Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(7): p. 745-52.

96. Wehkamp, J., et al., *The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4*. J Immunol, 2007. **179**(5): p. 3109-18.

97. Wehkamp, J., et al., *Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2003. **9**(4): p. 215-23.

98. Nuding, S., et al., *Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon*. Gut, 2007. **56**(9): p. 1240-7.

99. Voss, E., et al., *NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2*. J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2005-11.

100. Fellermann, K., et al., *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, 2006. **79**(3): p. 439-48.

101. Wehkamp, J., et al., *Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease*. Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S67-74.

102. Howell, M.D., et al., *Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis*. Clin Immunol, 2006. **121**(3): p. 332-8.

103. Ong, P.Y., et al., *Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis*. N Engl J Med, 2002. **347**(15): p. 1151-60.

104. Chen, H., et al., *Recent advances in the research and development of human defensins*. Peptides, 2006. **27**(4): p. 931-40.

105. Gambichler, T., et al., *Gene expression of cytokines in atopic eczema before and after ultraviolet A1 phototherapy*. Br J Dermatol, 2008. **158**(5): p. 1117-20.

106. Hollox, E.J., *Copy number variation of beta-defensins and relevance to disease*. Cytogenet Genome Res, 2008. **123**(1-4): p. 148-55.

107. Hollox, E.J., et al., *Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number*. Nat Genet, 2008. **40**(1): p. 23-5.

108. Howell, M.D., et al., *Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(4): p. 738-45.

109. Jeong, C.W., et al., *Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(12): p. 1717-24.

110. Hamid, Q., M. Boguniewicz, and D.Y. Leung, *Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis*. J Clin Invest, 1994. **94**(2): p. 870-6.

111. Harder, J., et al., *Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(5): p. 1355-64.

112. Nomura, I., et al., *Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6): p. 1195-202.

113. Leung, D.Y., *Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 860-76.

114. Leung, D.Y., et al., *New insights into atopic dermatitis*. J Clin Invest, 2004. **113**(5): p. 651-7.

115. Leung, D.Y. and T. Bieber, *Atopic dermatitis*. Lancet, 2003. **361**(9352): p. 151-60.

116. Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh, *Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 505-20.

117. Fridkin, S.K., et al., *Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities*. N Engl J Med, 2005. **352**(14): p. 1436-44.

118. Christophers, E. and T. Henseler, *Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis*. Arch Dermatol Res, 1987. **279 Suppl**: p. S48-51.
119. Gambichler, T., et al., *Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin*. Int Arch Allergy Immunol, 2008. **147**(1): p. 17-24.
120. Mukae, H., et al., *Elevated BALF concentrations of alpha- and beta-defensins in patients with pulmonary alveolar proteinosis*. Respir Med, 2007. **101**(4): p. 715-21.
121. Beisswenger, C. and R. Bals, *Antimicrobial peptides in lung inflammation*. Chem Immunol Allergy, 2005. **86**: p. 55-71.
122. Hiratsuka, T., et al., *Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis*. Thorax, 2003. **58**(5): p. 425-30.
123. Ross, D.J., et al., *Increased bronchoalveolar lavage human beta-defensin type 2 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation*. Transplantation, 2004. **78**(8): p. 1222-4.
124. Ishimoto, H., et al., *Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia*. Eur Respir J, 2006. **27**(2): p. 253-60.
125. Ashitani, J., et al., *Elevated pleural fluid levels of defensins in patients with empyema*. Chest, 1998. **113**(3): p. 788-94.
126. Hiratsuka, T., et al., *Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(3): p. 943-7.
127. Doss, M., et al., *Human defensins and LL-37 in mucosal immunity*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(1): p. 79-92.
128. Doss, M., et al., *Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7878-87.
129. Rivas-Santiago, B., et al., *Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4505-11.
130. Alekseeva, L., et al., *Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to Aspergillus fumigatus organisms*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 33.
131. Smith, J.J., et al., *Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid*. Cell, 1996. **85**(2): p. 229-36.
132. Dale, B.A., et al., *Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva*. J Periodontal Res, 2001. **36**(5): p. 285-94.
133. Harimurti, K., et al., *Human beta-defensin 2 concentration of respiratory tract mucosa in elderly patients with pneumonia and its associated factors*. Acta Med Indones, 2011. **43**(4): p. 218-23.
134. Vareille, M., et al., *The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(1): p. 210-29.
135. Schlapbach, C., N. Yawalkar, and R.E. Hunger, *Human beta-defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa*. J Am Acad Dermatol, 2009. **61**(1): p. 58-65.
136. Maple, P.A., J.M. Hamilton-Miller, and W. Brumfitt, *World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet, 1989. **1**(8637): p. 537-40.

137. Martin, M.A., *Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the persistent resistant nosocomial pathogen*. Curr Clin Top Infect Dis, 1994. **14**: p. 170-91.

138. Wertheim, H.F., et al., *The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 751-62.

139. Pantosti, A. and M. Venditti, *What is MRSA?* Eur Respir J, 2009. **34**(5): p. 1190-6.

140. Braun-Falco, O., et al., *Dermatologie Und Venerologie*. 2005: Springer.

141. Dinulos, J.G., et al., *Keratinocyte expression of human beta defensin 2 following bacterial infection: role in cutaneous host defense*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(1): p. 161-6.

142. Schuetz, A.N., et al., *Molecular classification of renal tumors by gene expression profiling*. J Mol Diagn, 2005. **7**(2): p. 206-18.

143. Shestakova, T., et al., *Immunohistochemical analysis of beta-defensin-2 expression in human lung tumors*. Exp Oncol, 2010. **32**(4): p. 273-6.

144. Kesting, M.R., et al., *Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma*. Cancer Invest, 2009. **27**(5): p. 575-81.

145. Shuyi, Y., et al., *Human beta-defensin-3 (hBD-3) upregulated by LPS via epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways to enhance lymphatic invasion of oral squamous cell carcinoma*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011. **112**(5): p. 616-25.

146. Xu, B., et al., *Synergistic antileukemia effect of combinational gene therapy using murine beta-defensin 2 and IL-18 in L1210 murine leukemia model*. Gene Ther, 2007. **14**(15): p. 1181-7.

147. Pinzon-Charry, A., T. Maxwell, and J.A. Lopez, *Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(5): p. 451-61.

148. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *New vistas on macrophage differentiation and activation*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 14-6.

149. Sica, A., *Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation*. Exp Oncol, 2010. **32**(3): p. 153-8.

150. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.

151. Pidala, J., *Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Cancer Control, 2011. **18**(4): p. 268-76.

152. Paczesny, S., et al., *New perspectives on the biology of acute GVHD*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(1): p. 1-11.

153. Billingham, R.E., *The biology of graft-versus-host reactions*. Harvey Lect, 1966. **62**: p. 21-78.

154. Jansen, P.A., et al., *Beta-defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4725.

155. Lippross, S., et al., *Multiple trauma induces serum production of host defence peptides*. Injury, 2011.

156. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., *MDP-NOD2 stimulation induces HNP-1 secretion, which contributes to NOD2 antibacterial function*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(5): p. 736-42.

157. Vermeire, S. and P. Rutgeerts, *Current status of genetics research in inflammatory bowel disease*. Genes Immun, 2005. **6**(8): p. 637-45.

158. Hussain, T., et al., *Innate immune responses in murine pleural mesothelial cells: Toll-like receptor-2 dependent induction of beta-defensin-2 by*

staphylococcal peptidoglycan. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(3): p. L461-70.

159. Sato, M., et al., *Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A.* J Immunol, 2003. **171**(1): p. 417-25.

160. Kumar, A., J. Zhang, and F.S. Yu, *Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells.* Microbes Infect, 2006. **8**(2): p. 380-9.

161. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway.* Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-51.

162. Chadebech, P., et al., *Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of beta-defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS.* Cell Biol Toxicol, 2003. **19**(5): p. 313-24.

163. Hof, H. and R. Dörries, *Medizinische Mikrobiologie.* 2005: Thieme.