

Funktionelle Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden in Entzündungsreaktionen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Daniela Morgenthaler
aus München
im Jahr 2016

Funktionelle Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden in Entzündungsreaktionen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Daniela Morgenthaler
aus München
im Jahr 2016

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 21.09.2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hehlgans

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2016

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Morgenthaler, Daniela; geb. Wanke, geboren am 02.01.1988 in München, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

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

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

Ort, Datum

Daniela Morgenthaler

Für meine Familie

„Man merkt nie, was schon getan wurde; man sieht immer nur das, was noch zu tun bleibt.“

Marie Curie (1867-1934)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Einleitung	15
1.1 Das Immunsystem.....	15
1.2 Die Entzündungsreaktion	16
1.2.1 Der <i>Toll-like</i> -Rezeptor (TLR)-vermittelte Signalweg	17
1.2.2 Der ATP-vermittelte Signalweg in Entzündungsreaktionen	18
1.3 Antimikrobielle Peptide.....	21
1.4 Die Familie der Defensine	22
1.5 Immunmodulatorische Funktionen der β -Defensine	24
1.6 Die <i>Regenerating gene</i> (Reg) Familie	26
1.6.1 Rolle des hReg3 α bei Erkrankungen des Darms	28
1.6.2 Rolle des hReg3 α bei der Tumorentstehung	30
1.7 Zielsetzung der Arbeit	32
2 Material	34
2.1 Geräte	34
2.2 Verbrauchsmaterialien	36
2.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien	37
2.4 Puffer und Lösungen.....	39
2.5 Kits.....	41
2.6 Enzyme	42
2.7 Oligonukleotide	42
2.8 Peptide	43
2.9 Plasmide.....	43
2.10 Antikörper.....	43
2.11 Zelllinien	44

Inhaltsverzeichnis

2.12 Versuchstiere	44
2.13 Software und Internet-Ressourcen.....	44
3 Methoden.....	45
3.1 Molekularbiologische Methoden	45
3.1.1 Isolation von genomischer DNA	45
3.1.2 Isolation von Gesamt-RNA	45
3.1.3 Vermessung von DNA und RNA	46
3.1.4 Reverse Transkription.....	46
3.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	47
3.1.6 Agarosegel-Elektrophorese	47
3.1.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	48
3.1.8 Restriktionsverdau von DNA	49
3.1.9 Isolation von DNA aus Agarosegelen	49
3.1.10 Ligation.....	49
3.1.11 Transformation	50
3.1.12 Bakterienkultur	50
3.1.13 Präparation von Plasmid-DNA.....	50
3.1.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA	50
3.1.15 Mikrobiom-Analyse mittels <i>Next Generation Sequencing</i>	50
3.1.15.1 Isolation und Aufreinigung von Stuhl-DNA	50
3.1.15.2 Quantifizierung 16S ribosomaler Genkopien mittels Echtzeit-PCR.....	51
3.1.15.3 Amplifikation und Aufreinigung von DNA-Präparationen	52
3.1.15.4 Emulsions-PCR und <i>Next Generation Sequencing</i> mittels GS FLX+ System	53
3.1.15.5 Datenanalyse	53
3.2 Proteinbiochemische Methoden.....	54
3.2.1 Isolation von Proteinextrakten.....	54
3.2.2 Immunopräzipitation mittels Chelating Sepharose	54
3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	55

Inhaltsverzeichnis

3.2.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.2.5	Western-Blot.....	56
3.2.6	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	57
3.3	Zellbiologische Methoden	57
3.3.1	Zellkulturbedingungen	57
3.3.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	58
3.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	58
3.3.4	Stabile Transfektion.....	58
3.3.5	Expression von Defensin:Ig in <i>Drosophila</i> -Schneider 2-Zellen	59
3.3.6	Generierung von <i>bone marrow-derived macrophages</i> (BMDM).....	59
3.3.7	Generierung von <i>bone marrow-derived dendritic cells</i> (BMDC)	60
3.3.8	Generierung von humanen <i>peripheral blood macrophages</i>	60
3.3.9	Stimulierungen	61
3.3.9.1	Vorstimulierung mit Defensinen	61
3.3.9.2	Einsatz verschiedener Inhibitoren	62
3.3.10	Bestimmung der extrazellulären ATP-Konzentration	62
3.3.11	LDH-Vitalitätstest	63
3.3.12	MTT-Assay.....	63
3.3.13	Durchflusszytometrie und YO-PRO [®] 1-Assay	64
3.4	Tierexperimentelle Methoden	64
3.4.1	Tierhaltung	64
3.4.2	Herstellung einer hReg3α transgenen Mauslinie.....	65
3.4.3	Serumgewinnung aus Mausvollblut	65
3.4.4	<i>In vivo</i> -Vorstimulierung mit HBD2.....	65
3.4.5	Induktion einer akuten DSS-induzierten Kolitis	66
3.4.6	Regeneration nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis	66
3.4.7	Erzeugung von Tumoren mit MC38-Zellen	66
3.4.8	Messung des MC38-Tumorwachstums	67

Inhaltsverzeichnis

3.5	Histologische Methoden	67
3.5.1	Vorbereiten und Färben von histologischen Schnitten.....	67
3.5.2	Histologischer Score.....	67
3.5.3	Immunhistochemische Färbung.....	68
3.6	Statistik	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Immunmodulatorische Funktion von HBD2	71
4.1.1	Analyse des proinflammatorischen Effekts von HBD2 und HBD3	71
4.1.2	Analyse der HBD2-induzierten Signalwege.....	76
4.1.2.1	Untersuchung der Interaktion von HBD2 mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR).....	76
4.1.2.2	Interaktion von HBD2 mit dem purinergen Rezeptor P2X7.....	78
4.1.2.3	Defensin-induzierte ATP-Freisetzung.....	82
4.1.3	<i>In vivo</i> -Analyse des proinflammatorischen Effekts von Defensinen	85
4.2	Charakterisierung der hReg3 α transgenen Mauslinie	85
4.2.1	Nachweis des hReg3 α -Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene.....	86
4.2.2	Nachweis des hReg3 α -Transgens auf Protein-Ebene.....	87
4.2.3	<i>In vivo</i> -Phänotypisierung der hReg3 α transgenen Mauslinie	89
4.2.3.1	Untersuchung der hReg3 α transgenen Mauslinie im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis.....	89
4.2.3.2	Untersuchung der Darmmikrobiota.....	92
4.2.3.3	Die Rolle des hReg3 α im Tumorwachstum	98
5	Diskussion	102
5.1	Immunregulatorische Funktion von Defensinen.....	102
5.1.1	Defensin-vermittelter proinflammatorischer Effekt in humanen Monozyten und Makrophagen.....	102
5.1.2	Beteiligung eines G Protein-gekoppelten Rezeptors am proinflammatorischen Effekt durch Defensine.....	104
5.1.3	Interaktion von HBD2 mit dem purinergen Rezeptor P2X7 über die Freisetzung von ATP.....	106

Inhaltsverzeichnis

5.1.4	Modell des proinflammatorischen Effekts von HBD2 und HBD3	110
5.2	Charakterisierung der hReg3 α transgenen Mauslinie.....	111
5.2.1	Nachweis des hReg3 α -Transgens.....	111
5.2.2	<i>In vivo</i> -Phänotypisierung der hReg3 α transgenen Mauslinie	112
5.2.2.1	Einfluss des hReg3 α -Transgens auf eine akute Dickdarmentzündung und auf das Darmmikrobiom.....	112
5.2.2.2	Die Rolle des hReg3 α im Tumorwachstum	116
6	Zusammenfassung.....	120
7	Anhang	123
	Detaillierte Legende zu Abb. 28	123
	Abbildungsverzeichnis.....	125
8	Literaturverzeichnis.....	127
9	Danksagung	148
10	Lebenslauf	149

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielle Peptide
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cell</i>
BMDM	<i>bone marrow derived macrophage</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CT	<i>threshold cycle</i>
CTLD	<i>C-type lectin-like carbohydrate recognition domain</i>
CXCL8	<i>IL8 = chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern molecules</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
dd	bidestilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSS	<i>dextrane sodium sulfate</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor rezeptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbend assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
F _c	<i>crystallisable fragment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fMLP	N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
FPRL-1	<i>formyl peptide receptor like-1</i>
gDNA	genomische DNA
GM-CSF	<i>granulocyte-/macrophage-colony stimulating factor</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
HBD	humanes β-Defensin
HD	humanes α-Defensin
HIP/PAP	<i>Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/ pancreatic associated protein</i>
HNPs	<i>human neutrophil peptide</i>
H ₂ O	Wasser
hReg3α	<i>human Regenerating gene protein 3α</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IgG	Immunglobulin G
IκB	<i>inhibitor of κB</i>
IL	Interleukin
IFNγ	Interferon γ
i.p.	<i>intraperitoneal</i>

Abkürzungsverzeichnis

IRAK1	<i>IL1-receptor associated kinase</i>
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LBP	LPS-Bindeprotein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MBD	murines β-Defensin
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIP-2	<i>macrophage inflammatory protein 2</i>
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MNCs	<i>mononuclear cells</i>
mReg3γ	<i>mouse Regenerating gene protein 3γ</i> , Ortholog zu hReg3α
mRNA	messenger RNA
Muc2	Mucin 2
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxyd
OD	Optische Dichte
oxATP	oxidiertes ATP, 2',3'-Dialdehyd-ATP
Pam ₃ CSK ₄	N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-Propyl]-[R]-Cysteinyl-[S]-Seryl-[S]-Lysyl-[S]-Lysyl-[S]-Lysyl-[S]-Lysin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBM	peripherale Blutmonozyten
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCoA	<i>Principal coordinate analysis</i>
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PG	Peptidoglykan
polyI:C	Polyinosin:Polycytidin-Säure
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTX	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative PCR
Reg	<i>Regenerating gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPF	<i>specific pathogen free</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TIR	Toll/interleukin-1-Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	<i>TNF-R-associated factor-6</i>
U	Unit
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp

Teilweise wurden gängige Fachausdrücke aus dem Englischen übernommen, wenn kein entsprechender deutscher Fachausdruck existiert oder gebräuchlich ist. Die genormten Bezeichnungen für naturwissenschaftliche Größen und die festgelegten Wertangaben wurden unverändert gebraucht. Die in der deutschen Sprache genormten Abkürzungen (Duden) wurden benutzt.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Als Immunsystem wird die Gesamtheit aller zellulärer und molekularer Bestandteile und Mechanismen bezeichnet, die den Körper gegen das Eindringen von Krankheitserregern schützen. Neben der Abwehr von Pathogenen, wie z.B. Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen sowie körperfremden Stoffen, hat das Immunsystem zusätzlich die Aufgabe, körpereigene entartete oder tote Zellen zu beseitigen. Dies setzt eine speziell koordinierte Immunantwort voraus, die zwischen Fremd- und Eigenantigenen unterscheiden kann. Dabei kann das unspezifische, angeborene und das spezifische, adaptive Immunsystem gegeneinander abgegrenzt werden. Die angeborene Immunantwort bewirkt eine frühe und ungerichtete Verteidigung gegen Krankheitserreger, während sich das adaptive Immunsystem erst durch den Kontakt zu Pathogenen entwickelt, daraufhin jedoch eine spezifische und effiziente Abwehr darstellt.

Im Zuge der angeborenen Immunantwort verhindern zunächst physische Barrieren, wie die epithelialen Grenzflächen der Haut und der Schleimhäute, das Eindringen von Krankheitserregern in den Organismus. Zusätzlich wird die äußere Schutzschicht durch die Produktion von antimikrobiellen Substanzen und Enzymen durch Epithelzellen unterstützt. Überwinden Pathogene dennoch diese Schutzbarrieren werden phagozytierende Immunzellen, wie dendritische Zellen (DCs), Neutrophile und Makrophagen, aber auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktiviert. Diese Zellen erkennen Krankheitserreger anhand gemeinsamer Muster, den sogenannten PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), über *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), nehmen sie auf und eliminieren sie. Außerdem gehören Phagozyten zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) und sind somit in der Lage, Peptide verdauter Pathogene auf ihrer Oberfläche an spezielle Moleküle (MHC-Moleküle) zu binden und in den sekundären lymphatischen Organen T-Zellen zu präsentieren. Diese Eigenschaft macht APC zu einem wichtigen Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Des Weiteren werden die Zellen des angeborenen Immunsystems durch verschiedene Serumproteine des Komplementsystems unterstützt. In Gegenwart von Krankheitserregern werden diese Komplementproteine kaskadenartig aktiviert und töten den Erreger durch die Ausbildung eines *membrane attack complex* (MAC). Abschließend führt die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen zu einer Rekrutierung, Aktivierung und Regulation verschiedener weiterer Immunzellen.

Einleitung

Im Vergleich dazu zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch seine besondere Spezifität und das sogenannte immunologische Gedächtnis aus, das bei einer späteren Infektion mit dem gleichen Pathogen zu einer schnelleren und wirkungsvolleren Immunantwort führt. Das spezifische Immunsystem besteht aus T- und B-Lymphozyten, die durch den APC-vermittelten Antigenkontakt aktiviert werden. T-Zellen vermitteln die zelluläre Immunantwort und lassen sich in T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen unterteilen. Letztere erkennen infizierte oder entartete Zellen unmittelbar und töten sie. T-Helfer-Zellen hingegen aktivieren weitere Immunzellen durch die Produktion von Zytokinen. B-Lymphozyten sind die antikörperproduzierenden Zellen des Organismus und vermitteln somit die humorale Immunantwort.

Anders als die angeborene Immunität reagieren die Zellen des adaptiven Immunsystems erst nach ca. zwölf Stunden. Dafür können sie dank der hochvariablen T- und B-Zell-Rezeptoren zwischen ähnlichen Mikroorganismen und Molekülen differenzieren. Außerdem werden nach einer Infektion Gedächtniszellen gebildet, die bei einem weiteren Kontakt mit dem Pathogen zu einer schnelleren und deutlich verstärkten Immunreaktion führen.

Die Effektormechanismen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems sind eng miteinander verbunden. Einerseits treten APCs mit adaptiven Immunzellen in Kontakt und stimulieren sie, andererseits führt die Zytokinproduktion durch die Zellen der angeborenen Immunantwort zur Induktion des adaptiven Immunsystems. Die anschließende adaptive Immunreaktion ist dabei abhängig von dem Zytokinprofil und dem antigenpräsentierenden Rezeptor. Außerdem verstärken viele Zellen der adaptiven Immunität Mechanismen der unspezifischen Immunantwort, wie z.B. die Stimulierung von Makrophagen.

Das Immunsystem stellt also ein komplexes Geflecht verschiedener Mechanismen dar, das eine effektive Verteidigung gegen eindringende Krankheitserreger gewährleistet (Abbas et al. 2012; Murphy et al. 2014; Rink et al. 2015).

1.2 Die Entzündungsreaktion

Als Entzündung werden all jene physiologischen Mechanismen bezeichnet, mit denen ein Organismus auf Verletzungen und pathogene Keime reagiert. Dabei werden infolge einer Entzündungsreaktion eindringende Krankheitserreger bekämpft sowie geschädigtes Gewebe strukturell und funktionell wiederhergestellt oder abgebaut (Henson 2005).

Einleitung

Kommt es zu einer Gewebeschädigung, z.B. durch eine Verletzung, lösen sogenannte *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMP) eine Immunantwort auch unabhängig von einer Infektion aus. Diese DAMP sind Bestandteile der Körperzellen, wie z.B. ATP, DNA oder RNA, und setzen über verschiedene Rezeptoren eine Immunreaktion in Gang. Im Gegensatz dazu werden *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) von Krankheitserregern über spezifische *pattern recognition receptors* (PRR), wie z.B. *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), auf der Oberfläche von Epithel- und Immunzellen identifiziert (Tang et al. 2012).

Nach Erkennen dieser DAMP oder PAMP wird eine Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF oder IL1 β , und Chemokinen initiiert. Diese führen zu einer weiteren Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Entzündung. Auch Proteine des Komplementsystems wandern in das Gewebe ein. Das Chemokinprofil sowie die durch die Komplementaktivierung freigesetzten Lockstoffe, wie C3a und C5a, bestimmen dabei, welche Immunzellen rekrutiert werden. Zunächst wandern hauptsächlich neutrophile Granulozyten in die Entzündungsstelle ein, werden jedoch später durch Monozyten und Makrophagen ersetzt. Neutrophile sowie Makrophagen erkennen Pathogene vorwiegend durch Opsonierung, z.B. durch Antikörper oder Komplementproteine, phagozytieren diese und zerstören sie durch die Bildung von ROS (*reactive oxygen species*) oder Stickstoffmonoxyd (NO). Antigenpräsentierende dendritische Zellen wandern, nachdem sie über PAMP Krankheitserreger erkannt, aufgenommen und Bestandteile an ihrer Oberfläche präsentiert haben, in die sekundären lymphatischen Organe, wie z.B. in die drainierenden Lymphknoten, ein. Dort treffen sie auf T- und B-Zellen und lösen eine dem Pathogen entsprechende adaptive Immunantwort aus (Abbas et al. 2012; Henson 2005).

1.2.1 Der *Toll-like*-Rezeptor (TLR)-vermittelte Signalweg

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind *single-pass* Typ 1-Transmembranproteine, die durch extrazelluläre leucinreiche Sequenzen und eine intrazelluläre Toll/interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne charakterisiert sind. Die TLR gehören zu den *pattern recognition receptors* (PRR) und erkennen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) durch direkte Interaktion mit der Erregermembran. TLR spielen somit eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung zwischen Fremd- und Eigenantigen durch das angeborene Immunsystem (Moresco et al. 2011).

Einleitung

Die TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 befinden sich intrazellulär auf Endosomen- oder Lysoendosomenmembranen, während die TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 an der Zelloberfläche vorkommen. Dabei bildet der TLR2 mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere, die restlichen TLR hingegen homodimerisieren (Kawai und Akira 2010). Das Heterodimer TLR1/2 erkennt Zellwandkomponenten gram-positiver Bakterien, wohingegen der TLR4 das Lipopolysaccharid (LPS) von gram-negativen Bakterien identifiziert. Doppelsträngige RNA (dsRNA) sowie das Analogon polyI:C aktivieren den TLR3. Das Zymosan aus Pilzen wird durch den TLR2/6 erkannt (Moresco et al. 2011). Neben den TLR-Liganden wurde jedoch auch für die antimikrobiellen Defensine beschrieben, dass sie über TLR4 oder TLR1/2 antigenpräsentierende Zellen aktivieren können (Biragyn et al. 2002; Funderburg et al. 2007).

Die Bindung eines Liganden an den TLR führt zur Anlagerung eines zytoplasmatischen Adapterproteins - meist MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) - an die TIR-Domäne. Daraufhin wird die IRAK1 (*IL1-receptor associated kinase*) rekrutiert, die nach einer Autophosphorylierung von MyD88 dissoziert und TRAF6 (*TNF-R-associated factor-6*) aktiviert. Anschließend induziert TRAF6 die IκB (*inhibitor of κB*)-Signalkaskade, die letztlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (*nuclear factor κB*) resultiert.

Je nachdem welcher TLR aktiviert wird, kommt es abschließend zur Ausschüttung eines bestimmten inflammatorischen Zytokinprofils, das die weitere immunologische Reaktion beeinflusst (Abbas et al. 2012; Beutler 2004).

1.2.2 Der ATP-vermittelte Signalweg in Entzündungsreaktionen

Entzündungsreaktionen gehen mit der Freisetzung von Nukleotiden – vorrangig ATP – in den extrazellulären Raum einher. Während ATP normalerweise die Energiewährung zellulärer Prozesse darstellt, spielt es in den extrazellulären Kompartimenten des Körpers eine wichtige Rolle als Signalmolekül (Khakh und Burnstock 2009). ATP interagiert dabei mit Nukleotidrezeptoren, den sogenannten purinergischen P2-Rezeptoren. Diese P2-Rezeptoren können – je nach Signalweg – weiter unterteilt werden: Die metabotropischen P2Y-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die ionotropischen P2X-Rezeptoren (P2XR) dagegen sind ATP-abhängige Ionenkanäle (Abb. 1) (Junger 2011).

P2-Rezeptoren wurden ursprünglich aufgrund ihrer funktionellen Rolle im zentralen Nervensystem entdeckt (Burnstock 2008). Neue Studien zeigen jedoch, dass sie in nahezu

Einleitung

allen Geweben des Körpers exprimiert werden und auch im angeborenen sowie im adaptiven Immunsystem eine Rolle spielen. Infolge einer Entzündung kann eine Vielzahl an verschiedenen Zellen ATP aus intrazellulären Depots in den extrazellulären Raum abgeben (Eltzschig et al. 2012; Junger 2011). Diese ATP-Freisetzung wird durch verschiedene Mechanismen gesteuert. Neben einer ATP-Entlassung über Transportvesikel, gibt es diverse spannungs- oder dehnungsabhängige Kanäle sowie Pannexine und Connexin-Hemikanäle, über die ATP gezielt freigesetzt werden kann (Praetorius und Leipziger 2009).

P2X-Rezeptoren sind Ionenkanäle in der Plasmamembran, die direkt über extrazelluläres ATP geöffnet werden. Dabei sind sie selektiv für mono- und divalente Kationen, wie z.B. Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . Bisher sind sieben verschiedene P2XR (P2X1–7R) bekannt (Surprenant und North 2009). Der strukturelle Aufbau aller P2XR besteht aus zwei Transmembran-Domänen, einer großen extrazellulären Schleife, die als Ligand-Bindestelle dient, und den intrazellulären N- und C-Termini. Dabei scheinen sich jeweils drei P2XR-Untereinheiten um eine ionendurchlässige Pore zusammenzulagern. Binden nun drei ATP-Moleküle an die extrazellulären Schleifen, kommt es zur Umlagerung der Untereinheiten und zur Öffnung der Pore. Dies führt zu Ionenströmen, wobei Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle hinein- und K^+ aus der Zelle herausfließen (Abb. 1). Die Depolarisierung der Plasmamembran sowie die plötzlich steigende intrazelluläre Ca^{2+} -Menge induziert Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden, wie z.B. die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) oder Phospholipidasen (Kawate et al. 2009; Khakh und North 2006).

Einleitung

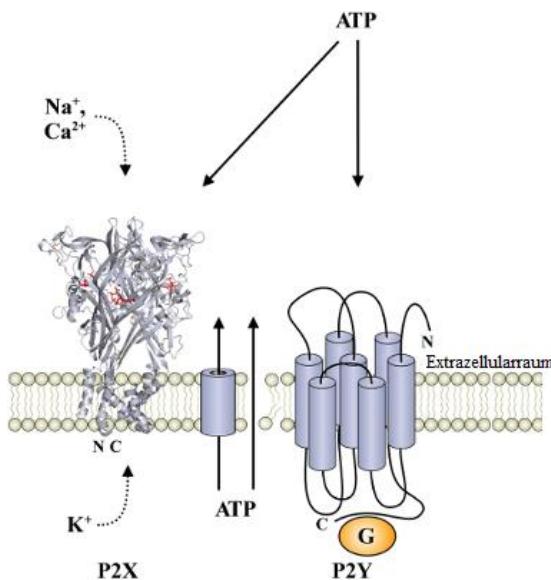


Abb. 1: ATP-abhängige purinerge P2-Rezeptoren. Neben seinen wichtigen Funktionen im Zellmetabolismus stellt ATP einen Liganden der purinergischen Signalwege dar. Die Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum erfolgt entweder über Exozytose oder über Transportkanäle. Anschließend löst ATP über die Ionenkanäle der P2X-Rezeptoren oder über die G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Familie P2Y eine Signalkaskade aus (modifiziert nach www.uni-leipzig.de/~straeter/research/purinergicsignaling.html).

Obwohl nahezu alle P2XR an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, scheint der P2X7R einen besonders starken Einfluss auf den Verlauf von Infektionen zu haben. Ausschlaggebend hierfür ist, dass der P2X7R vorrangig auf Immunzellen, wie Mastzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert wird (Idzko et al. 2014; Junger 2011). So spielt die Bindung von ATP an den P2X7R beispielsweise eine Schlüsselrolle bei der Abwehr von Mikroorganismen, da sie unter anderem zur Aktivierung des sogenannten Inflammasoms führt. Das Inflammasom ist ein großer zytosolischer Multiproteinkomplex, der sich infolge von Infektions- oder Stressstimuli zusammenlagert. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade führt zu einer proteolytischen Aktivierung der Caspase-1, die wiederum die Spaltung und Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL1 β und IL18 in biologisch aktiver Form bewirkt (Zoete et al. 2014). Außerdem konnten Studien zeigen, dass die Aktivierung des P2X7R-Signalwegs zu einer erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD86 sowohl auf antigenpräsentierenden dendritischen Zellen als auch auf Monozyten führt (Lioi et al. 2015; Wilhelm et al. 2010). Neben einer proinflammatorischen Rolle zur Bekämpfung von Pathogenen scheint die ATP-abhängige Aktivierung des P2X7R auch tumorsuppressiv zu wirken (Ghiringhelli et al. 2009; Stagg und Smyth 2010). Jedoch führt eine inkorrekte Aktivierung des P2X7R auch zu chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie Asthma, Psoriasis oder entzündlichen

Einleitung

Darmerkrankungen (IBD) (Killeen et al. 2013; Kurashima et al. 2012; Manthei et al. 2012).

Die Aktivierung des P2X7R-Signalwegs ist demnach einerseits wichtig für die Immunantwort gegen Pathogene und Tumorzellen, scheint andererseits jedoch auch bei einer Vielzahl an chronischen Erkrankungen eine Rolle zu spielen. Die zellulären und molekularen Mechanismen, die hinter diesen gegensätzlichen Funktionen des P2X7R stehen, sind noch nicht abschließend geklärt.

1.3 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind bedeutende Bestandteile des angeborenen Immunsystems und können in nahezu allen Organismen von Bakterien über Pflanzen und Pilze bis hin zu Säugetieren gefunden werden (Hoffmann et al. 1999; Jenssen et al. 2006). Sie stellen endogene Antibiotika mit besonderer Bedeutung für die frühe Abwehrphase gegen Bakterien, aber auch Viren, Pilze und Parasiten dar (Lehrer und Ganz 1999). Dabei können AMP entweder konstitutiv exprimiert werden oder durch Infektions- und Entzündungsstimuli, wie z.B. proinflammatorische Zytokine, induziert werden (Jenssen et al. 2006).

Die Mitglieder der Gruppe der AMP unterscheiden sich stark in ihrer Sequenz und Struktur, zeichnen sich jedoch alle in erster Linie durch ihre geringe Länge (10-100 Aminosäuren), ihre positive Molekülladung und ihren amphipathischen Charakter aus. Je nach Aminosäuren-Zusammensetzung und ihrer Sekundärstruktur, können AMP in vier Gruppen unterteilt werden: (1) α -helikale Peptide, (2) β -Faltblatt-Peptide, die durch zwei bis vier Disulfidbrückenbindungen stabilisiert werden, (3) schleifen- oder ringförmige Peptide mit einer Disulfidbrückenbindung und (4) Peptide mit *extended components* Elementen (Ganz und Lehrer 1998; Hancock und Sahl 2006; Jenssen et al. 2006).

Der genaue Wirkmechanismus der AMP ist bislang ungeklärt. Jedoch ermöglicht der kationische, amphipathische Charakter der AMP eine Bindung an die negativ geladene Bakterien-Zellwand. Die Ausbildung von Poren in der Membran oder die unspezifische Permeabilisierung der Zellwand führen letztendlich zur Zerstörung des Pathogens (Hancock und Rozek 2002). Außerdem ist die Hemmung der Zellwandbiosynthese durch das antimikrobielle β -Defensin HBD3 beschrieben (Sass et al. 2010) und auch die Induktion von Hydrolasen, die die Zellmembran beschädigen, ist denkbar (Bierbaum und

Einleitung

Sahl 1985). Demnach verfügen AMP über eine Vielzahl an verschiedenen Mechanismen, um Pathogene zu bekämpfen.

AMP verhindern mikrobielle Infektionen nicht nur durch die Fähigkeit Pathogene abzutöten, sondern übernehmen ebenso wichtige Aufgaben in der Modulation von angeborener und adaptiver Immunantwort. Somit stellen AMP ein wichtiges Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar (Bräff et al. 2005; Easton et al. 2009). Außerdem spielen AMP eine Rolle in der Wundheilung, bei der Embryonalentwicklung und in der Fertilität einiger Spezies (Semple und Dorin 2012).

1.4 Die Familie der Defensine

Defensine gehören zu den wichtigsten Vertretern der antimikrobiellen Peptide. Die kleinen, cysteinreichen Peptide mit einer Größe von ca. 30 bis 45 Aminosäuren besitzen einen amphipathischen Aufbau, bei dem das Molekül über einen hydrophoben und einen kationischen Bereich verfügt (Zasloff 2002). Außerdem verfügen Defensine über sechs Cysteinreste, die wiederum drei intramolekulare Disulfidbrückenbindungen, das sogenannte „6-Cystein-Motiv“, ausbilden (Lisitsyn et al. 2012).

Die Familie der Defensine lässt sich gemäß ihrer genomischen Organisation und der Lage der unterschiedlichen Disulfidbrückenbindungen in α -, β -, und θ -Defensine unterteilen (Yang et al. 2004), wobei alle bisher bekannten Defensine ein dreisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt gemeinsam haben (Abb. 2) (Taylor et al. 2008). Während α -Defensine ausschließlich in Säugetieren vorkommen, findet man β -Defensine in allen mehrzelligen Organismen. Die Expression der zyklischen θ -Defensine beschränkt sich sogar nur auf wenige Affenarten (Lehrer 2004; Tang et al. 1999).

Obwohl es sich bei den ersten beschriebenen Defensinen um die humanen α -Defensine HNP1-3 handelte (Ganz et al. 1985), stellen die β -Defensine die evolutionsgeschichtlich älteste Gruppe dar. Die Mehrzahl der bisher bekannten humanen β -Defensine ist in einem 450kb umspannenden Cluster auf dem Chromosom 8p23 lokalisiert (Linzmeier et al. 1999). Dieses Cluster entstand höchstwahrscheinlich durch die Duplikation der ursprünglichen Gene (Sparkes et al. 1989). Außerdem wurden mittlerweile fünf weitere Defensin-kodierende Gencluster identifiziert (Schutte et al. 2002). Die β -Defensin-Gene sind durch zwei Exons charakterisiert. Das erste Exon kodiert für die Signalsequenz des Propeptids, die für die Sekretion der β -Defensine benötigt wird. Das zweite Exon hingegen enthält die Sequenz für das reife, aktive β -Defensin (Liu et al. 1997; Liu et al. 1998). Eine

Einleitung

schnelle Evolution zur besseren Anpassung des Organismus an Krankheitserreger führte wahrscheinlich dazu, dass die Nukleotidsequenz des zweiten Exons nur schwach konserviert ist (Semple und Dorin 2012). Abschließend finden posttranskriptionale Modifikationen, wie z.B. eine proteolytische Prozessierung oder Glykosylierung, der Defensine statt (Zasloff 2002).

Defensine werden von unterschiedlichen Zellpopulationen produziert. Während die humanen α -Defensine HNP1, HNP2, HNP3 und HNP4 hauptsächlich von Neutrophilen exprimiert werden, produzieren die Paneth-Zellen des Dünndarms HD5 und HD6 (Ho et al. 2013; Ouellette 2011). β -Defensine werden dagegen von Keratinozyten sowie Epithelzellen der physischen Körperbarrieren gebildet, können jedoch auch durch Immunzellen, wie z.B. dendritische Zellen, produziert werden (Harder et al. 1997). Dabei liegen die β -Defensine HBD1 und HBD2 in Lösung ausschließlich in monomerer Form vor, während HBD3 Homodimere bilden kann (Schibli et al. 2002).

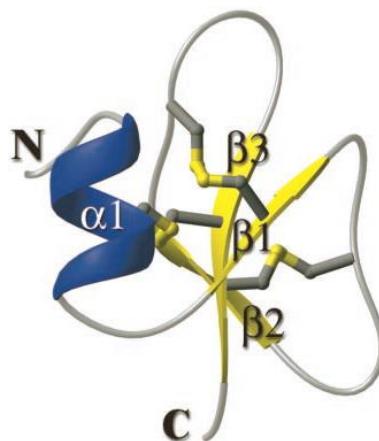


Abb. 2: Struktur des humanen β -Defensins 2 (HBD2). Das Molekül setzt sich aus einem dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt (gelb) zusammen, das von einer α -Helix (blau) flankiert wird. Die Gesamtkonformation wird durch drei Disulfidbrückenbindungen (dunkelgrau) stabilisiert (Hoover et al. 2000).

Die α -Defensine und auch das β -Defensin HBD1 werden konstitutiv exprimiert (Yang et al. 2004). Die Expression der weiteren β -Defensine ist durch proinflammatorische Stimuli induzierbar. Dabei spielen *Toll-like-Rezeptor* (TLR)-Agonisten eine wichtige Rolle. So konnte beispielsweise nach Stimulation von Epithelzellen mit Peptidoglykan (TLR2), polyI:C (TLR3) oder LPS (TLR4) eine erhöhte HBD2-Expression gezeigt werden (Becker et al. 2000; Pivarcsi et al. 2005; Schaefer et al. 2005). Auch proinflammatorische Zytokine, wie TNF, IFN γ , IL6 oder IL1 β , induzieren die Produktion von β -Defensinen (Joly et al. 2005; Rohrl et al. 2008). Im Gegenzug wird die Expression von β -Defensinen jedoch auch

Einleitung

durch Zytokine reguliert. So führte z.B. die Behandlung von Keratinozyten mit IL10, IL4 oder IL13 zu einer verminderten HBD2-Produktion (Kanda et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das humane β -Defensin 2 (HBD2) untersucht. Die Identifikation und Charakterisierung von HBD2 erfolgte erstmals in Biopsien von Psoriasis-Patienten (Harder et al. 1997). Dieses Defensin wird von Epithelzellen und Keratinozyten der Haut, des Darms sowie der Atemwege exprimiert. Dabei ist die Expression durch verschiedene TLR-Liganden und Zytokine induzierbar (Schroder und Harder 1999). HBD2 ist antimikrobiell gegen gram-positive sowie gram-negative Bakterien (Rohrl et al. 2010b). Des Weiteren wirkt HBD2 über den Chemokinrezeptor CCR2 chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen und Neutrophile (Jin et al. 2010; Rohrl et al. 2010a).

1.5 Immunmodulatorische Funktionen der β -Defensine

Neben der antimikrobiellen Wirkung gegen Krankheitserreger haben Defensine auch proinflammatorische sowie immunsuppressive Auswirkungen auf Immunzellen. Defensine haben somit eine vielfältige Bedeutung bei der Immunantwort gegen Pathogene (Semple und Dorin 2012).

Die Rekrutierung von Immunzellen zum Ort einer Entzündung findet entlang eines Gradienten von chemotaktischen Faktoren, wie z.B. Chemokinen statt. Diese chemotaktische Eigenschaft konnte auch für β -Defensine gezeigt werden. Das HBD2 ist beispielsweise in der Lage, Mastzellen chemotaktisch über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) anzulocken, zu aktivieren und somit die Degranulation und Ausschüttung von Histamin und Prostaglandin D₂ durch die Mastzelle anzuregen (Niyonsaba et al. 2001; Niyonsaba 2002). HBD1 und HBD2 locken über den Chemokinrezeptor CCR6 ebenfalls unreife dendritische Zellen, T-Zellen und Neutrophile an (Niyonsaba et al. 2004; Rohrl et al. 2010b; Yang et al. 1999). Außerdem wirken HBD2 und HBD3 über den Chemokinrezeptor CCR2 chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen und Neutrophile (Jin et al. 2010; Rohrl et al. 2010a). Sogar Keratinozyten werden durch β -Defensine rekrutiert (Niyonsaba et al. 2007). Dabei scheint es wahrscheinlich, dass β -Defensine aufgrund ihrer zu Chemokinen ähnlichen Struktur mit deren Rezeptoren interagieren können (Hoover et al. 2002).

Die β -Defensine dienen jedoch nicht nur der Rekrutierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems an die Entzündungsstelle, sondern beeinflussen auch die Reifung

Einleitung

und Funktion dieser Zellen. So bewirkt die Interaktion von HBD3 mit dem *Toll-like*-Rezeptor (TLR) 1/2 beispielsweise eine verstärkte Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD86 und CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen (Funderburg et al. 2007). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass HBD3 die Expression des co-stimulatorischen Moleküls CD86 auf Monozyten indirekt über die Freisetzung von ATP und die autokrine Aktivierung des ATP-regulierten Ionenkanals P2X7R induziert (Lioi et al. 2015).

B-Defensine spielen zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die als Kommunikationsmediatoren zwischen Immunzellen fungieren. So produzieren HBD3-aktivierte Monozyten beispielsweise proinflammatorische Zytokine, wie IL1 β , IL6 und IL8 (Funderburg et al. 2011). Auch Keratinozyten produzieren nach Kontakt mit einem Defensin proinflammatorische Chemokine sowie Zytokine (Niyonsaba et al. 2007). Die Stimulation von T-Zellen durch HBD2 resultiert in der Ausschüttung von diversen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Kanda et al. 2011). Das induzierte Zytokinprofil ist dabei abhängig vom induzierenden β -Defensin. Auf diese Weise können β -Defensine die Immunantwort auf unterschiedlichste Art modulieren (Boniotto et al. 2006).

Neben der Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen gibt es noch weitere Defensin-induzierte Effekte, die eine Entzündungsantwort hemmen. So verhindern die Defensine HNP1 und HBD2 beispielsweise die Bindung von LPS an das LPS-Bindeprotein (LBP) und blockieren somit eine Signalweiterleitung an den TLR4 (Scott et al. 2000). HBD3 und sein Maus-Ortholog MBD14 hemmen bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS die TNF- und IL6-Produktion von Makrophagen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Semple et al. 2010). Studien am Mausmodell der Atopischen Dermatitis sowie der Multiplen Sklerose zeigen gar, dass HBD3 und MBD14 regulatorische T-Zellen induzieren und somit eine Entzündungsreaktion lindern können (Bruhs et al. 2016; Navid et al. 2012). Außerdem induziert HBD3 die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 in T-Zellen und führt zu einer erhöhten Produktion der immunregulatorischen Zytokine IL2 und IL10 (Meisch et al. 2013).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die vielfältigen Wirkungsweisen von β -Defensinen über verschiedene oberflächenassoziierte Rezeptoren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen von Immunzellen beeinflussen und somit Entzündungsreaktionen maßgeblich modulieren können (Weinberg et al. 2012). Dabei können β -Defensine zunächst aktivierend auf die Immunantwort wirken, tragen durch ihre

Einleitung

antiinflammatorischen Eigenschaften aber auch zu einer Gegenregulation bei, um überschießende Entzündungsreaktionen zu vermeiden. Eine mögliche Erklärung für die teilweise gegensätzlichen Effektormechanismen von β -Defensinen könnte darin liegen, dass die Höhe der Defensin-Konzentration die Immunreaktion bestimmt (Lioi et al. 2012). Aber auch eine korrekte Faltung ist ausschlaggebend für die Defensin-induzierten Effekte (Semple et al. 2011). Dennoch sind die zellulären und molekularen Mechanismen, die zu einer immunmodulierenden Wirkung der β -Defensine führen noch nicht abschließend geklärt.

1.6 Die *Regenerating gene* (Reg) Familie

Die *Regenerating gene* (Reg) Familie umfasst eine vielfältige Gruppe an sekretorischen Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und -ausdifferenzierung in Leber, Pankreas und dem Gastrointestinaltrakt spielen (Zhang 2003). Dabei teilen alle Mitglieder dieser Familie das konservierte Sequenzmotiv der C-Typ Lektine, die sich durch ihre Ca^{2+} -abhängige *C-type lectin-like carbohydrate recognition domain* (CTLD) auszeichnen. Diese CTLD-Struktur bildet eine ca. 16kD große Doppelschleife ('loop-in-a-loop'), die durch zwei Disulfidbrückenbindungen stabilisiert wird und kann sowohl hydrophobe als auch polare Wechselbeziehungen mit Liganden eingehen (Zelensky und Gready 2005).

Je nach ihrer Primärstruktur können die Mitglieder der Reg-Familie in vier Untergruppen eingeteilt werden: Reg I, II, III und IV (Hartupee et al. 2001). Seit der Entdeckung des Reg I in den Langerhans-Inseln des Pankreas von Ratten (Terazono et al. 1988) wurden insgesamt 21 verschiedene Mitglieder der Reg-Familie in Säugetieren identifiziert (Gurr 2011). Dabei sind die humanen Reg-Gene RegI α , RegI β , Reg3 α und Reg3 γ in einem ca. 140kb umspannenden Cluster auf dem Chromosom 2p12 lokalisiert (Miyashita et al. 1995; Nata et al. 2004). Das hReg IV befindet sich dagegen auf Chromosom 1 (Nata et al. 2004). Die Mitglieder der Reg III-Untergruppe werden hauptsächlich in den Paneth-Zellen exprimiert. Dabei stellen die Paneth-Zellen eine von vier differenzierten Epithelzellgruppen dar, die das Gewebe des Dünndarms bilden. Während die anderen Zellarten die Villi des Dünndarms auskleiden, befinden sich die Paneth-Zellen am Fuß der Lieberkühn-Krypten (Abb. 3) (Bevins und Salzman 2011).

Einleitung

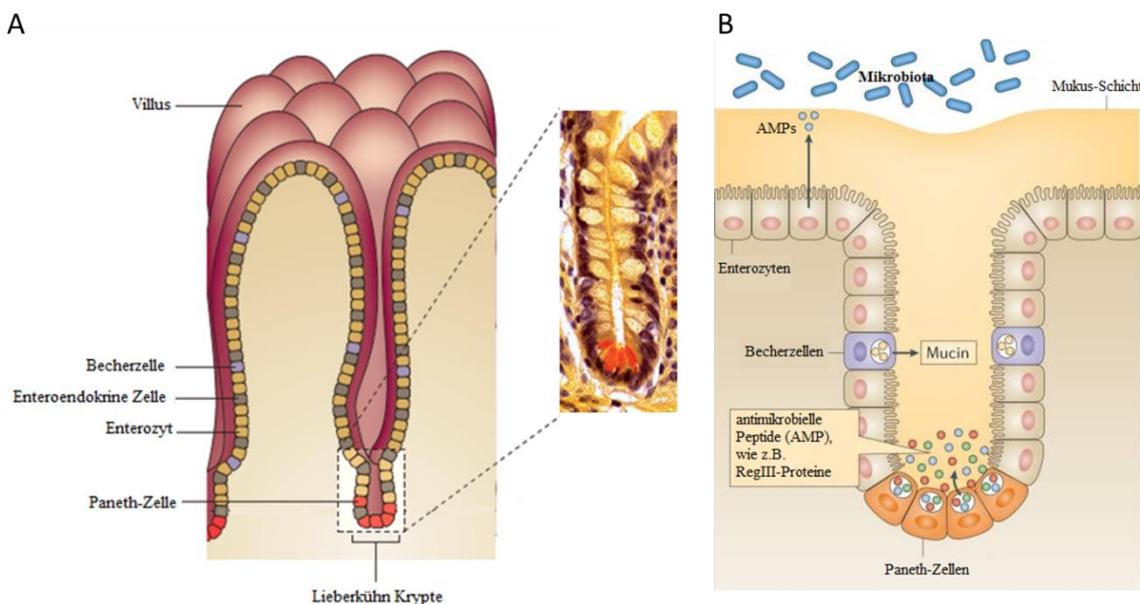


Abb. 3: Die Paneth-Zellen des Dünndarms. (A) Paneth-Zellen (rot, Phloxin-Tartrazin-Färbung) sind eine von vier Zellarten, die das Gewebe des Dünndarms auskleiden und befinden sich am Fuß der Lieberkühn-Krypten. Paneth-Zellen sind reich an zytoplasmatischen Granulae, die hohe Konzentrationen an antimikrobiellen Peptiden, wie z.B. Mitglieder der Reg III-Familie enthalten (Bevins und Salzman 2011). (B) Die Abgabe der Reg III-Peptide an die Mukus-Schicht des Darms verhindert einen direkten Kontakt der intestinalen Mikrobiota mit der Epithelschicht (Gallo und Hooper 2012).

Das humane Reg3 α (auch hReg3 α oder HIP/PAP) sowie das hReg3 γ sind die bisher beschriebenen Peptide der Reg III-Gruppe im Menschen (Lasserre et al. 1999; Nata et al. 2004). In der Maus sind hingegen vier Reg III-Proteine (mReg3 α - δ) bekannt (Abe et al. 2000). Dabei scheint mReg3 γ die größte Orthologie zu hReg3 α aufzuweisen (Cash et al. 2006).

Die Mitglieder der Reg III-Familie binden an Peptidoglykan und wirken zudem antimikrobiell gegen gram-positive Bakterien (Brandl et al. 2007; Cash et al. 2006). Die Abgabe der Reg III-Peptide an die Mukus-Schicht des Darms verhindert einen direkten Kontakt der intestinalen Bakterien mit der Epithelschicht (Abb. 3) (Vaishnava et al. 2011). Dies ermöglicht eine umfassende Regulation sowohl der symbiotischen als auch der pathogenen Bakterien und unterstützt somit die Toleranz des Darmmikrobioms durch das Immunsystem (Peterson und Artis 2014). Überwinden Bakterien dennoch die Schutzschicht der Darmschleimhaut, wird die Expression der Reg III-Peptide unter anderem durch den TLR-Signalweg induziert (Vaishnava et al. 2008). So produzieren beispielsweise die Paneth-Zellen von Mäusen, denen das Adaptermolekül MyD88 der TLR-Signalkaskade fehlt, kein mReg3 γ (Brandl et al. 2007).

Die antimikrobielle Aktivität von hReg3 α und mReg3 γ wird durch eine post-transkriptionale Modifikation kontrolliert. Das anionische N-terminale Prosegment scheint dabei die

Einleitung

positiv-geladene Kernregion des aktiven Proteins zu maskieren. Erst die Abspaltung des Prosegments durch das Enzym Trypsin legt die Kernregion frei, sodass diese mit bakteriellen Zellwandbestandteilen interagieren kann. Die antimikrobielle Aktivität von hReg3 α oder mReg3 γ erhöht sich dabei um das ca. 1000-fache (Medveczky et al. 2009; Mukherjee et al. 2009). Das hReg3 α tötet gram-positive Bakterien letztlich durch die Ausbildung einer hexamerischen Pore, die zur Lyse des Bakteriums führt (Mukherjee et al. 2014).

Die Familie der Reg-Proteine umfasst eine Vielzahl an unterschiedlich regulierten und wirksamen Peptiden, die die strukturelle Gemeinsamkeit der C-Typ Lektine verbindet. In der vorliegenden Arbeit wurde das humane Reg3 α untersucht, das erstmals im Verdauungssaft von Patienten nach einer Pankreas-Transplantation nachgewiesen wurde (Keim et al. 1992). Seit seiner Entdeckung konnte gezeigt werden, dass hReg3 α in einer Vielzahl an weiteren Geweben, wie z.B. der Leber, des Darms oder der Blase, exprimiert wird (Lasserre et al. 1994; Spencer et al. 2015; Wu et al. 2000). Dabei wird hReg3 α hauptsächlich von den Paneth-Zellen des Dünndarms produziert (Itoh und Teraoka 1993) und wird durch inflammatorische Stimuli sowie eine Beschädigung der Mukus-Schicht induziert (Cash et al. 2006).

1.6.1 Rolle des hReg3 α bei Erkrankungen des Darms

Die Funktion der epithelialen Grenzflächen des Darms besteht darin, die Besiedlung durch symbiotische Bakterien einerseits im Gleichgewicht zu halten und andererseits das Eindringen von Pathogenen zu verhindern. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, produzieren die Epithelzellen eine Vielzahl an unterschiedlichen antimikrobiellen Peptiden (AMP) (Mukherjee und Hooper 2015). Studien zeigen, dass das AMP mReg3 γ – das Ortholog zu hReg3 α – von den Paneth-Zellen des Dünndarms an die Mukus-Schicht abgegeben wird. Dies ist besonders wichtig, um die Trennung zwischen Darmmikrobiota und Gewebe aufrechtzuerhalten und eine Aktivierung des Immunsystems durch symbiotische Bakterien zu verhindern. Demnach ermöglichen beispielsweise die Peptide der Reg III-Familie das mutualistische Zusammenspiel zwischen Darmbakterien und Organismus (Loonen et al. 2014; Vaishnava et al. 2011). Durchbrechen Bakterien dennoch diese Barrièreschicht, induziert dies eine erhöhte Expression von hReg3 α oder mReg3 γ im Darm (Dieckgraefe et al. 2002; Ogawa et al. 2003). Dabei wirken diese Peptide antimikrobiell gegen gram-positive Bakterien, wie beispielsweise *Listeria monocytogenes*.

Einleitung

oder *Enterococcus faecalis*, und spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von intestinalen Krankheitserregern (Brandl et al. 2007; Brandl et al. 2008).

Im Gegenzug führt die Reduktion der Darmmikrobiota durch die Gabe von Antibiotika zu einer verminderten Expression von mReg3 γ . Der gleiche Effekt kann auch in gnotobiotischen Mäusen gezeigt werden (Brandl et al. 2008). Eine Veränderung des Mikrobioms beeinflusst demnach auch die Expression der Reg III-Proteine. Die Verabreichung des probiotischen Bakteriums *Bifidobacterium breve* beispielsweise kann genutzt werden, um die mReg3 γ -Expression zu erhöhen und die Barrierefunktion der Mukosa wieder herzustellen, wobei die Krankheitszeichen einer Kolitis abgeschwächt werden (Natividad et al. 2012; Natividad et al. 2013).

Muc2^{-/-}-Mäusen fehlt die Strukturkomponente Mucin (Muc2) der Mukus-Schicht. Dies führt zu einem Verlust der Schutzbarriere und damit zu einem direkten Kontakt der intestinalen Mikrobiota mit der Epithelschicht des Darms. Studien an Muc2^{-/-}-Mäusen zeigen, dass die fehlende Mukosa zu einer deutlich erhöhten mReg3 γ -Expression führt, wobei die Entstehung einer Kolitis abgemildert wird (Burger-van Paassen et al. 2012).

In Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*, IBD) steigt die hReg3 α -Expression im entzündeten Darmgewebe ebenfalls an (Dieckgraefe et al. 2002; Ogawa et al. 2003). Diese verstärkte hReg3 α -Produktion führt auch zu einem erhöhten hReg3 α -Spiegel im Blut. Dabei ist dieser Befund unabhängig von der Lage der Entzündung und kann bei Patienten mit chronischen Erkrankungen des Dünndarms gleichermaßen festgestellt werden (Desjeux et al. 2002; Gironella et al. 2005). Eine Behandlung dieser Patienten mit z.B. einem Antikörper gegen das proinflammatorische Zytokin TNF (Infliximab) führte zu einer signifikanten Reduktion der hReg3 α -Serumlevel. Daher könnte der hReg3 α -Spiegel des Blutes als Biomarker für den Erfolg entsprechender Therapien genutzt werden (Marafini et al. 2014).

Auch bei Patienten mit einer gastrointestinalen *Graft versus Host Disease* (GvHD) steigen die hReg3 α -Plasmamengen nachweislich an. In Kombination mit einer histologischen Überwachung und weiteren Biomarkern wird in diesem Falle der hReg3 α -Spiegel zur Früherkennung einer GvHD bereits klinisch angewandt (Ferrara et al. 2011; Harris et al. 2012; Levine et al. 2015).

Ex vivo-Studien an Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn zeigen, dass die Behandlung mit rekombinannten hReg3 α zu einer verringerten Produktion an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF, IL6 oder IFN γ , führt. Dabei scheint hReg3 α die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs in Monozyten, Epithelzellen und Endothelzellen, die maßgeblich für

Einleitung

das Einsetzen und Fortbestehen einer Immunreaktion verantwortlich sind, zu blockieren. Außerdem verhindert hReg3 α auch die Rekrutierung von weiteren Immunzellen an die Entzündungsstelle. Diese Daten weisen darauf hin, dass hReg3 α im Falle von chronischen Entzündungsreaktionen des Darms antiinflammatorisch wirkt (Gironella et al. 2005).

Die Aufgabe der Paneth-Zellen im Dünndarm besteht hauptsächlich darin, die Homöostase durch die Kontrolle der Mikrobiota aufrechtzuerhalten und Pathogene abzuwehren. Im gesunden Dickdarm befinden sich keine Paneth-Zellen. Kommt es jedoch zu einer Entzündung im Kolon erscheinen sogenannte metaplastische Paneth-Zellen, die durch die Umwandlung von Epithelzellen entstehen (Bevins und Salzman 2011). In beiden Fällen können Paneth-Zellen durch die Produktion von AMP, darunter z.B. Proteine der RegIII-Familie, den Krankheitsverlauf modifizieren (van Beelen et al. 2013). Dabei scheint hReg3 α vorrangig antiinflammatorisch zu wirken und die Regeneration von geschädigtem Gewebe zu fördern (Pull et al. 2005). Die dafür verantwortlichen Signalmechanismen erscheinen bisher jedoch als unklar.

1.6.2 Rolle des hReg3 α bei der Tumorentstehung

Der Entstehung von Tumoren gehen genetische Veränderungen voraus, die die Überwachungsmechanismen der Zellproliferation ausschalten. Die Folge ist ein unkontrolliertes Zellwachstum, das zur Entstehung der Tumoren führt (Fearon und Vogelstein 1990).

Bereits im Jahr 1990 konnte die ektopische Expression des Reg-Proteins hReg1 α in Kolon- und Rektumtumoren gezeigt werden (Watanabe et al. 1990). Weitere Studien unterstützen die Annahme, dass hReg1 α nur in Tumoren, nicht jedoch im umliegenden Gewebe produziert wird (Macadam et al. 2000). Auch bei Tumorerkrankungen der Magenschleimhaut besteht eine Korrelation zwischen hReg1 α -Expression und dem Tumorwachstum. Dabei scheint die Invasivität der Tumorzellen in das Lymphgefäßsystem bei hReg1 α -positiven Magenkarzinomen erhöht zu sein (Fukui et al. 2004; Yonemura et al. 2003)

Neben dem Reg-Protein hReg1 α kann auch die erhöhte Proteinproduktion von hReg3 α in kolorektalen Tumorgeweben nachgewiesen werden (Rechreche et al. 1999). Außerdem korreliert die Coexpression von hReg1 α und hReg3 α in Kolonkarzinomen mit einer um 50% reduzierten Überlebensrate der Patienten (Macadam et al. 2000). Vergleichbare Ergebnisse liefern auch Untersuchungen von hepatzellulären Karzinomen, in denen die

Einleitung

Coexpression von hReg1 α und hReg3 α in Zusammenhang mit einer Mutation des Transkriptionsregulators β -Catenin gebracht werden konnte (Cavard et al. 2006).

In vitro-Studien an humanen Kolonkarzinom-Zelllinien zeigen, dass hReg1 α eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und in der Zellproliferation spielt, jedoch vor der Zelldifferenzierung herunterreguliert wird (Bernard-Perrone et al. 1999). Dies unterstützt die Annahme, dass die erhöhte Expression von Reg-Proteinen zu einer Tumorentstehung oder -progression beitragen kann (Zhang 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die hReg1 α -Expression in Magenkarzinomen in Zusammenhang mit entzündetem Nachbargewebe steht. So induzieren hReg1 α -positive Tumore der Magenschleimhaut beispielsweise eine verstärkte Infiltration von Immunzellen in das benachbarte Gewebe (Sekikawa et al. 2005a; Sekikawa et al. 2005b). Die Produktion von hReg1 α wird wiederum durch die proinflammatorischen Zytokine IL6 und IFN γ unter Beteiligung des *signal transducer and activator of transcription 3* (p-STAT3)-Signalwegs induziert (Sekikawa et al. 2008). Dabei ist weithin bekannt, dass der STAT3-Signalweg die Tumorentstehung fördert. STAT3 gilt als sogenanntes Onkogen, das für die Hochregulation einer Vielzahl an Genen, die proliferativ oder antiapoptotisch wirken, verantwortlich ist (Yu et al. 2009). Es handelt sich bei diesem Mechanismus also scheinbar um eine positive Rückkopplungsschleife, die zur Freisetzung von immer mehr hReg1 α führt. Dabei unterstützt hReg1 α zusätzlich das Zellwachstum und wirkt antiapoptotisch (Sekikawa et al. 2005a; Sekikawa et al. 2005b; Sekikawa et al. 2008). Weitere Studien unterstützen die Annahme, dass Reg-Proteine eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation von kolorektalen Epithelzellen spielen, sowie diese Zellen vor Apoptose schützen (Bishnupuri et al. 2010; Dieckgraefe et al. 2002).

Die hohe strukturelle und funktionelle Konservierung der Reg-Familie (Zhang 2003) lässt vermuten, dass neben hReg1 α auch weitere Reg-Proteine die Karzinogenese über IL6-abhängige Signalwege begünstigen. Studien in Pankreastumorzellen belegen, dass die Expression von hReg3 α im Rahmen einer Entzündung in normalen sowie in tumoralen Pankreaszellen ansteigt. Diese Erhöhung der hReg3 α -Produktion wird auch hier durch das proinflammatorische Zytokin IL6 über den JAK2 (Janus-Kinase 2)/STAT3-Signalweg induziert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass dabei JAK2 sowie STAT3 durch exogenes hReg3 α ebenfalls vermehrt exprimiert werden und somit die hReg3 α -Expression in einer positiven Rückkopplungsschleife reguliert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass hReg3 α an den *epidermal growth factor* Rezeptor (EGFR) bindet (Liu et al. 2015b).

Einleitung

Dabei spielt der EGFR eine wichtige Rolle bei der Entstehung unterschiedlichster Tumorentitäten (Hoshino et al. 2007; Troiani et al. 2012; Wu et al. 2014).

In Leber-tumoren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu einer erhöhten hReg3 α -Expression führt (Cavard et al. 2006). Auch in Kolonkarzinomen scheint hReg3 α die Zellproliferation, die Apoptose, die Tumorzellmigration sowie die -invasion zu regulieren. Dabei wirkt hReg3 α als Onkogen über die Aktivierung der AKT- oder *extracellular signal-regulated kinases* (ERK)-Signalwege (Ye et al. 2015).

Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass die Überexpression von Reg-Proteinen scheinbar die maligne Zelltransformation und somit die Tumorentstehung unterstützen. Dabei scheint die Reg-Protein-Produktion in gesunden Geweben unterdrückt zu sein und erst durch autokrine oder parakrine Gegebenheiten induziert zu werden. Die Expression von Reg-Proteinen wird offenbar in diesem Zusammenhang unter anderem durch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL6, IFN γ oder TNF, gefördert (Rechreche et al. 1999). Eine Vielzahl an Studien konnte die Beteiligung unterschiedlichster Signalwege an der Tumorentstehung durch hReg3 α aufzeigen, die genauen Mechanismen, über die hReg3 α wirkt, bleiben jedoch weiterhin unklar.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Antimikrobielle Peptide (AMP) spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort. Sie stellen einen effektiven Abwehrmechanismus gegen ein breites Spektrum an Pathogenen, wie gram-positive und –negative Bakterien, Viren und Pilze, dar. Neben ihrer antimikrobiellen Aktivität wirken sie jedoch auch chemotaktisch auf verschiedene Immunzellen und verbinden somit das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem. Außerdem können AMP durch proinflammatorische sowie antiinflammatorische Einflüsse eine Vielzahl an Immunreaktionen modulieren.

Die regulatorischen Eigenschaften der β -Defensine im Rahmen einer Immunantwort werden in der Literatur widersprüchlich beschrieben. So ist ein Einfluss der β -Defensine auf Antigen-präsentierende Zellen zwar nachgewiesen, es konnte aber sowohl eine aktivierende als auch eine hemmende Wirkung auf die Zytokinproduktion sowie die Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen gezeigt werden. Die genaue Kenntnis über die Regulation einer Entzündungsreaktion könnte jedoch Aufschluss über mögliche Therapieformen geben. Daher bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Untersuchung der immunmodulatorischen Funktion des β -Defensins HBD2 auf Monozyten und

Einleitung

Makrophagen. Hierfür wurden humane Zellen der monozytären Zelllinie THP1 oder primäre Blutmakrophagen mit HBD2 und verschiedenen TLR-Liganden stimuliert, um pro- bzw. antiinflammatorische Effekte nachzuweisen. Außerdem wurden die an der modulatorischen Reaktion beteiligten Rezeptoren und Signalwege näher charakterisiert.

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des humanen *regenerating gene*-Proteins hReg3 α in Entzündungsreaktionen näher charakterisiert werden. Eine Vielzahl an Studien zeigt, dass hReg3 α in chronischen Darmerkrankungen vermehrt produziert wird sowie die Entstehung von Tumoren begünstigt. Die genauen Wirkmechanismen sind jedoch weitestgehend ungeklärt. Zur Charakterisierung des hReg3 α *in vivo* wurde eine hReg3 α transgene Mauslinie generiert, die das hReg3 α ubiquitär überexprimiert. Dabei bestand die Aufgabe zunächst darin, das Transgen auf DNA, mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zellen und Organen nachzuweisen. Anschließend wurde der Einfluss der transgenen hReg3 α -Überexpression in verschiedenen *in vivo*-Entzündungsmodellen untersucht.

2 Material

2.1 Geräte

Analysenwaage CP 224S	Sartorius, Göttingen
Assistant Counter AC-12	De Bruyne Instruments, Knokke-Heist, Belgien
Bakterienschüttler MaxQ 4000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BD LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Begasungsbrutschrank Cell Safe	Integra Biosciences, Heidelberg
Eismaschine AF80	Scotsman, Mailand, Italien
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Fastblot B34	Biometra, Göttingen
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach
Geldokumentation GeneGenius	Syngene, Cambridge, UK
Gelkammer Sub-Cell® GT	Bio-Rad, München
Haarschneidemaschine Genio Type 1565	Moser Profiline, Unterkirnach
ImageQuant LAS4000 mini	GE Healthcare, Freiburg
Inkubator BBD 6620	Heraeus, Hanau
iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München
Kreisschüttler GFL-3015	Omnilab, Mettmenstetten
Kryostat CM3050S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Luminometer Glomax®	Promega, Mannheim
Magnetührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Leitz Diaplan	Ernst Leitz Wetzlar, Wetzlar
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mini-PROTEAN® Electrophoresis System	Bio Rad, München
Mini Trans-Blot® Cell	Bio Rad, München
Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbach

Material und Methoden

Mr Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nanophotometer	Implen GmbH, München
Netzgerät PowerPac 300	Bio-Rad, München
Netzgerät PowerPack P25 T	Biometra, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Gerät iCycler	Bio-Rad, München
PCR-Gerät MyCycler	Bio-Rad, München
pH-Meter Inolab	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet pro®	Brand, Wertheim
Schieblehre	Kern, Balingen-Frommern
Slab Dryer Model 483	Bio Rad, München
Sterilbank HERAsafe® KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Stickstofftank MVE 810 Eterne/MVE	German Cryo, Jüchen
EuroCyl	
Thermoblock Bio TDB-100	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
ThermoShaker TS-100	A. Hartenstein, Würzburg
Tissue Lyser LT	Qiagen, Hilden
Trennkammer für Gegenstromzentrifugation	Beckmann, München
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin, Mörfelden-Walldorf
Ultra-Turrax T25	IKA, Staufen
Ultrazentrifuge Sorvall® RC6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge J6M-E	Beckmann, München

2.2 Verbrauchsmaterialien

Dako Pen	Dako, Hamburg
Deckgläser (Automat Star)	Engelbrecht, Edermünde
Eppendorfcups (1,5 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen BD Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier Whatman®	A. Hartenstein, Würzburg
Glas-Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Hyperfilm™ MF	GE Healthcare, Freiburg
Kanülen BD Microlance 3™	BD Biosciences, Heidelberg
Kryoröhrchen Cryo Tubes™	Nunc, Langenselbold
Microwelltiterplatten MicroWell™ (96-Well)	Nunc, Langenselbold
Multiwell-Platten (6, 12, 24, 48 und 96-Well)	BD Biosciences, Heidelberg
Objektträger (geschnitten, Matt-Rand)	Engelbrecht, Edermünde
PCR Platte 96-Well (farblos, ultra-dünnwandig)	Peqlab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (100mm, quadratisch)	Sterilin Ltd, London, UK
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Transfermembran Immobilon-P	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäß (1, 1,5, 15 und 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rollerflaschen 850cm²	Corning, Lowell, MA, USA
Safe Seal-Tips professional	Biozym, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten (5 und 10ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Siebgewebe aus Polyamid	Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg
Spritzen BD Plastikpak™ (1, 2, 5, 10 und 20ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Stahlkugel, (rostfrei, 5mm)	Qiagen, Hilden
Sterilfilter (0,2µM)	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter Bottle Top 75mm Nalgene®	Nunc, Langenselbold
Teflonbeutel Biofolie 25	Heraeus, Hanau
UV-Küvette micro, Plastibrand®	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen (25, 75 und 175cm²)	Sarstedt, Nümbrecht

Material und Methoden

Zellkulturflaschen BD Falcon™ (25, 75 und 175cm ²)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber (25 und 39cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb Cell Strainer BD Falcon (40µm und 70µM)	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenbecher (300ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien

A438079	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
AB-Gruppen-Serum, human	PAN Biotech, Aidenbach
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel® 30	Roth, Karlsruhe
Agar, bacteriological	Affymetrix, Cleveland, OH, USA
Agarose, electrophoresis grade	Bio&Sell, Nürnberg
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Apyrase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Bacteria Lysis Buffer	Roche Diagnostics, Mannheim
BD OptEIA™ Substrat Reagent A und B	BD Biosciences, Heidelberg
BSA	PAA Laboratories, Cölbe
Chealating Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets EASYpack	Roche Diagnostics, Mannheim
compound 48/80	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CuSO ₄	Merck, Darmstadt
Dako REAL Antibody Diluent	Dako, Hamburg
Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution	Dako, Hamburg
Dextranodiumsulfat (DSS)	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA Standard (100bp und 1kb Ladder)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
dNTP-Mix	Promega, Mannheim

Material und Methoden

ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg
Entellan® Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
EnVision Detection Systems Peroxidase/ DAB, Rabbit/Mouse	Dako, Hamburg
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
Ficoll/Hypaque	PAN Biotech, Aidenbach
fMLP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs, Frankfurt a. M
Hämatoxylin (Meyer's Hämalaun Lösung)	Merck, Darmstadt
human IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hygromycin B	PAA Laboratories, Cölbe
Insect Express Prime	PAA Laboratories, Cölbe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ketamin 10%	Bela-Pharm, Vechta
LB Broth	Affymetrix, Cleveland, OH, USA
LPS (E. coli 0127:38)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LPS (E.coli 055:B5)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MACS MicroBeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Magermilchpulver	Granovita, Lüneburg
Neomycin (G418/G420)	PAN Biotech, Aidenbach
nukleasefreies H ₂ O	Promega, Mannheim
ox. ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pam ₃ CSK ₄	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
Pertussis-Toxin	List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA
polyI:C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein Marker VI (10-245) prestained	AppliChem, Darmstadt
Restriktionspuffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.

Material und Methoden

RNase AWAY	Molecular BioProducts, San Diego
RNA later™ RNA Stabilisation Reagent	Qiagen, Hilden
RPMI 1640 Fertigmedium	PAN Biotech, Aidenbach
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
Tween®20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wash Buffer 10x	Dako, Hamburg
Xylazin 2%	Serumwerk, Bernburg
YO-PRO®1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zymosan	InvivoGen, San Diego, CA, USA
β-Mercaptoethanol	PAN Biotech, Aidenbach

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

2.4 Puffer und Lösungen

Abstopplösung für ELISA	2N H ₂ SO ₄
Blockierlösung für ELISA	1% BSA in PBS oder TBS-T
Blockierlösung für Western Blot	5% Magermilch in TBS-T
Blotpuffer (10x)	2M Glycin 250mM Tris
Coomassie-Entfärbepuffer	10% Essigsäure 40% Ethanol
Coomassie-Färbepuffer	10% Essigsäure 40% Ethanol 0,2% Coomassie-Brillant Blue R250
DEPC-H ₂ O	0,1% DEPC
DNA-Ladepuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerol

Material und Methoden

Einfriermedium für Zellen (2x)	20% DMSO 80% FCS
Erythrozyten-Lysepuffer	0,17M NH ₄ Cl 20mM HEPES
FACS-Puffer	2% FCS in PBS
Elutionspuffer für Defensinaufreinigung	50mM NaH ₂ PO ₄ 300mM NaCl 100mM oder 250mM Imidazol
Lämmli-Auftragspuffer (4x)	0,5M Tris-HCl, pH 6,8 40% Glycerin 0,04% β-Mercaptoethanol 4% SDS 0,05% Bromphenolblau
Lämmli-Elektrophorese-Puffer (5x)	120mM Tris-Base 0,95M Glycin 0,5% SDS
MACS-Puffer (entgast, pH 7,3)	0,5% BSA 2mM EDTA in PBS
Neutralisierungslösung (pH 7,0)	0,5M Tris-Base 1,5M NaCl
PBS (pH 7,3)	137mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄ 2,7mM KCl
PBS-T	0,05% Tween [®] 20 in PBS
RIPA-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 7,5 150mM NaCl 1% Nonidet P40 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS
Säulenregenerierungspuffer	0,2M EDTA 0,5M NaCl
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA

Material und Methoden

TBS (pH 7,4)	150mM NaCl 2,7mM KCl 25mM Tris-Base
TBS-T	0,05% Tween® 20 in TBS
Tris-Puffer für SDS-PAGE	1,5M Tris-HCl (pH 8,8) und 1,0M Tris-HCl (pH 6,8)
Tris-Puffer (Neutralisationspuffer)	1,0M Tris-HCl (pH 9,0)
Trypanblau-Lösung (pH 7,4)	0,16% (w/v) Trypanblau 150mM NaCl
Waschpuffer für Defensinaufreinigung	50mM NaH ₂ PO ₄ 300mM NaCl 20mM Imidazol

2.5 Kits

Ab-Match Assambly Human PAP1 Kit	MBL International Cooperation, Woburn, MA, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
Diff-Quick Stainig Kit	Medion Diagnostics AG, Düdingen, Schweiz
DNase I Kit	Promega, Mannheim
ELISA Duo Sets	R&D Systems, Wiesbaden
jetPRIME™ Transfection Kit	Polyplus, Illkirch, Frankreich
LDH Cytotoxicity Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
M-MLV-Reverse Transkriptase Kit	Promega, Mannheim
N-Histofine® Simple Stain MAX PO Kit (anti-rabbit)	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
NucleoSpin RNAII Kit	Macherey und Nagel, Düren
Puregene Gentra DNA Purification Kit	Qiagen, Hilden
• Cell Lysis Solution	
• Protein Precipitation Solution	

Material und Methoden

Pure Yield™ Plasmid Miniprep System Promega, Mannheim
Quantikine ELISA Kit Mouse TNF-alpha R&D Systems, Wiesbaden
Reverse Transkription System Promega, Mannheim
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Promega, Mannheim
Purification System
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Promega, Mannheim
System

2.6 Enzyme

iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, München
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Promega, Mannheim
REDTaq® DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) in einer Konzentration von 100µM bezogen. Für eine Standard-PCR wurden die Primer 1:10, für eine quantitative Real-Time PCR 1:20 mit nukleasefreiem Wasser vorverdünnt.

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

Reverse Transkription

Oligo (dT) 15 Primer 5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT 3'

mRNA-Expression

mIFN γ	RT ² qPCR Primer Assay
mIL6	RT ² qPCR Primer Assay
mTNF	RT ² qPCR Primer Assay

housekeeping Gene

18S rRNA 5'	5'GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3'
18S rRNA 3'	5'CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG3'
HPRT 5'	5' CTC ATG GAC TGA TTA TGG ACA GGA C 3'

Material und Methoden

HPRT 3'

5' GCA GGT CAG CAA AGA ACT TAT
AGC C 3'

Primer zur Genotypisierung der hReg3 α -Mauslinie

rabbit β -globulin pCAGEN

5' GCA ACG TGC TGG TTA TTG TG 3'

hReg3 α pCAGEN geno

5' CCA GAG GGC CGC TTC TGG CAG
G 3'

Primer für Klonierung hReg3 α in SIg+

Reg3 α SIg plus 5' Hind III

5' AAG CCT GAA GAA CCC CAG AGG
GAA CTG 3'

Reg3 α SIg plus 3' Xba I

5' TCT AGA GTC AGT GAA CTT GCA
GAC 3'

Sequenzierprimer

T7 Promotor forward

5' AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'

BGH reverse

5' TAG AAG GCA CAG TCG AGG 3'

2.8 Peptide

Defensin:Ig Fusionsproteine

eigene Herstellung

Kontrollpeptid SIg+

eigene Herstellung

hIgG

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.9 Plasmide

pCAGEN

Addgene, Cambridge, MA, USA

pCAGEN hReg3 α mit endogener

eigene Herstellung

Signalsequenz

pMT Bip V5-His Hygro HBD2:Ig

eigene Herstellung

SIg+ hReg3 α

eigene Herstellung

Signal pIgplus (SIg+) Protein-
expressionsvektor

R&D, Wiesbaden

2.10 Antikörper

Anti mCD31 (PECAM-1, Ratte)

Dianova, Hamburg

Anti hIgG HRP (Esel)

Dianova, Hamburg

Anti hReg3 α (Kaninchen)

Acris Antibodies, Herford

Material und Methoden

Anti hReg3α (Kaninchen)	Sigma, Aldrich, Taufkirchen
Anti Kaninchen IgG HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti V5 HRP (Maus)	Invitrogen, Karlsruhe

2.11 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kultur
Drosophila-Schneider-2-Zellen	Insektenzelllinie, semi-adhärent	Insect Express Prime
MC-38	murine Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie, syngen zu C57BL/6, adhärent	RPMI 1640, 10% FCS, 50µM β-Mercaptoethanol
THP1	humane Blutmonozyten-Zelllinie, Suspensionszellen	RPMI 1640, 10% FCS

2.12 Versuchstiere

C57BL/6N Wildtyp	Janvier, Le Genest, Frankreich bzw. Eigenzucht (D4)
C57BL/6N-Tg(REG3A) bzw. hReg3αTg	eigene Herstellung
B6-P2X7 ^{-/-}	Prof. Dr. K. Biber, Universitätsklinikum Freiburg

2.13 Software und Internet-Ressourcen

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2010 erstellt. Die Darstellung der Diagramme erfolgte mit GraphPad Prism Version 4.0a. Die Auswertung von Quantitativen Real-Time PCR wurde durch das Programm Bio-Rad iQ5 2.1 unterstützt. Für die Auswertung durchflusszytometrischer Messungen kam die Software BD FACSDiva zum Einsatz. Die Archivierung von Literatur und das Erstellen des Literaturverzeichnisses erfolgte unter Zuhilfenahme von Citavi 5.0. Außerdem wurde die Internetplattform Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) für die Literaturrecherche verwendet.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolation von genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus frischen oder bei -20°C gelagerten Gewebestücken. Das zu verarbeitende Material wurde in 500µl Cell Lysis Solution (Qiagen) aufgenommen und 0,4µg/µl Proteinase K (Promega) hinzugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 56°C schüttelnd bei 700rpm im Thermomixer comfort (Eppendorf) verdaut. Anschließend wurden 200µl Protein Precipitation Solution (Qiagen) hinzugegeben und mittels eines Vortex MS2 Minishakers (IKA) durchmischt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1700g wurde der Überstand zu 700µl 100%igem Isopropanol gegeben und durch Invertieren gemischt. Daraufhin erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 18 000g für 5min. Das Pellet wurde anschließend in 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nun konnte das Pellet getrocknet und die DNA in 50µl nucleasefreiem ddH₂O resuspendiert werden. Die Lagerung von genomischer DNA erfolgte bei 4°C.

3.1.2 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen und aus Gewebe erfolgte mittels des RNA-Isolationskits Nucleo-Spin® RNA (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben.

Hierfür wurde zur RNA-Isolation bestimmtes Gewebe zunächst in 500µl RNA later™ (Qiagen) auf Eis gesammelt und bei -80°C zwischengelagert. Maximal 30mg Gewebe wurden abgewogen und in 350µl RA1-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol überführt. Nach Zugabe einer Stahlkugel (Ø 5mm, Qiagen) wurde das Gewebe im Tissue Lyser LT (Qiagen) 2min bei 50Hz aufgeschlossen.

Die gewonnene RNA wurde in 50µl nukleasefreiem H₂O resuspendiert und bei -80°C gelagert. Um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, wurden alle Oberflächen und verwendeten Gegenstände mit RNase AWAY (Molecular BioProducts) gereinigt und ausschließlich gestopfte Spitzen (Biozym) verwendet. Alle Arbeiten mit isolierter RNA erfolgten auf Eis.

Material und Methoden

3.1.3 Vermessung von DNA und RNA

Die Vermessung von DNA und RNA erfolgte mit dem Nanophotometer (Implen GmbH) bei einer Wellenlänge von 260nm. Dabei berechnet sich die Nukleinsäurekonzentration folgendermaßen:

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

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

Außerdem gibt das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} Aufschluss über die Proteinkontamination der Lösung. Ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 spricht für eine saubere Nukleinsäureisolation.

3.1.4 Reverse Transkription

Das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgte mittels reverser Transkription. Hierfür wurde zunächst ein DNase Verdau durchgeführt. 1 μg RNA wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 8 μl verdünnt und mit je 1 μl DNase-Puffer und DNase (Promega) versetzt. Der Ansatz wurde für 30min bei 37°C inkubiert und die Reaktion nach Zugabe von 1 μl DNase-Stop Lösung (Promega) bei 65°C für 10min beendet. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 μl Oligo dT-Nukleotiden (Fermentas) versetzt. Es erfolgte die Inkubation für 5min bei 70°C, wobei die Oligo dT-Nukleotide an den PolyA-Schwanz der aufgeschmolzenen RNA binden. Nach einer weiteren Inkubation für 5min auf Eis wurde folgender Mastermix zugegeben:

Mastermix für die reverse Transkription

5 μl	MMLV-Puffer
1,25 μl	dNTP-Mix
1 μl	MMLV Reverse Transkriptase
5,75 μl	nukleasefreies H ₂ O

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

Material und Methoden

3.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA wurde die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Hierfür wurde die benötigte Menge DNA mit nukleasefreiem H₂O auf ein Volumen von 14µl aufgefüllt und in einem PCR-Reaktionsgefäß mit folgendem Mastermix gemischt:

Mastermix für die Polymerase-Kettenreaktion:

10µl	RedTaq Ready Mix™ PCR Reaction Mix (enthält 2x RedTaq Puffer mit Ladepuffer, dNTPs, MgCl ₂ und RedTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich))
0,5µl	5'-Primer (10pmol/µl)
0,5µl	3'-Primer (10pmol/µl)

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm in einem PCR-Cycler:

Programm für eine PCR

1x	Initiale Denaturierung	94°C 3min
35x	Denaturierung	94°C 30s
	Primer-Annealing	54-60°C 30s
	Elongation	72°C 1min/1kb
1x	Finale Elongation	72°C 5min

Nach der PCR wurde die DNA bei 4°C aufbewahrt.

3.1.6 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde die DNA-Probe falls nötig mit 6x Ladepuffer versetzt und 10µl davon auf ein angemessen konzentriertes Agarosegel aufgetragen. Um Fragmentlängen von 0,5kb bis 7kb aufzutrennen, wurde ein 1%iges Gel verwendet, wohingegen mit einem 1,5-2%igen Gel eine Auftrennung von 0,2kb bis 1kb erreicht wurde. Zur Bestimmung der Produktgröße wurde ein Standard mitgeführt. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 0,5x TAE-Puffer aufgekocht und mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend erfolgte der Gellauf bei 120V sowie die Geldokumentation mittels UV-Licht.

3.1.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR erlaubt neben der Vervielfältigung von Nukleinsäuren mittels PCR eine Quantifizierung und damit die RNA-Expressionsanalyse. Die Quantifizierung beruht dabei auf der Messung von Fluoreszenz-Farbstoffen, die unspezifisch in doppelsträngige DNA interkalieren, wie z.B. SYBR Green. SYBR Green emittiert nach Anregung bei 498nm Licht der Wellenlänge 522nm. Da die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt, können diese quantifiziert werden.

Für die qPCR wurde der iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) verwendet, der nach Zugabe von Primern und cDNA alle Bestandteile für eine PCR enthält. Die cDNA-Proben wurden in Duplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert und im iQTM 5 Multicolor Real Time PCR Cycler (Biorad) vermessen. Die Reaktionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

cDNA (40ng)	5µl
5' Primer (5pmol/µl)	1µl
3' Promer (5pmol/µl)	1µl
iQTM SYBR [®] Green Supermix	12,5µl
nukleasefreies Wasser	<u>5,5µl</u>
	25µl

Die qPCR-Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

		Temperatur	Zeit
1. Schritt	Denaturierung	95°C	5min
2. Schritt	Denaturierung	95°C	15s
(45 Zyklen)	Primer-Annealing und Elongation	60°C	1min
3. Schritt	Termination	95°C	1min
4. Schritt	Vorbereitung der Schmelzkurve		1min
5. Schritt	Schmelzkurve (in 0,5°C Schritten)	55-95°C	

Die Schmelzkurve dient als Nachweis einer spezifischen Amplifikation.

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge an DNA dient bei der qPCR der sogenannte C_T-Wert (*threshold cycle*). Dieser gibt an, ab welchem PCR-Zyklus die

Material und Methoden

Fluoreszenz der amplifizierten DNA die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Bei Erreichen des C_T -Wertes enthalten alle Reaktionsgefäße die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Je mehr Ausgangsmaterial an cDNA und somit mRNA in der Reaktion vorhanden war, desto früher wird der C_T -Wert erreicht. Zusätzlich zu dem zu analysierenden Gen wird die Expression eines sogenannten *housekeeping* Gens untersucht, das homogen und ubiquitär exprimiert wird. Die Expression der untersuchten RNA kann nun mittels der ΔC_T Methode relativ zur Expression des *housekeeping* Gens berechnet werden.

3.1.8 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktionsverdaue wurden Enzyme der Firma New England Biolabs verwendet. Dazu wurden jeweils 1U der entsprechenden Enzyme und 5 μ l des vom Hersteller empfohlenen Puffers zusammen mit 1 μ g DNA mit nukleasefreiem H₂O auf ein Endvolumen von 50 μ l aufgefüllt. Der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Anschließend konnten die verdauten DNA-Proben in einem Agarosegel aufgetrennt und gereinigt werden (3.1.9).

3.1.9 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese (3.1.6). Die entsprechenden DNA-Banden wurden auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 312nm ausgeschnitten. Die Isolation von PCR-Produkten bzw. restriktionsverdauter DNA erfolgte anschließend mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) nach Herstellerangaben.

3.1.10 Ligation

Der Ligationsansatz enthielt neben 14,5 μ l des gewünschten DNA-Fragments und 2 μ l des Zielvektors noch 1,5 μ l T4 DNA Ligase und 2 μ l 10x T4 Ligase Puffer (New England Biolabs). Die Reaktion fand bei 14°C über Nacht statt. Das Produkt der Ligation wurde anschließend zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

Material und Methoden

3.1.11 Transformation

Zu 50 μ l kompetenter *E. coli* DH5 α wurden jeweils 1 μ l DNA aus einer Plasmid-Präparation oder 20 μ l eines Ligationsansatzes gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Nach 90s Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad wurden die Bakterien 5min auf Eis gehalten, bevor die Zugabe von 1ml LB-Medium erfolgte. Die Bakterien wurden für 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert, ehe 50 μ l des Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit 200 μ g/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C vermehrt wurden.

3.1.12 Bakterienkultur

Nach der Transformation gewachsene Bakterienkolonien wurden in frisches LB-Medium mit 200 μ g/ml Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37°C und 220rpm geschüttelt. Im Anschluss konnte die Präparation der Plasmid-DNA durchgeführt werden.

3.1.13 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 α erfolgte mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System oder dem Pure Yield™ Midiprep System Kit (Promega) nach Herstellerangaben.

3.1.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Sequenzierungen wurden von GeneArt (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 300ng DNA sowie 1 μ l Primer (10 μ M) verwendet und auf 8 μ l Gesamtvolumen mit nukleasefreiem H₂O eingestellt. Die verwendeten Sequenzierprimer sind unter (2.7) aufgelistet.

3.1.15 Mikrobiom-Analyse mittels *Next Generation Sequencing*

3.1.15.1 Isolation und Aufreinigung von Stuhl-DNA

Aus dem Blinddarm einer naiven Maus wurden 100mg Stuhl in ein Reaktionsgefäß überführt, in Flüssigstickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert (Tong et al. 2014).

Zur Kontrolle aller folgenden Einzelschritte wurde den Proben eine definierte Menge an internem Mikrobiom-Standard zugesetzt, der aus drei Bakterienarten (*Salinibacter ruber*, *Alicyclobacillus acidiphilus* und *Rhizobium radiobacter*) besteht. Diese Bakterien gehören

Material und Methoden

unterschiedlichen Phyla an, besitzen verschiedene Zellwandstrukturen und kommen in humanen und murinen Mikrobiom-Datensätzen nicht vor.

Für die Präparation von Stuhlsuspensionen wurde der Stuhl auf Eis aufgetaut und mit steriles PBS gemischt. Zur Nukleinsäure-Gewinnung aus dieser Suspension wurden die zellulären Bestandteile enzymatisch, chemisch sowie mechanisch in mehreren Schritten aufgeschlossen. Die eigentliche Nukleinsäureaufreinigung wurde im MagNA Pure Gerät (Roche Diagnostics) durchgeführt. Dabei basiert die DNA-Extraktion auf der „Magnetic Bead“-Technologie, bei der die Probe mit magnetischen Glaskugeln in einem Guanidin-reichen Puffer vermischt wird. Aufgrund der Pufferzusammensetzung kann die DNA an die Silikatoberfläche der magnetischen Glaskugeln binden. Diese Beads wurden nachfolgend mittels Magneten von der Suspension getrennt und gewaschen. Mit Hilfe eines Elutionspuffers konnte die DNA abschließend von den Glaskugeln gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt werden.

Die Probenaufbereitung wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Reischl (Molekulare Diagnostik, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt.

3.1.15.2 Quantifizierung 16S ribosomaler Genkopien mittels Echtzeit-PCR

Die Amplifikation der konservierten DNA-Sequenzabschnitte des 16S ribosomalen RNA (rRNA) Gens wurde mittels Echtzeit-PCR unter Zuhilfenahme spezifischer Primer (Biomers.net GmbH) durchgeführt. Dabei wird ein Amplifikat mit einer variablen Größe für verschiedene Bakterienspezies der Mikrobiota erzeugt. Der im PCR-Ansatz enthaltene SYBR Green Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und ermöglicht so die Detektion der Amplifikation, da mit Fortschreiten der Zyklusanzahl ein stärkeres Fluoreszenzsignal erhalten wird. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde ein Plasmid-Standard, der 16S rDNA-Sequenzabschnitte enthielt, in verschiedenen Verdünnungsstufen mitgeführt. Die ermittelte Standardgerade ermöglichte die Umrechnung der Amplifikationsschwellenwerte der Proben in einen Konzentrationswert und somit die Bestimmung der vorhandenen 16S rRNA Genkopien in den analysierten Proben.

Die Amplifikation der 16S rRNA Gene der im internen Mikrobiom-Standard enthaltenen Bakterienspezies erfolgte in drei separaten Ansätzen. Dabei kamen Primer (Biomers.net GmbH), die an speziesspezifische Sequenzabschnitte der 16S rRNA Gene binden, zum Einsatz. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte dabei mit erregerspezifischen

Material und Methoden

fluoreszierenden Sonden, die den Anstieg des amplifizierten Produkts durch Fluoreszenzemission messbar machen.

Die Quantifizierung der 16S rRNA Gene wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Reischl (Molekulare Diagnostik, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg) vorgenommen.

3.1.15.3 Amplifikation und Aufreinigung von DNA-Präparationen

Für die speziesübergreifende Bakterien-16S-rDNA-PCR wurden jeweils 25ng Proben-DNA eingesetzt. Die PCR wurde mit sequenzspezifischen Primern für die V4-Region des 16s rRNA Gens durchgeführt. Zur späteren Analyse der Mikrobiomzusammensetzung mittels *Next Generation Sequencing* wurden Primer verwendet, die einen probenspezifischen Multiplex Identifier (MIDs), einen Lib-L Titanium Adapter sowie eine Key Sequenz besitzen.

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikationsprodukte mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und die Banden erwarteter Größe ausgeschnitten. Die Gelextraktion der DNA erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Bevor die DNA-Sequenzierung zur Analyse der Mikrobiota mit dem GS FLX+ System durchgeführt werden konnte, wurde die DNA mit AmPureXP Beads (Beckmann-Coulter) gereinigt. Dabei bindet DNA in einem Polyethylenglycol (PEG)-haltigen, 2,5M NaCl-Puffer an die Oberfläche der AMPureXP Beads. Da die DNA-geladenen Beads magnetische Eigenschaften aufweisen, können sie mit Hilfe eines Magneten von Suspensionen getrennt werden. Der Wechsel zu einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration führt zu einer Ablösung der DNA-Fragmente von der Bead-Oberfläche. Durch erneutes Anlegen eines magnetischen Feldes können nun die Beads von der DNA-Lösung abgetrennt werden und die gereinigte DNA liegt vor. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung erfolgte mittels Quant-iTTM PicoGreen[®] dsDNA Reagenz (Molecular Probes/Invitrogen) nach Herstellerangaben.

Die Amplifikation und Probenaufbereitung wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Reischl (Molekulare Diagnostik, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt.

3.1.15.4 Emulsions-PCR und *Next Generation Sequencing* mittels GS FLX+ System

Das *Next Generation Sequencing* (NGS) wurde mit dem FLX+ System (Roche Diagnostics) durchgeführt. Dabei nutzt das System die räumliche Trennung und klonale Vervielfältigung von einzelnen DNA-Molekülen. Hierfür wurden die DNA-Moleküle mit speziellen Beads verknüpft. Die Menge der Beads wurde so gewählt, dass statistisch je ein DNA-Molekül an ein Bead bindet. Anschließend wurden die Beads in die wässrige Phase einer Öl-Wasser Emulsion eingebracht und in einer sogenannten Emulsions-PCR klonal amplifiziert. Die DNA-haltigen Beads wurden nach der Emulsions-PCR über einen spezifischen Primer, der seinerseits an Capture-Beads gebunden ist, angereichert und zur Sequenzierung auf eine sogenannte Pico Titer Platte aufgebracht. Diese Pico Titer Platte besitzt an ihrer Oberfläche Vertiefungen, die so gestaltet sind, dass jeweils nur ein DNA-Bead in eine Vertiefung gelangen kann. Danach erfolgt die Sequenzierung nach dem *Pyrosequencing*-Prinzip. Hierfür werden in einer vorgegebenen Reihenfolge die einzelnen Desoxynukleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin in die Vertiefungen der Pico Titer Platte zugegeben. Eine Polymerase versucht den DNA-Strang ausgehend vom Sequenziertprimer doppelsträngig aufzufüllen. Passt das zugegebene Nukleotid, so wird es eingebaut und dabei ein Molekül Pyrophosphat freigesetzt. Mit Hilfe des Enzyms Sulfurylase wird daraus ATP erzeugt, das wiederum von dem Enzym Luciferase unter Freisetzung von Licht hydrolysiert wird. Diese Lichtsignale werden aufgezeichnet, nach dem Lauf von einer Software analysiert und die Sequenz der ursprünglich auf dem entsprechenden Bead angelagerten DNA ermittelt.

Die Durchführung der Emulsions-PCR und des *Next Generation Sequencing* erfolgte nach Herstellerangaben entsprechend dem „emPCR Amplification Method Manual - Lib-L LV (XL+ & XLR70)“ und dem „Sequencing Method Manual (GS FLX+ XL+) (Version Juni 2013)“ nach dem XL+ Protokoll und wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Reischl (Molekulare Diagnostik, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg) übernommen.

3.1.15.5 Datenanalyse

Die Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften mittels *Next Generation Sequencing* beruht auf der Hochdurchsatz-Nukleinsäuren-Sequenzanalyse von universellen Markergenen, wie z.B. des 16S ribosomalen RNA Gens. QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology, Version 1.8.0) ist ein Open Source Software Paket zur Auswertung und Datenanalyse von Mikrobiom-Sequenzdaten. Die Datenauswertung enthält die

Material und Methoden

Qualitätskontrolle der NGS-Rohdaten, das Clustern von sogenannten „Operational Taxonomic Units“ (OTUs), die taxonomische Zuordnung durch Abgleich mit 16S RNA Referenzdatenbanken und eine statistische Analyse zur Alpha- und Beta-Diversitätsbestimmung.

Die Datenanalyse wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Hiergeist (Molekulare Diagnostik, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg) übernommen.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Isolation von Proteinextrakten

Um die Proteinexpression verschiedener Zellen mittels Western Blot Analyse (3.2.5) zu untersuchen, wurden Zelllysate hergestellt. Hierfür wurden die Zellpellets in 50µl RIPA-Puffer resuspendiert. Für die Stabilisierung der Proteine in dieser Lösung wurde zusätzlich ein Protease-Inhibitor-Cocktail zugegeben. Die Zelllysate wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2 Immunopräzipitation mittels Chelating Sepharose

Die in *Drosophila*-Schneider 2 (DS2)-Zellen hergestellten Defensin:Ig-Fusionsproteine (3.3.5) sind neben der Kopplung an den Fc-Teil des humanen IgG1 ebenfalls mit einem 6-fach Histidin-Tag versehen. Durch diesen können die Defensin:Ig-Konstrukte sowohl nachgewiesen werden, als auch aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden.

Hierfür wurde je ein Liter des gesammelten, sterilfiltrierten Zellkulturüberstands mit 1ml Chelating Sepharose™ 4 Fast Flow versetzt. Die Immunopräzipitation des Defensins erfolgte über Nacht bei 4°C rollend. Zum Pelletieren der Sepharose-Defensin-Verbindungen erfolgte eine Zentrifugation bei 3 000g für 10min und 4°C.

Für einen schnellen Nachweis des Defensins wurden 50µl der Sepharose-Defensin-Verbindung in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 4x Lämmli-Puffer im Verhältnis 1:4 versetzt. Nach dem Denaturieren der Mischung für 5min bei 95°C konnte eine SDS-Gelelektrophorese (3.2.4) durchgeführt werden.

Für die Proteinaufreinigung wurde die Sepharose-Defensin-Verbindung anschließend mit Hilfe einer Pasteurpipette in eine Glassäule überführt. Dabei stellte die Sepharose das eigentliche Säulenmaterial dar. Die Elution des Defensin:Ig-Konstrukts erfolgte mittels aufsteigenden Imidazol-Konzentrationen. Hierfür wurde die Sepharose zunächst mit 5ml

Material und Methoden

Waschpuffer (20mM Imidazol) gewaschen. Anschließend wurde zweimal mit je 1ml Elutionspuffer 1 (100mM Imidazol) und dreimal mit je 1ml Elutionspuffer 2 (250mM Imidazol) eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden jeweils getrennt gesammelt, in Dialysekassetten überführt und zweimal gegen drei Liter PBS dialysiert.

Um das Säulenmaterial für eine erneute Anwendung zu regenerieren, wurde die Sepharose mit dem doppelten Säulenvolumen an 0,2M EDTA/0,5M NaCl gewaschen, wodurch das gebundene Cu²⁺ abgelöst wurde. Anschließend wurde mit dem 6- bis 9-fachen Säulenvolumen an 0,5M NaCl nachgespült bis keine Blaufärbung der Sepharose mehr zu sehen war. Anschließend konnte die Sepharose im halben Säulenvolumen 20% Ethanol aufgenommen und bei 4°C gelagert werden.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA™ Protein Assay Kit von Pierce (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Die dabei entstandene Farbreaktion wurde am Mithras LB 940 (Berthold Technologies) bei einer OD₅₄₀ vermesssen.

3.2.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenauf trennung denaturierter Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher, eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970). Dabei wird durch gebundenes SDS die Eigenladung der Proteine maskiert und die Auftrennung nach deren Molekulargewicht ermöglicht.

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN® Electrophoresis System (Bio Rad) verwendet und Gele mit einer Konzentration von 4% Acrylamid/Bisacrylamid im Sammelgel und 15% Acrylamid/Bisacrylamid im Trengel gegossen.

Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die Proteinproben mit 4x Laemmli-Ladepuffer versetzt und für 5min bei 95°C aufgekocht. Zur späteren Kontrolle der Proteingröße wurden neben den Proben stets 3µl des Proteinstandards Protein Marker VI (AppliChem, Darmstadt) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 180V und 40mA für ca. 1h in der Elektrophoresekammer Mini Trans-Blot® Cell (Bio Rad).

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine entweder mit der Western-Blot-Technik (3.2.5) auf eine PVDF-Membran transferiert oder mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für ca. 15min in Coomassie Brilliant Blue

Material und Methoden

R250-Lösung geschwenkt und anschließend so lange in Coomassie-Entfärblerlösung geschwenkt bis der Hintergrund vollständig entfärbt, die Proteinbanden jedoch gut erkennbar waren. Abschließend wurde das gefärbte Polyacrylamidgel im Geltrockner Slap Dryer Model 483 (Bio Rad) bei 80°C unter Vakuum auf Whatman®-Papier getrocknet.

3.2.5 Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die aufgetrennten Proteine auf dem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendiflourid (PVDF)-Membran Immobilon™ (Millipore) transferiert.

Für den Proteintransfer kam das sogenannte SemiDry-Verfahren zum Einsatz. Hierfür wurden 6 Whatman-Papiere und die PVDF-Membran zunächst auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Anschließend wurde die PVDF-Membran zur Hydrophilisierung für je 2min in Methanol und Wasser geschwenkt. Die Whatman®-Papiere, das SDS-Gel sowie die PVDF-Membran wurden in Blotpuffer äquilibriert und abschließend der Western-Blot auf der Blot-Apparatur Fast Blot (Biometra) aufgebaut. Hierfür wurden 3 Whatman®-Papiere, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und weitere 3 Whatman®-Papiere blasenfrei aufeinander gelegt. Der Proteintransfer erfolgte für 70min bei einer Spannung von 1mA pro cm².

Anschließend konnten über die Bindung von spezifischen Antikörpern Proteine auf der PVDF-Membran nachgewiesen werden. Hierfür wurde die PVDF-Membran zunächst für 1h bei RT in 5% Magermilchpulver/TBS-T geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit 2% Magermilchpulver/TBS-T wurde die PVDF-Membran für 1h bei RT mit dem primären Antikörper in 2% Magermilchpulver/TBS-T inkubiert und erneut dreimal mit 2% Magermilchpulver/TBS-T gewaschen. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) kovalent gebunden war, in 2% Magermilchpulver/TBS-T für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C zugegeben. Abschließend erfolgten zwei Waschschritte mit 2% Magermilchpulver/TBS-T sowie ein Waschschritt mit TBS-T ehe das Signal mittels Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen wurde. Dazu wurde die Membran für 1min im ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare), das das Substrat für die Peroxidase enthält, nach Angabe des Herstellers geschwenkt. Die Detektion des Signals erfolgte mit Hilfe des ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare). Die Expositionslänge richtete sich nach der Stärke des Signals.

Material und Methoden

3.2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mittels eines ELISAs ist es möglich geringe Antikörper- oder Antigenkonzentrationen in Lösungen wie Serum oder Zellkulturüberständen nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde das System des „Sandwich-ELISAs“ verwendet. Hierfür werden sogenannte „Fang“-Antikörper an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden, die anschließend das zu detektierende Antigen, z.B. ein Zytokin, aus der Probenlösung binden und dabei aufkonzentrieren. Anschließend können unspezifische Antigene weggewaschen werden. Danach erfolgt die Zugabe eines zweiten Detektions-Antikörpers, der ein anderes Epitop des gleichen Antigens erkennt. Die Auswertung eines ELISA erfolgt mit Hilfe einer Enzymreaktion, die auf der Meerrettich-Peroxidase (HRP) beruht. Das Enzym kann direkt an den Detektions-Antikörper gebunden sein oder z.B. über eine Biotin-Streptavidin-Bindung zugegeben werden. Bei der anschließenden Inkubation mit einem chromogenen Substrat wird dieses umgesetzt und die resultierende Farbreaktion kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen werden.

In dieser Arbeit kamen zur Detektion von Zytokinen in Zellkulturüberständen verschiedene ELISA Duo Sets der Firma R&D Systems zum Einsatz. Die Detektion von mTNF in Serumproben erfolgte mit dem Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). Das humane Reg3 α wurde in Serumproben und Zellkulturüberständen mit dem Ab-Match Assambly Human PAP1 Kit (MBL International Cooperation) nachgewiesen. Die Proben wurden unverdünnt oder falls notwendig entsprechend verdünnt eingesetzt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach Herstellerangaben.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellkulturbedingungen

Zellbiologische Arbeiten wurden stets unter Verwendung von sterilen Reagenzien und Materialien in der Sterilbank HERAsafe® KS (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die verwendeten Primärzellkulturen oder Zelllinien wurden mit den entsprechend angegebenen Medien (2.11) bei einer Temperatur von 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5% und einer Luftfeuchte von 95% im Begasungsbrutschrank Cell Safe (Integra Biosciences) kultiviert. Die Zelllinien wurden – je nach Zelldichte – zwei- bis dreimal wöchentlich geteilt. Hierfür wurden adhärente Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflaschen gelöst und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 300g für 5min und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in der benötigten Lösung resuspendiert. Um

Material und Methoden

Zellkulturüberstände zu gewinnen, wurden die Zellen bei 3200g für 10min und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet verworfen.

3.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Um Zellen langfristig in flüssigem Stickstoff zu lagern wurden diese für 5min bei 300g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in kaltem Einfriermedium (50% RPMI 1640, 40% FCS und 10% DMSO) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots zu je 1,6m in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C in einem Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Fisher Scientific) tiefgefroren. Nach wenigen Tagen wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt und aufbewahrt.

Um tiefgefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurde das Kryoröhrchen mit den gewünschten Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in frischem Medium aufgenommen. Nach einem Waschschritt zur Entfernung des giftigen DMSO, wurden die Zellen in einem frischen Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Anzahl lebender Zellen wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand) bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Lebende Zellen bleiben dabei ungefärbt, tote Zellen können durch eine Blaufärbung aus der Zählung ausgeschlossen werden. Ausgezählt wurden vier Großquadrate, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt waren, und sodann der Mittelwert gebildet. Die Zellkonzentration wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

3.3.4 Stabile Transfektion

Zur Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz jetPRIME™ (Polyplus Transfection) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden die Zellen in 6-Well-Platten in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in 2ml Medium kultiviert und über Nacht im Brutschrank Cell Safe (Integra Biosciences) zum Adhärieren inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach einem Mediumswechsel die

Material und Methoden

Transfektion der Zellen mit 2 μ g DNA durchgeführt. Das Medium wurde 4h nach der Transfektion erneuert. Zur Selektion der Zellen wurde das Medium 24h nach der Transfektion durch ein Antibiotikum-haltiges Medium ersetzt.

3.3.5 Expression von Defensin:Ig in *Drosophila*-Schneider 2-Zellen

Für alle *in vitro*-Stimulationsversuche in der vorliegenden Arbeit wurden HBD2:Ig oder HBD3:Ig-Fusionsproteine verwendet. Dabei ist das jeweilige Defensin C-terminal an den Fc-Teil des humanen IgG1 gekoppelt. Dies ermöglicht sowohl die Aufreinigung des Fusionspeptids als auch dessen Detektion. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass der Ig-Tag weder einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität noch auf die chemotaktische Wirkung der verwendeten Defensin:Ig-Fusionsproteine hat. (Rohrl et al. 2008).

Für die Expression von HBD2:Ig und HBD3:Ig wurden mit pMTBipV5-Hygro Defensin:Ig transfizierte DS2-Zellen in 100ml Insect Express Prime-Medium (Lonza) mit 100 μ g/ml Kanamycin (Sigma-Aldrich) und 300 μ g/ml Hygromycin B (PAA) kultiviert und zweimal pro Woche geteilt. Die restlichen Zellen wurden in 50ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 230g und 4°C für 5min abzentrifugiert. Zur Produktion des Proteins wurden die Zellen in einer Rollerflasche (Corning) mit 200ml Medium mit Kanamycin und 0,5mM CuSO₄ für 3 bis 4 Tage bei RT rollend inkubiert. Da das Defensin in dem verwendeten Plasmid unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promotors steht, induzierte das zugegebene CuSO₄ die Expression des Defensin:Ig-Fusionsproteins. Für die Gewinnung des proteinhaltigen Überstands erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 9000g und 4°C für 15min in der Ultrazentrifuge Sorvall® RC6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Der so gewonnene Überstand wurde sterilfiltriert bei 4°C gelagert.

3.3.6 Generierung von *bone marrow-derived macrophages* (BMDM)

Die Generierung von *bone marrow-derived macrophages* (BMDM) erfolgte nach einem Protokoll von M. Rehli (Rehli et al. 2005). Dabei wurde stets RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 10% M-CSF (konditionierter L929-Überstand aus eigener Herstellung), 100U/ml Penicillin, 100U/ml Streptomycin und 50 μ M β -Mercaptoethanol verwendet. Zur Isolation der Knochenmarkzellen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, mit 70% Ethanol desinfiziert und Femur sowie Tibia entnommen. Die Knochen wurden in eiskaltem PBS gesammelt und vor Öffnung an beiden Enden für 15s in Ethanol sterilisiert.

Material und Methoden

Anschließend wurde das Knochenmark mittels einer Kanüle mit sterilem PBS in ein 50ml-Reaktionsgefäß gespült. Die Knochenmarkzellen wurden bei 300g für 8min bei 4°C zentrifugiert und erneut mit Medium gewaschen. Danach wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Zur Kultivierung der Knochenmarkzellen wurden 1×10^7 Zellen in 20ml Medium in quadratischen Petrischalen (Sterilin) ausgesät. Am Tag 5 der Kultur erfolgte ein Wechsel des Mediums, womit nicht adhärente Zellen entfernt wurden. An Tag 7 der Kultur konnten die Zellen geerntet werden. Dafür wurde das Medium abgenommen, in einem 50ml-Reaktionsgefäß gesammelt und durch 10ml eiskaltes PBS ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für ca. 3min auf Eis inkubiert und mittels Zellschaber vorsichtig entfernt. Die Zellsuspension wurde in das zuvor gesammelte Medium gegeben und bei 300g für 8min und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt und die BMDM – je nach Fragestellung – in die Experimente eingesetzt.

3.3.7 Generierung von *bone marrow-derived dendritic cells (BMDC)*

Für die Generierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark wurde zunächst eine Einzelzellsuspension – wie in 3.3.6 – beschrieben hergestellt. Daraufhin wurden 2×10^5 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte in 1ml RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 30ng/ml GM-CSF (aus eigener Herstellung), 100U/ml Penicillin, 100U/ml Streptomycin und 50 μ M β -Mercaptoethanol ausgesät. An Tag zwei der Kultur wurde 1ml frisches Medium zugegeben und anschließend alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durch Austausch von je 1ml Medium durchgeführt. An Tag 10 der Kultur konnten die Zellen geerntet werden.

3.3.8 Generierung von humanen *peripheral blood macrophages*

Die Generierung von peripheren Blutmakrophagen (PBM) erfolgte nach einem Protokoll von T. Pham (Pham et al. 2012). Dabei wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) über Leukaphorese von gesunden Spendern gewonnen und die mononukleären Blutzellen (MNC) über einen Ficoll/Hyque-Dichthegradienten (PAN Biotech, Aidenbach) gewonnen. Die Sammlung von Blutproben gesunder Spender erfolgte unter Beachtung der Deklaration von Helsinki und wurde durch die Ethikbehörde genehmigt (Referenznummer 92-1782 und 09/066c). Alle Spender unterschrieben eine Einverständniserklärung.

Die isolierten MNCs wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und durch eine Gegenstromzentrifugation entsprechend ihrer Größe, Dichte und Form in verschiedene

Material und Methoden

Fraktionen aufgetrennt. Die erhaltene Monozytenfraktion wurde zentrifugiert, in RPMI 1640 resuspendiert und gezählt. Die Reinheit der erhaltenen Monozytenfraktion wurde unter dem Mikroskop überprüft und betrug $\geq 85\%$.

Zur Reifung der gewonnenen PBM zu peripheren Makrophagen wurden diese für 7 Tage in Teflon-Beuteln (Heraeus) in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit Vitaminen, Antibiotika, Pyruvat, nicht-essentiellen Aminosäuren (alles von Gibco BRL), 50nM β -Mercaptoethanol sowie 2% humanem AB-Gruppen-Serum (PAN Biotech) angereichert wurde.

Die Elutration von PBM sowie die Reifung zu primären humanen Makrophagen wurde freundlicherweise mit der Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marina Kreutz (Molekulare Onkologie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt.

3.3.9 Stimulierungen

Für alle Stimulierungen wurden 5×10^5 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach Ruhen der Zellen über Nacht wurde ein Mediumswechsel vorgenommen. Alle Stimulierungen erfolgten in einem Volumen von 500 μ l.

3.3.9.1 Vorstimulierung mit Defensinen

Die Stimulationsexperimente bestanden aus einer Vorstimulierung von THP1-Zellen, BMDM bzw. humanen peripheren Blutmakrophagen mit Defensinen und einer anschließenden Restimulierung durch einen TLR-Liganden. Dabei erfolgte die Vorstimulierung für 4h mit 5 μ g/ml Ig-gekoppeltem Defensin oder den Kontrollpeptiden SIg+ bzw. hIgG. Zur Kontrolle wurden auch inaktivierte Defensine verwendet, die über Nacht bei 56°C mit Proteinase K verdaut und anschließend für 5min bei 95°C aufgekocht wurden. Weitere Alternativen bildeten die Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren fMLP (10nM) und compound 48/80 (5, 10 oder 15 μ g/ml).

Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C, 300g für 7min wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit verschiedenen TLR-Liganden, wie 100ng/ml LPS in THP1-Zellen und BMDM bzw. 1ng/ml in PBM, 25 μ g/ml polyI:C, 100 μ g/ml Zymosan, 100 μ g/ml Peptidoglykan oder 1 μ g/ml Pam₃CSK₄, für weitere 4h (THP1-Zellen) oder 24h (PBM und BMDM) restimuliert. Bis zur Durchführung eines entsprechenden ELISAs (3.2.6) wurden die Überstände bei -20°C gelagert.

3.3.9.2 Einsatz verschiedener Inhibitoren

Für eine differenzierte Analyse möglicher Signalmechanismen von HBD2 kamen unterschiedliche Inhibitoren zum Einsatz.

Zur Inhibierung der Signalweiterleitung über G Protein-gekoppelter Rezeptoren wurde das Pertussis Toxin (PTX) (List Biological Laboratories) verwendet. Dieses katalysiert die ADP-Ribosylierung der α -Einheit des G_i Protein-Komplexes und unterbindet somit dessen Anlagerung an den Rezeptor (Burns 1988). Die Zellen wurden mit 100ng/ml PTX für 2h vorinkubiert, gewaschen und wie unter 3.3.9.1 weiter stimuliert.

Ein anderer Inhibitor in dieser Arbeit war das oxidierte ATP (ox. ATP; Sigma-Aldrich), das alle ATP-vermittelten Signalkaskaden hemmt und somit einen potenzen Inhibitor der P2X-Rezeptoren darstellt. Die Zellen wurden mit 350 μ M ox. ATP für 2h inkubiert, gewaschen und daraufhin wie unter 3.3.9.1 weiter stimuliert.

Ein weiterer Inhibitor war A438079 (Sigma-Aldrich), ein spezifischer Hemmer des P2X7-Rezeptors. Hierbei erfolgte eine gleichzeitige Stimulierung der Zellen mit 10 μ M A438079 (chemische Formel: C₁₃H₉Cl₂N₅HCl) und HBD2 für die angegebenen 4h.

Außerdem wurde das Enzym Apyrase, das die Hydrolyse von ATP zu AMP katalysiert, verwendet, um extrazelluläres ATP abzubauen und eine Signalweiterleitung durch dieses zu verhindern. Die Apyrase wurde in einer Konzentration von 0,8U/ml zeitgleich mit HBD2 für 4h zu den Zellen gegeben.

Des Weiteren wurden Ionenströme, die für die Signalweiterleitung der ionotropischen P2X-Rezeptoren benötigt werden, durch die Erhöhung der extrazellulären K⁺-Menge gehemmt. Hierfür wurden die Zellen mit 130 μ M KCl im Kulturmedium für 30min inkubiert, gewaschen und wie unter 3.3.9.1 weiter stimuliert.

3.3.10 Bestimmung der extrazellulären ATP-Konzentration

Die THP1-Zellen wurden geerntet und je 5x10⁵ Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in Duplikaten mit 5 μ g/ml HBD2 oder Kontrollpeptid SIg+ in 500 μ l Kulturmedium für 30, 60, 75, 90 oder 105min stimuliert. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurde Zellkulturmedium abgenommen, eventuell enthaltene Zellen bei 300g für 5min pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der extrazellulären ATP-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe des Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) nach Herstellerangaben. Die Auswertung des Signals erfolgte am Luminometer Glomax® (Promega).

Material und Methoden

3.3.11 LDH-Vitalitätstest

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazelluläres Enzym, das an der anaeroben Glykolyse beteiligt ist und somit in allen Geweben vorkommt. Da sich die LDH in lebenden Zellen im Zytoplasma befindet und erst bei Beeinträchtigung der Zellen durch den Verlust der Zellintegrität in den Extrazellularraum freigesetzt wird, kann LDH als Parameter für die Schädigung oder das Absterben von Zellen genutzt werden. Die Menge an extrazellulärem LDH ist dabei proportional zur Anzahl der lysierten Zellen.

Für die LDH-Messung wurden THP1-Zellen geerntet und je 5×10^5 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in Duplikaten mit 5 μ g/ml HBD2 oder Kontrollpeptid SIg+ in 500 μ l Kulturmedium für 30, 60, 75, 90 oder 105min stimuliert. Zu jedem angegeben Zeitpunkt wurde Zellkulturmedium abgenommen, eventuell enthaltene Zellen bei 300g für 5min pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der LDH-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe des Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben. Die Auswertung des photometrischen Signals erfolgte am Mithras LB 940 (Berthold Technologies).

3.3.12 MTT-Assay

Zur Bestimmung der Vitalität der transfizierten MC38 Zellen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf der Reduktion von gelbem MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in violettes Formazan, wobei diese Reaktion in den Mitochondrien lebender Zellen durch die mitochondriale Reduktase in Abhängigkeit der metabolischen Aktivität abläuft. Dafür wurden die verschiedenen transfizierten MC38 Zellen in 96-Well-Platten in unterschiedlichen Konzentrationen in Triplikaten ausgesät und in 200 μ l Medium für 37°C inkubiert. Anschließend wurden pro Well 10 μ l MTT einer Stammlösung (5mg/ml) zugegeben und 4h lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 70 μ l einer 20% SDS-Lösung hinzugefügt. Diese stoppte die Reaktion und lysierte die Zellen ü.N. bei 37°C. Letztlich konnte die Zellvitalität kolorimetrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm im Spektrometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies) bestimmt werden.

Material und Methoden

3.3.13 Durchflusszytometrie und YO-PRO[®]1-Assay

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Charakterisierung einzelner Zellen in Zellsuspensionen. Die Zellen werden hierfür separat in einem Flüssigkeitsstrom an Lasern vorbeigeleitet. Durch das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward scatter) kann eine Aussage über die Größe, durch das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side scatter) über die Granularität der Zellen getroffen werden. Auch Oberflächeneigenschaften sowie die intrazelluläre Zusammensetzung einzelner Zellen können durch Fluoreszenzmarkierung von Oberflächen- und intrazellulären Strukturen charakterisiert werden. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe durch einen Laserstrahl führt dabei zur Emission einer bestimmten Wellenlänge. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff erhält man somit ein spezifisches Signal.

Der grün-fluoreszierende Carbocyanin-Farbstoff YO-PRO[®]-1 (Thermo Fisher Scientific) ist ein ca. 375kD großes Molekül, das Membranen normalerweise nicht passieren kann. Kommt es jedoch zur Öffnung des Ionenkanals P2X7-Rezeptor kann YO-PRO[®]-1 über die entstehende Pore in die Zelle gelangen und dort in die DNA interkalieren (Cankurtaran-Sayar et al. 2009). Die Aktivierung des P2X7R kann also indirekt über die Fluoreszenzmessung YO-PRO[®]-1-positiver Zellen am Durchflusszytometer erfolgen. Hierfür wurden 5×10^5 THP1-Zellen für 1h in Ab- oder Anwesenheit von 0,8U Apyrase mit 5µg/ml HBD2 bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurden THP1-Zellen mit 2mM ATP für 15min bei 37°C behandelt. Während der letzten 2min der Inkubationszeit wurden 0,5M YO-PRO[®]-1 hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2ml PBS gewaschen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen wurde an einem BD LSR II Durchflusszytometer (BD Biosciences) durchgeführt. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit dem Programm BD FACS Diva.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Tierhaltung

Alle verwendeten Mäuse waren entsprechend den Haltungsvorschriften (BGBI. II Nr. 46) untergebracht, hatten einen 12h Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät sowie Leitungswasser *ad libitum*. Alle verwendeten Mäuse wurden unter SPF (spezifisch-pathogen-freien)-Bedingungen gehalten. Für die Durchführung der Koliitis-Experimente erfolgte eine Überführung der entsprechenden

Material und Methoden

Tiere in ein konventionelles Tierlaboratorium. Für alle hier beschrieben Tierexperimente wurde ein Tierversuchsantrag bei der zuständigen Behörde gestellt (TVA: 54-2532.1-31/10).

3.4.2 Herstellung einer hReg3 α transgenen Mauslinie

Zur Generierung einer hReg3 α transgenen Mauslinie wurde das volle Länge hReg3 α -DNA-Fragment mit endogener Signalsequenz in befruchtete C57BL6/N x C57BL6/N Oozyten injiziert. Diese Fremd-DNA-haltigen Eizellen wurden anschließend in scheinschwangere Weibchen transplantiert. Der Einbau des Transgens wurde mittels Genotypisierungs-PCR mit spezifischen Primern überprüft (2.7). Dabei enthielten insgesamt 9 Nachkommen das Transgen. Nach einer Bestimmung der hReg3 α -Menge im Serum dieser Tiere mittels ELISA (3.2.6) wurden die 2 Männchen mit dem höchsten hReg3 α -Serumgehalt mit C57BL6/N- Weibchen verpaart. Beide Gründerlinien gaben das Transgen erfolgreich an ihre Nachkommen weiter.

Die Injektion des DNA-Fragments in befruchtete Oozyten sowie die Maushaltung bis zur ersten Generation wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Rülicke (Institut für Labortierkunde, Veterinärmedizinische Universität Wien) übernommen.

3.4.3 Serumgewinnung aus Mausvollblut

Die Entnahme von Mausvollblut erfolgte unter Narkose retrobulbär. Das Vollblut wurde auf Eis gesammelt und anschließend bei 37°C für 30min inkubiert. Die vollständige Gerinnung erfolgte für 30min auf Eis. Danach wurden die Proben bei 21000g und 4°C für 10min zentrifugiert und das Serum großzüig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Serum abgenommen und bei -20°C gelagert.

3.4.4 *In vivo*-Vorstimulierung mit HBD2

Für eine Überprüfung der *in vitro*-Vorstimulierungsdaten *in vivo* wurden C57BL/6N-Mäuse i.p. mit 100 μ g HBD2:Ig oder mit 100 μ g hIgG in 100 μ l PBS behandelt. Nach 4h erfolgte die zweite Stimulierung mit 400 μ g LPS (*E. coli* 055:B5, Sigma-Aldrich) in 100 μ l PBS i.p. 4h später wurde den narkotisierten Mäusen retrobulbär Blut entnommen und diese

Material und Methoden

anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Gewinnung des Serums erfolgte wie unter 3.4.2 beschrieben.

3.4.5 Induktion einer akuten DSS-induzierten Kolitis

Zur Induktion einer akuten DSS-induzierten Kolitis wurde weiblichen Mäusen mit einem Körpergewicht von mindestens 20g 1,8% Dextran-Sodium-Sulfat (DSS, MG36.000-50.000, MP Biomedicals) gelöst in Trinkwasser verabreicht (Okayasu et al. 1990). Die DSS-Gabe erfolgte über 7 Tage, wobei an Tag 3 und Tag 5 ein Wechsel des DSS-Wassers erfolgte. Über den gesamten Zeitraum wurde das Gewicht der Mäuse protokolliert und anschließend der Gewichtsverlauf grafisch dargestellt. An Tag 7 wurden die Mäuse mittels Genickzug getötet, das Kolon entnommen und dessen Länge vermessen, da diese einen Indikator für eine Dickdarmentzündung darstellt. Zur weiteren Probenentnahme wurde je ein ca. 1cm großes Stück stuhlfreies Kolon in 500µl RNAlaterTM Puffer (Qiagen) für eine spätere RNA-Isolation (3.1.2) überführt, sowie ein Stück für die Bestimmung des histologischen Scores (3.5.2) in 4% Formaldehyd konserviert.

3.4.6 Regeneration nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis

Zur Beobachtung der Regenerationsfähigkeit von Mäusen nach einer DSS-induzierten Kolitis (3.4.5) erfolgte im Anschluss an die DSS-Gabe eine Erholungsphase von 6 Tagen, in der die Tiere wieder reines Trinkwasser erhielten. Die Probenentnahme erfolgte dementsprechend an Tag 13. Der Gewichtsverlauf wurde während der Regenerationsphase alle 2-3 Tage protokolliert.

3.4.7 Erzeugung von Tumoren mit MC38-Zellen

Zur Erzeugung von Tumoren auf weiblichen Mäusen mit C57BL6/N-Hintergrund wurden syngene MC38-Kolonkarzinomzellen *in vitro* in RPMI-Medium mit 10% FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 50µM β-Mercaptoethanol kultiviert. Das Kulturmedium von MC38-Zellen, die hReg3α:Ig oder das Kontroll-Fusionsprotein SIg+ rekombinant exprimieren, wurde zusätzlich mit 0,8mg/ml des Antibiotikums G418 versetzt.

Zur Ernte der Zellen wurden diese mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst, in Kulturmedium aufgenommen und nach Bestimmung der Lebendzellzahl auf eine Konzentration von 3×10^7 Zellen/ml in Kulturmedium eingestellt.

Material und Methoden

Die Mäuse wurden zunächst mit einer Lösung aus 15% Ketamin (5% Ketaminhydrochlorid) und 8% Xylazin (2% Xylazinhydrochlorid) in PBS anästhesiert. Das Anästhetikum wurde dabei in einer Konzentration von 10 μ l pro g Maus i.p. injiziert. Nach Feststellung der vollständigen Anästhesie durch Drucktest an der Hinterpfote wurde das Fell auf dem Rücken mit Hilfe der Haarschneidemaschine Genio Type 1565 (Moser Profiline, Unterkirnach) abrasiert. Abschließend konnten 1,5x10⁶ MC38-Zellen in einem Volumen von 50 μ l dorsal subkutan appliziert werden.

3.4.8 Messung des MC38-Tumorwachstums

Das Tumorwachstum wurde von Tag 3 bis Tag 14 nach der Tumorapplikation regelmäßig alle 2-3 Tage mit einer Schieblehre (Kern) verfolgt und jeweils Länge und Breite des Tumors vermessen. Die Tumorgröße wurde in cm² angegeben.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Vorbereiten und Färben von histologischen Schnitten

Nach Beendigung eines Versuchs wurde das zu untersuchende Gewebe in einer Kunststoffkassette in 4% Formaldehyd fixiert. Das Gewebe wurde anschließend mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen entwässert und in Paraffin eingebettet. Darauf folgte die Anfertigung von zwei Längsschnitten mit 3 μ m Dicke, die mittels Hämatoxylin/Eosin angefärbt wurden. Hierzu wurden zunächst die Paraffinreste mittels Xylol entfernt, um die Schnitte in absteigenden Alkoholkonzentrationen (100%, 90% und 70%) zu entwässern. Anschließend wurde die Hämatoxylin-Färbung (Merck) für 2min durchgeführt. Dabei färbt Hämatoxylin alle sauren bzw. basophilen Strukturen – insbesondere das endoplasmatische Retikulum sowie den Zellkern – blau an. Nach einem 15-minütigen Waschschritt mit Wasser wurden die Schnitte 2min in 0,1% Eosin (Sigma) inkubiert. Eosin färbt alle basischen Strukturen der Zelle rot, wobei besonders die Zytoplasmabroteine hervorgehoben werden. Nach 1-minütigem Waschen mit Wasser folgte die aufsteigende Alkoholreihe mit einem abschließenden Xylolschritt zur Fixierung der Färbung.

3.5.2 Histologischer Score

Die Bestimmung des histologischen Scores nach Beendigung einer Kolitis erfolgte an Hand von zwei Parametern. Einerseits wurde der Epithelschaden ermittelt, andererseits

Material und Methoden

wurde die Menge an infiltrierenden Zellen bewertet. Pro Tier erfolgte die Bewertung von mindestens zwei seriellen Dickdarmschnitten nach folgendem Schema:

Score	Epithelschaden	Infiltrate
0	Normale Morphologie	Kein Infiltrat
1	Verlust einzelner Becherzellen	wenige, vereinzelte Infiltrate
2	Flächenhafter Becherzellverlust, Krypten vorhanden	milde und vereinzelte Infiltrate zwischen den Krypten und der Lamina musc. mucosae
3	vereinzelte Kryptenverluste	mehrere, moderate Infiltrate, Ödeme
4	flächenhafter Kryptenverlust	massive und flächenhafte Infiltrate, durch die Lamina musc. mucosae bis in die Submucosa reichend

Nach Bewertung der Schnitte anhand dieser Tabelle wurde der Mittelwert pro Tier berechnet und die Summe der Werte aus den Teilbereichen Epithelschaden und Infiltrate gebildet. Diese so ermittelte Summe stellte den histologischen Score dar.

3.5.3 Immunhistochemische Färbung

Das zu untersuchende Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und Schnitte mit 3µm Dicke angefertigt (3.5.1). Für eine immunhistochemische Färbung der Schnitte mit geeigneten Antikörpern wurde das Paraffin bei 72°C zunächst abgeschmolzen und die Schnitte zweimal 5min in Xylol deparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in absteigenden Alkoholkonzentrationen (100%, 90% und 70%) entwässert. Durch die Formalinfixierung und Paraffinbehandlung können Zielantigene maskiert sein. Um diese Antigene freizulegen, erfolgte eine Behandlung der Schnitte in 1mM Tris-EDTA-Puffer für 5min bei 120°C. Nach einem Waschschnitt in Wasser wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einer hydrophoben Emulsion (Dako Pen, Dako) umrandet. Zunächst erfolgten eine Inhibierung endogener Peroxidasen mit der Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution (Dako) für 5min und ein 5-minütiger Waschschnitt mit Waschpuffer (Wash Buffer 10x, Dako). Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper in Dako REAL Antibody Diluent (Dako) für 30min inkubiert und 5min gewaschen. Die Detektion des ersten Antikörpers erfolgte mit dem N-Histofine® Simple Stain MAX PO Kit (anti-rabbit, Nichirei Biosciences) für 30min. Nach einem 5-minütigen Waschschnitt wurde die

Material und Methoden

Signalentwicklung durch Zugabe der Substratlösung EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB (Dako) eingeleitet. Nach 10min konnten die Schnitte mit Wasser gewaschen, 1min mit Hämatoxylin gefärbt, erneut gewaschen und mit Entellan® Eindeckmedium (Merck) sowie einem Deckglas eingedeckt werden. Die Gewebepräparate konnten nun unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

3.6 Statistik

Alle statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0a. Sollte ein Vergleich zwischen ausschließlich zwei Gruppen erfolgen, wurde ein ungepaarter T-Test oder ein Mann-Whitney-Test angewandt. Sollte ein Vergleich mehrerer Gruppen untereinander erfolgen, kam ein One-Way-ANOVA unter Zuhilfenahme eines Bonferroni-*Multiple-Comparison*-Posttests zum Einsatz, der alle Gruppen miteinander vergleicht. In den Abbildungen ist immer der Mittelwert mit der Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden in Entzündungsreaktionen. Dabei lässt sich die Arbeit in zwei Hauptthemen untergliedern:

1) Zum einen wurde die immunregulatorische Funktion des humanen β -Defensins HBD2 auf humane Monozyten und Makrophagen näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Vorstimulierung mit humanen β -Defensinen zu einer erhöhten TLR-induzierten TNF- und IL8-Produktion führt. Dieser synergistische Effekt wird über die HBD2-induzierte Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum vermittelt. Dabei bindet ATP wiederum an den purinergen Rezeptor P2X7. Diese Signalkaskade kann durch die Verwendung von spezifischen Inhibitoren gegen die ATP-Freisetzung oder den P2X7R gehemmt werden.

2) Zum anderen erfolgte die Generierung und Charakterisierung einer hReg3 α -transgenen Mauslinie durch den Nachweis des Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene sowie ihr Einsatz in verschiedenen Entzündungsmodellen. Dabei wurde der Einfluss des hReg3 α -Transgens unter anderem im Entzündungsmodell der akuten DSS-induzierten Kolitis sowie der Regeneration nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die ubiquitäre Expression des hReg3 α negativ auf die Erholungsfähigkeit nach einer DSS-induzierten Kolitis auswirkt. Auch der Effekt des hReg3 α Transgens auf das Darmmikrobiom stand im Fokus der Arbeit. Dabei konnte mittels Mikrobiomanalyse gezeigt werden, dass die dauerhafte hReg3 α -Produktion im Darm das Überhandnehmen gram-negativer Bakteriengattungen begünstigt. In weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von hReg3 α die Entstehung von Kolonkarzinomen in einem syngenen Tumormodell fördert.

4.1 Immunmodulatorische Funktion von HBD2

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass Defensine neben ihrer antimikrobiellen Funktion auf eindringende Pathogene (Rohrl et al. 2008) auch einen immunregulatorischen Einfluss auf Zellen des Immunsystems haben. So wurde beispielsweise die chemotaktische Wirkung von Defensinen über die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR6 auf T- und B-Lymphozyten und Zellen myeloiden Ursprungs nachgewiesen (Rohrl et al. 2010a, 2010b; Rohrl et al. 2012; Yang et al. 1999). Außerdem wurde beschrieben, dass HBD3 Antigen-präsentierende Zellen über TLR1 und TLR2 in einem NF κ B-abhängigen Signalweg aktiviert (Funderburg et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurde beschrieben, dass HBD2 Entzündungsreaktionen durch die Hemmung des NF κ B-Signalwegs abschwächt (Semple et al. 2010). MBD14, das Maus-Ortholog von HBD3, aktiviert primäre Maus-Makrophagen und verstärkt die Zytokin- und Chemokin-Expression nach Stimulation von Makrophagen mit TLR-Liganden. Dieser synergistische Effekt scheint über einen G_i Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt zu sein (Barabas et al. 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass HBD3 die Oberflächenexpression von CD86 auf Monozyten über die Aktivierung des ATP-abhängigen Rezeptors P2X7 erhöht (Lioi et al. 2015).

Ein Ziel der Arbeit war es, den immunomodulatorischen Effekt von HBD2 auf humane Monozyten und Makrophagen näher zu untersuchen.

4.1.1 Analyse des proinflammatorischen Effekts von HBD2 und HBD3

Die Vorstimulierung mit Ig-gekoppeltem HBD2 (HBD2:Ig) gefolgt von einer anschließenden Restimulierung mit LPS führte zu einer signifikanten Erhöhung der TNF-Produktion in monozytischen THP1-Zellen im Vergleich zu LPS-stimulierten THP1-Zellen (Abb. 4A). Eine Vorstimulierung mit HBD2 scheint die Zytokin-Expression nach TLR-Stimulierung zu unterstützen und wirkt somit proinflammatorisch.

Um eine Kontamination des verwendeten HBD2 z.B. durch LPS auszuschließen, wurde ein Hitze-inaktiviertes HBD2:Ig verwendet (Abb. 4B). Außerdem wurde eine Vorstimulierung mit nicht fusioniertem SIg+ anstatt des HBD2:Ig-Fusionsproteins durchgeführt, um einen Effekt durch den Ig-Tag ausschließen zu können (Abb. 4C). In beiden Fällen produzierten die THP1-Zellen nach Vorstimulierung nicht mehr TNF als nach alleiniger LPS-Gabe.

Ergebnisse

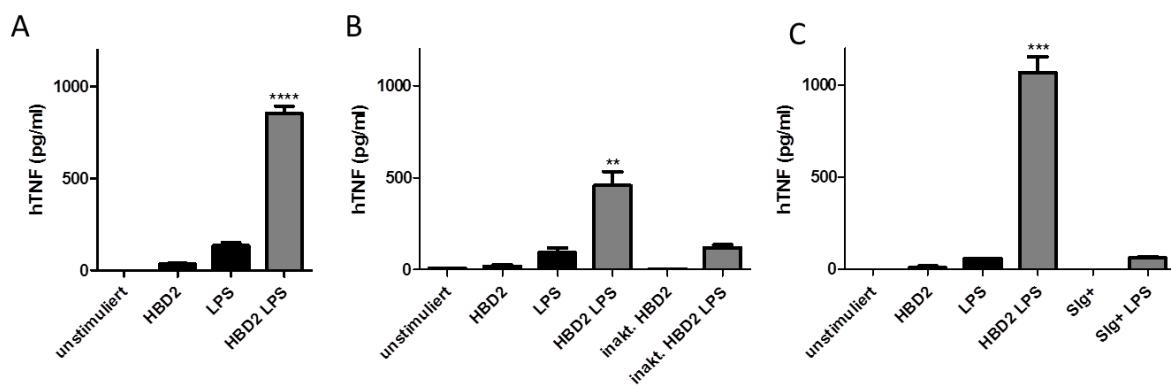


Abb. 4: Produktion von TNF nach HBD2-Vorstimulierung in THP1-Zellen. (A) Vorstimulierung mit 5µg/ml HBD2:Ig für 4h und anschließende Restimulierung mit 100ng/ml LPS für 4h. (B) Keine synergistische TNF-Produktion nach Vorstimulation mit 5µg/ml inaktiviertem HBD2:Ig oder (C) Sig⁺ Kontrollpeptid in LPS-stimulierten THP1-Zellen. Die TNF-Produktion wurde im Überstand mittels eines ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Neben der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF verstärkte HBD2 auch die Expression von CXCL8 (Abb. 5A) und IL1 β (Abb. 5B) in THP1-Zellen. Die synergistische Expression von IL6 wurde dagegen nicht induziert (Daten nicht gezeigt).

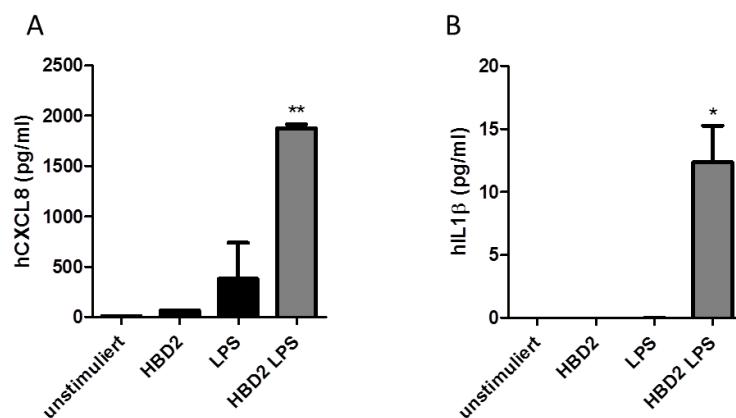


Abb. 5: Synergistischer Effekt von HBD2 auf die Produktion von CXCL8 und IL1 β in THP1-Zellen. (A) CXCL8- und (B) IL1 β -Produktion nach Vorstimulierung von THP1-Zellen mit 5µg/ml HBD2:Ig für 4h und anschließender Restimulierung mit 100ng/ml LPS für 4h. Die Chemokin- und Zytokin-Konzentrationen wurden im Überstand mittels ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Um den proinflammatorischen Effekt von HBD2 nach Stimulierung mit weiteren TLR-Agonisten zu untersuchen, wurden polyI:C (Abb. 6A), Zymosan (Abb. 6B) oder Peptidoglykan (PG; Abb. 6C) anstatt des LPS als TLR-Liganden verwendet. Während LPS an TLR4 bindet, handelt es sich bei polyI:C um den Liganden des TLR3, bei Zymosan um den Liganden von TLR2/6 und Peptidoglykan (PG) bindet an TLR1/2 (Kawai und Akira

Ergebnisse

2010). Alle drei weiteren hier getesteten Liganden induzieren den gleichen synergistischen Effekt wie er für LPS gezeigt werden konnte.

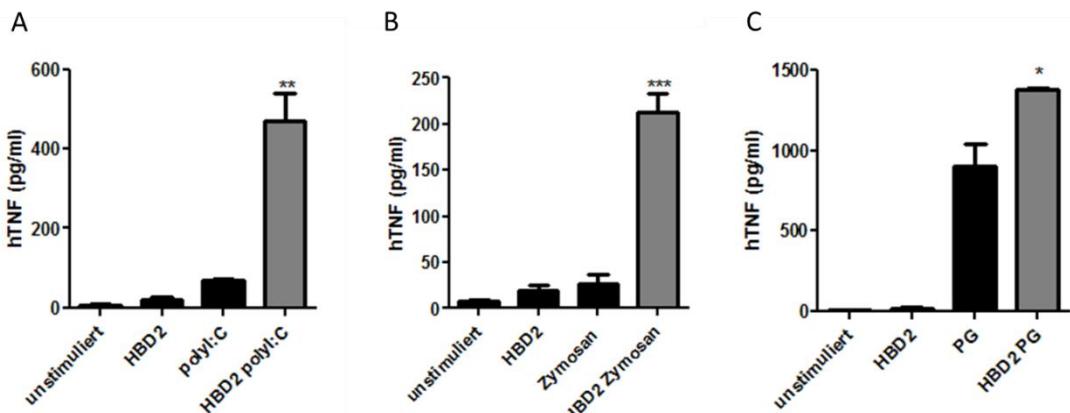


Abb. 6: Proinflammatorischer Effekt einer HBD2-Vorbehandlung mit weiteren TLR-Liganden in THP1-Zellen. (A-C) Vorstimulierung von THP1-Zellen mit 5µg/ml HBD2:Ig für 4h und anschließende Restimulierung mit 25µg/ml polyI:C (A), 100µg/ml Zymosan (B) oder 100µg/ml Peptidoglykan (C) für 4h. Die TNF-Produktion wurde im Überstand mittels eines ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Nachdem der proinflammatorische Effekt von HBD2 unabhängig von den untersuchten TLR-Liganden war, wurde neben HBD2 ein weiteres Mitglied der β-Defensine auf die synergistische Wirkung hin getestet. Dafür erfolgte eine Vorbehandlung mit Ig-konjugiertem HBD3 anstatt HBD2. Auch dieses untersuchte β-Defensin führte zu einer synergistischen Erhöhung der TNF-, CXCL8- sowie IL1β-Produktion in THP1-Zellen (Abb. 7A-C) im Vergleich zu alleinig mit LPS-stimulierten THP1-Zellen. Außerdem produzierten die THP1-Zellen nach Vorstimulierung mit Hitze-inaktiviertem HBD3:Ig nicht mehr TNF als nach alleiniger LPS-Gabe (Abb. 7A).

Ergebnisse

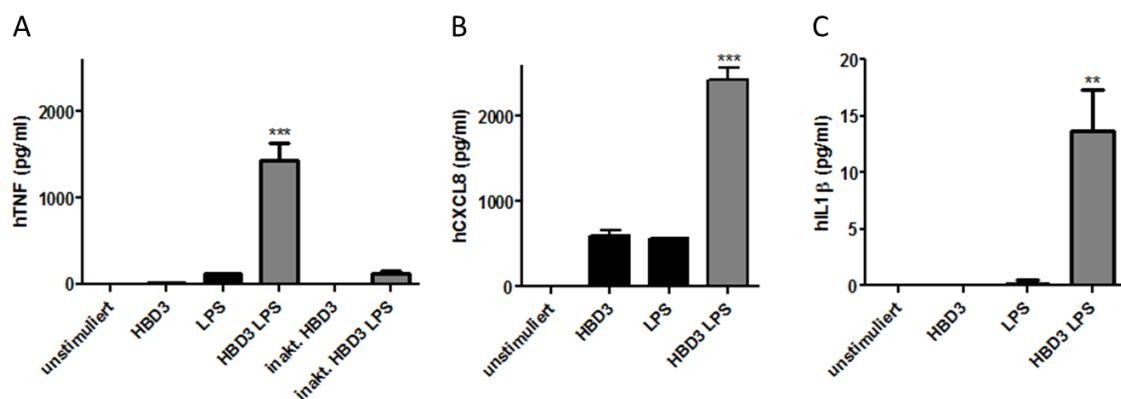


Abb. 7: Proinflammatorischer Effekt der Vorstimulierung mit HBD3. (A) TNF-, (B) CXCL8- und (C) IL1 β -Produktion nach Vorstimulierung von THP1-Zellen mit 5 μ g/ml HBD3:Ig für 4h und anschließender Restimulierung mit 100ng/ml LPS für 4h. (A) Keine synergistische TNF-Produktion nach Vorstimulation mit 5 μ g/ml inaktiviertem HBD3:Ig in LPS-stimulierten THP1-Zellen. Die Chemokin- und Zytokin-Konzentrationen wurden im Überstand mittels ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Auch im Falle einer Vorstimulierung von THP1-Zellen mit HBD3 wurde der zweite Stimulus mit LPS durch weitere TLR-Liganden ersetzt. Eine HBD3-Behandlung mit anschließender polyI:C- (Abb. 8A), Zymosan- (Abb. 8B), Peptidoglykan- (PG; Abb. 8C) sowie mit Pam₃CSK₄-Stimulierung (Abb. 8D) führte ebenfalls zu einer signifikant gesteigerten TNF-Produktion. Bei Pam₃CSK₄ handelt es sich dabei um ein synthetisch hergestelltes, triacyliertes Lipopeptid, das bakteriellen Lipoproteinen ähnelt und an den TLR1/2 bindet.

Ergebnisse

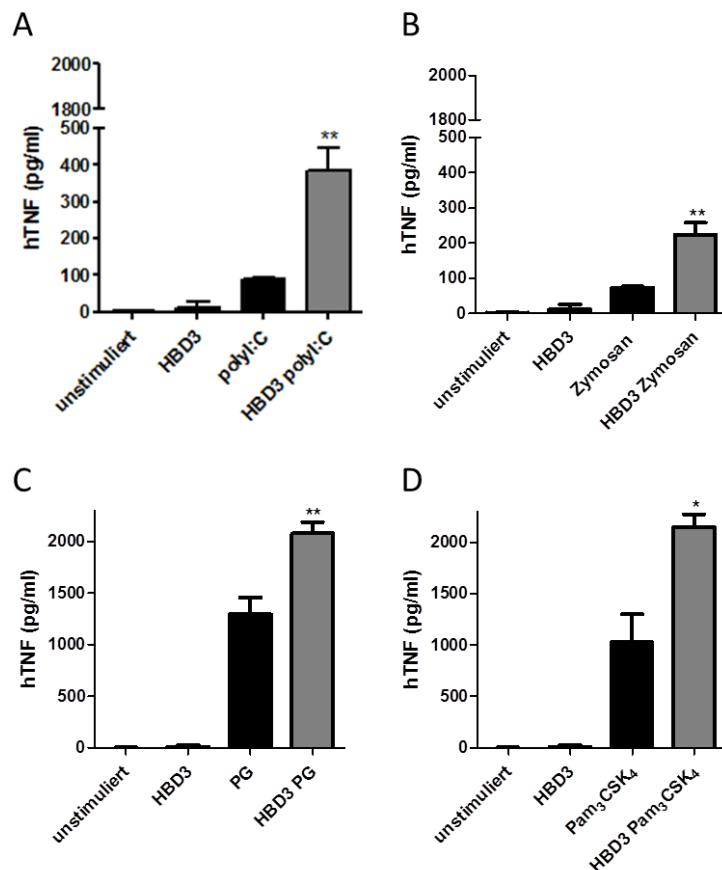


Abb. 8: Proinflammatorischer Effekt einer HBD3-Vorbehandlung mit weiteren TLR-Liganden in THP1-Zellen. (A-D) Vorstimulierung von THP1-Zellen mit 5µg/ml HBD3:Ig für 4h und anschließende Restimulierung mit 25µg/ml polyI:C (A), 100µg/ml Zymosan (B), 100µg/ml Peptidoglykan (C) oder 1µg/ml Pam₃CSK₄ (D) für 4h. Die TNF-Produktion wurde im Überstand mittels eines ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Da die bisherigen Untersuchungen ausschließlich in der monozytischen Zelllinie THP1 durchgeführt wurden, erfolgte abschließend die Überprüfung, ob der gezeigte proinflammatorische Effekt auch in primären humanen Makrophagen nachgewiesen werden kann. Dazu wurden gesunden Patienten primäre mononukleäre Blutzellen entnommen und diese zu primären humanen Makrophagen (PBM) generiert (3.3.8). Anschließend wurden die PBM im gleichen experimentellen Verfahren auf die proinflammatorische Wirkung von HBD2 hin getestet.

Auch hier führten eine Vorbehandlung mit HBD2 und eine anschließende LPS-Stimulierung zu einer erhöhten TNF-, CXCL8- und IL1β-Produktion im Vergleich zu alleiniger LPS-Gabe (Abb. 9A-C).

Ergebnisse

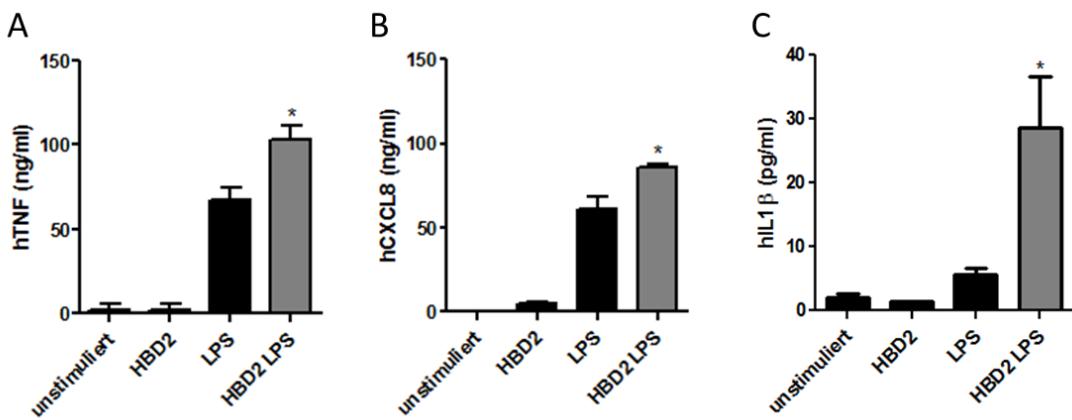


Abb. 9: Synergistischer Effekt von HBD2 auf die Produktion von TNF, CXCL8 und IL1 β in PBM. (A) TNF-, (B) CXCL8- und (C) IL1 β -Produktion nach Vorstimulierung von PBM mit 5 μ g/ml HBD2:Ig für 4h und anschließender Restimulierung mit 1ng/ml LPS für 24h. Die Chemokin- und Zytokin-Konzentrationen wurden im Überstand mittels ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

4.1.2 Analyse der HBD2-induzierten Signalwege

Die bisherigen Ergebnisse legen eine proinflammatorische Wirkung einer β -Defensin-Vorstimulierung auf myeloide Zellen dar. Im Anschluss erfolgt die Analyse verschiedener möglicher Signalwege und Interaktionspartner, die zu diesem synergistischen Effekt beitragen.

4.1.2.1 Untersuchung der Interaktion von HBD2 mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR)

Ein möglicher Interaktionspartner für β -Defensine sind G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass β -Defensine eine chemotaktische Wirkung über die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR6 auf verschiedene Immunzellen haben (Rohrl et al. 2010a, 2010b; Yang et al. 1999). Auch MBD14, das Maus-Ortholog von HBD3, aktiviert primäre Maus-Makrophagen und verstärkt die Zytokin- und Chemokin-Expression nach Stimulation dieser Zellen mit TLR-Liganden. Dabei wird dieser synergistische Effekt über einen bisher unbekannten G_i Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt (Barabas et al. 2013).

Es sind vier Gruppen GPCR (G_i, G_q, G_s, G₁₂) beschrieben. Die Chemokinrezeptoren gehören zu den G_iPCR. Für die Untersuchung einer Interaktion von HBD2 mit GPCR wurde zunächst das Exotoxin des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis* verwendet, das die gesamte Signalweiterleitung G_iPCR hemmt. Das sogenannte Pertussis Toxin (PTX)

Ergebnisse

katalysiert dabei die ADP-Ribosylierung der α -Einheit des G_i Protein-Komplexes und inhibiert somit dessen Anlagerung an den Rezeptor.

Eine Vorinkubierung von PBM mit PTX und eine anschließende HBD2-Gabe sowie Restimulierung mit LPS hatte keinen Einfluss auf die erhöhte TNF-Produktion (Abb. 10). Eine Beteiligung G_iPCR-Signalwege an dem von HBD2-induzierten proinflammatorischen Effekt scheint somit im humanen System unwahrscheinlich zu sein.

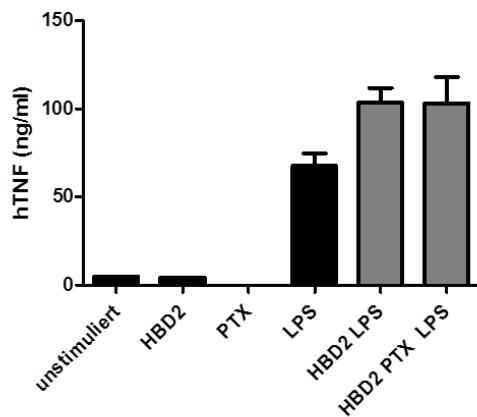


Abb. 10: Keine Beteiligung von G_iPCR-Signalwegen bei HBD2-induziertem synergistischem Effekt. Vorbehandlung von PBM mit 100ng/ml PTX für 2h, anschließende Stimulierung zunächst mit 5 μ g/ml HBD2:Ig für 4h und dann mit 1ng/ml LPS für 24h. Die TNF-Produktion wurde im Überstand mittels eines ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Es ist beschrieben, dass LL-37, ein anderes antimikrobielles Peptid, chemotaktisch auf Neutrophile, Monozyten und T-Zellen über den G_i Protein-gekoppelten Rezeptor FPRL-1 (*formyl peptide receptor-like 1*) wirken kann (Yang et al. 2000). Um das Ergebnis der PTX-Inhibition zu überprüfen sowie den FPRL-1 als möglichen Interaktionspartner für HBD2 zu untersuchen, wurde der Defensin-Stimulus durch verschiedene Konzentrationen fMLP ersetzt. Dabei ist fMLP ein synthetisches Molekül, das aus den drei Aminosäuren N-Formyl-Met-Leu-Phe besteht und als Ligand an FPRL-1 bindet. Die fMLP-Vorstimulierung war nicht in der Lage eine erhöhte TNF-Produktion in THP1-Zellen zu induzieren (Abb. 11A). Der FPRL-1 scheint somit den HBD2-vermittelten synergistischen Effekt einer Defensin-Vorstimulierung nicht zu vermitteln. Auch das Ersetzen der HBD2-Vorstimulierung durch die Substanz compound 48/80 (c48/80) induzierte keinen synergistischen Effekt (Abb. 11B). Compound 48/80 ist ein synthetisches Kondensationsprodukt von N-Methyl-p-Methoxyphenethylamin mit Formaldehyd und aktiviert G_iPCR-Signalwege unabhängig von einer Rezeptorbindung durch die Erhöhung

Ergebnisse

der Nukleotidbindungsrate an G_i Proteine sowie durch Verstärkung der GTPase-Aktivität von diesen G_i Proteinen (Mousli et al. 1990).

Die Ergebnisse stützen erneut die Annahme, dass G_iPCR-Signalwege am synergistischen Effekt von humanen Defensinen nicht beteiligt sind.

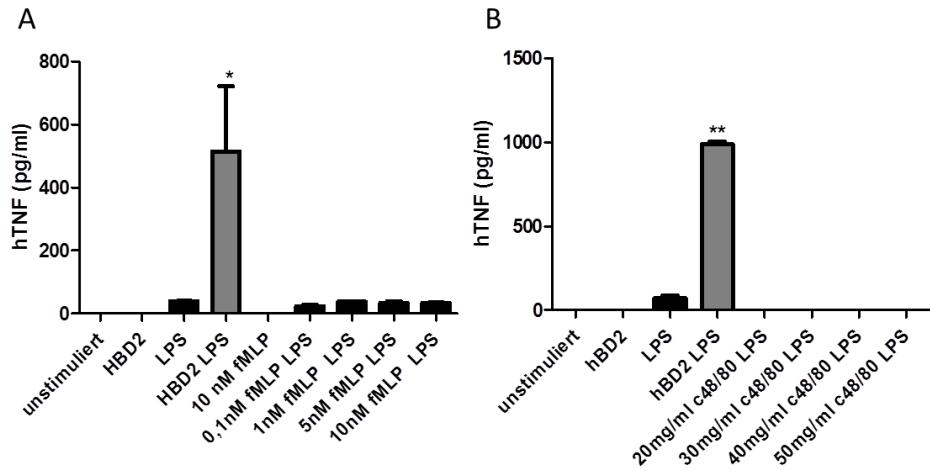


Abb. 11: fMLP und compound48/80 vermitteln keine erhöhte TNF-Produktion in THP1-Zellen. Vorstimulierung von THP1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an (A) fMLP, (B) compound48/80 (c48/80) oder 5µg/ml HBD2:Ig für 4h mit anschließender Gabe von 100ng/ml LPS für 4h. Die TNF-Produktion wurde im Überstand mittels eines ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

4.1.2.2 Interaktion von HBD2 mit dem purinergen Rezeptor P2X7

Die vorausgehenden Experimente zeigten, dass HBD2 und HBD3 nicht in der Lage sind allein die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in den Zellen zu induzieren. Für das Entstehen eines synergistischen Effekts ist immer die Restimulation mit TLR-Agonisten notwendig (4.1.1). Eine direkte Aktivierung der Zelle über die Bindung von Defensinen an einen TLR ist somit nicht nachweisbar.

Jedoch induziert die Defensin-Vorstimulierung auch eine synergistisch erhöhte IL1β-Produktion in den Zellen (Abb. 5B, Abb. 7C). Für die Freisetzung des Zytokins IL1β aus der Zelle werden zwei Stimuli benötigt. Der erste Stimulus erfolgt durch einen TLR-Agonisten und führt zur Transkription der pro-Form des Zytokins. Der zweite Stimulus, z.B. durch die Bindung von ATP an den P2X7R, induziert die Zusammenlagerung des sogenannten Inflammasom-Komplexes, dem unter anderem die Caspase 1 angehört. Die durch die Inflammasom-Aggregation aktivierte Caspase 1 spaltet das pro-IL1β in seine reife Form. Anschließend wird das reife Zytokin aus der Zelle entlassen (Latz et al. 2013). Vordaten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Stimulierung von THP1-Zellen mit LPS

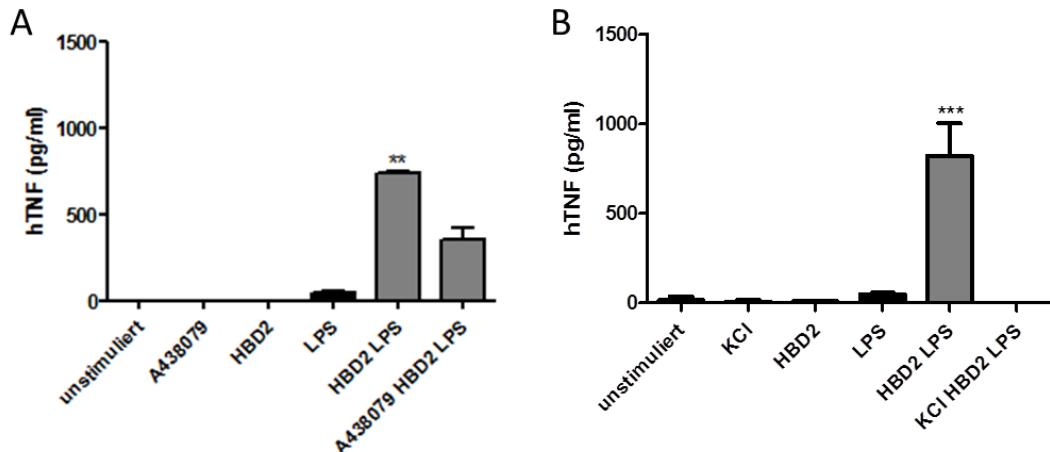
Ergebnisse

als ersten und ATP als zweiten Stimulus eine deutliche IL1 β -Freisetzung zur Folge hat. Das Ersetzen eines der beiden Stimuli durch HBD2 oder HBD3 konnte dagegen keine Zytokinausschüttung induzieren (Mauch-Mücke, unveröffentlichte Daten). Somit scheint eine Beteiligung der Defensine an der Induktion der Inflammasom-Aktivierung ausgeschlossen. Außerdem legt dieses Ergebnis erneut dar, dass Defensine nicht an TLR binden, da der erste Stimulus nicht durch HBD2 oder HBD3 ersetzt werden kann. Auch eine direkte Bindung von HBD2 und HBD3 an den purinergen Rezeptor P2X7, über den der ATP-vermittelte zweite Stimulus erfolgt, ist nicht belegbar.

Eine Vorstimulierung von THP1-Zellen mit HBD2 in Anwesenheit des spezifischen P2X7R-Inhibitor A438079 zeigt jedoch, dass die HBD2-vermittelte erhöhte TNF-Produktion nach LPS-Restimulierung signifikant reduziert ist (Abb. 12A). Dies legt den Schluss nahe, dass der P2X7R an der Signalkaskade, die zu einem Defensin-induzierten synergistischen Effekt führt, dennoch beteiligt ist.

P2X-Rezeptoren sind Ionenkanäle in der zellulären Plasmamembran. Die Bindung von extrazellulärem ATP an die P2X-Rezeptoren führt zur Öffnung einer selektiven Pore, wobei Na⁺ und Ca²⁺ in die Zelle hinein- und K⁺ aus der Zelle herausfließen. Wird die extrazelluläre K⁺-Konzentration im Versuchsansatz durch die Zugabe von KCl in das Zellkulturmedium so erhöht, dass der K⁺-Efflux nicht mehr stattfinden kann, so wird die P2X-Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung blockiert. Eine Vorinkubation von THP1-Zellen mit KCl führte zu einem vollständigen Verlust der HBD2-induzierten TNF-Produktion nach Restimulierung mit LPS (Abb. 12B). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass der ionotrope Rezeptor P2X7 Bestandteil des Signalwegs ist, der zur HBD2- und HBD3-vermittelten, synergistischen Zytokinfreisetzung führt.

Ergebnisse



Um die oben gezeigten Ergebnisse zu verifizieren, wurden *bone marrow derived macrophages* (BMDM) von einer P2X7R-defizienten Maus untersucht, die wie bisher beschrieben mit HBD2 und LPS stimuliert wurden. Auch hier konnte eine Reduktion der TNF-Produktion in BMDM einer P2X7R-defizienten Maus im Vergleich zu BMDM einer WT-Maus nachgewiesen werden. Diese verringerte TNF-Ausschüttung erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 13).

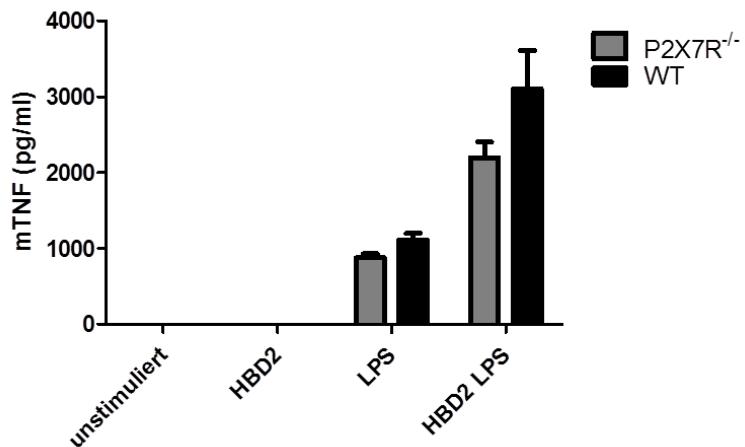


Abb. 13: Kein Unterschied in der TNF-Produktion von WT-BMDM zu P2X7^{-/-}-BMDM nach HBD2-Vorstimulierung. Vergleich von WT- mit P2X7^{-/-}-BMDM. Vorstimulierung mit 5µg/ml HBD2:Ig für 4h und anschließende Gabe von 100ng/ml LPS für 24h. Die TNF-Konzentration wurde mittels ELISA aus Zellkulturüberständen bestimmt. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Ergebnisse

Da der Einsatz von KCl und A438079 eine Beteiligung des P2X7R zeigte, wurde im Folgenden die Mitwirkung von ATP, als wichtigsten Liganden des P2X7R, bei der Signalweiterleitung analysiert.

Oxidiertes ATP ist eine sogenannte Schiffsche Base. Die Nukleotidstruktur von oxidiertem ATP ermöglicht vermutlich die Modifikation von Lysin-Resten in der Umgebung der ATP-Bindestelle und blockiert somit ATP-vermittelte Signalkaskaden, wie die der P2X-Rezeptoren (Di Virgilio 2003). Wie A438079 konnte oxidiertes ATP die synergistische Verstärkung der TNF-Produktion von HBD2 signifikant reduzieren (Abb. 14A). Auch der Einsatz des Enzyms Apyrase, das die Hydrolyse von extrazellulärem ATP zu AMP katalysiert, führt zu einer signifikanten Reduktion des synergistischen Effekts nach HBD2-Vorstimulation und anschließender LPS-Gabe (Abb. 14B).

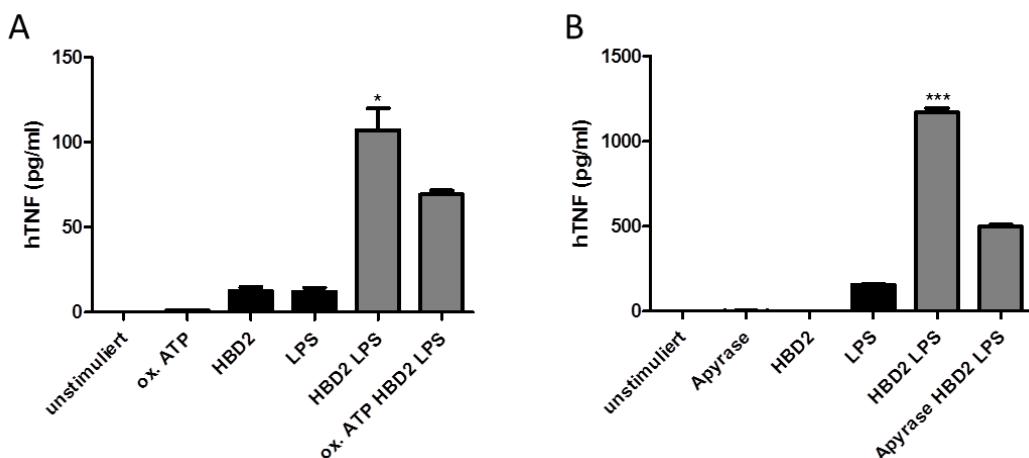


Abb. 14: Synergistischer Effekt von HBD2 ist ATP-vermittelt. (A) Vorbehandlung von THP1-Zellen mit 350µM oxidiertem ATP für 2h, anschließende Stimulierung zunächst mit 5µg/ml HBD2:Ig für 4h und dann mit 100ng/ml LPS für 4h. (B) Gleichzeitige Stimulierung von THP1-Zellen mit 0,8U Apyrase und 5µg/ml HBD2:Ig mit anschließender Gabe von 100ng/ml LPS. Die TNF-Produktion wurde im Überstand mittels eines ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Des Weiteren wurde die HBD2-abhängige Öffnung des P2X7R-Ionenkanals durch die Aufnahme des grün-fluoreszierenden Carbocyanin-Farbstoff YO-PRO®-1 gemessen. YO-PRO®-1 ist ein ca. 375kD großes Molekül, das Membranen normalerweise nicht passieren kann. Kommt es jedoch zur Öffnung des Ionenkanals P2X7R kann YO-PRO®-1 über die entstehende Pore in die Zelle gelangen und dort in die DNA interkalieren (Cankurtaran-Sayar et al. 2009). Im Vergleich zur unstimulierten Probe (Abb. 15B) führte eine Inkubation von THP1-Zellen mit ATP zu einer deutlichen Zunahme der YO-PRO®-1-Fluoreszenz (Abb. 15C). Auch die Inkubation mit HBD2 erhöhte die Aufnahme von YO-PRO®-1 in die Zelle (Abb. 15D). Dieser Effekt der HBD2-abhängigen YO-PRO®-1-

Ergebnisse

Resorption durch die Zellen konnte durch die Anwesenheit von Apyrase wieder vollständig aufgehoben werden (Abb. 15E). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass HBD2 nicht unmittelbar mit dem P2X7R interagiert, sondern indirekt über die Induktion einer autokrinen ATP-Freisetzung in den extrazellulären Raum.

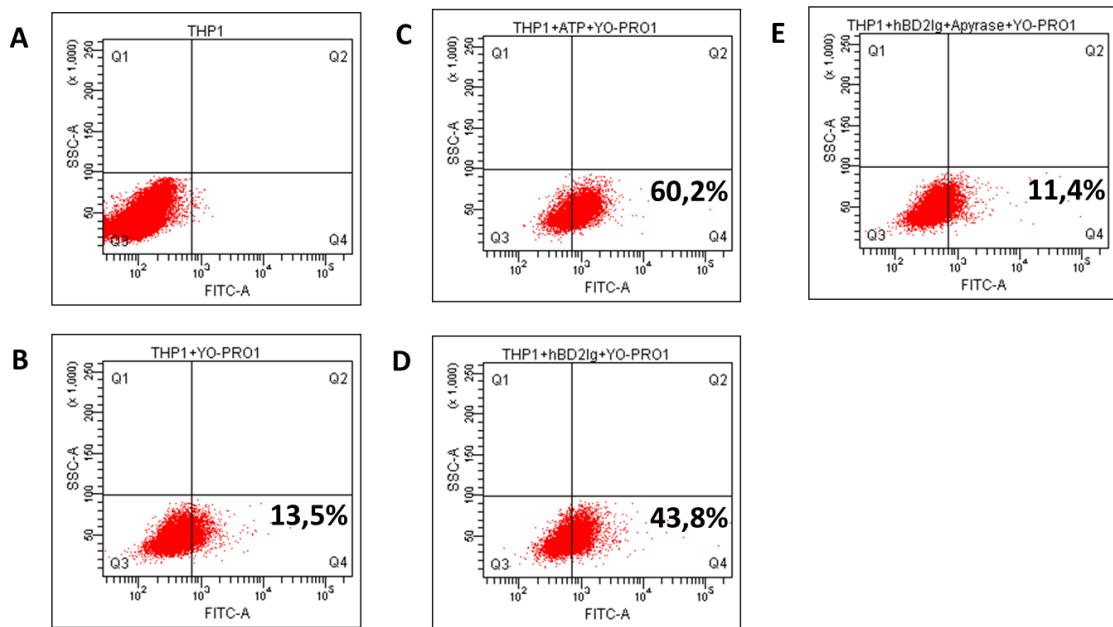


Abb. 15: HBD2-Stimulierung aktiviert P2X7R über ATP-Freisetzung. (A-E) Durchflusszytometrie der YO-PRO[®]-1 Aufnahme in THP1-Zellen: (A) native THP1-Zellen, (B) unstimulierte THP1-Zellen, (C) nach Vorstimulation mit 2mM ATP für 15min als Positivkontrolle, (D) nach Vorstimulation mit 5µg/ml HBD2 für 1h (E) und nach gleichzeitiger Inkubation mit 0,8U/ml Apyrase und 5µg/ml HBD2 für 1h. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten.

4.1.2.3 Defensin-induzierte ATP-Freisetzung

Nachdem die bisherigen Ergebnisse darauf hinweisen, dass HBD2 die Freisetzung von ATP induziert und somit indirekt eine Signalweiterleitung über den P2X7R aktiviert, wurde getestet, ob eine Stimulation von THP1-Zellen mit HBD2 tatsächlich zu erhöhten extrazellulären ATP-Konzentrationen führt.

Hierfür wurde die Menge an extrazellulärem ATP im Zellkulturerstand mit Hilfe eines Luciferin-Luciferase-Chemolumineszenz Assays ermittelt. Dabei wird die Oxidation von Leuchtkäfer-Luciferin durch das Enzym Luciferase unter Verbrauch von Mg^{2+} , molekularem Sauerstoff und ATP katalysiert. Bei dieser Reaktion entsteht Chemolumineszenz, die direkt proportional zur Menge an ATP im Kulturerstand ist.

Die Inkubation von THP1-Zellen mit HBD2 führte zu einer zeitabhängigen Induktion der ATP-Freisetzung, wobei die höchste ATP-Menge etwa 75min nach der Stimulation

Ergebnisse

erreicht wurde (Abb. 16A). Unstimulierte Zellen oder Zellen, die für 75min mit dem Kontrollpeptid SIg+ behandelt wurden, zeigten keine ATP-Abgabe in den extrazellulären Raum (Abb. 16B).

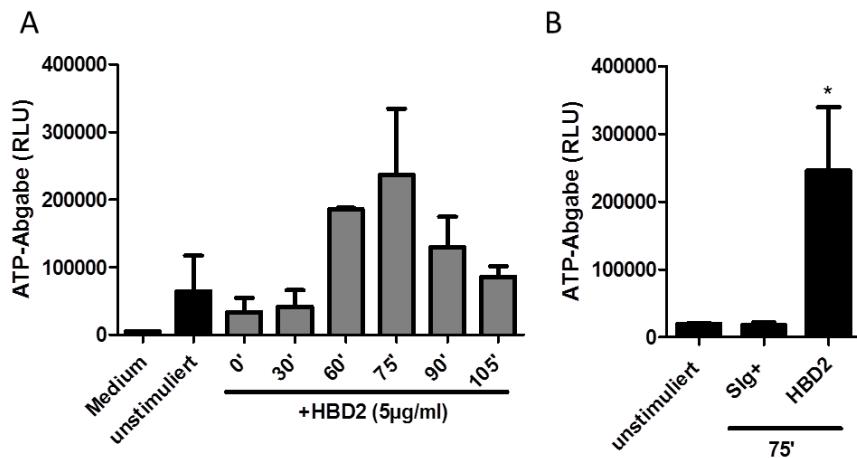


Abb. 16: HBD2-Stimulation induziert die ATP-Freisetzung in den Extrazellularraum. (A, B) Zeitverlauf der HBD2-induzierten ATP-Abgabe: THP1-Zellen wurden mit 5 μ g/ml HBD2 or SIg+ Kontrollpeptid stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten abgenommen und die enthaltene ATP-Menge bestimmt. Die ATP-Konzentration im Überstand wurde mittels Luciferin-Luciferase Chemolumineszenz Assay gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Katrin Mauch-Mücke/Institut für Immunologie, Arbeitsgruppe Prof. Thomas Hehlgans, Universität Regensburg.

Da ATP entweder von apoptotischen Zellen oder von lebenden Zellen durch die kontrollierte Abgabe von zytosolischem gespeichertem ATP freigesetzt werden kann, wurde außerdem getestet, ob die HBD2-Stimulation einen erhöhten apoptotischen Zelltod zur Folge hat. Es konnte jedoch über den untersuchten Zeitraum kein vermehrter Zelltod in HBD2-behandelten THP1-Zellen festgestellt werden (Abb. 17). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass HBD2 die Exozytose von intrazellulär gespeichertem ATP induziert.

Ergebnisse

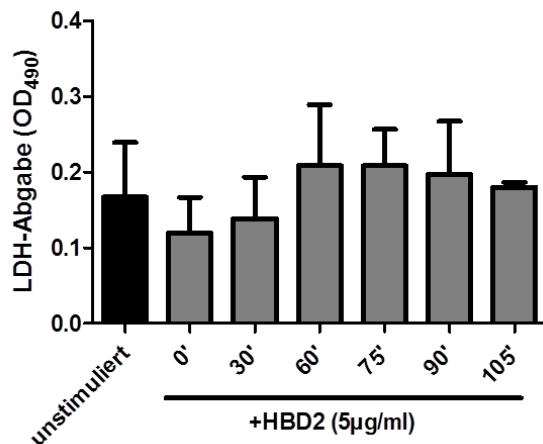


Abb. 17: HBD2-Stimulation induziert keinen Zelltod. Zeitverlauf der HBD2-induzierten LDH-Abgabe: THP1-Zellen wurden mit 5µg/ml HBD2 or SIg+ Kontrollpeptid stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten abgenommen und die enthaltene LDH-Menge bestimmt. Die LDH-Konzentration im Überstand wurde mittels LDH-Zytotoxizitäts Assay gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Jedoch scheint extrazelluläres ATP allein nicht in der Lage zu sein, die synergistisch erhöhte Zytokin- und Chemokinproduktion, wie sie nach einer Vorstimulierung mit HBD2 oder HBD3 in Makrophagen beobachtet werden kann, hervorzurufen. Ein Ersetzen der Defensin-Vorstimulierung durch verschiedene Konzentrationen an ATP führte nicht zu einer erhöhten TNF-Produktion in LPS-stimulierten THP1-Zellen (Abb. 18).

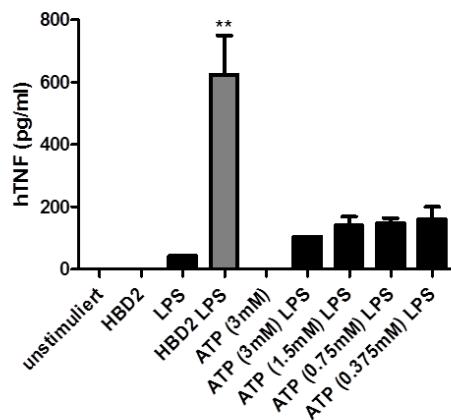


Abb. 18: ATP allein vermittelt keine erhöhte TNF-Produktion in THP1-Zellen. Vorstimulierung von THP1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an ATP oder 5µg/ml HBD2:Ig für 4h mit anschließender Gabe von 100ng/ml LPS für 4h. Die TNF-Produktion wurde im Überstand mittels eines ELISA gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: One way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

Ergebnisse

4.1.3 In vivo-Analyse des proinflammatorischen Effekts von Defensinen

Um den Defensin-induzierten proinflammatorischen Effekt auch *in vivo* zu überprüfen, wurden C57BL/6N Mäuse i.v. mit 100 μ g HBD2:Ig oder hIgG als Kontrolle behandelt. Nach 4h erfolgte die Gabe von 400 μ g LPS pro Maus ebenfalls i.v. Nach weiteren 4h wurde den Mäusen Blut entnommen und die TNF-Konzentration im Serum gemessen.

In vivo konnte ein Anstieg der TNF-Konzentration im Serum der mit HBD2 behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit hIgG behandelten Tieren nicht nachgewiesen werden (Abb. 19).

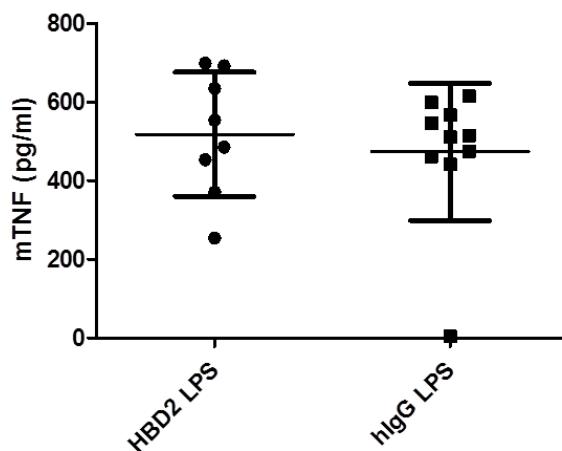


Abb. 19: In vivo-Vorstimulierung mit HBD2 führt nicht zu erhöhter TNF-Produktion. Injektion von je 100 μ g HBD2:Ig oder hIgG i.p. pro Maus. Nach 4h i.p. Applikation von 400 μ g LPS pro Maus. 4h später folgte die Blutentnahme zur Serumgewinnung. Messung der TNF-Konzentration mittels ELISA. Pro Gruppe kamen 8 oder 10 Tiere zum Einsatz. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Statistischer Test: Mann-Whitney U Test.

4.2 Charakterisierung der hReg3 α transgenen Mauslinie

Diverse Veröffentlichungen schildern immunmodulatorische Effekte von antimikrobiellen Peptiden in unterschiedlichen Entzündungsmodellen. Die Familie der antimikrobiellen RegIII-Proteine gehört strukturell zu den C-Typ Lektinen und spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und -ausdifferenzierung. Das hReg3 α – ebenso wie sein Maus-Ortholog mReg3 γ – wird hauptsächlich von den Paneth-Zellen des Dünndarms produziert (Itoh und Teraoka 1993) und dort durch inflammatorische Stimuli sowie eine Beschädigung der Mukus-Schicht induziert (Cash et al. 2006). Jedoch zeigen immer mehr Studien, dass hReg3 α und mReg3 γ infolge einer Erkrankung in diversen Geweben induziert werden können. So konnte eine erhöhte hReg3 α -Expression beispielsweise bei chronischen Entzündungen des Darms (Gironella et al. 2005) und der Haut, aber auch bei Harnwegsinfektionen nachgewiesen werden. Dabei scheint hReg3 α die Regeneration des

Ergebnisse

Gewebes nach Abklingen einer Entzündung zu begünstigen (Lai et al. 2012; Spencer et al. 2015). Jedoch kann eine vermehrte hReg3 α -Produktion auch in einigen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Hier begünstigt hReg3 α scheinbar das Tumorwachstum (Liu et al. 2015b). Die genauen Wirkmechanismen von hReg3 α , die zu einer positiven oder negativen Beeinflussung des Krankheitsverlaufes führen, sind jedoch weitgehend unverstanden.

Vor diesem Hintergrund wurde zur Untersuchung der Wirkungsweise des hReg3 α in entzündlichen Reaktionen *in vivo* eine hReg3 α transgene Mauslinie generiert, die das hReg3 α -Peptid ubiquitär überexprimiert.

4.2.1 Nachweis des hReg3 α -Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene

Das hReg3 α -Transgen enthält den CAG-Promotor, der eine starke ubiquitäre Expression in allen Geweben und Zellen von Säugetieren induziert. Die endogene Signalsequenz sorgt für einen Export des hReg3 α aus der Zelle. Anschließend folgt die volle Länge hReg3 α -cDNA und ein polyA (pA)-Schwanz, der eine effektivere Expression der mRNA gewährleistet (Abb. 20).

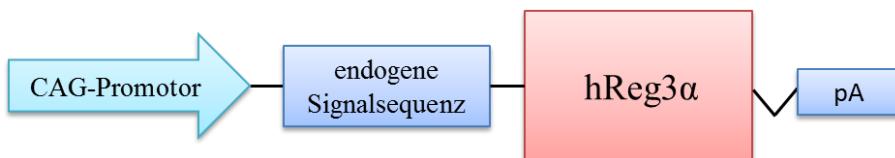


Abb. 20: Schematische Darstellung des hReg3 α -Transgens. mit CAG-Promotor, endogener Signalsequenz und polyA-Schwanz.

Aus der Gründergeneration gingen mehrere hReg3 α -positive Tiere hervor, deshalb wurden zwei Männchen für die weitere Zucht ausgewählt. Die daraus resultierenden Nachkommen wurden hier vergleichend auf die Expression des Transgens hin untersucht. Bei den sogenannten littermate-Tieren handelt es sich um Geschwistertiere, die das Transgen nicht tragen. Mit Hilfe von spezifischen Primern konnte das hReg3 α -Transgen auf genomischer DNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 21A). Darüber hinaus war es möglich, die mRNA-Expression des Transgens in allen untersuchten Geweben sowie in myeloiden Zellen nachzuweisen (Abb. 21B). Die mRNA-Expression war in beiden transgenen Linien etwa in gleichem Maße ausgeprägt. Als Positivkontrolle wurde die käuflich erworbene hReg3 α -cDNA verwendet.

Ergebnisse

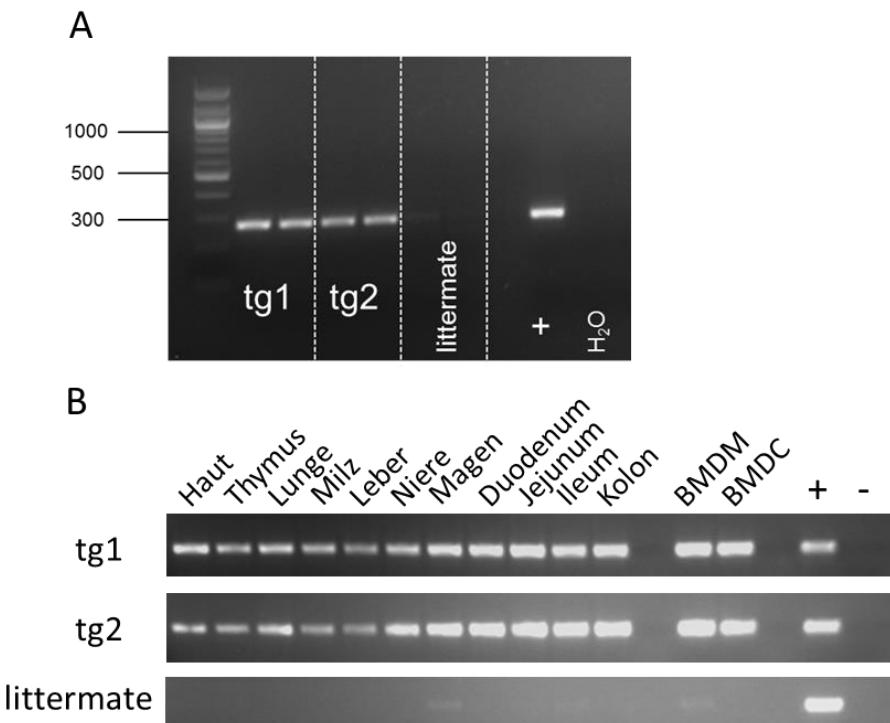


Abb. 21: Nachweis des hReg3 α Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene. Vergleich der gDNA- und mRNA-Expression in den beiden Linien. (A) Nachweis der DNA des Transgens mittels PCR-Analyse. (B) Nachweis des hReg3 α -Transgens in verschiedenen Organen und myeloiden Zellen auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR.

4.2.2 Nachweis des hReg3 α -Transgens auf Protein-Ebene

Neben dem Nachweis des Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene wurde auch die Proteinexpression des hReg3 α -Transgens untersucht. Hierfür erfolgte zunächst die Untersuchung des hReg3 α -Serumgehalts mittels ELISA in beiden untersuchten Gründerlinien. Dabei weisen die hReg3 α transgenen Tiere beider Linien deutliche Serumkonzentrationen an hReg3 α in Vergleich zu ihren littermates oder C57BL6/N-Wildtyp-Tieren auf (Abb. 22). Da die Proteinproduktion in der tg1-Linie gleichmäßiger zu sein scheint, wurden die weiteren Arbeiten nur mit der hReg3 α tg1-Linie durchgeführt.

Ergebnisse

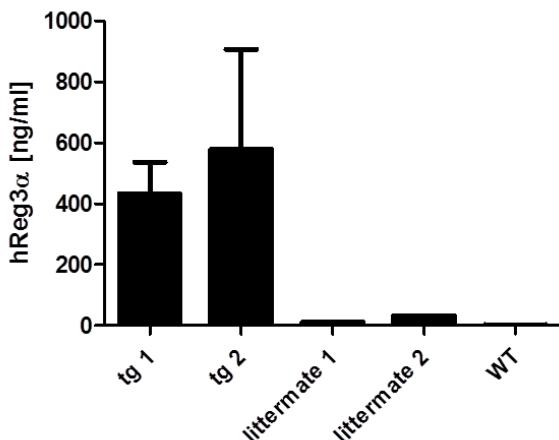


Abb. 22: Nachweis des hReg3 α -Serumgehalts. Nach der Blutentnahme zur Serumgewinnung erfolgte die Messung der hReg3 α -Konzentration mittels ELISA. Pro Gruppe kamen 2 Tiere zum Einsatz.

Des Weiteren wurde die hReg3 α -Produktion in den Zellen des Dünndarms immunhistochemisch untersucht. Dafür wurde das hReg3 α -Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in Paraffinschnitten des Duodenums sichtbar gemacht (braune Färbung). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zellen der hReg3 α transgenen Tiere im Vergleich zu ihren littermates deutliche Mengen an hReg3 α produzieren (Abb. 23).

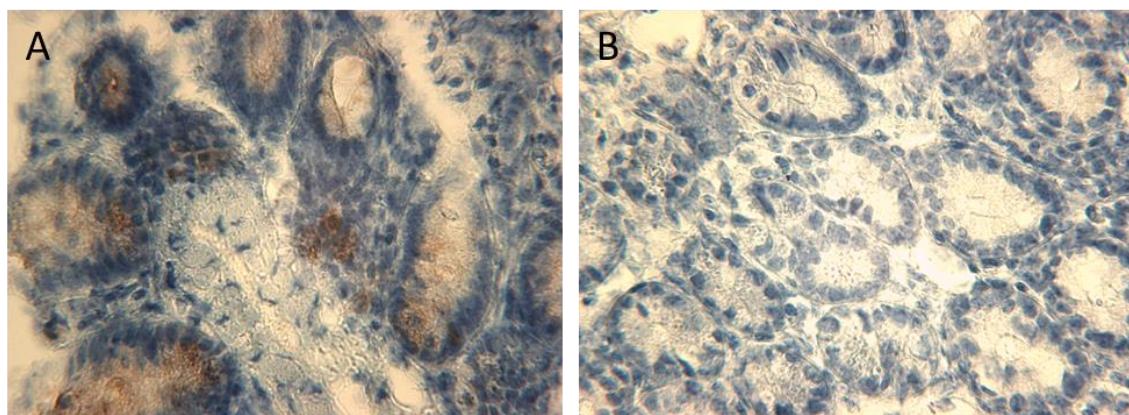


Abb. 23: Immunhistochemische Untersuchung von hReg3 α im Dünndarm. Anti hReg3 α -Färbung in Paraffinschnitten des Duodenums von einem (A) hReg3 α transgenem Tier im Vergleich zu seinem (B) nicht-transgenen littermate. Nach Entnahme der Gewebeproben wurde das Gewebe in Paraffin konserviert. Anschließend erfolgte die Anfertigung von 3 μ m Schnitten und eine Färbung mit einem anti hReg3 α -Antikörper. Die Signalentwicklung (braune Färbung) erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau angefärbt. Vergrößerung 160x.

Ergebnisse

4.2.3 In vivo-Phänotypisierung der hReg3 α transgenen Mauslinie

4.2.3.1 Untersuchung der hReg3 α transgenen Mauslinie im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis

Viele Studien heben die Rolle von hReg3 α als Biomarker zur Erkennung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Marafini et al. 2014) oder auch bei der Entstehung einer gastrointestinalen *Graft versus Host Disease* (GvHD) hervor (Harris et al. 2012). Im Folgenden sollte der Einfluss von hReg3 α auf Enzündungen des Darms im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis untersucht werden. Bei diesem Modell handelt es sich um eine chemisch hervorgerufene Darmentzündung, die zu einem Verlust der Darmwandintegrität führt. Die daraus resultierenden Infektionen und die Zerstörung des Gewebes führen zu einer entzündlichen Reaktion des Immunsystems.

Den Tieren wurde 1,8% DSS im Trinkwasser für sieben Tage verabreicht. Im Verlauf der Kolitis wurde täglich das Gewicht protokolliert sowie bei der abschließenden Analyse die Dickdarmlänge, der histologische Befund des Kolons und die Zytokinexpression im Kolongewebe untersucht.

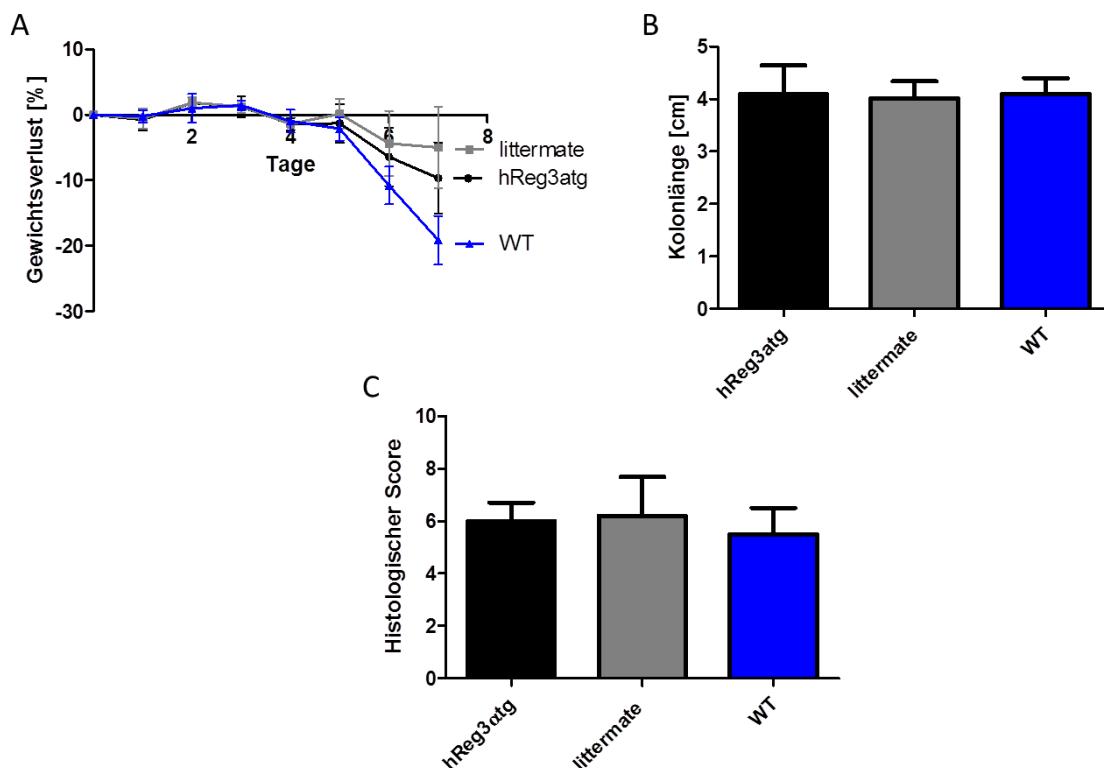


Abb. 24: Keine Unterschiede der hReg3 α transgenen Mauslinie zu Kontrolltieren im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis. Gabe von 1,8% DSS in Trinkwasser über einen Zeitraum von 7d. (A) Darstellung des Gewichtsverlaufs der untersuchten Mauslinien über den Verlauf des Experiments. (B) Messung der Kolonlänge nach Beendigung der Kolitis. (C) Beurteilung des histologischen Scores an Hand histologischer Schnitte (HE-Färbung). Pro Gruppe wurden 5 Tiere verwendet. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Ergebnisse

WT-, ebenso wie hReg3 α transgene Mäuse und deren nicht transgene littermates verloren im Verlauf der Kolitis an Gewicht, jedoch war dieser Gewichtsverlust nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 24A). Auch die Kolonlänge der untersuchten Gruppen war vergleichbar, wobei jedoch die Manifestierung einer Entzündung am insgesamt verkürzten Dickdarm erkennbar war (Abb. 24B). Außerdem erfolgte die Bestimmung des histologischen Scores. Dieser setzt sich aus zwei Bewertungskriterien zusammen. Dabei wird einerseits der Epithelschaden und andererseits das Einwandern von Zellen, der sogenannten Infiltrate, beurteilt (3.5.2). Jedoch zeigte auch der histologische Vergleich der Gewebeschädigungen infolge einer Entzündung keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-, hReg3 α transgenen Tieren und littermates (Abb. 24C).

Abschließend wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF (Abb. 25A), IL6 (Abb. 25B) und IFN γ (Abb. 25C) im Kolongewebe mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dabei zeigten sich bei der Überprüfung dieser Entzündungsparameter ebenfalls keine Unterschiede zwischen hReg3 α transgenen Tieren und den untersuchten Kontrollgruppen.

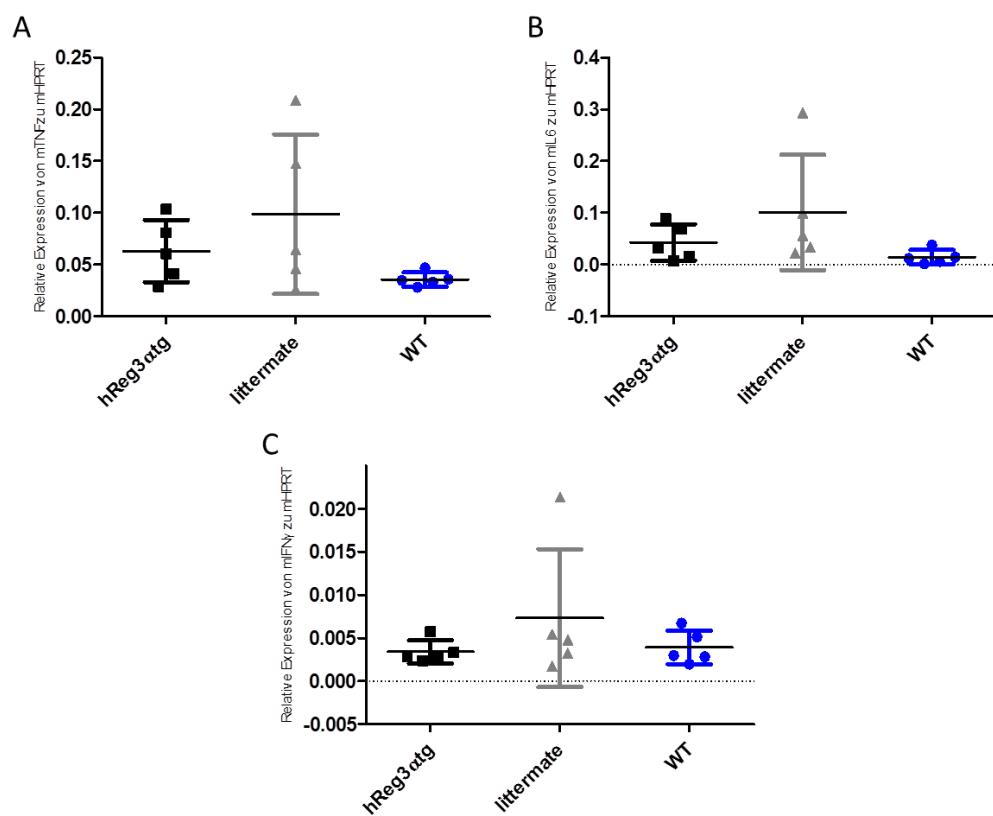


Abb. 25: Zytokinexpression in Kolongewebe nach akuter DSS-induzierter Kolitis. Gabe von 1,8% DSS in Trinkwasser über einen Zeitraum von 7 Tagen. Darstellung der Expression von den proinflammatorischen Zytokinen (A) TNF, (B) IL6 und (C) IFN γ im Kolongewebe nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis in den untersuchten Mauslinien. Pro Gruppe wurden 5 Tiere verwendet. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Ergebnisse

Da einige Studien belegen, dass hReg3 α die Wiederherstellung des Gewebes nach Abklingen einer Entzündung zu begünstigen scheint (Lai et al. 2012; Spencer et al. 2015), wurde überprüft, wie hReg3 α die Regeneration der Mäuse nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis beeinflusst. Hierfür erhielten die untersuchten Tiere zunächst 7 Tage 1,8% DSS in Trinkwasser und anschließend für 6 Tage Leitungswasser. Alle Tiere verloren bis Tag 10 des Versuchszeitraums weiter an Gewicht. Anschließend gelang allen WT-Tieren eine Gewichtszunahme (Abb. 26A). Dabei konnten sich 100% (10 Tiere zu je 5 in 2 unabhängigen Experimenten) der untersuchten WT-Tiere bis zum Versuchsende an Tag 13 erholen. Von den hReg3 α transgenen Tieren überlebten nur 60%, in der littermate Gruppe gar nur 25% der untersuchten Tiere (pro Gruppe 8 Tiere zu je 4 in 2 unabhängigen Experimenten) die Regenerationsphase (Abb. 26B). Vergleichende Untersuchungen der Entzündungsparameter, wie z.B. Gewichtsverlauf (Abb. 26A), Dickdarmlänge und Zykokinexpression im Kolongewebe, in den überlebenden Tieren zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

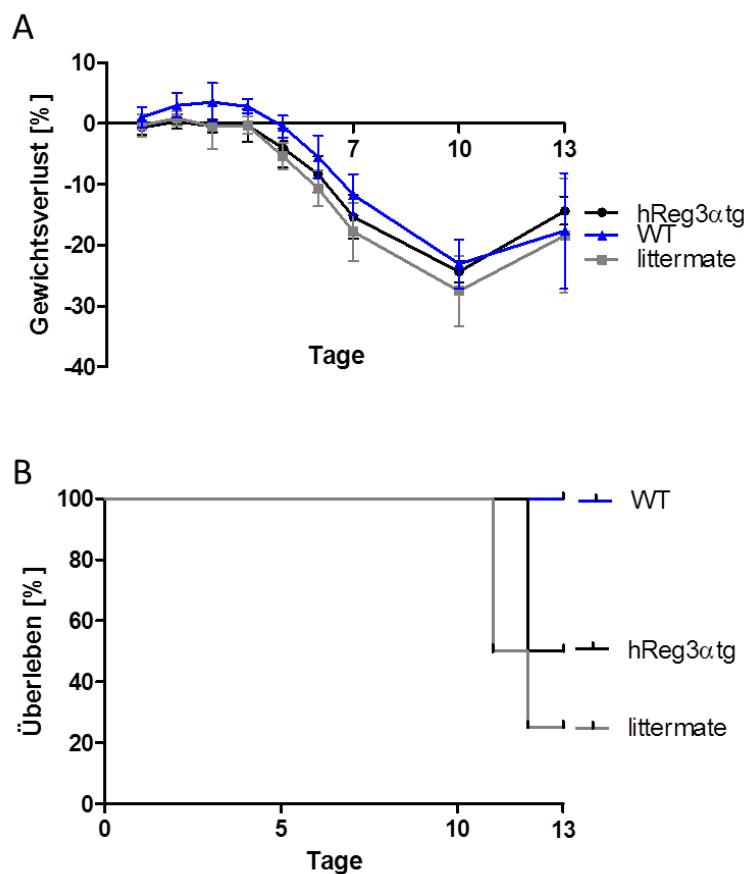


Abb. 26: Regeneration nach akuter DSS-induzierter Kolitis. Gabe von 1,8% DSS in Trinkwasser über einen Zeitraum von 7 Tagen mit anschließendem Wechsel auf Trinkwasser für 6 Tage. (A) Darstellung des Gewichtsverlaufs der untersuchten Mauslinien über den Verlauf des Experiments. (B) Grafische Darstellung der Überlebensrate über den Versuchszeitraum. Pro Gruppe wurden 5 bzw. 4 Tiere verwendet. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Ergebnisse

Im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis konnten keine Unterschiede zwischen hReg3 α transgenen Tieren und den Kontrolltieren in der Ausprägung der Entzündungsreaktion festgestellt werden. Die ubiquitäre Expression des hReg3 α -Transgens schien sich jedoch negativ auf die Erholungsfähigkeit der hReg3 α -transgenen Mäuse auszuwirken. Dabei wiesen nicht nur die transgenen Tiere sondern auch die nicht-transgenen littermates eine deutlich eingeschränkte Regeneration nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis auf. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass die Immunantwort der littermates indirekt durch das Zusammenleben mit hReg3 α transgenen Tieren in einem Käfig modifiziert wurde. Um detailliertere Einblicke in die Unterschiede zwischen hReg3 α transgenen und nicht-transgenen Mäusen zu erhalten, wurde eine *Next-Generation Sequenzierung* des Darmmikrobioms durchgeführt.

4.2.3.2 Untersuchung der Darmmikrobiota

Um den Einfluss des hReg3 α -Transgens auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms zu untersuchen, wurde ein *Next Generation Sequencing* mit dem GS FLX+ System durchgeführt. Die analysierten Proben zeigten den Stand des Darmmikrobioms bei gesunden Tieren an. Dabei wurden drei verschiedene Gruppen untersucht: 1) hReg3 α transgene Tiere, die mit 2) littermates seit Geburt im gleichen Käfig gehalten wurden (*co-housing*), sowie 3) littermates, die seit Geburt ohne hReg3 α transgene Geschwister im Käfig gehalten wurden (*single housing*). Es konnte gezeigt werden, dass sich das Mikrobiom von Tieren unterschiedlicher Genotypen bereits innerhalb eines Monats bei *co-housing*-Experimenten angleicht (Elinav et al. 2011).

Zur Qualitätssicherung wurde zunächst ein sogenannter *Rarefaction-Plot* erstellt (Abb. 27). Die erhaltenen Kurven gingen für die untersuchten Maus-Stämme in eine Sättigung über. Damit konnte gezeigt werden, dass eine ausreichend hohe Spezieszahl für eine qualitative Untersuchung der Mikrobiomzusammensetzung vorlag.

Ergebnisse

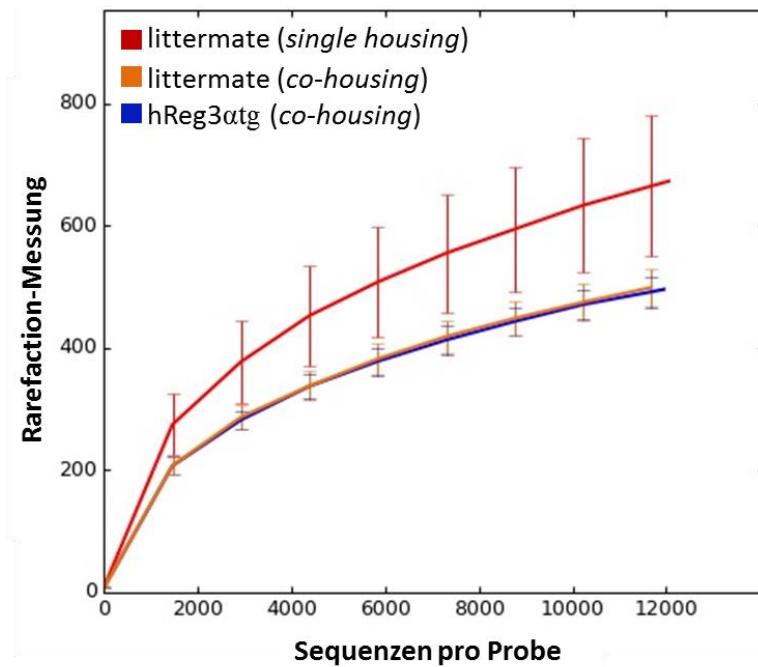


Abb. 27: Rarefaction-Kurven der nachgewiesenen Bakterienspezies. Die abgebildeten Sequenzen wurden auf 12000 eingestellt. Dargestellt sind die Rarefaction-Plots der hReg3 α transgenen Gruppe (blau), sowie der Kontrollgruppen littermate *single housing* (rot) und *co-housing* (gelb). Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Hiergeist/Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Regensburg.

Um einen ersten Eindruck der relativen Häufigkeit verschiedener Bakteriengattungen zu erhalten, wurde aus den Daten ein *Taxa-Summary-Plot* erstellt (Abb. 28). Bei der Verteilung im *Taxa-Summary-Plot* zeigte sich, dass sich die beiden *co-housing*-Gruppen stark ähnelten. In der Gruppe der *single-housing* littermates fanden sich einige Bakteriengattungen, die in den beiden anderen untersuchten Gruppen fehlten.

Ergebnisse

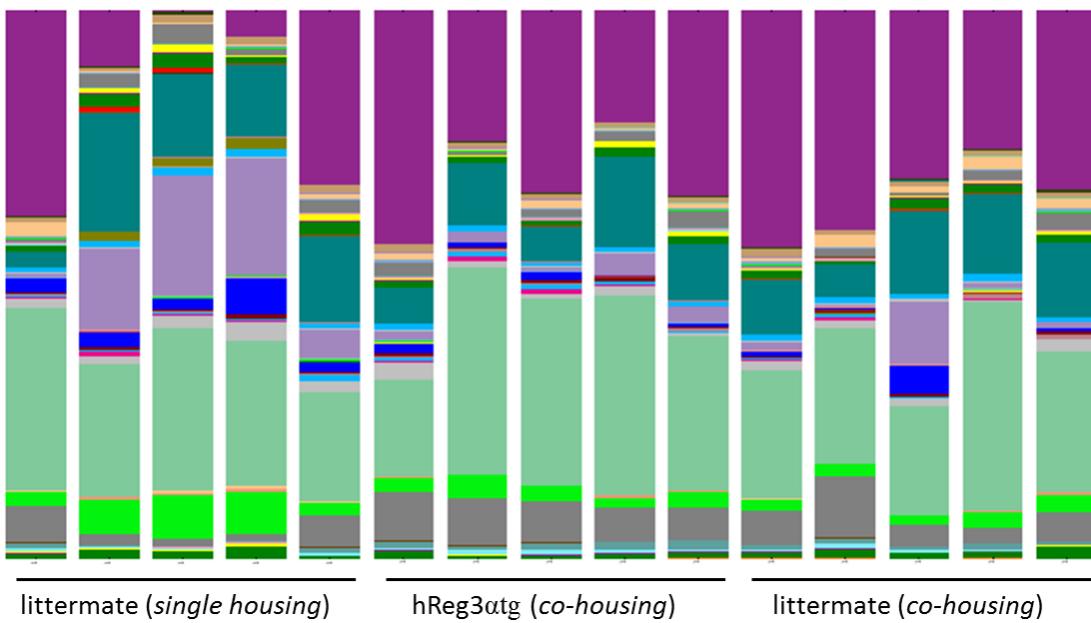


Abb. 28: Taxa-Summary-Plot. Dargestellt ist die relative Häufigkeit der verschiedenen Taxa auf Gattungsebene in hReg3 α transgenen Mäusen sowie den Kontrollgruppen. Eine detaillierte Farb-Legende befindet sich im Anhang. Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Hiergeist/Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Regensburg.

Zur weiteren Differenzierung der Mikrobiomkomposition in den untersuchten Gruppen wurde eine *Principal coordinate analysis* (PCoA) durchgeführt. Dieses statistische Verfahren beruht darauf, dass Objekte – in diesem Falle die untersuchten Tiere – räumlich so angeordnet werden, dass die Distanzen zwischen den Objekten den erhobenen Unterschieden möglichst exakt entsprechen (Ranka et al. 2007). Ähnliche Proben liegen also näher zusammen.

Anhand der PCoA-Grafik wurde ersichtlich, dass sich die *co-housing* Gruppen in ihrer Mikrobiomzusammensetzung sehr ähnlich sind und sich deutlich von den *single housing* littermates unterscheiden (Abb. 29). Die Gruppe der *single housing* littermates ist dabei auch die insgesamt variabelste Gruppe. Die Unterschiede zwischen den Mäusen scheinen sich also durch das *co-housing* anzugeleichen.

Ergebnisse

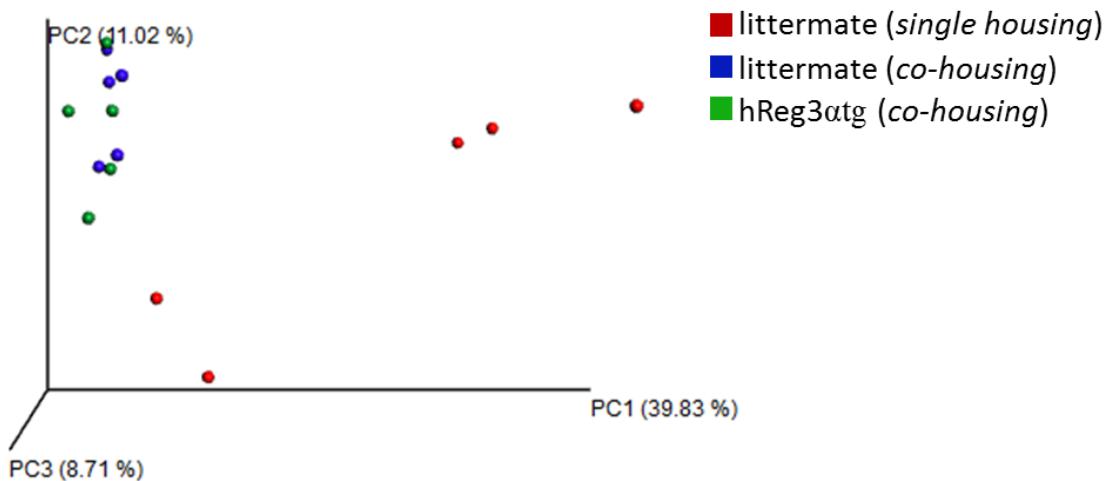


Abb. 29: Principal coordinate analysis (PCoA). Dargestellt sind die PCoA-Analyse der hReg3 α transgenen Gruppe (grün), sowie der Kontrollgruppen littermate *single housing* (rot) und *co-housing* (blau). Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert. Die statistische Korrelation der Daten erfolgte nach dem Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Hiergeist/Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Regensburg.

Auch der Simpson-Diversitätsindex war für die littermate *single housing* Gruppe deutlich erhöht. Die Diversität des Mikrobioms in diesen Mäusen war also höher als in den Vergleichsgruppen. Die geringste Diversität wies dabei die hReg3 α transgene Gruppe auf.

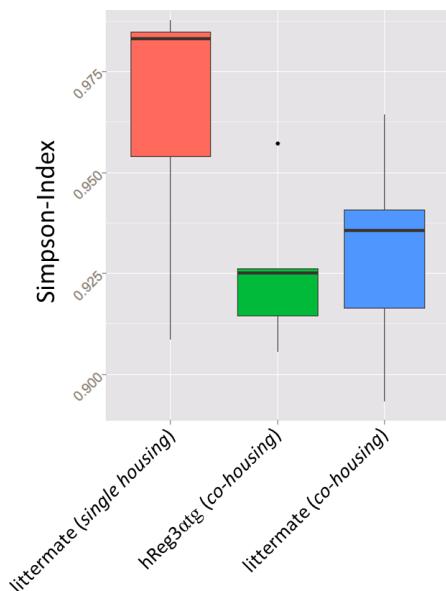


Abb. 30: Simpson-Diversitätsindex. Dargestellt ist der Simpson-Diversitätsindex der hReg3 α transgenen Gruppe (grün), sowie der Kontrollgruppen littermate *single housing* (rot) und *co-housing* (blau). Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Hiergeist/Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Regensburg.

Der Hauptanteil des Mikrobioms wird von den Bakterienstämmen der *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Actinobacteria* gebildet (Eckburg und Relman 2007).

Ergebnisse

Die Untersuchung dieser Bakterienstämme zeigte, dass die gram-positiven *Firmicutes* in den *co-housing* Gruppen im Vergleich zu den *single housing* littermates deutlich reduziert ist (Abb. 31A). Dafür scheinen die gram-negativen *Verrucomicrobia* diese Nische zu füllen (Abb. 31B). Die anderen untersuchten Bakterienstämme wiesen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Daten nicht gezeigt).

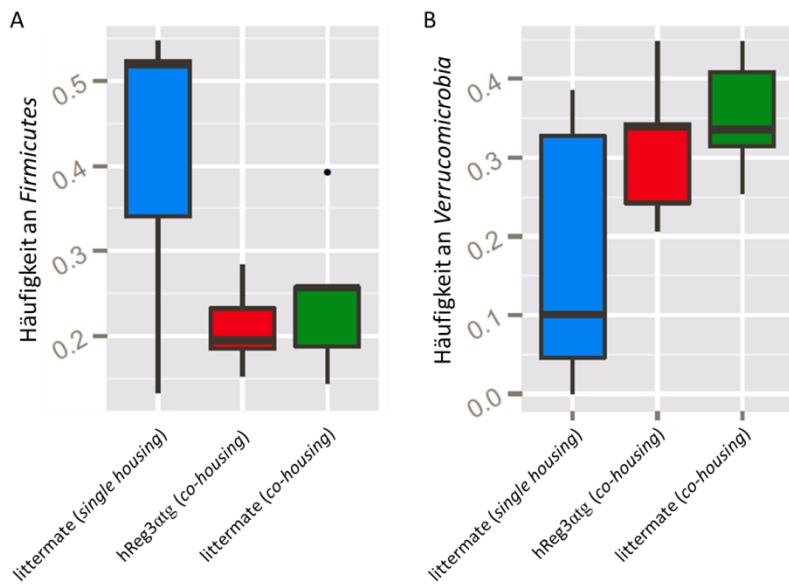


Abb. 31: Next Generation Sequencing auf Phylum-Ebene. Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der Bakterienstämme der (A) *Firmicutes* und (B) *Verrucomicrobia* in den untersuchten Gruppen. Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Hiergeist/Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Regensburg.

Bei einer detaillierteren Betrachtung der NGS-Daten auf Gattungsebene fielen einige Gattungen auf, die zwischen den *co-housing* Gruppen und den *single housing* littermates unterschiedlich verteilt waren. Besonders deutlich zeigten sich auch hier Unterschiede in den Gattungen, die zu den *Verrucomicrobia* (Abb. 32A) oder *Firmicutes* (Abb. 32B) zählen. Einige Gattungen konnten in den *co-housing* Gruppen gar nicht gefunden werden. Dazu gehörten vorrangig gram-positive Gattungen, wie *Acetatifactor* oder *Anaerotruncus*. Es gab aber auch Gattungen, wie beispielsweise die gram-negative Gattung *Bartonella*, die ausschließlich in den hReg3 α transgenen Tieren zu finden waren (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

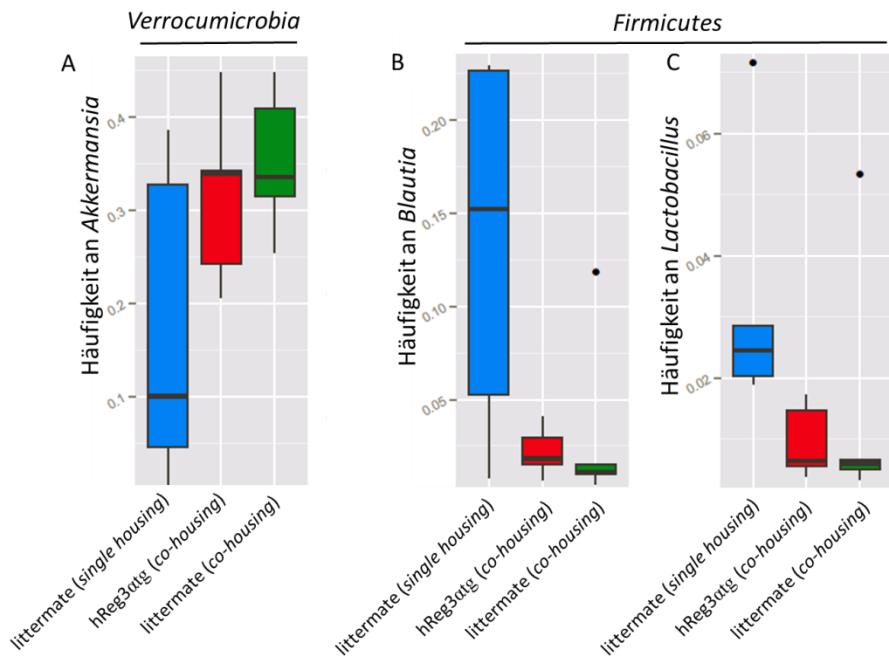


Abb. 32: Next Generation Sequencing auf Gattungs-Ebene. Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der Bakteriengattungen der (A) Akkermansia, (B) Blautia und (C) Lactobacillus in den untersuchten Gruppen. Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Hiergeist/Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Regensburg.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die ubiquitäre Expression des hReg3 α die Mikrobiomkomposition – insbesondere dessen Diversität – beeinflusst. Da hReg3 α antimikrobiell gegen gram-positive Bakterien wirkt, kommt es in den hReg3 α transgenen Tieren zu einer Verringerung des gram-positiven *Firmicutes*-Stamms. Die dadurch entstehende Nische führt zu einer Vermehrung von gram-negativen Bakterien. Durch ein *co-housing* wird dieses durch hReg3 α veränderte Mikrobiom an die nicht-transgenen littermates im gleichen Käfig weitergegeben, so dass hReg3 α transgene Mäuse und littermates aus dem gleichen Käfig ein ähnliches Darmmikrobiom aufweisen. Nicht-transgene littermates, die für mindestens vier Wochen nach dem Absetzen von hReg3 α transgenen Tieren getrennt gehalten wurden, wiesen dagegen eine höhere Diversität des Darmmikrobioms – insbesondere der gram-positiven Gattungen – auf.

4.2.3.3 Die Rolle des hReg3 α im Tumorwachstum

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die ubiquitäre Expression von hReg3 α in transgenen Mäusen zu einer schlechteren Prognose bei der Regeneration nach einer DSS-induzierten Kolitis führt (4.2.3.1). Die dauerhafte hReg3 α -Expression induziert außerdem eine Verschiebung des Darmmikrobioms in hReg3 α transgenen Tieren, wobei gram-positive Bakteriengattungen reduziert und gram-negative vermehrt auftreten (4.2.3.2). Diverse Studien zeigen, dass eine Überexpression von Reg-Proteinen scheinbar die maligne Zelltransformation und somit die Tumorentstehung fördern. Die Expression von Reg-Proteinen wird in diesem Zusammenhang unter anderem durch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL6, IFN γ oder TNF, verstärkt (Rechreche et al. 1999). Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, welchen Einfluss die ubiquitäre hReg3 α -Expression auf die Entstehung von Tumoren hat. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von hReg3 α auf ein etabliertes syngenes Kolonkarzinom-Modell untersucht. Hierfür wurde die murine MC38-Kolonkarzinom-Zelllinie verwendet. Diese Zellen wurden mit dem zuvor hergestellten Expressionsvektor für hReg3 α :Ig bzw. als Kontrolle mit dem SIg+ Leervektor transfiziert. Die erfolgreiche Produktion des hReg3 α :Ig- bzw. SIg+-Peptids in den Zellkulturüberstand dieser Zellen konnte mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Als weitere Kontrolle diente die MC38 WT-Zelllinie.

Den syngenen C57BL/6N Mäusen wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 50 μ l dorsal subkutan appliziert (3.4.7). Alle 2-3 Tage wurde das Tumorwachstum durch Messen von Länge und Breite protokolliert.

Ergebnisse

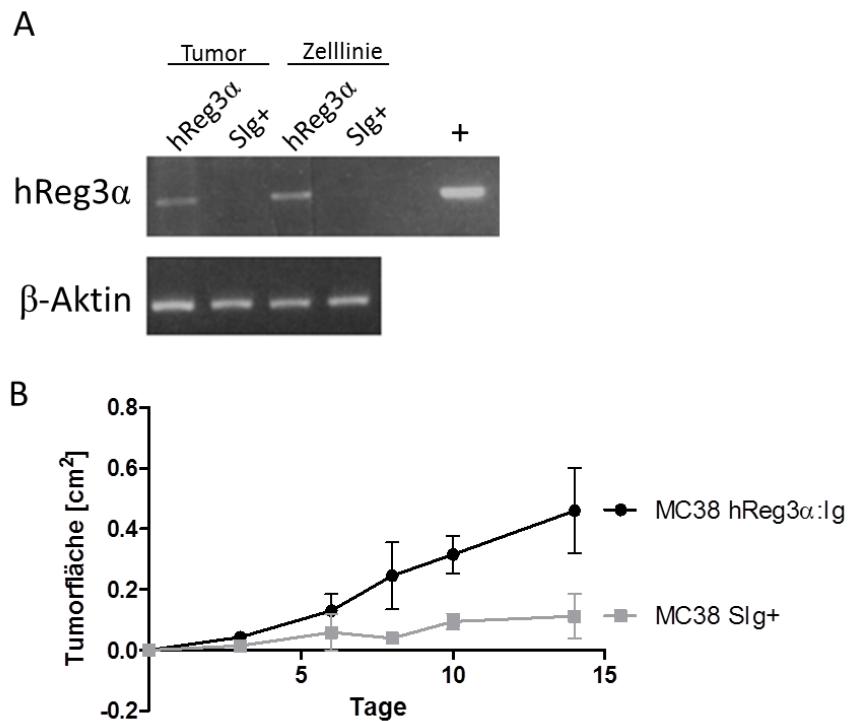


Abb. 33: Wachstum der MC38-Tumoren in C57BL/6N Mäusen. (A) Nachweis von hReg3 α auf mRNA-Ebene in Tumorgewebe und Zellkulturlinien mittels RT-PCR. (B) Liniendiagramm des Tumorwachstums. MC38-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für hReg3 α :Ig (MC38 hReg3 α :Ig) oder dem SIg+ Leervektor (MC38 SIg+) transfiziert. C57BL/6 Mäusen wurden dorsal 1.5×10^6 Zellen in $50\mu\text{l}$ appliziert. Pro Gruppe wurden 3 Tiere analysiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens vier unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: Mann-Whitney-Test. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Nadja Tedesco im Rahmen ihrer Bachelorarbeit, Institut für Immunologie, Universität Regensburg.

Eine Untersuchung der hReg3 α mRNA-Expression mittels RT-PCR in RNA von MC38-Kolonkarzinomen an Tag 14 nach Applikation oder den entsprechenden Zellkulturzellen zeigte, dass das hReg3 α sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erfolgreich exprimiert wird (Abb. 33A). Die SIg+ transfizierten Kontrollzellen (Abb. 33A) sowie untransfizierte MC38 WT-Zellen (Daten nicht gezeigt) exprimierten dagegen keine hReg3 α mRNA.

Während der ersten 7 Tage zeigten sowohl die hReg3 α :Ig als auch die SIg+ exprimierenden Tumoren einen gleichmäßigen Verlauf im Tumorwachstum. An den folgenden Tagen wiesen die Tumoren, die von hReg3 α :Ig exprimierenden MC38 Zellen gebildet wurden, eine deutlich erhöhte Größenzunahme auf, während das Wachstum der SIg+ produzierenden Tumoren stagnierte (Abb. 33B). Die Expression von hReg3 α scheint also das Tumorwachstum zu begünstigen.

Da das verstärkte Tumorwachstum der hReg3 α :Ig exprimierenden MC38 Zellen mit einer veränderten Zellproliferation erklärt werden könnte, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei korreliert der OD₅₄₀-Wert mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Ein MTT-Assay konnte keinen Unterschied in den proliferativen Eigenschaften der hReg3 α :Ig

Ergebnisse

oder SIg+ transfizierten Zellen im Vergleich zu MC38 WT-Zellen aufzeigen (Abb. 34). Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass eine veränderte Zellproliferation Grund für das verstärkte Wachstum der hReg3 α :Ig exprimierenden Tumoren ist.

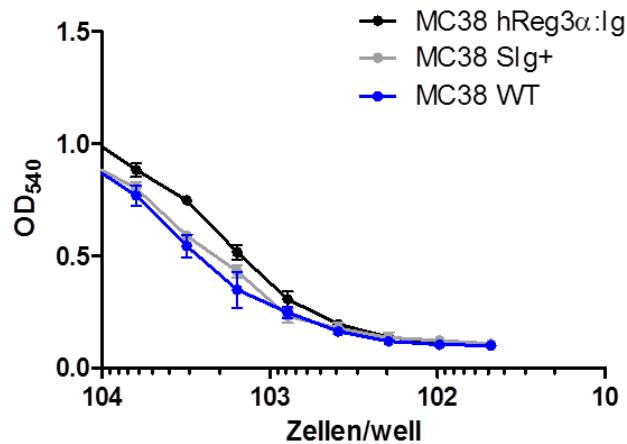


Abb. 34: MTT-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität. Die Zellvitalität von MC38 Zellen, die mit dem hReg3 α :Ig-Expressionsvektor (MC38 hReg3 α :Ig, schwarz) oder dem SIg+-Kontrollvektor (MC38 SIg+, grau) transfiziert wurden, und nicht transfizierte MC38 Zellen (blau) wurde mittels MTT-Assay analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Triplikate.

Die subkutane Inokulation von $1,5 \times 10^6$ MC38 WT-Zellen auf hReg3 α transgenen Tieren oder C57BL/6N Tieren als Kontrolle zeigte ebenfalls, dass die Tumoren auf hReg3 α transgenen Mäusen ein erhöhtes Wachstum aufzeigen (Abb. 35). Für die Wachstumszunahme scheint somit ausreichend zu sein, wenn das den Tumor umgebende Endothel hReg3 α exprimiert.

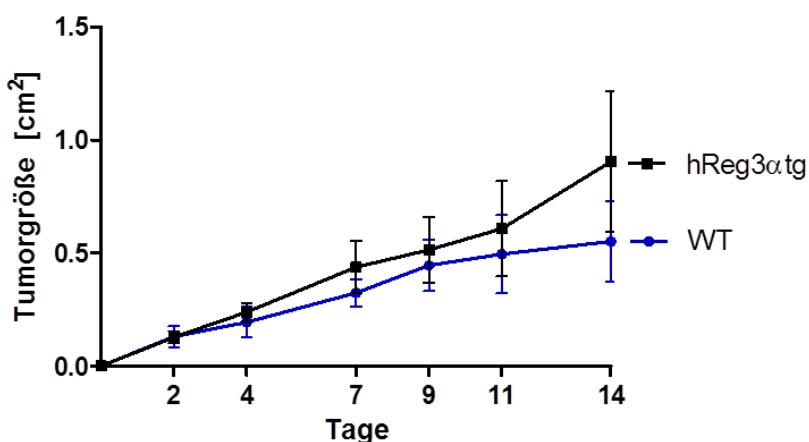


Abb. 35: Wachstum von MC38-Tumoren in hReg3 α transgenen Mäusen. Liniendiagramm des Tumorwachstums. $1,5 \times 10^6$ Zellen MC38 WT-Zellen wurden hReg3 α transgenen oder C57BL/6N Mäusen dorsal subkutan appliziert. Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Ergebnisse

Ab einer gewissen Größe der Tumoren reicht die Versorgung des Gewebes durch Diffusion alleine nicht mehr aus. In Folge dessen setzt die Vaskularisierung des Gewebes ein (Hanahan und Folkman 1996). Als Maß für die Angiogenese kann dabei das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1 oder CD31) dienen, das in Paraffin-konservierten Tumorschnitten angefärbt wurde. In den histologischen Präparaten der hReg3 α :Ig MC38 Tumoren konnten jedoch keine Unterschiede in den CD31 $^+$ Gefäßstrukturen im Vergleich zu den SIg $^+$ exprimierenden Tumoren festgestellt werden. Die Isotyp-Kontrollen waren stets negativ (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Expression des Vaskularisationsfaktors MIP-2 wider, wobei keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen detektiert werden konnten (Abb. 36).

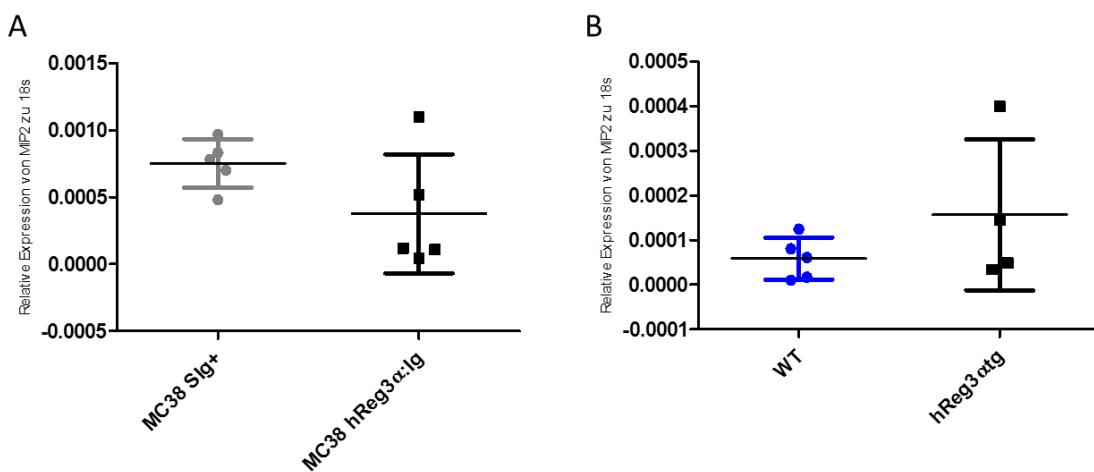


Abb. 36: Expression von MIP2 im Tumorgewebe. Aus Biopsien von MC38 Tumoren, die (A) hReg3 α :Ig oder SIg $^+$ exprimieren und auf C57BL/6 Mäusen wuchsen, oder MC38 WT-Tumoren, die auf hReg3 α transgenen bzw. C57BL/6/N Tieren wuchsen, wurde die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und mit spezifischen Primern gegen MIP2 oder 18s eine qPCR durchgeführt. Pro Gruppe wurden 4-5 Tiere analysiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Statistischer Test: Mann-Whitney-Test.

Studien zeigen, dass hReg3 α die Karzinogenese über IL6-abhängige Signalwege begünstigt. Dabei scheint eine erhöhte hReg3 α -Produktion einerseits durch IL6 über den JAK2/STAT3-Signalweg induziert zu werden, andererseits wird die Expression von JAK2 sowie STAT3 durch exogenes hReg3 α reguliert und die hReg3 α -Expression in einer positiven Rückkopplungsschleife gesteuert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass hReg3 α an den *epidermal growth factor* Rezeptor (EGFR) bindet (Liu et al. 2015b).

Zur Klärung der zellulären und molekularen Funktionen von hReg3 α in dem hier verwendeten Tumormodell bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

5 Diskussion

5.1 Immunregulatorische Funktion von Defensinen

5.1.1 Defensin-vermittelter proinflammatorischer Effekt in humanen Monozyten und Makrophagen

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer β -Defensin-Stimulierung auf humane Monozyten und Makrophagen näher betrachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine vierstündige HBD2-Vorstimulierung der humanen Monozyten-Zellline THP1 zu einer signifikant erhöhten TNF-Produktion nach LPS-Restimulierung im Vergleich zu einer alleinigen LPS-Gabe führte (Abb. 4). Der gleiche synergistische Effekt konnte auch in humanen peripheren Blutmakrophagen (PBM) nachgewiesen werden (Abb. 9). Diese Wirkung konnte außerdem für HBD3 bestätigt werden (Abb. 7). Defensine unterscheiden sich zwar in ihrer Aminosäuresequenz, besitzen jedoch eine sehr ähnliche Tertiärstruktur. Demnach ist es denkbar, dass Defensine über gemeinsame Rezeptoren Signale induzieren können. So interagieren beispielsweise mehrere untersuchte Defensine mit den Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR6 und lösen somit eine Chemotaxis aus (Rohrl et al. 2010a, 2010b; Yang et al. 1999).

Diese proinflammatorische Wirkung von HBD2 und HBD3 bestätigte frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe, die eine synergistische Wirkung von MBD14 – dem Maus-Ortholog von HBD3 – auf Mausmakrophagen belegen konnten (Barabas et al. 2013). Auch eine gleichzeitige Stimulierung von THP1-Zellen oder Mausmakrophagen mit polyI:C und HBD3 verstärkte die proinflammatorische Zytokin- und Chemokinproduktion signifikant (Semple et al. 2015).

Es gibt jedoch auch Studien, die einen immunsuppressiven Einfluss von Defensinen auf die Entzündungsantwort aufzeigen (Bruhs et al. 2016; Navid et al. 2012; Semple et al. 2010). Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse ist die Verwendung unterschiedlich hergestellter Defensine. Während in der vorliegenden Arbeit in *Drosophila-Schneider 2* Zellen exprimierte Defensin-Fusionsproteine verwendet wurden, nutzten die genannten anderen Arbeiten chemisch synthetisierte Peptide oder in *E. coli* exprimierte Defensine. Dabei sind Abweichungen in der Peptidmodifikation oder der Zusammensetzung der Disulfidbrückenbindungen denkbar. Außerdem ist der humano IgG-Tag im Vergleich zum Defensin relativ groß. Dies könnte bei einigen Ligand-Rezeptor-

Diskussion

Bindungen zu sterischen Hinderungen führen. Ein Einfluss des Ig-Tags auf die Zytokinproduktion von Monozyten und Makrophagen konnte jedoch mit Hilfe der SIg+- und hIgG-Kontrollen ausgeschlossen werden. Auch eine LPS-Kontamination der verwendeten Defensine konnte nicht nachgewiesen werden, da eine Aktivierung der Zellen nach alleiniger Defensin-Stimulierung bzw. mit Hitze-inaktiviertem Defensin zu keiner proinflammatorischen Reaktion führte (Abb. 4; Abb. 7).

Neben einer erhöhten TNF-Expression wurde auch das Zytokin IL1 β und das Chemokin CXCL8 vermehrt produziert (Abb. 5; Abb. 7). HBD2 und HBD3 induzieren demnach mehrere proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Die Produktion von IL6 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren führte auch die Restimulierung mit anderen TLR-Liganden anstatt der LPS-Gabe zu einem synergistischen Effekt der Defensine (Abb. 6; Abb. 8). Es scheint also für die Signalweiterleitung nicht ein bestimmter TLR verantwortlich zu sein, sondern die proinflammatorische Wirkung der Defensine wird über einen oder mehrere gemeinsame Faktoren vermittelt. Einerseits könnten die untersuchten Defensine die Produktion oder Aktivierung von Molekülen, die am TLR-Signalweg beteiligt sind, verstärken. Andererseits könnten sie aber auch negative Regulatoren der TLR-Signaltransduktion inhibieren. Jedoch zeigten auch hier Studien, dass eine gleichzeitige Stimulation von THP1-Zellen oder Mausmakrophagen mit HBD3 und verschiedenen TLR-Liganden keine Produktion proinflammatorischer Zytokine induzierte (Semple et al. 2015). Dies lässt die Vermutung zu, dass auch der zeitliche Ablauf der Stimulierung eine Rolle bei der Signalentwicklung spielt.

Versuche den *in vitro* gezeigten proinflammatorischen Effekt auch *in vivo* durch eine Erhöhung der TNF-Konzentration im Serum nachzuweisen, waren nicht erfolgreich. *In vivo* konnten keine Unterschiede in der TNF-Serumkonzentration von HBD2-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 19). Obwohl diverse *in vitro*-Studien zeigen, dass humane Defensine eine Signalweiterleitung auf Mauszellen auslösen können (Barabas et al. 2013; Rohrl et al. 2010b), ist eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden proinflammatorischen Effekt, dass *in vivo* diese Defensin-Rezeptor-Bindung nicht fehlerfrei funktioniert. Eine Signaleinleitung, die letztlich im synergistischen Effekt der Defensine resultiert, wäre somit nicht möglich. Eine weitere Erklärung könnte der Zeitpunkt der Blutabnahme sein. Das proinflammatorische Zytokin TNF erreicht *in vitro* seine Höchstmenge im Blut nach ca. 2h und wird sehr zügig abgebaut (Oliver et al. 1993). Bei den hier LPS- bzw. kontrollbehandelten Mäusen erfolgte die Blutgewinnung erst 4h nach der LPS-Behandlung analog zu den in dieser Arbeit

Diskussion

durchgeführten *in vitro*-Stimulierungen der THP1-Zellen. Es ist also möglich, dass das durch den Endotoxin-Schock produzierte TNF im Serum bereits teilweise wieder abgebaut war und dadurch keine Unterschiede zwischen den Gruppen detektierbar waren. Hier spricht allerdings dagegen, dass das in dieser Arbeit verwendete Endotoxin-Schock-Modell in anderen Studien auch nach 24h noch deutlich messbare Serumkonzentrationen an TNF, IL1 β und IL6 lieferte (Sakaki et al. 2013).

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit kein proinflammatorischer Effekt *in vivo* nachgewiesen werden konnte, so könnte die Voraktivierung von Makrophagen durch Defensine *in vivo* dennoch relevant sein.

5.1.2 Beteiligung eines G Protein-gekoppelten Rezeptors am proinflammatorischen Effekt durch Defensine

Diverse Studien beschreiben eine Interaktion von β -Defensinen mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). So konnte beispielsweise eine Defensin-induzierte Chemotaxis unterschiedlicher Zellpopulationen über die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR6 gezeigt werden (Rohrl et al. 2010b; Yang et al. 1999). Neben CCR2 und CCR6 ist in der Literatur auch die Bindung von HBD3 an den Chemokinrezeptor CXCR4 beschrieben. Jedoch konnte hier bisher nur eine Internalisierung des Rezeptors nach Defensin-Kontakt nachgewiesen werden (Feng et al. 2006). Versuche, eine Defensin-abhängige Aktivierung oder Chemotaxis von Zellen über CXCR4 zu induzieren, waren nicht erfolgreich (Rohrl et al. 2010b). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Defensine über GPCR die Aktivierung und Degranulation von Mastzellen (Chen et al. 2007) vermitteln. Dabei scheinen Mastzellen mindestens zwei GPCR zu exprimieren, an die HBD2 bindet, wobei einer eine hohe und der andere eine niedrige Affinität für HBD2 aufweist. Da CCR6 keiner dieser Rezeptoren war, scheint HBD2 neben CCR2 der Interaktionspartner von mindestens einem weiteren GPCR zu sein (Niyonsaba 2002). Auch die Zytokinausschüttung von Keratinozyten (Niyonsaba et al. 2007) und T-Zellen (Kanda et al. 2011) kann von Defensinen über GPCR induziert werden. Im Falle der T-Zellen wurde diese erhöhte Zytokinproduktion nach gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit CD3/CD28 und HBD2 ausgelöst, wobei in der Signalkaskade ein GPCR beteiligt war. Auch hier wurden CCR2 und CCR6 als Bindungspartner ausgeschlossen (Kanda et al. 2011). Des Weiteren wurde belegt, dass MBD14 die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Makrophagen verstärkt und die vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers CD86 reguliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt über

Diskussion

einen nicht näher charakterisierten G_iPCR vermittelt wird, bei dem es sich weder um CCR2 noch um CCR6 handelte (Barabas et al. 2013).

Die Vorbehandlung von PBM mit Pertussis Toxin, einem ubiquitären Inhibitor G_iPCR, hatte keinen Einfluss auf die Induktion des proinflammatorischen Effekts durch Defensine (Abb. 10). Dennoch zeigen einige Studien, dass neben Defensinen auch andere antimikrobielle Peptide G Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren für die Signalweiterleitung nutzen. So bindet das humane Cathelicidin LL37 z.B. an den G_iPCR FPRL-1 (*formyl peptide receptor-like 1*) und wirkt über diesen chemotaktisch auf Neutrophile, Monozyten und T-Zellen (Yang et al. 2000). Für die Untersuchung von FPRL-1 als potentiellen Rezeptor für HBD2 und HBD3 wurde der Defensin-Stimulus durch fMLP, einen Liganden des FPRL-1, ersetzt. Das fMLP konnte jedoch keine vermehrte TNF-Produktion in THP1-Zellen hervorrufen (Abb. 11). Der FPRL-1 konnte somit als Interaktionspartner für Defensine ausgeschlossen werden. Auch der Austausch der Defensin-Vorstimulierung durch compound 48/80, das alle G_iPCR-Signalwege unabhängig von einer Rezeptorbindung aktiviert, induzierte keinen synergistischen Effekt in THP1-Zellen (Abb. 11). Die Beteiligung eines G_iPCR an der Defensin-vermittelten Signalkaskade konnte im humanen System somit nicht bestätigt werden.

Allerdings stellen die GPCR die größte Rezeptorklasse mit über 1000 bisher identifizierten Rezeptoren dar (Tuteja 2014). Je nach Sequenzähnlichkeit der α-Untereinheit des an der Signalweiterleitung beteiligten G-Proteins können die GPCR in vier Untergruppen unterteilt werden: G_i, G_q, G_s und G₁₂. So konnte beispielsweise die Interaktion von Defensinen mit dem G_sPCR MC1R (*melanocortin 1 receptor*) nachgewiesen werden, die für die Fellfärbung des Hundes verantwortlich ist (Candille et al. 2007). Eine Beteiligung des MCR1 an Defensin-vermittelten immunologischen Signalwegen konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. Außerdem beschreiben einige Studien die proinflammatorische Aktivierung von Monozyten und Makrophagen über die purinerge Rezeptorfamilie P2Y, die ebenfalls zur Familie der GPCR gehören. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL6 durch Makrophagen in der Leber nach LPS-Stimulus unter Beteiligung von P2Y Rezeptoren induziert wird (Ishimaru et al. 2014). Es ist also durchaus denkbar, dass Defensine im humanen System mit einer der anderen GPCR-Subklassen interagieren.

In THP1-Zellen wurde nachgewiesen, dass ein durch CCL2-CCR2-vermitteltes Chemotaxis-Signal durch die Co-Aktivierung des G_q Protein-gekoppelten Rezeptor P2Y6 verstärkt wird (Campwala et al. 2014). Es lässt sich demnach annehmen, dass Zellen über

Diskussion

einen hoch affinen Rezeptor chemotaktisch angelockt werden und ein weiterer niedrig affiner Rezeptor überdies zu einer Aktivierung der Zellen führt (Yang et al. 2000). Ein ähnlicher Ablauf ist auch im Falle des Defensin-vermittelten synergistischen Effekts vorstellbar: über die Interaktion von Defensinen mit CCR2 werden die Monozyten und Makrophagen chemotaktisch an den Ort der Entzündung gelockt. Dort induzieren die Defensine über einen weiteren noch nicht identifizierten Rezeptor die Aktivierung der Zellen, was in Folge eines weiteren Stimulus durch TLR-Liganden zu einer verstärkten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt. Da in der vorliegenden Arbeit G_iPCR als Interaktionspartner für die untersuchten Defensine im humanen System ausgeschlossen wurden, stellt sich jedoch weiterhin die Frage nach dem Rezeptor der Defensine.

5.1.3 Interaktion von HBD2 mit dem purinergen Rezeptor P2X7 über die Freisetzung von ATP

Neben der Interaktion mit GPCR wird in der Literatur auch eine mögliche Bindung von Defensinen an *Toll-like* Rezeptoren (TLR) beschrieben. So ist beispielsweise die β-Defensin-vermittelte Aktivierung von Monozyten über TLR1/2 (Funderburg et al. 2007) sowie von dendritischen Zellen über TLR4 (Biragyn et al. 2002) nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine Interaktion von HBD2 und HBD3 mit TLR nicht nachgewiesen werden, da die untersuchten Defensine nur nach Restimulation mit TLR-Agonisten die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen induzierten (4.1.1).

Durch die Defensin-Vorstimulierung wurde jedoch auch die IL1β-Produktion in den Zellen synergistisch erhöht (Abb. 5; Abb. 7). Für die Freisetzung des reifen IL1β aus der Zelle werden zwei Stimuli benötigt. Die Transkription der pro-Form des Zytokins wird durch einen TLR-Agonisten induziert. Anschließend bewirkt der zweite Stimulus, z.B. durch die Bindung von ATP an den P2X7R, die Zusammenlagerung des sogenannten Inflammasom-Komplexes, dem unter anderem die Caspase 1 angehört. Die Caspase 1 wird durch die Inflammasom-Aggregation aktiviert und spaltet das pro-IL1β in seine reife Form. Anschließend wird das reife Zytokin aus der Zelle entlassen (Latz et al. 2013). Auch die Stimulation von THP1-Zellen mit LPS als ersten und ATP als zweiten Stimulus führte zu einer deutlichen IL1β-Freisetzung. Ein Austausch einer der beiden Stimuli durch HBD2 oder HBD3 konnte dagegen keine Zytokinausschüttung induzieren (Mauch-Mücke, unveröffentlichte Daten). Eine direkte Beteiligung der Defensine an der Induktion der Inflammasom-Aktivierung ist somit unwahrscheinlich.

Diskussion

Allerdings konnte gezeigt werden, dass verschiedene antimikrobielle Peptide die IL1 β -Freisetzung induzieren. So geben LPS-vorstimulierte Monozyten nach Behandlung mit dem antimikrobiellen Schweineprotegrin 1 und 3, Froschmagainin oder mit dem humanen α -Defensin HNP1 verstört reifes IL1 β ab (Perregaux et al. 2002). Auch LL37 steigert die IL1 β -Prozessierung in LPS-voraktivierten Monozyten. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt über den purinergen Rezeptor P2X7 vermittelt wird (Elssner et al. 2004). Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung gestzt, dass eine LL37- und Flagellin-Stimulierung ebenfalls synergistisch auf die Produktion des Chemokins CXCL8 in Keratinozyten wirkt. Dabei induziert LL37 diesen Effekt unter Beteiligung des purinergen Rezeptors P2X7 und Flagellin bindet an TLR5 (Nijnik et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Vorstimulierung von THP1-Zellen mit HBD2 in Anwesenheit des spezifischen P2X7R-Inhibitors A438079 den synergistischen Effekt des Defensins nach LPS-Restimulierung signifikant reduziert (Abb. 12). Da die Signalweiterleitung des P2X7R von dem Efflux von K $^{+}$ -Ionen aus der Zelle abhgt, wurde dieser durch die Zugabe von KCl in das Zellkulturmedium unterbunden. In KCl-vorbehandelten THP1-Zellen kam es zu einem vollständigen Verlust der HBD2-induzierten TNF-Produktion nach Restimulierung mit LPS (Abb. 12). Dies legt den Schluss nahe, dass der P2X7R an der Signalkaskade, die zu einem HBD2-induzierten synergistischen Effekt frt, beteiligt ist. Auch eine HBD2-Stimulation von BMDM aus P2X7 $^{-/-}$ -Mäusen zeigte eine verringerte TNF-Produktion im Vergleich zu BMDM aus WT-Tieren nach LPS-Restimulation (Abb. 13). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es zwei Spleiß-Varianten des P2X7R-Gens gibt (Nicke et al. 2009). Es ist also – je nach Herstellung der P2X7 $^{-/-}$ -Mauslinie – möglich, dass nicht beide Spleiß-Varianten vollständig deaktiviert wurden und die Expression des P2X7R nur verringert jedoch nicht ausgeschalten ist.

Für die Signalinitiation über den P2X7R gibt es mehrere denkbare Möglichkeiten. Die zunächst naheliegendste wäre eine direkte Bindung von HBD2 an den P2X7R. Untersuchungen dieser Interaktion mittels Durchflusszytometrie mit geeigneten Antikörpern gegen P2X7R und HBD2 konnten eine direkte Bindung jedoch nicht eindeutig bestätigen (Ruiz Faria, nicht verentlichte Daten). Durch den kationischen, amphipathischen Charakter von HBD2 wäre auch die Ausbildung einer Transmembranpore in der Zellwand vorstellbar (Hancock und Rozek 2002). Diese könnte unabhig von P2X7R zu einem Ausstrom von intrazellulärem K $^{+}$ führen. Die sinkenden K $^{+}$ -Konzentrationen in der Zelle würden dann in einer P2X7R-unabhigen

Diskussion

Inflammasom-Aktivierung resultieren. Die HBD2-vermittelte Inflammasom-Zusammenlagerung wäre allerdings nur eine Begründung für die synergistische Produktion von IL1 β , nicht jedoch der anderen proinflammatorischen Zytokine. Am wahrscheinlichsten ist demnach die indirekte Aktivierung des P2X7R über eine HBD2-vermittelte Exozytose von ATP. Diverse Studien zeigen, dass sowohl der P2X7R als auch ATP als ein Ligand eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen vor allem nach LPS-Stimulation spielen (Watters et al. 2001). Untersuchungen an der Mausmakrophagen-Zelllinie RAW 264 zeigen beispielsweise, dass exogenes ATP und andere Adenin-Nukleotide in LPS-stimulierten Zellen die Produktion von TNF und Stickstoffmonoxid synergistisch induzieren (Tonetti et al. 1995). Dieser Effekt wird über P2Z/P2X7 Rezeptoren vermittelt (Hu et al. 1998). Dabei moduliert ATP als Ligand einer Vielzahl an purinergen Rezeptoren z.B. auch die Aktivierung und Zytokinfreisetzung von LPS-aktivierten THP1-Zellen über P2Y11 (Sakaki et al. 2013) oder die C5a-vermittelte Chemotaxis von Makrophagen über P2Y2 (Kronlage et al. 2010). Außerdem konnten Studien zeigen, dass HBD3 die Aktivierung des P2X7R-Signalwegs durch ATP vermittelt und zu einer erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf Monozyten führt (Lioi et al. 2015; Wilhelm et al. 2010). Diese Studien werden auch durch die in dieser Arbeit ermittelten Daten bestätigt. Eine Vorbehandlung von THP1-Zellen mit oxidiertem ATP, das alle ATP-Bindestellen blockiert, zeigte eine Reduktion des durch HBD2-vermittelten synergistischen Effekts (Abb. 14). Die proinflammatorische TNF-Produktion wurde außerdem in Anwesenheit des Enzyms Apyrase, das die Hydrolyse von extrazellulärem ATP zu AMP katalysiert, signifikant gehemmt (Abb. 14; Abb. 15). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass HBD2 den P2X7R indirekt durch die Freisetzung von exogenem ATP induziert. Auch Studien an Bakterienzellen belegen, dass Defensine die Sekretion von intrazellulärem ATP bewirken können (Vylkova et al. 2007).

Die Inkubation von THP1-Zellen mit HBD2 führte zu einer zeitabhängigen Induktion der ATP-Abgabe in den extrazellulären Raum, wobei die höchste ATP-Menge etwa 75min nach der Stimulation erreicht wurde (Abb. 16). Die ATP-Freisetzung folgt dabei einer Glockenkurve. Dieser Effekt kann durch die Desensibilisierung des mitwirkenden Rezeptors erklärt werden und ist charakteristisch für GPCR, die z.B. eine Chemotaxis ebenfalls über einen glockenförmigen Verlauf vermitteln (Ferguson et al. 1996). Dieses Ergebnis ist demnach ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung eines GPCR an dem Defensin-induzierten synergistischen Effekt in Monozyten und Makrophagen.

Diskussion

Eine ATP-Freisetzung wird durch diverse Mechanismen gesteuert. Neben einer ATP-Entlassung über Transportvesikel, gibt es diverse spannungs- oder dehnungsabhängige Kanäle sowie Pannexine und Connexin-Hemikanäle, über die intrazelluläres ATP gezielt abgegeben werden kann (Praetorius und Leipziger 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass Pannexin-1 (Panx-1) Kanäle Bestandteil des P2X7R Signalkomplexes sind (Locovei et al. 2007) und, dass Panx-1 in einer Vielzahl an Zellarten für die ATP-Freisetzung verantwortlich ist (Iglesias et al. 2008; Pelegrin und Surprenant 2006). Allerdings war es nicht möglich, den HBD2-vermittelten proinflammatorischen Effekt in LPS-aktivierten THP1-Zellen unter Verwendung des spezifischen Panx-1-Inhibitors ¹⁰Panx zu blockieren (Daten nicht gezeigt). Eine Beteiligung von Panx-1 am Signalweg des synergistischen Effekts von Defensinen scheint somit unwahrscheinlich. ATP wird jedoch auch in großen Mengen von apoptotischen Zellen ausgestoßen. Ein Einfluss von HBD2 auf die Zellvitalität konnte jedoch ausgeschlossen werden (Abb. 17). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass HBD2 die Exozytose von intrazellulär gespeichertem ATP direkt induziert. Der genaue Mechanismus einer HBD2-vermittelten ATP-Freisetzung bleibt allerdings unklar. Interessanterweise war extrazelluläres ATP allein nicht in der Lage die synergistisch erhöhte Zytokin- und Chemokinproduktion, wie sie nach einer Vorstimulierung mit HBD2 oder HBD3 in Makrophagen beobachtet werden konnte, hervorzurufen (Abb. 18). Es scheint demnach auch bei der Vermittlung des synergistischen Effekts von Defensinen ein zweigeteiltes Signal zu benötigen, wie es beispielsweise für die purinerge Signalkaskade nach Bindung von fMLP an FPR beschrieben ist. Hierbei führt die FPR-Aktivierung durch fMLP einerseits zu einer ATP-Freisetzung, andererseits liefert diese Aktivierung auch eine qualitative Information an die Zelle. Das abgesonderte ATP induziert anschließend die autokrine Aktivierung von P2 Rezeptoren. Dabei erhält die Zelle je nach Menge an freigesetztem ATP auch eine quantitative Information. Diese quantitative Information leitet in der durch die qualitative Information voraktivierten Zelle eine adäquate Immunantwort ein (Junger 2011). Fehlt einer der beiden Stimuli kommt es zu keiner, einer abgeschwächten oder zu einer veränderten Immunreaktion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HBD2 die Exozytose von ATP direkt einleitet und dadurch die ATP-vermittelte Aktivierung des P2X7-Signalwegs induziert. Der ATP-Freisetzung vorgeschaltet scheint ein bisher unbekannter GPCR zu sein. Durch die Aktivierung dieses GPCR wird die erhöhte synergistische Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen eingeleitet.

Diskussion

5.1.4 Modell des proinflammatorischen Effekts von HBD2 und HBD3

Kommt es zu einer Verletzung oder tritt der Organismus in Kontakt mit Krankheitserregern werden unter anderem β -Defensine von Epithelzellen sowie von Keratinozyten, aber auch von Immunzellen produziert (Harder et al. 1997). Dabei wirken diese einerseits direkt antimikrobiell gegen die eindringenden Pathogene, andererseits locken sie unter anderem Monozyten und Makrophagen chemotaktisch über CCR2 an den Ort der Entzündung (Rohrl et al. 2010b). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen außerdem darauf hin, dass Defensine über einen weiteren bisher unbekannten (G Protein-gekoppelten) Rezeptor zu einer Aktivierung von Monozyten und Makrophagen beitragen.

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit lässt sich folgendes Modell ableiten (Abb. 37):

- 1) Durch die Interaktion von HBD2 oder HBD3 mit dem Chemokinrezeptor CCR2 werden Monozyten und Makrophagen chemotaktisch an den Entzündungsort gelockt.
- 2) Die Interaktion mit einem weiteren (G Protein-gekoppelten) Rezeptor führt zu einer Defensin-vermittelten Aktivierung der angelockten Zellen und induziert die Exozytose von intrazellulärem ATP.
- 3) Das freigesetzte ATP führt zu einer autokrinen P2X7R-Signalkaskade.
- 4) Die angelockten und vorstimulierten Monozyten und Makrophagen produzieren nach der Detektion von Krankheitserregern über TLR verstärkt proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF, IL1 β und CXCL8.

Auf diese Art könnten Defensine einen wichtigen Beitrag zu einer effizienten Entzündungsreaktion leisten und das Immunsystem modulieren.

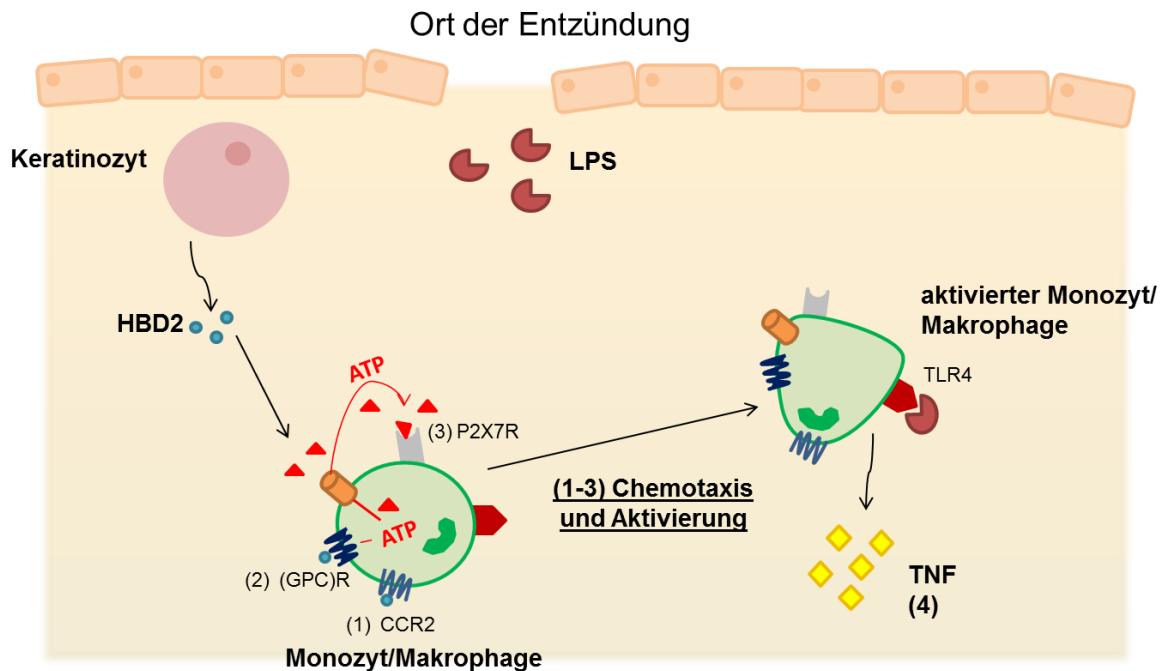


Abb. 37: Modell des proinflammatorischen Effekts von HBD2. Schematische Darstellung

5.2 Charakterisierung der hReg3 α transgenen Mauslinie

5.2.1 Nachweis des hReg3 α -Transgens

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Charakterisierung und funktionelle Analyse einer hReg3 α transgenen Mauslinie.

Das hReg3 α -Transgen wurde unter Kontrolle eines CAG-Promotors exprimiert, der eine starke ubiquitäre Expression in allen Zellen von Säugetieren gewährleistete. Die endogene Signalsequenz sorgte für einen effektiven Export des hReg3 α aus der Zelle (Abb. 20).

Da aus der Gründergeneration mehrere hReg3 α -positive Tiere hervorgingen, wurden zwei Männchen für die weitere Zucht ausgewählt und die Expression des Transgens in deren Nachkommen vergleichend analysiert. Die mRNA-Expression war in den untersuchten Geweben und myeloiden Zellen in beiden Linien etwa in gleichem Maße ausgeprägt (Abb. 21). Auch der Nachweis des Transgens auf Protein-Ebene war erfolgreich (Abb. 22; Abb. 23). Allerdings zeigte die Bestimmung des hReg3 α -Serumgehalts in den untersuchten Gründerlinien, dass die Proteinproduktion in der tg1-Linie gleichmäßiger war. Dies ist auf eine unterschiedliche Transgen-Integration in das Genom zurückzuführen. Die weiteren Arbeiten wurden deshalb nur mit der hReg3 α tg1-Linie durchgeführt.

Diskussion

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die Generierung einer hReg3 α transgenen Mauslinie erfolgreich war und diese zur funktionellen Analyse des hReg3 α in Entzündungsreaktionen geeignet ist.

5.2.2 *In vivo*-Phänotypisierung der hReg3 α transgenen Mauslinie

5.2.2.1 Einfluss des hReg3 α -Transgens auf eine akute Dickdarmentzündung und auf das Darmmikrobiom

Diverse Studien zeigen, dass in Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease, IBD) die hReg3 α -Expression im entzündeten Darmgewebe (Dieckgraefe et al. 2002; Ogawa et al. 2003) und somit auch der hReg3 α -Serumspiegel ansteigen (Marafini et al. 2014). Auch bei Patienten mit einer gastrointestinalen *Graft versus Host Disease* (GvHD) sind die hReg3 α -Plasmamengen nachweislich erhöht. In diesem Falle wird die hReg3 α -Menge im Blut bereits als Biomarker zur Früherkennung einer GvHD klinisch angewandt (Ferrara et al. 2011; Harris et al. 2012; Levine et al. 2015).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die hReg3 α transgene Mauslinie im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis untersucht, um den Einfluss des hReg3 α auf Entzündungen des Darms zu analysieren. Jedoch konnten im Modell der akuten DSS induzierten Kolitis weder im Gewichtsverlauf noch in der Kolonlänge Unterschiede zwischen WT-, hReg3 α transgenen Tieren sowie deren nicht-transgenen littermates nachgewiesen werden. Allerdings bestätigten der deutliche Gewichtsverlust sowie der stark verkürzte Kolon die Manifestierung einer Entzündung durch die DSS-Gabe. Auch der histologische Score sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine im Kolongewebe zeigten keine Abweichungen zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 24; Abb. 25). Im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis scheint die ubiquitäre Produktion des hReg3 α -Transgens demnach keinen Einfluss auf den Verlauf der Entzündung zu haben.

Dies steht im Kontrast zu *ex vivo*-Studien an Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn, deren Behandlung mit rekombinantem hReg3 α zu einer verringerten Produktion an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF, IL6 oder IFN γ , führt. Außerdem blockiert hReg3 α die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs in Immunzellen und verhindert somit eine Immunreaktion. Demnach scheint hReg3 α im Falle einer Entzündung des Darms antiinflammatorisch zu wirken (Gironella et al. 2005). Eine mögliche Erklärung für die fehlende antiinflammatorische Wirkung des hReg3 α -Transgens im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis ist, dass die verwendete Menge an DSS zu hoch und die daraus

Diskussion

resultierende Entzündung zu stark war. Dies könnte einen sichtbaren antiinflammatorischen Effekt maskieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das humane Transgen im Maussystem aufgrund fehlender Kompatibilität keine immunmodulatorische Wirkungen zeigt.

Die antiinflammatorische und regenerative Wirkung von Reg-Proteinen wird durch eine Vielzahl an Studien gestützt. So ist beispielsweise die Heilung von Magengeschwüren in Reg1 transgenen Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen beschleunigt (Fukuhara et al. 2010). Auch während der Wundheilung der Haut unterstützt hReg3 α die Proliferation von Keratinozyten (Lai et al. 2012). Nach einer Zystitis wirkt mReg3 γ regenerierend auf das Blasenepithel (Spencer et al. 2015). Außerdem scheint die IL22-vermittelte Expression von Reg-Proteinen die Kolonschleimhaut vor entzündlichen Beschädigungen zu schützen (Sekikawa et al. 2010). Um zu beurteilen, ob hReg3 α eine Rolle bei der Ausheilung von Darmentzündungen spielt, folgte nach der akuten DSS-induzierten Kolitis eine Regenerationsphase. Überraschenderweise wirkte sich die ubiquitäre Expression des hReg3 α -Transgens jedoch negativ auf die Regeneration nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis aus. Während sich alle Tiere aus der WT-Kontrollgruppe erholten, kam es im Verlauf der Regenerationsphase zu einer erhöhten Sterberate der hReg3 α transgenen Tiere. Allerdings starben in der Erholungsphase auch die nicht-transgenen littermates vermehrt (Abb. 26). Der negative Einfluss des hReg3 α auf die Regenerationsfähigkeit konnte also nicht ausschließlich auf die hReg3 α -vermittelte Modulation des Immunsystems zurückgeführt werden, da auch die nicht-transgenen Tiere betroffen waren. Der beobachtete Effekt musste demnach auch auf die im gleichen Käfig (*co-housing*) lebenden littermates übertragbar sein. Hinweise auf eine mögliche Erklärung der negativen Auswirkungen einer hReg3 α -Überexpression auf die Regenerationsfähigkeit von littermates, liefern Studien zu *co-housing* Experimenten, die belegen, dass sich das Mikrobiom von Tieren unterschiedlicher Genotypen bereits innerhalb eines Monats angleicht. Dabei ist nachgewiesen, dass einerseits Inflamasom-defiziente Mäuse einen verschlimmerten Verlauf im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis aufweisen und andererseits, dass dieser Effekt durch *co-housing* und das Angleichen des Mikrobioms auf WT-Tiere übertragen werden kann (Elinav et al. 2011; Elinav et al. 2013).

Die intestinale Mikrobiota von Säugetieren ist eine der komplexesten mikrobiellen Gemeinschaften. Um die Homöostase des Darms aufrecht zu erhalten, produzieren die Zellen an den epithelialen Grenzflächen des Darms eine Vielzahl an unterschiedlichen antimikrobiellen Peptiden, die den Körper einerseits vor eindringenden Pathogenen

Diskussion

schützen, andererseits aber auch die Überhandnahme von symbiotischen Bakterien verhindern (Mukherjee et al. 2008). Dabei zeigt eine Vielzahl an Studien, dass auch Reg-Proteinen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Darmhomöostase zukommt. Das mReg3 γ wird von den Paneth-Zellen des Dünndarms an die Mukus-Schicht abgegeben. Dies gewährleistet eine Trennung zwischen Darmmikrobiota und Gewebe und verhindert die Aktivierung des Immunsystems durch symbiotische Bakterien (Vaishnava et al. 2011). In mReg3 $\gamma^{-/-}$ -Mäusen fehlt diese räumliche Trennung zwischen Bakterien und Epithel und führt zu deutlich erhöhten Entzündungswerten auch ohne Krankheitszeichen (Loonen et al. 2014). Jedoch beeinflusst die Zusammensetzung des Mikrobioms auch die Expression von Reg III-Proteinen. So führt die durch eine Antibiotika-Gabe reduzierte Darmmikrobiota zu einer verminderten mReg3 γ -Expression. Der gleiche Effekt kann auch in gnotobiotischen Mäusen gezeigt werden (Brandl et al. 2008). Werden dagegen probiotische Bakterien, wie z.B. *Bifidobacterium breve*, verabreicht, kann die Expression von mReg3 γ erhöht und die Krankheitszeichen einer Kolitis abgeschwächt werden (Natividad et al. 2012; Natividad et al. 2013).

Um einen Einblick in die Unterschiede des Darmmikrobioms zwischen naiven hReg3 α -transgenen und nicht-transgenen Mäusen zu erhalten, wurde eine *Next-Generation Sequenzierung* durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass sich das Mikrobiom von hReg3 α -transgenen Tieren und nicht-transgenen littermates, die seit Geburt im gleichen Käfig gehalten wurden, stark ähnelte. Das Mikrobiom von littermates, die ohne Kontakt zu hReg3 α transgenen Tieren gehalten wurden (*single housing*), unterschied sich jedoch deutlich von dem der *co-housing* Gruppen (Abb. 28, Abb. 29). Dabei war besonders auffällig, dass die Diversität des Mikrobioms in der *single housing* Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen erhöht war (Abb. 30). Die gram-positiven *Firmicutes* waren in den *co-housing* Gruppen hingegen deutlich reduziert, wobei die gram-negativen *Verrucomicrobia* diese Nische jedoch zu füllen schienen (Abb. 31). Diese Unterschiede traten auf Gattungsebene noch deutlicher hervor (Abb. 32).

Es ist bekannt, dass Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmmikrobiota einen bedeutenden Teil zur Entstehung von IBD beitragen (Rutgeerts et al. 1991). Dabei machen Studien zu Morbus Crohn auch die Rolle der Paneth-Zellen und der von ihnen produzierten antimikrobiellen Peptide bei der Modulation des Krankheitsverlaufs deutlich (VanDussen et al. 2014). Mäuse, die das humane Paneth-Zell- α -Defensin HD5 überexprimieren besitzen eine reduzierte Menge an *segmented filamentous bacteria* (SFB) in ihrem Darmmikrobiom, was zu einer verringerten TH₁₇-Antwort im Darm und somit zu einer

Diskussion

Chronifizierung einer Entzündung führt (Salzman et al. 2010). Auch *Prevotellaceae*-Arten verschlimmern die Entzündungen des Gastrointestinaltrakts in Mäusen mit einer DSS-induzierten Kolitis (Elinav et al. 2011). Allerdings stellt es sich als schwierig heraus, mögliche entzündungsfördernde Bakterienarten im Mikrobiom zuverlässig zu identifizieren (Knights et al. 2013; Round und Mazmanian 2009). Jedoch stimmen die meisten Beobachtungen darüber ein, dass eine reduzierte Mikrobiom-Diversität sowie ein Verlust von *Firmicutes* und ein Anstieg an *Proteobacteria* zu einem erhöhten Risiko für IBD führt (Matsuoka und Kanai 2015). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass das Mikrobiom der hReg3 α transgenen Tiere sowie der *co-housing* littermates eine verringerte Diversität sowie deutlich reduzierte Mengen an *Firmicutes* aufwiesen. Diese Mikrobiomverschiebungen erklären die schlechte Regenerationsprognose dieser Tiere nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis.

Zusätzlich zeigten die *co-housing* Gruppen erhöhte Mengen der Gattung *Akkermansia* in ihrem Genom auf (Abb. 32). Es ist nachgewiesen, dass *Akkermansia* sowohl im Stuhl von Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis erhöht ist (Schwab et al. 2014), als auch im Stuhl von Patienten mit Kolonkarzinomen und Gallenblasenentzündungen (Liu et al. 2015a; Weir et al. 2013). Die Infektion von gnotobiotischen Mäusen mit *Salmonella enterica Typhimurium* zusammen mit *Akkermansia muciniphila* führt zu einem schwereren Krankheitsverlauf als eine Infizierung mit *S. enterica Typhimurium* allein (Ganesh et al. 2013). Außerdem ist beschrieben, dass die Vermehrung von *Akkermansia* zu einer Verschlechterung im Kolitismodell beiträgt (Zhang et al. 2016). In gesunden Individuen gehört *Akkermansia* zu den symbiotischen Bakterien im Darm, die durch eine Anlagerung an die Mukus-Schicht eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Barrierefunktion spielen (Derrien et al. 2011). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eigentlich nützliche Bakterien in einem veränderten Mikrobiom fatale Konsequenzen für den Krankheitsverlauf entwickeln können. In den *single-housing* littermates wurden dagegen im Vergleich zu den *co-housing* Gruppen erhöhte Mengen der Gattungen *Lactobacillus* und *Blautia* nachgewiesen (Abb. 32). Hierbei zeigen Studien, dass eine Administration von *Lactobacillus casei* Shirota eine DSS-induzierte Kolitis zwar nicht verhindern, jedoch den Krankheitsverlauf abmildern kann (Herias et al. 2005). In Patienten mit einer intestinalen GvHD scheint sich das Vorhandensein von *Blautia* im Darmmikrobiom positiv auf die Krankheitssymptome auszuwirken (Jenq et al. 2015).

Zusammenfassend legen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit den Schluss nahe, dass die permanente Überexpression des hReg3 α die Mikrobiomkomposition stark beeinflusst.

Diskussion

Durch die antimikrobielle Aktivität des hReg3 α gegen gram-positive Bakterien, kommt es in den hReg3 α transgenen Tieren zu einer Verringerung des gram-positiven *Firmicutes*-Stamms. Die dadurch entstehende Nische führt zu einer Vermehrung von gram-negativen Bakterien. Diese Verschiebung der Mikrobiomdiversität führt zu einer Vermehrung von Bakteriengattungen, die sich negativ auf die Regeneration nach einer DSS-induzierten Kolitis auswirken. Durch ein *co-housing* wird dieses veränderte Mikrobiom an die nicht-transgenen littermates im gleichen Käfig weitergegeben und verschlechtert auch deren Erholungsfähigkeit unabhängig von einer hReg3 α -Expression. Jedoch war es im Verlauf der Arbeit nicht möglich, die hier vorliegenden Ergebnisse mit dem Mikrobiom von C57BL6/N-Tieren und von hReg3 α transgenen Tieren, die ohne Kontakt zu littermates gehalten wurden, zu vergleichen. Zu erwarten wäre hierbei eine noch deutlichere Mikrobiomverschiebung in den *single-housing* hReg3 α transgenen Tieren, da hier kein Austausch mit der normalen Mikrobiota der littermates erfolgen kann. Interessant wäre insbesondere auch ein Vergleich der WT-Mikrobiota mit der von *single-housing* littermates. Das Darmmikrobiom wird von Geburt an geprägt. Da die littermates bis zu einer Trennung der Tiere von den Eltern in einem Käfig mit hReg3 α transgenen Mäusen gehalten werden, könnten durchaus Abweichungen des Mikrobioms im Vergleich zu WT-Tieren vorliegen. Für eine genauere Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse sollten diese Mikrobiomdaten mit einbezogen werden.

5.2.2.2 Die Rolle des hReg3 α im Tumorwachstum

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die ubiquitäre Expression von hReg3 α in transgenen Mäusen eine Verschiebung des Darmmikrobioms zur Folge hat und dies zu einer schlechteren Prognose bei der Regeneration nach einer DSS-induzierten Kolitis führt. Diverse Studien belegen, dass eine Überexpression von Reg-Proteinen auch die maligne Zelltransformation und somit die Tumorentstehung fördern (Zhang 2003; Zheng et al. 2011). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der Einfluss der ubiquitären Expression des hReg3 α -Transgens auf das Tumorwachstum in einem syngenen Kolonkarzinom-Tumormodell überprüft.

Hierfür wurde die murine MC38-Kolonkarzinom-Zelllinie verwendet und mit dem Expressionsvektor für hReg3 α :Ig bzw. als Kontrolle mit dem SIg+ Leervektor transfiziert. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Tumorentstehung aus MC38 WT-Zellen in hReg3 α transgenen Mäusen oder deren littermates untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Tumoren, die aus hReg3 α :Ig transfizierten Zellen gebildet wurden, ein

Diskussion

deutlich erhöhtes Tumorwachstum im Vergleich zu Tumoren aus den Kontrollzellen zeigten (Abb. 33). Anhand daraufhin durchgeföhrter MTT-Assays konnte eine Veränderung der Zellproliferation oder der Zellvitalität aufgrund der Transfektion mit den verwendeten Expressionsvektoren ausgeschlossen werden (Abb. 34). Die Ergebnisse wurden zudem dadurch gestützt, dass auch MC38 WT-Tumore auf hReg3 α transgenen Tieren ein verstärktes Tumorwachstum im Vergleich zu MC38 WT-Tumoren auf littermates aufwiesen (Abb. 35). Die verstärkte Expression von hReg3 α scheint das Tumorwachstum demnach tatsächlich zu begünstigen. Diese Resultate spiegeln auch die Erkenntnisse in der Literatur wider. Es ist nachgewiesen, dass die Expression einer Vielzahl an Reg-Proteinen in Krebserkrankungen hochreguliert ist. So ist beispielsweise gezeigt, dass die Reg1 α -Expression in Magen-, Kolon- und Rektumkarzinomen deutlich ansteigt (Fukui et al. 2004; Watanabe et al. 1990; Yonemura et al. 2003). Neben hReg1 α ist auch die gesteigerte Proteinproduktion von hReg3 α in kolorektalen Tumorgeweben nachgewiesen (Rechreche et al. 1999). Außerdem führt eine Coexpression von hReg1 α und hReg3 α in Kolonkarzinomen zu einer verschlechterten Prognose für den Patienten (Macadam et al. 2000). Dabei scheinen Reg-Proteine eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und in der Zellproliferation zu spielen (Bernard-Perrone et al. 1999). Dies deckt sich mit Studien, die belegen, dass Reg-Proteine eine antiinflammatorische und regenerative Funktion besitzen. hReg3 α unterstützt beispielsweise die Proliferation von Keratinozyten während der Wundheilung (Lai et al. 2012). Auch die mitogene und antiapoptotische Wirkung von hReg3 α ist nachgewiesen (Simon et al. 2003), durch die hReg3 α z.B. eine Exzitotoxizität der Nervenzellen im Gehirn abmildern kann (Haldipur et al. 2014). Es ist also denkbar, dass nach einer Entzündung die regenerative und antiapoptotische Wirkung von hReg3 α zur Heilung beiträgt, diese jedoch im Falle einer Überexpression von hReg3 α eine maligne Zelltransformation und somit die Tumorentstehung begünstigt.

Es ist erwiesen, dass ab einer gewissen Größe der Tumoren die Versorgung des Gewebes durch Diffusion alleine nicht mehr ausreicht und die Vaskularisierung des Gewebes einsetzt (Hanahan und Folkman 1996). Da die verstärkte Zunahme des Tumorwachstums in den in dieser Arbeit durchgeföhrten Versuchen erst ab ca. Tag 7 eintrat, konnte angenommen werden, dass zu diesem Zeitpunkt auch die Angiogenese begann. Es lag demnach der Schluss nahe, dass die Expression des hReg3 α direkt oder indirekt die Angiogenese beeinflusst. In diesem Zusammenhang ist bereits gezeigt, dass hReg1 α -positive Magentumore im Vergleich zu hReg1 α -negativen Tumoren eine signifikant

Diskussion

erhöhte Menge an Mikrogefäßen durchzieht und, dass demnach hReg1 α eine wichtige Rolle bei der Angiogenese zukommt (Hara et al. 2015). Als Maß für die Angiogenese wurde in der vorliegenden Arbeit das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäisionsmolekül (PECAM-1 oder CD31) genutzt sowie der Vaskularisationsfaktor MIP-2, der eine wichtige Rolle in der Tumorangiogenese spielt (Kollmar et al. 2006). Allerdings konnten in hReg3 α -positiven MC38-Tumoren im Vergleich zu den Kontrolltumoren weder erhöhte Mengen an MIP-2 (Abb. 36) noch Unterschiede in der CD31 $^+$ -Gefäßstruktur nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass Tag 14 nach der Inokulation möglicherweise nicht der richtige Zeitpunkt für eine Untersuchung der Vaskularisation war, da die Vaskularisation zu dem Zeitpunkt bereits abgeschlossen ist. Eine Wiederholung der Untersuchungen ca. an Tag 7, an dem sich die Wachstumskurven der untersuchten Gruppen zu trennen beginnen, scheint demnach sinnvoll.

Die Expression von Reg-Proteinen wird in Tumoren unter anderem durch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL6, IFN γ oder TNF, verstärkt (Rechreche et al. 1999). So ist beispielsweise gezeigt, dass die hReg1 α -Expression in Magenkarzinomen in Zusammenhang mit entzündetem Nachbargewebe steht und eine Infiltration von Immunzellen verstärkt (Sekikawa et al. 2005a; Sekikawa et al. 2005b). Dabei wird die Produktion von hReg1 α wahrscheinlich durch IL6 und IFN γ unter Beteiligung des STAT3-Signalwegs gefördert (Sekikawa et al. 2008). Auch in Mäusen ist gezeigt, dass mReg1, mReg3 β und mReg3 γ verstärkt durch IL11, IL6 und IFN γ induziert werden. Dabei weisen Mäuse mit Mutationen des STAT3-Signalwegs geringere Reg-Expressionsmengen auf (Judd et al. 2006). Studien in Pankreaszellen belegen, dass die Expression von hReg3 α ebenfalls durch IL6 über den JAK2/STAT3-Signalweg induziert wird. Interessanterweise ist die Expression von JAK2 sowie STAT3 durch exogenes hReg3 α reguliert und die hReg3 α -Expression scheint somit in einer positiven Rückkopplungsschleife gesteuert zu sein (Liu et al. 2015b). Dabei ist auch der *suppressor of cytokine signaling* SOCS3 beteiligt. hReg3 α induziert in Pankreaskarzinomen offenbar die Methylierung von SOCS3, was zu einer Aktivierung von Wachstumsfaktoren führt und die protumoralen Eigenschaften von hReg3 α unterstützt (Wang et al. 2014).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass hReg3 α an den EGFR bindet (Liu et al. 2015b). Allerdings war es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich eine Beteiligung des EGFR oder seines Liganden EGF am hReg3 α -vermittelten Tumorwachstum eindeutig nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Neben der Beteiligung des EGFR und von JAK/STAT-Signalwegen an einer von Reg-Proteinen induzierten Tumorentstehung, ist

Diskussion

eine Vielzahl an weiteren Signalwegen beschrieben. So kann beispielsweise auch ein Zusammenhang zwischen der hReg3 α -Expression und dem Wnt-Signalweg sowie von AKT- oder ERK-Signalwegen hergestellt werden (Cavard et al. 2006; Ye et al. 2015).

Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass eine hReg3 α -Überexpression die Tumorentstehung unterstützt. Es war jedoch in den bisherigen Untersuchungen nicht möglich, ein beteiligtes Effektorprotein oder gar einen Signalweg, über den hReg3 α das erhöhte Tumorwachstum induziert, zu ermitteln. Zur Klärung der Funktion von hReg3 α in dem hier verwendeten Tumormodell bedarf es also weiterer Untersuchungen.

Diverse Studien konnten die Beteiligung unterschiedlichster Signalwege an der Tumorentstehung durch hReg3 α nachweisen, die genauen Mechanismen, über die hReg3 α wirkt, bleiben jedoch weiterhin unklar.

6 Zusammenfassung

Antimikrobielle Peptide sind wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Neben ihrer antimikrobiellen Wirkung spielen sie eine wichtige Rolle bei der Modulation einer Immunantwort infolge einer Entzündungsreaktion. Diverse Studien zeigen dabei sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zunächst die Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften der β -Defensine HBD2 und HBD3 auf Monozyten und Makrophagen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Vorstimulation der monozytischen THP1-Zelllinie bzw. von peripheren Blutmakrophagen mit HBD2 zu einer signifikanten und synergistischen Induktion der LPS-induzierten TNF-Produktion führt. Diese proinflammatorische Wirkung wurde auch für die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie IL1 β oder CXCL8, nachgewiesen. Außerdem wurde der synergistische Effekt neben HBD2 ebenfalls von HBD3 hervorgerufen. Des Weiteren konnte die Defensin-induzierte, erhöhte Zytokinexpression neben LPS, dem Liganden von TLR4, auch mit polyI:C, Zymosan bzw. Peptidoglykan, den Liganden von TLR3, TLR2/6 bzw. TLR1/2, beobachtet werden. Allerdings induzierte eine HBD2-Vorstimulation von Mäusen *in vivo*, gefolgt von einer LPS-Restimulation, keine erhöhten TNF-Serumkonzentrationen. Zur Bestimmung einer *in vivo*-Relevanz der Ergebnisse sind somit weitere Untersuchungen notwendig.

Durch die Verwendung eines spezifischen Inhibitors gegen den purinergen Rezeptor P2X7 konnte gezeigt werden, dass der synergistische Effekt von HBD2 auf die Zytokinproduktion von Monozyten und Makrophagen über den P2X7R vermittelt wird. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass HBD2 nicht direkt an den P2X7R bindet, sondern die Aktivierung des P2X7R indirekt durch die Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum induziert. Da ein Ersetzen des Defensin-Stimulus durch verschiedene Konzentrationen an ATP nicht ausreichte um den synergistischen Effekt zu induzieren, liegt die Vermutung nahe, dass der Exozytose von ATP die Bindung des HBD2 an einen noch unbekannten Rezeptor vorausgeht. Unter Berücksichtigung der bekannten Literatur und des glockenförmigen ATP-Freisetzungsprofils könnte es sich dabei um einen G Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) handeln. Allerdings konnte die Beteiligung eines G_iPCR ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass HBD2 indirekt mit dem P2X7R über die Freisetzung von ATP interagiert und dieser Signalweg zu einer

Zusammenfassung

synergistischen und proinflammatorischen Zytokinproduktion in Monozyten und Makrophagen nach TLR-Stimulation führt.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Generierung und Charakterisierung einer hReg3 α transgenen Mauslinie, mit deren Hilfe die immunmodulatorischen Eigenschaften des humanen *regenerating gene*-Proteins Reg3 α *in vivo* analysiert werden sollten. Das ubiquitär exprimierte Transgen konnte sowohl auf gDNA- wie auch auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Geweben und myeloiden Zellen nachgewiesen werden. Auch eine Detektion des hReg3 α -Proteins im Serum transgener Mäuse sowie in histologischen Darmschnitten war möglich. Die Generierung dieser hReg3 α transgenen Mauslinie konnte somit als erfolgreich betrachtet werden.

Die *in vivo*-Charakterisierung des hReg3 α -Transgens erfolgte zunächst im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis. Allerdings konnte hier kein Einfluss der hReg3 α -Überexpression auf den Krankheitsverlauf festgestellt werden. Eine Erweiterung des Modells um eine sich anschließende Regenerationsphase zeigte jedoch, dass die Überlebensrate und somit die Erholungsfähigkeit hReg3 α transgener Tiere im Vergleich zu WT-Tieren deutlich reduziert war. Dieser Effekt konnte erstaunlicher Weise auch für nicht-transgene Wurfgeschwister (littermates), die im gleichen Käfig mit transgenen Tieren gehalten wurden, nachgewiesen werden. Eine Untersuchung des Darmmikrobioms von naiven Tieren lieferte eine mögliche Erklärung für diese Auswirkungen des hReg3 α -Transgens auf die Regenungsfähigkeit nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis. Dabei beeinflusste die Überexpression des hReg3 α die Mikrobiomkomposition in den transgenen Tieren stark. Durch die antimikrobielle Aktivität des hReg3 α gegen gram-positive Bakterien, kam es in den hReg3 α transgenen Tieren zu einer Verringerung des gram-positiven *Firmicutes*-Stamms und zu einer Vermehrung von gram-negativen Bakterien. Diese Verschiebung der Mikrobiomdiversität führte zu einer Vermehrung von Bakteriengattungen, die sich negativ auf die Regeneration nach einer DSS-induzierten Kolitis auswirkten. Durch die Haltung der littermates mit transgenen Tieren im gleichen Käfig, wurde dieses veränderte Mikrobiom auch an die nicht transgenen Tiere weitergegeben und deren Erholungsfähigkeit unabhängig von einer hReg3 α -Expression verschlechtert.

Des Weiteren wurde der Einfluss des hReg3 α auf das Tumorwachstum untersucht. Hierfür wurde ein syngenes MC38-Kolonkarzinommodell gewählt. In diesem Falle führte die hReg3 α -Überexpression zu einem erhöhten Tumorwachstum. Allerdings war es nicht möglich einen Einfluss des hReg3 α auf die Angiogenese der Tumoren nachzuweisen.

Zusammenfassung

Auch eine Identifikation eines am erhöhten Tumorwachstum beteiligten Signalwegs war nicht erfolgreich.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Generierung einer hReg3 α transgenen Mauslinie erfolgreich war. Dabei führte eine Überexpression des hReg3 α zu einer Veränderung des Darmmikrobioms, die sich negativ auf die Erholungsfähigkeit nach einer akuten DSS-induzierten Kolitis auswirkte. Auch im untersuchten Tumormodell induzierte die Expression von hReg3 α ein erhöhtes Tumorwachstum. Die Mauslinie scheint somit zur Untersuchung des hReg3 α in Entzündungsmodellen geeignet zu sein.

7 Anhang

Detaillierte Legende zu Abb. 28

■	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Bifidobacteriales;D_4_Bifidobacteriaceae;D_5_Bifidobacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Microccales;D_4_Microbacteriaceae;D_5_Pseudoclavibacter
■	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteria;D_3_Coriobacteriales;D_4_Coriobacteriaceae;D_5_Adlercreutzia
■	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteria;D_3_Coriobacteriales;D_4_Coriobacteriaceae;D_5_Enterorhabdus
■	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteria;D_3_Coriobacteriales;D_4_Coriobacteriaceae;D_5_Parvibacter
■	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteria;D_3_Coriobacteriales;D_4_Coriobacteriaceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroides;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Bacteroidaceae;D_5_Bacteroides
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Porphyrimonadaceae;D_5_Odoribacter
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Porphyrimonadaceae;D_5_Parabacteroides
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Porphyrimonadaceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Prevotellaceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Rikenellaceae;D_5_Alistipes
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Rikenellaceae;D_5_RC gut group
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_S24-7;D_5_mouse gut metagenome
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_S24-7;D_5_uncultured Bacteroidales bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_S24-7;D_5_uncultured bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_S24-7;D_5_uncultured organism
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_S24-7;D_5_unidentified
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Cytophagia;D_3_Order II;D_4_Rhodothermaceae;D_5_Salinibacter
■	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_VC2.1 Bac22;D_3_uncultured bacterium;D_4_uncultured bacterium;D_5_uncultured bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Candidate division TM7;D_2_Uncertain Class;D_3_Uncertain Order;D_4_Uncertain Family;D_5_Candidatus Saccharimonas
■	D_0_Bacteria;D_1_Candidate division TM7;D_2_uncultured bacterium;D_3_uncultured bacterium;D_4_uncultured bacterium;D_5_uncultured bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Cyanobacteria;D_2_Melainabacteria;D_3_Gastranaerophiles;D_4_uncultured bacterium;D_5_uncultured bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Cyanobacteria;D_2_Melainabacteria;D_3_Gastranaerophiles;D_4_uncultured organism;D_5_uncultured organism
■	D_0_Bacteria;D_1_Deferrribacteres;D_2_Deferrribacteres;D_3_Deferribacterales;D_4_Deferribacteraceae;D_5_Mucispirillum
■	D_0_Bacteria;D_1_Elusimicrobia;D_2_Elusimicrobia;D_3_Elusimicrobiae;D_4_Elusimicrobiaceae;D_5_Elusimicrobium
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Bacillales;D_4_Alicyclobacillaceae;D_5_Alicyclobacillus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Bacillales;D_4_Staphylococcaceae;D_5_Staphylococcus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Staphylococcaceae;D_5_Staphylococcus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Enterococcaceae;D_5_Enterococcus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Lactobacillaceae;D_5_Lactobacillus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Streptococcaceae;D_5_Lactococcus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Streptococcaceae;D_5_Streptococcus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Christensenellaceae;D_5_Christensenella
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Christensenellaceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiaceae 1;D_5_Candidatus Arthromitus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Defluvitaleaceae;D_5_Incertae Sedis
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Defluvitaleaceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Eubacteriaceae;D_5_Anaerofustis
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_Anærovorax
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_Incertae Sedis
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_Mogibacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Aacetatifactor
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Anærostipes
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Blautia
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Butyribrio
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Coprococcus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Dorea
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Incertae Sedis
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Marvinbryantia
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Moryella
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Pseudobutyribrio
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Roseburia
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_uncultured bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptococcaceae;D_5_Peptococcus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptococcaceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Anaerotruncus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Flavorifractor
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Hydrogenoanaerobacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Incertae Sedis
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Intestinimonas
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Oscillibacter
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Oscillospira
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Papillibacter
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcus
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Subdoligranulum
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_vadinBB60;D_5_uncultured bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_vadinBB60;D_5_unidentified

Anhang

■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_Allobaculum
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_Incertae Sedis
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_uncultured bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhizobiales;D_4_Bartonellaceae;D_5_Bartonella
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhizobiales;D_4_Brucellaceae;D_5_Ochrobactrum
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhizobiales;D_4_Phyllobacteriaceae;D_5_Mesorhizobium
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhizobiales;D_4_Rhizobiaceae;D_5_Ensifer
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhizobiales;D_4_Rhizobiaceae;D_5_Rhizobium
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhodobacterales;D_4_Rhodobacteraceae;D_5_uncultured
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhodospirillales;D_4_Rhodospirillaceae;D_5_Thalassospira
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhodospirillales;D_4_Rhodospirillales Incertae Sedis;D_5_Reyranella
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Betaproteobacteria;D_3_Burkholderiales;D_4_Alcaligenaceae;D_5_Parasutterella
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Betaproteobacteria;D_3_Burkholderiales;D_4_Oxalobacteraceae;D_5_Herbspirillum
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Deltaproteobacteria;D_3_Desulfovibionales;D_4_Desulfovibrionaceae;D_5_Bilophila
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Deltaproteobacteria;D_3_Desulfovibionales;D_4_Desulfovibrionaceae;D_5_Desulfovibrio
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Enterobacteriales;D_4_Enterobacteriaceae;D_5_Escherichia-Shigella
■	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Pseudomonadales;D_4_Pseudomonadaceae;D_5_Pseudomonas
■	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Anaeroplasmatales;D_4_Anaeroplasmataceae;D_5_Anaeroplasma
■	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_RF9;D_4_uncultured bacterium;D_5_uncultured bacterium
■	D_0_Bacteria;D_1_Verrucomicrobia;D_2_Verrucomicrobiae;D_3_Verrucomicrobiales;D_4_Verrucomicrobiaceae;D_5_Akkermansia

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: ATP-abhängige purinerge P2-Rezeptoren.....	20
Abb. 2: Struktur des humanen β -Defensins 2 (HBD2).....	23
Abb. 3: Die Paneth-Zellen des Dünndarms.....	27
Abb. 4: Produktion von TNF nach HBD2-Vorstimulierung in THP1-Zellen.....	72
Abb. 5: Synergistischer Effekt von HBD2 auf die Produktion von CXCL8 und IL1 β in THP1-Zellen.....	72
Abb. 6: Proinflammatorischer Effekt einer HBD2-Vorbehandlung mit weiteren TLR-Liganden in THP1-Zellen.....	73
Abb. 7: Proinflammatorischer Effekt der Vorstimulierung mit HBD3.....	74
Abb. 8: Proinflammatorischer Effekt einer HBD3-Vorbehandlung mit weiteren TLR-Liganden in THP1-Zellen.....	75
Abb. 9: Synergistischer Effekt von HBD2 auf die Produktion von TNF, CXCL8 und IL1 β in PBM.....	76
Abb. 10: Keine Beteiligung von G _i PCR-Signalwegen bei HBD2-induziertem synergistischem Effekt.....	77
Abb. 11: fMLP und compound48/80 vermitteln keine erhöhte TNF-Produktion in THP1-Zellen.....	78
Abb. 12: Beteiligung von P2X7R an proinflammatorischen Effekt von HBD2.....	80
Abb. 13: Kein Unterschied in der TNF-Produktion von WT-BMDM zu P2X7 ^{-/-} -BMDM nach HBD2-Vorstimulierung.....	80
Abb. 14: Synergistischer Effekt von HBD2 ist ATP-vermittelt.....	81
Abb. 15: HBD2-Stimulierung aktiviert P2X7R über ATP-Freisetzung.....	82
Abb. 16: HBD2-Stimulation induziert die ATP-Freisetzung in den Extrazellulärtraum....	83
Abb. 17: HBD2-Stimulation induziert keinen Zelltod.....	84
Abb. 18: ATP allein vermittelt keine erhöhte TNF-Produktion in THP1-Zellen.....	84
Abb. 19: <i>In vivo</i> -Vorstimulierung mit HBD2 führt nicht zu erhöhter TNF-Produktion....	85
Abb. 20: Schematische Darstellung des hReg3 α -Transgens.....	86
Abb. 21: Nachweis des hReg3 α Transgens auf DNA- und mRNA-Ebene.....	87
Abb. 22: Nachweis des hReg3 α -Serumgehalts.....	88
Abb. 23: Immunhistochemische Untersuchung von hReg3 α im Dünndarm.....	88
Abb. 24: Keine Unterschiede der hReg3 α transgenen Mauslinie zu Kontrolltieren im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 25: Zytokinexpression in Kolongewebe nach akuter DSS-induzierter Kolitis.....	90
Abb. 26: Regeneration nach akuter DSS-induzierter Kolitis.	91
Abb. 27: <i>Rarefaction</i> -Kurven der nachgewiesenen Bakterienspezies.	93
Abb. 28: Taxa-Summary-Plot.....	94
Abb. 29: <i>Principal coordinate analysis</i> (PCoA).	95
Abb. 30: Simpson-Diversitätsindex.....	95
Abb. 31: <i>Next Generation Sequenzing</i> auf Phylum-Ebene.....	96
Abb. 32: <i>Next Generation Sequenzing</i> auf Gattungs-Ebene.....	97
Abb. 33: Wachstum der MC38-Tumoren in C57BL/6N Mäusen.	99
Abb. 34: MTT-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität.	100
Abb. 35: Wachstum von MC38-Tumoren in hReg3 α transgenen Mäusen.	100
Abb. 36: Expression von MIP2 im Tumorgewebe.	101
Abb. 37: Modell des proinflammatorischen Effekts von HBD2.	111

8 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S.** (2012): Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Abe, M.; Nata, K.; Akiyama, T.; Shervani, N. J.; Kobayashi, S.; Tomioka-Kumagai, T. et al.** (2000): Identification of a novel Reg family gene, Reg III δ , and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. In: *Gene* 246 (1-2), S. 111–122.
- Barabas, N.; Rohrl, J.; Holler, E.; Hehlgans, T.** (2013): Beta-defensins activate macrophages and synergize in pro-inflammatory cytokine expression induced by TLR ligands. In: *Immunobiology* 218 (7), S. 1005–1011.
- Becker, M. N.; Diamond, G.; Verghese, M. W.; Randell, S. H.** (2000): CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (38), S. 29731–29736.
- Bernard-Perrone, F. R.; Renaud, W. P.; Guy-Crotte, O. M.; Bernard, P.; Figarella, C. G.; Okamoto, H. et al.** (1999): Expression of REG protein during cell growth and differentiation of two human colon carcinoma cell lines. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 47 (7), S. 863–870.
- Beutler, B.** (2004): Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. In: *Nature* 430 (6996), S. 257–263.
- Bevins, C. L.; Salzman, N. H.** (2011): Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. In: *Nature reviews. Microbiology* 9 (5), S. 356–368.
- Bierbaum, G.; Sahl, H. G.** (1985): Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. In: *Archives of microbiology* 141 (3), S. 249–254.
- Biragyn, A.; Ruffini, P. A.; Leifer, C. A.; Klyushnenkova, E.; Shakhov, A.; Chertov, O. et al.** (2002): Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5595), S. 1025–1029.
- Bishnupuri, K. S.; Luo, Q.; Sainathan, S. K.; Kikuchi, K.; Sureban, S. M.; Sabarinathan, M. et al.** (2010): Reg IV regulates normal intestinal and colorectal cancer

cell susceptibility to radiation-induced apoptosis. In: *Gastroenterology* 138 (2), 616-26, 626.e1-2.

Boniotto, M.; Jordan, W. J.; Eskdale, J.; Tossi, A.; Antcheva, N.; Crovella, S. et al. (2006): Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50 (4), S. 1433–1441.

Braff, M. H.; Hawkins, M. A.; Nardo, A. D.; Lopez-Garcia, B.; Howell, M. D.; Wong, C. et al. (2005): Structure-Function Relationships among Human Cathelicidin Peptides. In: *The Journal of Immunology* 174 (7), S. 4271–4278.

Brandl, K.; Plitas, G.; Mihu, C. N.; Ubeda, C.; Jia, T.; Fleisher, M. et al. (2008): Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. In: *Nature* 455 (7214), S. 804–807.

Brandl, K.; Plitas, G.; Schnabl, B.; DeMatteo, R. P.; Pamer, E. G. (2007): MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (8), S. 1891–1900.

Bruhs, A.; Schwarz, T.; Schwarz, A. (2016): Prevention and Mitigation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Murine β -Defensins via Induction of Regulatory T Cells. In: *The Journal of investigative dermatology* 136 (1), S. 173–181.

Burger-van Paassen, N.; Loonen, L. M. P.; Witte-Bouma, J.; Korteland-van Male, A. M.; de Bruijn, Adrianus C J M; van der Sluis, M. et al. (2012): Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3beta, Reg3gamma and angiogenin-4. In: *PloS one* 7 (6), e38798.

Burns, D. L. (1988): Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin. In: *Microbiological sciences* 5 (9), S. 285–287.

Burnstock, G. (2008): Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. In: *Nature reviews. Drug discovery* 7 (7), S. 575–590.

Campwala, H.; Sexton, D. W.; Crossman, D. C.; Fountain, S. J. (2014): P2Y₆ receptor inhibition perturbs CCL2-evoked signalling in human monocytic and peripheral blood mononuclear cells. In: *Journal of cell science* 127 (Pt 22), S. 4964–4973.

- Candille, S. I.; Kaelin, C. B.; Cattanach, B. M.; Yu, B.; Thompson, D. A.; Nix, M. A. et al.** (2007): A -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5855), S. 1418–1423.
- Cankurtaran-Sayar, S.; Sayar, K.; Ugur, M.** (2009): P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. In: *Molecular pharmacology* 76 (6), S. 1323–1332.
- Cash, H. L.; Whitham, C. V.; Behrendt, C. L.; Hooper, L. V.** (2006): Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5790), S. 1126–1130.
- Cavard, C.; Terris, B.; Grimber, G.; Christa, L.; Audard, V.; Radenen-Bussiere, B. et al.** (2006): Overexpression of regenerating islet-derived 1 alpha and 3 alpha genes in human primary liver tumors with beta-catenin mutations. In: *Oncogene* 25 (4), S. 599–608.
- Chen, X.; Niyonsaba, F.; Ushio, H.; Hara, M.; Yokoi, H.; Matsumoto, K. et al.** (2007): Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. In: *European journal of immunology* 37 (2), S. 434–444.
- Derrien, M.; van Baarlen, P.; Hooiveld, G.; Norin, E.; Muller, M.; Vos, W. M. de** (2011): Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader *Akkermansia muciniphila*. In: *Frontiers in microbiology* 2, S. 166.
- Desjeux, A.; Barthe, M.; Barthelemy, S.; Dagorn, J.-C.; Hastier, P.; Heresbach, D. et al.** (2002): Serum measurements of pancreatitis associated protein in active Crohn's disease with ileal location. In: *Gastroenterologie clinique et biologique* 26 (1), S. 23–28.
- Di Virgilio, F.** (2003): Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. In: *British journal of pharmacology* 140 (3), S. 441–443.
- Dieckgraefe, B. K.; Crimmins, D. L.; Landt, V.; Houchen, C.; Anant, S.; Porche-Sorbet, R.; Ladenson, J. H.** (2002): Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg Ialpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. In: *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 50 (6), S. 421–434.

- Easton, D. M.; Nijnik, A.; Mayer, M. L.; Hancock, R. E. W.** (2009): Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. In: *Trends in biotechnology* 27 (10), S. 582–590.
- Eckburg, P. B.; Relman, D. A.** (2007): The role of microbes in Crohn's disease. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 44 (2), S. 256–262.
- Elinav, E.; Strowig, T.; Kau, A. L.; Henao-Mejia, J.; Thaiss, C. A.; Booth, C. J. et al.** (2011): NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. In: *Cell* 145 (5), S. 745–757.
- Elinav, E.; Thaiss, C. A.; Flavell, R. A.** (2013): Analysis of microbiota alterations in inflammasome-deficient mice. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1040, S. 185–194.
- Elssner, A.; Duncan, M.; Gavrilin, M.; Wewers, M. D.** (2004): A Novel P2X7 Receptor Activator, the Human Cathelicidin-Derived Peptide LL37, Induces IL-1 Processing and Release. In: *The Journal of Immunology* 172 (8), S. 4987–4994.
- Eltzschig, H. K.; Sitkovsky, M. V.; Robson, S. C.** (2012): Purinergic signaling during inflammation. In: *The New England journal of medicine* 367 (24), S. 2322–2333.
- Fearon, E. R.; Vogelstein, B.** (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. In: *Cell* 61 (5), S. 759–767.
- Feng, Z.; Dubyak, G. R.; Lederman, M. M.; Weinberg, A.** (2006): Cutting Edge. In: *The Journal of Immunology* 177 (2), S. 782–786.
- Ferguson, S. S.; Zhang, J.; Barak, L. S.; Caron, M. G.** (1996): G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: regulators of G-protein-coupled receptor sequestration. In: *Biochemical Society transactions* 24 (4), S. 953–959.
- Ferrara, J. L. M.; Harris, A. C.; Greenson, J. K.; Braun, T. M.; Holler, E.; Teshima, T. et al.** (2011): Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. In: *Blood* 118 (25), S. 6702–6708.
- Fukuhara, H.; Kadowaki, Y.; Ose, T.; Monowar, A.; Imaoka, H.; Ishihara, S. et al.** (2010): In vivo evidence for the role of RegI in gastric regeneration: transgenic overexpression of RegI accelerates the healing of experimental gastric ulcers. In:

Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 90 (4), S. 556–565.

Fukui, H.; Fujii, S.; Takeda, J.; Kayahara, T.; Sekikawa, A.; Nanakin, A. et al. (2004): Expression of reg I alpha protein in human gastric cancers. In: *Digestion* 69 (3), S. 177–184.

Funderburg, N.; Lederman, M. M.; Feng, Z.; Drage, M. G.; Jadlowsky, J.; Harding, C. V. et al. (2007): Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (47), S. 18631–18635.

Funderburg, N. T.; Jadlowsky, J. K.; Lederman, M. M.; Feng, Z.; Weinberg, A.; Sieg, S. F. (2011): The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam(3) CSK(4) and human beta-defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor-kappaB signalling patterns in human monocytes. In: *Immunology* 134 (2), S. 151–160.

Gallo, R. L.; Hooper, L. V. (2012): Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (7), S. 503–516.

Ganesh, B. P.; Klopfleisch, R.; Loh, G.; Blaut, M. (2013): Commensal Akkermansia muciniphila exacerbates gut inflammation in *Salmonella Typhimurium*-infected gnotobiotic mice. In: *PLoS one* 8 (9), e74963.

Ganz, T.; Lehrer, R. I. (1998): Antimicrobial peptides of vertebrates. In: *Current opinion in immunology* 10 (1), S. 41–44.

Ganz, T.; Selsted, M. E.; Szklarek, D.; Harwig, S. S.; Daher, K.; Bainton, D. F.; Lehrer, R. I. (1985): Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. In: *The Journal of clinical investigation* 76 (4), S. 1427–1435.

Ghiringhelli, F.; Apetoh, L.; Tesniere, A.; Aymeric, L.; Ma, Y.; Ortiz, C. et al. (2009): Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. In: *Nature medicine* 15 (10), S. 1170–1178.

Gironella, M.; Iovanna, J. L.; Sans, M.; Gil, F.; Penalva, M.; Closa, D. et al. (2005): Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. In: *Gut* 54 (9), S. 1244–1253.

Literaturverzeichnis

- Gurr, W.** (2011): The Role of Reg Proteins, a Family of Secreted C-Type Lectins, in Islet Regeneration and as Autoantigens in Type 1 Diabetes; Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy, Prof. David Wagner (Ed.): InTech.
- Haldipur, P.; Dupuis, N.; Degos, V.; Moniaux, N.; Chhor, V.; Rasika, S. et al.** (2014): HIP/PAP prevents excitotoxic neuronal death and promotes plasticity. In: *Annals of clinical and translational neurology* 1 (10), S. 739–754.
- Hanahan, D.; Folkman, J.** (1996): Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. In: *Cell* 86 (3), S. 353–364.
- Hancock, R. E. W.; Rozek, A.** (2002): Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. In: *FEMS microbiology letters* 206 (2), S. 143–149.
- Hancock, R. E. W.; Sahl, H.-G.** (2006): Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. In: *Nature biotechnology* 24 (12), S. 1551–1557.
- Hara, K.; Fukui, H.; Sun, C.; Kitayama, Y.; Eda, H.; Yamasaki, T. et al.** (2015): Effect of REG Ialpha protein on angiogenesis in gastric cancer tissues. In: *Oncology reports* 33 (5), S. 2183–2189.
- Harder, J.; Bartels, J.; Christophers, E.; Schroder, J. M.** (1997): A peptide antibiotic from human skin. In: *Nature* 387 (6636), S. 861.
- Harris, A. C.; Ferrara, J. L.; Braun, T. M.; Holler, E.; Teshima, T.; Levine, J. E. et al.** (2012): Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. In: *Blood* 119 (12), S. 2960–2963.
- Hartupee, J. C.; Zhang, H.; Bonaldo, M. F.; Soares, M. B.; Dieckgraefe, B. K.** (2001): Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV. In: *Biochimica et biophysica acta* 1518 (3), S. 287–293.
- Henson, P. M.** (2005): Dampening inflammation. In: *Nature immunology* 6 (12), S. 1179–1181.
- Herias, M. V.; Koninkx, J F J G; Vos, J. G.; Huis in't Veld, J H J; van Dijk, J. E.** (2005): Probiotic effects of Lactobacillus casei on DSS-induced ulcerative colitis in mice. In: *International journal of food microbiology* 103 (2), S. 143–155.
- Ho, S.; Pothoulakis, C.; Koon, H. W.** (2013): Antimicrobial peptides and colitis. In: *Current pharmaceutical design* 19 (1), S. 40–47.

- Hoffmann, J. A.; Kafatos, F. C.; Janeway, C. A.; Ezekowitz, R. A.** (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5418), S. 1313–1318.
- Hoover, D. M.; Boulegue, C.; Yang, D.; Oppenheim, J. J.; Tucker, K.; Lu, W.; Lubkowski, J.** (2002): The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (40), S. 37647–37654.
- Hoover, D. M.; Rajashankar, K. R.; Blumenthal, R.; Puri, A.; Oppenheim, J. J.; Chertov, O.; Lubkowski, J.** (2000): The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (42), S. 32911–32918.
- Hoshino, M.; Fukui, H.; Ono, Y.; Sekikawa, A.; Ichikawa, K.; Tomita, S. et al.** (2007): Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. In: *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 74 (1), S. 15–21.
- Hu, Y.; Fisette, P. L.; Denlinger, L. C.; Guadarrama, A. G.; Sommer, J. A.; Proctor, R. A.; Bertics, P. J.** (1998): Purinergic Receptor Modulation of Lipopolysaccharide Signaling and Inducible Nitric-oxide Synthase Expression in RAW 264.7 Macrophages. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (42), S. 27170–27175.
- Idzko, M.; Ferrari, D.; Eltzschig, H. K.** (2014): Nucleotide signalling during inflammation. In: *Nature* 509 (7500), S. 310–317.
- Iglesias, R.; Locovei, S.; Roque, A.; Alberto, A. P.; Dahl, G.; Spray, D. C.; Scemes, E.** (2008): P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 295 (3), S. 60.
- Ishimaru, M.; Yusuke, N.; Tsukimoto, M.; Harada, H.; Takenouchi, T.; Kitani, H.; Kojima, S.** (2014): Purinergic signaling via P2Y receptors up-mediates IL-6 production by liver macrophages/Kupffer cells. In: *The Journal of toxicological sciences* 39 (3), S. 413–423.
- Itoh, T.; Teraoka, H.** (1993): Cloning and tissue-specific expression of cDNAs for the human and mouse homologues of rat pancreatitis-associated protein (PAP). In: *Biochimica et biophysica acta* 1172 (1-2), S. 184–186.

- Jenq, R. R.; Taur, Y.; Devlin, S. M.; Ponce, D. M.; Goldberg, J. D.; Ahr, K. F. et al.** (2015): Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (8), S. 1373–1383.
- Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W.** (2006): Peptide antimicrobial agents. In: *Clinical microbiology reviews* 19 (3), S. 491–511.
- Jin, G.; Kawsar, H. I.; Hirsch, S. A.; Zeng, C.; Jia, X.; Feng, Z. et al.** (2010): An antimicrobial peptide regulates tumor-associated macrophage trafficking via the chemokine receptor CCR2, a model for tumorigenesis. In: *PLoS one* 5 (6), e10993.
- Joly, S.; Organ, C. C.; Johnson, G. K.; McCray, P. B., JR; Guthmiller, J. M.** (2005): Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. In: *Molecular immunology* 42 (9), S. 1073–1084.
- Judd, L. M.; Bredin, K.; Kalantzis, A.; Jenkins, B. J.; Ernst, M.; Giraud, A. S.** (2006): STAT3 activation regulates growth, inflammation, and vascularization in a mouse model of gastric tumorigenesis. In: *Gastroenterology* 131 (4), S. 1073–1085.
- Junger, W. G.** (2011): Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (3), S. 201–212.
- Kanda, N.; Kamata, M.; Tada, Y.; Ishikawa, T.; Sato, S.; Watanabe, S.** (2011): Human beta-defensin-2 enhances IFN-gamma and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. In: *Journal of leukocyte biology* 89 (6), S. 935–944.
- Kawai, T.; Akira, S.** (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. In: *Nature immunology* 11 (5), S. 373–384.
- Kawate, T.; Michel, J. C.; Birdsong, W. T.; Gouaux, E.** (2009): Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. In: *Nature* 460 (7255), S. 592–598.
- Keim, V.; Iovanna, J. L.; Orelle, B.; Verdier, J. M.; Busing, M.; Hopt, U.; Dagorn, J. C.** (1992): A novel exocrine protein associated with pancreas transplantation in humans. In: *Gastroenterology* 103 (1), S. 248–254.
- Khakh, B. S.; Burnstock, G.** (2009): The double life of ATP. In: *Scientific American* 301 (6), 84-90, 92.
- Khakh, B. S.; North, R. A.** (2006): P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. In: *Nature* 442 (7102), S. 527–532.

- Killeen, M. E.; Ferris, L.; Kupetsky, E. A.; Falo, L., JR; Mathers, A. R.** (2013): Signaling through purinergic receptors for ATP induces human cutaneous innate and adaptive Th17 responses: implications in the pathogenesis of psoriasis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (8), S. 4324–4336.
- Knights, D.; Lassen, K. G.; Xavier, R. J.** (2013): Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. In: *Gut* 62 (10), S. 1505–1510.
- Kollmar, O.; Scheuer, C.; Menger, M. D.; Schilling, M. K.** (2006): Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. In: *Annals of surgical oncology* 13 (2), S. 263–275.
- Kronlage, M.; Song, J.; Sorokin, L.; Isfort, K.; Schwerdtle, T.; Leipziger, J.** (2010): Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. In: *Science signaling* 3 (132), S. ra55.
- Kurashima, Y.; Amiya, T.; Nochi, T.; Fujisawa, K.; Haraguchi, T.; Iba, H. et al.** (2012): Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. In: *Nature communications* 3, S. 1034.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lai, Y.; Li, D.; Li, C.; Muehleisen, B.; Radek, K. A.; Park, H. J. et al.** (2012): The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. In: *Immunity* 37 (1), S. 74–84.
- Lasserre, C.; Colnot, C.; Bréchot, C.; Poirier, F.** (1999): HIP/PAP Gene, Encoding a C-Type Lectin Overexpressed in Primary Liver Cancer, Is Expressed in Nervous System as well as in Intestine and Pancreas of the Postimplantation Mouse Embryo. In: *The American Journal of Pathology* 154 (5), S. 1601–1610.
- Lasserre, C.; Simon, M.-T.; Ishikawa, H.; Diriong, S.; van Nguyen, C.; Christa, L. et al.** (1994): Structural Organization and Chromosomal Localization of a Human Gene (HIP/PAP) Encoding a C-type Lectin Overexpressed in Primary Liver Cancer. In: *Eur J Biochem* 224 (1), S. 29–38.
- Latz, E.; Xiao, T. S.; Stutz, A.** (2013): Activation and regulation of the inflammasomes. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (6), S. 397–411.

- Lehrer, R. I.** (2004): Primate defensins. In: *Nature reviews. Microbiology* 2 (9), S. 727–738.
- Lehrer, R. I.; Ganz, T.** (1999): Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. In: *Current opinion in immunology* 11 (1), S. 23–27.
- Levine, J. E.; Braun, T. M.; Harris, A. C.; Holler, E.; Taylor, A.; Miller, H. et al.** (2015): A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers. In: *The Lancet Haematology* 2 (1), e21-e29.
- Linzmeier, R.; Ho, C. H.; Hoang, B. V.; Ganz, T.** (1999): A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. In: *Gene* 233 (1-2), S. 205–211.
- Lioi, A. B.; Ferrari, B. M.; Dubyak, G. R.; Weinberg, A.; Sieg, S. F.** (2015): Human β Defensin-3 Increases CD86 Expression on Monocytes by Activating the ATP-Gated Channel P2X7. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (9), S. 4438–4445.
- Lioi, A. B.; Rodriguez, A. L. R.; Funderburg, N. T.; Feng, Z.; Weinberg, A.; Sieg, S. F.** (2012): Membrane damage and repair in primary monocytes exposed to human beta-defensin-3. In: *Journal of leukocyte biology* 92 (5), S. 1083–1091.
- Lisitsyn, N. A.; Bukurova, Y. A.; Nikitina, I. G.; Krasnov, G. S.; Sykulev, Y.; Beresten, S. F.** (2012): Enteric alpha defensins in norm and pathology. In: *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 11, S. 1.
- Liu, J.; Yan, Q.; Luo, F.; Shang, D.; Wu, D.; Zhang, H. et al.** (2015a): Acute cholecystitis associated with infection of Enterobacteriaceae from gut microbiota. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21 (9), 851.e1-9.
- Liu, L.; Wang, L.; Jia, H. P.; Zhao, C.; Heng, H. H.; Schutte, B. C. et al.** (1998): Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. In: *Gene* 222 (2), S. 237–244.
- Liu, L.; Zhao, C.; Heng, H. H.; Ganz, T.** (1997): The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. In: *Genomics* 43 (3), S. 316–320.
- Liu, X.; Wang, J.; Wang, H.; Yin, G.; Liu, Y.; Lei, X.; Xiang, M.** (2015b): REG3A accelerates pancreatic cancer cell growth under IL-6-associated inflammatory condition:

Involvement of a REG3A-JAK2/STAT3 positive feedback loop. In: *Cancer letters* 362 (1), S. 45–60.

Locovei, S.; Scemes, E.; Qiu, F.; Spray, D. C.; Dahl, G. (2007): Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. In: *FEBS letters* 581 (3), S. 483–488.

Loonen, L. M. P.; Stolte, E. H.; Jaklofsky, M. T. J.; Meijerink, M.; Dekker, J.; van Baarlen, P.; Wells, J. M. (2014): REG3gamma-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. In: *Mucosal immunology* 7 (4), S. 939–947.

Macadam, R. C.; Sarela, A. I.; Farmery, S. M.; Robinson, P. A.; Markham, A. F.; Guillou, P. J. (2000): Death from early colorectal cancer is predicted by the presence of transcripts of the REG gene family. In: *British journal of cancer* 83 (2), S. 188–195.

Manthei, D. M.; Jackson, D. J.; Evans, M. D.; Gangnon, R. E.; Tisler, C. J.; Gern, J. E. et al. (2012): Protection from asthma in a high-risk birth cohort by attenuated P2X(7) function. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 130 (2), S. 496–502.

Marafini, I.; Di Sabatino, A.; Zorzi, F.; Monteleone, I.; Sedda, S.; Cupi, M. L. et al. (2014): Serum regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of mucosal enteropathies. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 40 (8), S. 974–981.

Matsuoka, K.; Kanai, T. (2015): The gut microbiota and inflammatory bowel disease. In: *Seminars in immunopathology* 37 (1), S. 47–55.

Medveczky, P.; Szmola, R.; Sahin-Toth, M. (2009): Proteolytic activation of human pancreatitis-associated protein is required for peptidoglycan binding and bacterial aggregation. In: *The Biochemical journal* 420 (2), S. 335–343.

Meisch, J. P.; Vogel, R. M.; Schlatzer, D. M.; Li, X.; Chance; Levine, A. D. (2013): Human beta-defensin 3 induces STAT1 phosphorylation, tyrosine phosphatase activity, and cytokine synthesis in T cells. In: *Journal of leukocyte biology* 94 (3), S. 459–471.

Miyashita, H.; Nakagawara, K.; Mori, M.; Narushima, Y.; Noguchi, N.; Moriizumi, S. et al. (1995): Human REG family genes are tandemly ordered in a 95-kilobase region of chromosome 2p12. In: *FEBS letters* 377 (3), S. 429–433.

Moresco, E. M. Y.; LaVine, D.; Beutler, B. (2011): Toll-like receptors. In: *Current biology : CB* 21 (13), S. 93.

- Mousli, M.; Bronner, C.; Landry, Y.; Bockaert, J.; Rouot, B.** (1990): Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. In: *FEBS letters* 259 (2), S. 260–262.
- Mukherjee, S.; Hooper, L. V.** (2015): Antimicrobial defense of the intestine. In: *Immunity* 42 (1), S. 28–39.
- Mukherjee, S.; Partch, C. L.; Lehotzky, R. E.; Whitham, C. V.; Chu, H.; Bevins, C. L. et al.** (2009): Regulation of C-type lectin antimicrobial activity by a flexible N-terminal prosegment. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (8), S. 4881–4888.
- Mukherjee, S.; Vaishnava, S.; Hooper, L. V.** (2008): Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (19), S. 3019–3027.
- Mukherjee, S.; Zheng, H.; Derebe, M. G.; Callenberg, K. M.; Partch, C. L.; Rollins, D. et al.** (2014): Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. In: *Nature* 505 (7481), S. 103–107.
- Murphy, K. M.; Travers, P.; Walport, M.** (2014): Janeway Immunologie. 7., Aufl. 2009. Korrigierter Nachdruck 2014. Berlin: Springer Berlin (Lehrbuch).
- Nata, K.; Liu, Y.; Xu, L.; Ikeda, T.; Akiyama, T.; Noguchi, N. et al.** (2004): Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human REG family gene, REG III. In: *Gene* 340 (1), S. 161–170.
- Natividad, J. M.; Hayes, C. L.; Motta, J. P.; Jury, J.; Galipeau, H. J.; Philip, V. et al.** (2013): Differential induction of antimicrobial REGIII by the intestinal microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. In: *Applied and environmental microbiology* 79 (24), S. 7745–7754.
- Natividad, J. M. M.; Petit, V.; Huang, X.; Palma, G. de; Jury, J.; Sanz, Y. et al.** (2012): Commensal and probiotic bacteria influence intestinal barrier function and susceptibility to colitis in Nod1^{-/-}; Nod2^{-/-} mice. In: *Inflammatory bowel diseases* 18 (8), S. 1434–1446.
- Navid, F.; Boniotto, M.; Walker, C.; Ahrens, K.; Proksch, E.; Sparwasser, T. et al.** (2012): Induction of regulatory T cells by a murine beta-defensin. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (2), S. 735–743.

- Nicke, A.; Kuan, Y.-H.; Masin, M.; Rettinger, J.; Marquez-Klaka, B.; Bender, O. et al.** (2009): A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (38), S. 25813–25822.
- Nijnik, A.; Pistolic, J.; Filewod, N. C. J.; Hancock, R. E. W.** (2012): Signaling pathways mediating chemokine induction in keratinocytes by cathelicidin LL-37 and flagellin. In: *Journal of innate immunity* 4 (4), S. 377–386.
- Niyonsaba, F.** (2002): Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. In: *International immunology* 14 (4), S. 421–426.
- Niyonsaba, F.; Ogawa, H.; Nagaoka, I.** (2004): Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. In: *Immunology* 111 (3), S. 273–281.
- Niyonsaba, F.; Someya, A.; Hirata, M.; Ogawa, H.; Nagaoka, I.** (2001): Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. In: *European journal of immunology* 31 (4), S. 1066–1075.
- Niyonsaba, F.; Ushio, H.; Nakano, N.; Ng, W.; Sayama, K.; Hashimoto, K. et al.** (2007): Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (3), S. 594–604.
- Ogawa, H.; Fukushima, K.; Naito, H.; Funayama, Y.; Unno, M.; Takahashi, K.-i. et al.** (2003): Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. In: *Inflammatory bowel diseases* 9 (3), S. 162–170.
- Okayasu, I.; Hatakeyama, S.; Yamada, M.; Ohkusa, T.; Inagaki, Y.; Nakaya, R.** (1990): A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. In: *Gastroenterology* 98 (3), S. 694–702.
- Oliver, J. C.; Bland, L. A.; Oettinger, C. W.; Arduino, M. J.; McAllister, S. K.; Aguero, S. M.; Favero, M. S.** (1993): Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. In: *Lympkine and cytokine research* 12 (2), S. 115–120.

- Ouellette, A. J.** (2011): Paneth cell α -defensins in enteric innate immunity. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68 (13), S. 2215–2229.
- Pelegrin, P.; Surprenant, A.** (2006): Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. In: *EMBO J* 25 (21), S. 5071–5082.
- Perregaux, D. G.; Bhavsar, K.; Contillo, L.; Shi, J.; Gabel, C. A.** (2002): Antimicrobial Peptides Initiate IL-1 Posttranslational Processing. In: *The Journal of Immunology* 168 (6), S. 3024–3032.
- Peterson, L. W.; Artis, D.** (2014): Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (3), S. 141–153.
- Pham, T.-H.; Benner, C.; Lichtinger, M.; Schwarzfischer, L.; Hu, Y.; Andreesen, R. et al.** (2012): Dynamic epigenetic enhancer signatures reveal key transcription factors associated with monocytic differentiation states. In: *Blood* 119 (24), S. 71.
- Pivarcsi, A.; Nagy, I.; Koreck, A.; Kis, K.; Kenderessy-Szabo, A.; Szell, M. et al.** (2005): Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. In: *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7 (9-10), S. 1117–1127.
- Praetorius, H. A.; Leipziger, J.** (2009): ATP release from non-excitable cells. In: *Purinergic signalling* 5 (4), S. 433–446.
- Pull, S. L.; Doherty, J. M.; Mills, J. C.; Gordon, J. I.; Stappenbeck, T. S.** (2005): Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (1), S. 99–104.
- Ranka, S.; Kahveci, T.; Singh, M.** (2007): The 2012 ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine. ACM-BCB 2012 ; Orlando, Florida, U.S.A., October 7-10, 2012. New York, New York: Association for Computing Machinery.
- Rechreche, H.; Montalto, G.; Mallo, G. V.; Vasseur, S.; Marasa, L.; Soubeyran, P. et al.** (1999): pap, reg Ialpha and reg Ibeta mRNAs are concomitantly up-regulated during human colorectal carcinogenesis. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 81 (5), S. 688–694.

- Rehli, M.; Sulzbacher, S.; Pape, S.; Ravasi, T.; Wells, C. A.; Heinz, S. et al.** (2005): Transcription factor Tfec contributes to the IL-4-inducible expression of a small group of genes in mouse macrophages including the granulocyte colony-stimulating factor receptor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (11), S. 7111–7122.
- Rink, L.; Haase, H.; Kruse, A.** (2015): Immunologie für Einsteiger. 2., neu bearb. und aktualisierte Aufl. Berlin [u.a.]: Springer Spektrum (SpringerLink : Bücher).
- Rohrl, J.; Huber, B.; Koehl, G. E.; Geissler, E. K.; Hehlgans, T.** (2012): Mouse beta-defensin 14 (Defb14) promotes tumor growth by inducing angiogenesis in a CCR6-dependent manner. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (10), S. 4931–4939.
- Rohrl, J.; Yang, D.; Oppenheim, J. J.; Hehlgans, T.** (2008): Identification and Biological Characterization of Mouse beta-defensin 14, the orthologue of human beta-defensin 3. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (9), S. 5414–5419.
- Rohrl, J.; Yang, D.; Oppenheim, J. J.; Hehlgans, T.** (2010a): Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (12), S. 6688–6694.
- Rohrl, J.; Yang, D.; Oppenheim, J. J.; Hehlgans, T.** (2010b): Specific binding and chemotactic activity of mBD4 and its functional orthologue hBD2 to CCR6-expressing cells. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (10), S. 7028–7034.
- Round, J. L.; Mazmanian, S. K.** (2009): The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (5), S. 313–323.
- Rutgeerts, P.; Goboes, K.; Peeters, M.; Hiele, M.; Penninckx, F.; Aerts, R. et al.** (1991): Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. In: *Lancet (London, England)* 338 (8770), S. 771–774.
- Sakaki, H.; Tsukimoto, M.; Harada, H.; Moriyama, Y.; Kojima, S.** (2013): Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. In: *PLoS one* 8 (4), S. e59778.
- Salzman, N. H.; Hung, K.; Haribhai, D.; Chu, H.; Karlsson-Sjoberg, J.; Amir, E. et al.** (2010): Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. In: *Nature immunology* 11 (1), S. 76–83.

- Sass, V.; Schneider, T.; Wilmes, M.; Korner, C.; Tossi, A.; Novikova, N. et al.** (2010): Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. In: *Infection and immunity* 78 (6), S. 2793–2800.
- Schaefer, T. M.; Fahey, J. V.; Wright, J. A.; Wira, C. R.** (2005): Innate Immunity in the Human Female Reproductive Tract. In: *The Journal of Immunology* 174 (2), S. 992–1002.
- Schibli, D. J.; Hunter, H. N.; Aseyev, V.; Starner, T. D.; Wienczek, J. M.; McCray, P. B., JR et al.** (2002): The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (10), S. 8279–8289.
- Schroder, J. M.; Harder, J.** (1999): Human beta-defensin-2. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 31 (6), S. 645–651.
- Schutte, B. C.; Mitros, J. P.; Bartlett, J. A.; Walters, J. D.; Jia, H. P.; Welsh, M. J. et al.** (2002): Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (4), S. 2129–2133.
- Schwab, C.; Berry, D.; Rauch, I.; Rennisch, I.; Ramesmayer, J.; Hainzl, E. et al.** (2014): Longitudinal study of murine microbiota activity and interactions with the host during acute inflammation and recovery. In: *The ISME journal* 8 (5), S. 1101–1114.
- Scott, M. G.; Vreugdenhil, A. C. E.; Buurman, W. A.; Hancock, R. E. W.; Gold, M. R.** (2000): Cutting Edge. In: *The Journal of Immunology* 164 (2), S. 549–553.
- Sekikawa, A.; Fukui, H.; Fujii, S.; Ichikawa, K.; Tomita, S.; Imura, J. et al.** (2008): REG Ialpha protein mediates an anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells. In: *Carcinogenesis* 29 (1), S. 76–83.
- Sekikawa, A.; Fukui, H.; Fujii, S.; Nanakin, A.; Kanda, N.; Uenoyama, Y. et al.** (2005a): Possible role of REG Ialpha protein in ulcerative colitis and colitic cancer. In: *Gut* 54 (10), S. 1437–1444.
- Sekikawa, A.; Fukui, H.; Fujii, S.; Takeda, J.; Nanakin, A.; Hisatsune, H. et al.** (2005b): REG I α protein may function as a trophic and/or anti-apoptotic factor in the development of gastric cancer. In: *Gastroenterology* 128 (3), S. 642–653.

- Sekikawa, A.; Fukui, H.; Suzuki, K.; Karibe, T.; Fujii, S.; Ichikawa, K. et al.** (2010): Involvement of the IL-22/REG Ialpha axis in ulcerative colitis. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90 (3), S. 496–505.
- Semple, F.; Dorin, J. R.** (2012): beta-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? In: *Journal of innate immunity* 4 (4), S. 337–348.
- Semple, F.; MacPherson, H.; Webb, S.; Cox, S. L.; Mallin, L. J.; Tyrrell, C. et al.** (2011): Human beta-defensin 3 affects the activity of pro-inflammatory pathways associated with MyD88 and TRIF. In: *European journal of immunology* 41 (11), S. 3291–3300.
- Semple, F.; MacPherson, H.; Webb, S.; Kilanowski, F.; Lettice, L.; McGlasson, S. L. et al.** (2015): Human beta-Defensin 3 corrected Exacerbates MDA5 but Suppresses TLR3 Responses to the Viral Molecular Pattern Mimic Polyinosinic:Polycytidylic Acid. In: *PLoS genetics* 11 (12), e1005673.
- Semple, F.; Webb, S.; Li, H. N.; Patel, H. B.; Perretti, M.; Jackson, I. J. et al.** (2010): Human beta-defensin 3 has immunosuppressive activity in vitro and in vivo. In: *European journal of immunology* 40 (4), S. 1073–1078.
- Simon, M.-T.; Pauloin, A.; Normand, G.; Lieu, H.-T.; Mouly, H.; Pivert, G. et al.** (2003): HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (11), S. 1441–1450.
- Sparkes, R. S.; Kronenberg, M.; Heinzmann, C.; Daher, K. A.; Klisak, I.; Ganz, T.; Mohandas, T.** (1989): Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23. In: *Genomics* 5 (2), S. 240–244.
- Spencer, J. D.; Jackson, A. R.; Li, B.; Ching, C. B.; Vonau, M.; Easterling, R. S. et al.** (2015): Expression and Significance of the HIP/PAP and RegIIIgamma Antimicrobial Peptides during Mammalian Urinary Tract Infection. In: *PloS one* 10 (12), e0144024.
- Stagg, J.; Smyth, M. J.** (2010): Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. In: *Oncogene* 29 (39), S. 5346–5358.
- Surprenant, A.; North, R. A.** (2009): Signaling at purinergic P2X receptors. In: *Annual review of physiology* 71, S. 333–359.

- Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C. B.; Zeh, H. J.; Lotze, M. T.** (2012): PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity. In: *Immunological reviews* 249 (1), S. 158–175.
- Tang, Y. Q.; Yuan, J.; Osapay, G.; Osapay, K.; Tran, D.; Miller, C. J. et al.** (1999): A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5439), S. 498–502.
- Taylor, K.; Clarke, D. J.; McCullough, B.; Chin, W.; Seo, E.; Yang, D. et al.** (2008): Analysis and separation of residues important for the chemoattractant and antimicrobial activities of beta-defensin 3. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (11), S. 6631–6639.
- Terazono, K.; Yamamoto, H.; Takasawa, S.; Shiga, K.; Yonemura, Y.; Tochino, Y.; Okamoto, H.** (1988): A novel gene activated in regenerating islets. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (5), S. 2111–2114.
- Tonetti, M.; Sturla, L.; Giovine, M.; Benatti, U.; Flora, A. de** (1995): Extracellular ATP enhances mRNA levels of nitric oxide synthase and TNF-alpha in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 murine macrophages. In: *Biochemical and biophysical research communications* 214 (1), S. 125–130.
- Tong, M.; Jacobs, J. P.; McHardy, I. H.; Braun, J.** (2014): Sampling of intestinal microbiota and targeted amplification of bacterial 16S rRNA genes for microbial ecologic analysis. In: *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* 107, S. 7–11.
- Troiani, T.; Martinelli, E.; Capasso, A.; Morgillo, F.; Orditura, M.; Vita, F. de; Ciardiello, F.** (2012): Targeting EGFR in pancreatic cancer treatment. In: *Current drug targets* 13 (6), S. 802–810.
- Tuteja, N.** (2014): Signaling through G protein coupled receptors. In: *Plant Signaling & Behavior* 4 (10), S. 942–947.
- Vaishnava, S.; Behrendt, C. L.; Ismail, A. S.; Eckmann, L.; Hooper, L. V.** (2008): Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (52), S. 20858–20863.

- Vaishnava, S.; Yamamoto, M.; Severson, K. M.; Ruhn, K. A.; Yu, X.; Koren, O. et al.** (2011): The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. In: *Science (New York, N.Y.)* 334 (6053), S. 255–258.
- van Beelen, G. A.; Ostvik, A. E.; Brenna, O.; Torp, S. H.; Gustafsson, B. I.; Sandvik, A. K.** (2013): REG gene expression in inflamed and healthy colon mucosa explored by in situ hybridisation. In: *Cell and tissue research* 352 (3), S. 639–646.
- VanDussen, K. L.; Liu, T.-C.; Li, D.; Towfic, F.; Modiano, N.; Winter, R. et al.** (2014): Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. In: *Gastroenterology* 146 (1), S. 200–209.
- Vylkova, S.; Sun, J. N.; Edgerton, M.** (2007): The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. In: *Purinergic signalling* 3 (1-2), S. 91–97.
- Wang, J.; Zhou, H.; Han, Y.; Liu, X.; Wang, M.; Wang, X. et al.** (2014): SOCS3 methylation in synergy with Reg3A overexpression promotes cell growth in pancreatic cancer. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 92 (12), S. 1257–1269.
- Watanabe, T.; Yonekura, H.; Terazono, K.; Yamamoto, H.; Okamoto, H.** (1990): Complete nucleotide sequence of human reg gene and its expression in normal and tumoral tissues. The reg protein, pancreatic stone protein, and pancreatic thread protein are one and the same product of the gene. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (13), S. 7432–7439.
- Watters, J. J.; Sommer, J. A.; Fisette, P. L.; Pfeiffer, Z. A.; Aga, M.; Prabhu, U. et al.** (2001): P2X7 nucleotide receptor: Modulation of LPS-induced macrophage signaling and mediator production. In: *Drug Dev. Res.* 53 (2-3), S. 91–104.
- Weinberg, A.; Jin, G.; Sieg, S.; McCormick, T. S.** (2012): The yin and yang of human Beta-defensins in health and disease. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 294.
- Weir, T. L.; Manter, D. K.; Sheflin, A. M.; Barnett, B. A.; Heuberger, A. L.; Ryan, E. P.** (2013): Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. In: *PloS one* 8 (8), e70803.
- Wilhelm, K.; Ganesan, J.; Muller, T.; Durr, C.; Grimm, M.; Beilhack, A. et al.** (2010): Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. In: *Nature medicine* 16 (12), S. 1434–1438.

Wu, H.; Zheng, Q.; Rengabhashyam, P.; Zenilman, M. E. (2000): A Brief History of Pancreatic Reg: Implications as to its Clinical Importance. In: *The Einstein quarterly journal of biology and medicine* 17 (4), S. 178.

Wu, J.; Patmore, D. M.; Jousma, E.; Eaves, D. W.; Breving, K.; Patel, A. V. et al. (2014): EGFR-STAT3 signaling promotes formation of malignant peripheral nerve sheath tumors. In: *Oncogene* 33 (2), S. 173–180.

Yang, D.; Biragyn, A.; Hoover, D. M.; Lubkowski, J.; Oppenheim, J. J. (2004): Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. In: *Annual review of immunology* 22, S. 181–215.

Yang, D.; Chen, Q.; Schmidt, A. P.; Anderson, G. M.; Wang, J. M.; Wooters, J. et al. (2000): L1-37, the Neutrophil Granule-And Epithelial Cell-Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor-Like 1 (Fprl1) as a Receptor to Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells. In: *J Exp Med* 192 (7), S. 1069–1074.

Yang, D.; Chertov, O.; Bykovskaia, S. N.; Chen, Q.; Buffo, M. J.; Shogan, J. et al. (1999): Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5439), S. 525–528.

Ye, Y.; Xiao, L.; Wang, S.-J.; Yue, W.; Yin, Q.-S.; Sun, M.-Y. et al. (2015): Up-regulation of REG3A in colorectal cancer cells confers proliferation and correlates with colorectal. In: *Oncotarget*.

Yonemura, Y.; Sakurai, S.; Yamamoto, H.; Endou, Y.; Kawamura, T.; Bandou, E. et al. (2003): REG gene expression is associated with the infiltrating growth of gastric carcinoma. In: *Cancer* 98 (7), S. 1394–1400.

Yu, H.; Pardoll, D.; Jove, R. (2009): STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (11), S. 798–809.

Zasloff, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. In: *Nature* 415 (6870), S. 389–395.

Zelensky, A. N.; Gready, J. E. (2005): The C-type lectin-like domain superfamily. In: *The FEBS journal* 272 (24), S. 6179–6217.

Zhang, Q.; Wu, Y.; Wang, J.; Wu, G.; Long, W.; Xue, Z. et al. (2016): Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium. In: *Scientific reports* 6, S. 27572.

Literaturverzeichnis

- Zhang, Y.-W.** (2003): Reg gene family and human diseases. In: *WJG* 9 (12), S. 2635.
- Zheng, H. C.; Sugawara, A.; Okamoto, H.; Takasawa, S.; Takahashi, H.; Masuda, S.; Takano, Y.** (2011): Expression profile of the REG gene family in colorectal carcinoma. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 59 (1), S. 106–115.
- de Zoete; Palm, N. W.; Zhu, S.; Flavell, R. A.** (2014): Inflammasomes. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (12), S. a016287.

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Professor Dr. Thomas Hehlgans**, der mir dieses interessante Thema zu Verfügung gestellt hat, mich während der Zeit meiner Arbeit unterstützt und gefördert hat. Vielen Dank auch für das allzeit offene Ohr bei Problemen und Fragen, sowie die vielen Vorschläge und Anregungen.

Ein großer Dank gilt auch meinen Mentoren **Prof. Dr. Uwe Ritter** und **PD Dr. Wulf Schneider** für die konstruktive Kritik, wertvollen Ratschläge und die Diskussionsbereitschaft auch während der Seminare.

Ganz besonders möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei unserer Arbeitsgruppe bedanken: **Dr. Diana Ruiz Faria**, **Dr. Katrin Mauch-Mücke**, **Wenke Hüter** und **Yana Urban**. Vielen Dank für die ständige Hilfsbereitschaft, die Unterstützung im Laboralltag und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Dank an alle **Mitglieder des Lehrstuhls Immunologie**, für die gute Stimmung und Hilfestellungen; mein besonderer Dank gilt **Dr. Bernd Echtenacher** und **Karin Holz** für die Bereitstellung ihres Wissens.

Dank auch an **Dr. Andreas Hiergeist** und die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Reischl für die vielen Hilfestellungen bei der Mikrobiom-Analyse. Ebenso danken möchte ich **Alice Peuker**, für den unermüdlichen Nachschub an primären humanen Makrophagen sowie **Rudolf Jung** für die Färbung von histologischen Schnitten.

Ganz herzlicher Dank gilt schließlich **meiner Familie** sowie **meinen Freunden** für die anhaltende Unterstützung und den ermutigenden Zuspruch in jeder Phase meines Studiums. Vielen Dank auch für die konstruktive Durchsicht dieses Manuskripts.

Lebenslauf

10 Lebenslauf

Angaben zu Person:

Name: Daniela Morgenthaler, geb. Wanke
Geburtstag/-ort: 02.01.1988 in München
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Ausbildung:

- 8/2013-heute **Promotion**, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Hehlgans, Lehrstuhl für Immunologie, Universität Regensburg, Bayern
Thema: „Die funktionelle Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden in Entzündungsreaktionen“
Angestrebter Abschluss: Dr. rer. physiol.
- 4/2011-7/2013 **Masterstudium Biologie**, Universität Regensburg, Bayern
Studienschwerpunkte: Zoologie, Botanik und Immunologie
Master of Science (Note: 1,5)

Masterarbeit, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Hehlgans, Lehrstuhl für Immunologie, Universität Regensburg, Bayern
Thema: „Funktionelle Rolle des Lymphotoxin- β -Rezeptors bei der Entstehung von IL17 exprimierenden $\gamma\delta$ T-Zellen“ (Note: 1,3)
- 10/2007-3/2011 **Bachelorstudium Biologie**, Universität Regensburg, Bayern
Bachelor of Science (Note: 2,4)

Bachelorarbeit, Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Heize, Lehrstuhl für Zoologie, Universität Regensburg, Bayern
Thema: „Dominanzhierarchien und vergleichende Populationsgenetik bei der Ameisenart *Pseudomyrmex gracilis* (Formicidae)“ (Note: 1,7)

Schule:

- 1998-2007 **Gabriel- von-Seidl-Gymnasium**, Bad Tölz, Bayern
Allgemeine Hochschulreife (Note 2,3)

Facharbeit Biologie

- Thema: „Vergleich unterschiedlich bewirtschafteter Wiesen in Hinblick auf den Blühpflanzenbestand“ (Note: 1,0)

Lebenslauf

Manuskript, das im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist:

Human beta-defensin-2 and -3 enhance pro-inflammatory cytokine expression induced by TLR ligands via ATP-release in a P2X7R dependent manner. Wanke, D.; Mauch-Mucke, K.; Holler, E.; Hehlgans, T. (Manuskript eingereicht)

Vortrag:

“HBD2 activates human macrophages and synergizes in proinflammatory cytokine expression induced by TLR ligands“, Biomedical Symposium for Graduate Students, 18.-19. September 2015, Kelheim

Poster:

“Beta-defensins activate macrophages and synergize in pro-inflammato ry cytokine expression induced by TLR ligands”, 43rd annual meeting of the German Society for Immunology (DGfI), 11.-14. September 2013, Mainz

“HBD2 activates human macrophages and synergizes in proinflammatory cytokine expression induced by TLR ligands”, Biomedical Symposium for Graduate Students, 26.-27. September 2014, Regen

“Beta-defensins activate macrophages and synergize in pro-inflammato ry cytokine expression induced by TLR ligands”, Gordon Research Conferences: Antimicrobial Peptides, 03.-08. Mai 2015, Lucca, Italien.