

**Identifizierung und Charakterisierung
von Beta-Defensin 14
der Maus**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johann Röhrl aus Regensburg
2009

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2005 bis Februar 2009 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlhans am Institut für Immunologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:

21.11.08

Tag des Kolloquiums:

28.01.09

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Thomas Hehlhans

Prof. Dr. Richard Warth

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Tamm (Vorsitz)

Prof. Dr. Warth

Prof. Dr. Hehlhans

Prof. Dr. Wirth

**Für meine Frau
und für meine Mutter**

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:

**Unermüdliche Ausdauer und
die Bereitschaft, etwas, in das man
viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,
wieder wegzuwerfen“**

Albert Einstein (1879-1955)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Johann Röhl

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	EINFÜHRUNG IN DAS IMMUNSYSTEM	1
1.2	FAMILIE DER β -DEFENSINE	2
1.3	BEDEUTUNG DER β -DEFENSINE FÜR DIE ANGEBORENE IMMUNANTWORT	5
1.4	BEDEUTUNG DER β -DEFENSINE FÜR DIE ADAPTIVE IMMUNANTWORT	8
1.5	ERKRANKUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT β -DEFENSINEN	9
1.5.1	Psoriasis und atopische Dermatitis	9
1.5.2	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	11
1.5.3	<i>Helicobacter pylori</i> -induzierte Gastritis	12
1.5.4	Erkrankungen der Lunge	13
1.5.5	Die β -Defensine im Tumorwachstum	14
1.6	ZIEL DER ARBEIT	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	MATERIAL	17
2.1.1	Chemikalien, Medien und Reagenzien	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial	18
2.1.3	Oligonukleotide	19
2.1.4	Plasmide	21
2.1.5	Enzyme	21
2.1.6	Antikörper	22
2.1.7	Kits	23
2.1.8	Puffer und Lösungen	23
2.1.9	Geräte	26
2.1.10	Bakterienstämme	28
2.1.11	Eukaryontische Zelllinien	28
2.1.12	Tiere	28
2.1.13	Software und Internet-Ressourcen	29
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
2.2.1	Präparation genomischer DNA	29
2.2.2	Präparation von Gesamt-RNA	30
2.2.3	Reverse Transkription	30

2.2.4	Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.2.5	Quantitative Real Time PCR (RT-PCR).....	31
2.2.6	Ligation.....	33
2.2.7	Transformation.....	33
2.2.8	Bakterienkultur.....	34
2.2.9	Antibakterieller Assay.....	34
2.2.10	Präparation von Plasmid-DNA.....	34
2.2.11	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	34
2.2.12	Agarosegel-Elektrophorese.....	35
2.2.13	Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	35
2.2.14	Restriktionsverdau von DNA.....	35
2.2.15	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	35
2.2.16	Proteinaufreinigung.....	36
2.2.17	Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose.....	36
2.2.18	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
2.2.19	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.2.20	Western-Blot.....	37
2.2.21	Luciferase Reporter-Gen-Assay.....	38
2.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	39
2.3.1	Zellkulturbedingungen.....	39
2.3.2	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	39
2.3.3	Transfektion.....	40
2.3.4	Gewinnung von Splenozyten.....	40
2.3.5	Generierung und Stimulierung von BMDCs.....	40
2.3.6	Lymphozytenisolation aus soliden BFS-1 Fibrosarkomen.....	41
2.3.7	Isolation von residenten Monozyten aus dem Peritoneum.....	41
2.3.8	Chemotaxis Assay.....	42
2.3.9	MACS-Reinigung.....	42
2.3.10	MTT-Assay.....	43
2.3.11	Durchflusszytometrie.....	43
2.3.12	Zellsortierung.....	44
2.4	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN.....	44
2.4.1	Tierhaltung.....	44
2.4.2	Erzeugung von Fibrosarkomen mit BFS-1 Zellen.....	44

2.4.3	Messung des BFS-1 Tumorwachstums	45
2.5	IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN	45
2.5.1	Herstellung histologischer Schnitte aus kryokonserviertem Gewebe.....	45
2.5.2	Immunhistochemische Färbung von CD31	46
2.6	STATISTIK	46
3	ERGEBNISSE	47
3.1	IDENTIFIKATION DES <i>DEFB14</i> -GENS.....	47
3.2	NACHWEIS DER EXPRESSION VON MBD14 <i>IN VIVO</i>	49
3.2.1	Nachweis der Expression von mBD14 in verschiedenen Organen	49
3.2.2	Nachweis der Expression von mBD14 in BMDCs.....	50
3.3	REGULATION DER EXPRESSION VON MBD14.....	51
3.3.1	Verstärkte Expression von mBD14 nach Stimulierung von BMDCs.....	51
3.3.2	NOD2/CARD15-Signaling induzierte Expression von mBD14	52
3.4	KLONIERUNG UND EXPRESSION REKOMBINANTER β -DEFENSINE.....	56
3.4.1	Hergestellte Expressionsvektoren.....	56
3.4.2	Expression der hIgG ₁ -Fusionsproteine in HEK-293 und BFS-1 Zellen	59
3.4.3	Expression der hIgG ₁ -Fusionsproteine in Drosophila Schneider 2 (S2) Zellen...	60
3.4.4	Aufreinigung rekombinant exprimierter hIgG ₁ -Fusionsproteine	61
3.5	ANTIBAKTERIELLE AKTIVITÄT DER β -DEFENSIN:IG-FUSIONSPROTEINE.....	63
3.6	EXPRESSION VON MCCR6 IN HEK-293 ZELLEN	68
3.7	DAS MBD14:IG-FUSIONSPROTEIN BINDET AN CCR6	69
3.8	β -DEFENSIN:IG-FUSIONSPROTEINE INDUZIEREN CHEMOTAXIS	70
3.9	INTERAKTION VON MBD14 MIT B-LYMPHOZYTEN	73
3.10	DIE ROLLE DES MBD14 IM TUMORWACHSTUM	76
3.10.1	Nachweis der mBD14-Expression im BFS-1 Fibrosarkom.....	76
3.10.2	Einfluss des mBD14 auf das Tumorwachstum.....	77
3.10.3	Analyse der tumorinfiltrierenden Leukozyten.....	80
3.10.4	Expression der proangiogenen Faktoren MIP-2 und VEGF α	81
3.10.5	Untersuchung der Gefäßbildung im Tumor.....	83
4	DISKUSSION	85
4.1	IDENTIFIKATION DES <i>DEFB14</i> -GENS.....	85
4.2	NACHWEIS DER EXPRESSION VON MBD14 <i>IN VIVO</i>	86
4.3	REGULATION DER EXPRESSION VON MBD14	87

4.4	ANTIBAKTERIELLE AKTIVITÄT DER REKOMBINANT EXPRIMIERTEN β -DEFENSIN:IG-FUSIONSPROTEINE	90
4.5	BINDUNG UND AKTIVIERUNG DES CHEMOKIN-REZEPTORS CCR6 DURCH MBD14.....	92
4.6	DIE INTERAKTION VON MBD14 MIT CCR6 ⁺ B-LYMPHOZYTEN	94
4.7	DIE ROLLE DES MBD14 IM TUMORWACHSTUM	96
4.8	AUSBLICK.....	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	102
7	LITERATURVERZEICHNIS	104
8	ANHANG.....	119

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Antibakterieller Assay
Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
ad	auffüllen auf
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin oder antigenpräsentierende Zelle
Ak	Antikörper
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cell</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serum-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CFU	<i>colony forming units</i> (Kolonie-bildende Einheiten)
cm	Zentimeter
DAPI	4, 6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC	<i>dendritic cell</i>
<i>Defb</i>	β-Defensin (Genname)
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbend assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein
FKS	fötale Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung

GM-CSF	<i>granulocyte-/macrophage-colony stimulation factor</i>
h	Stunde oder human
hBD	human β -Defensin
HPF	<i>high power field</i> (Hauptgesichtsfeld)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	<i>Luria Broth</i> (Bakterienmedium)
LPS	Lipopolysaccharid
m	aus der Maus oder milli (10^{-3}) oder Meter
M	molar (mol/l)
MACS	<i>magnetic cell sorting</i> (magnetische Zellsortierung)
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
mBD	Maus β -Defensin
MDP	Muramyldipeptid (<i>N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine hydrate</i>)
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9}) oder Anzahl
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
ORF	<i>open reading frame</i>
OVA	Ovalbumin
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> (periphere Blut-mononukleare Zelle)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
Poly (I:C)	<i>Polyinosinic-Polycytidylic acid</i>
r	rekombinant
RBC	<i>red blood cell</i> (rote Blutzellen)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sog.	so genannt
SSC	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TAE	Tris-acetat EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	<i>Unit(s)</i>
ü. N.	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Immunsystem

Das Immunsystem ist die Gesamtheit aller zellulärer und molekularer Komponenten und Mechanismen mit der Aufgabe die Integrität des Organismus in der Auseinandersetzung mit seiner Umwelt zu wahren. Dies findet in Form einer speziell koordinierten Immunantwort statt. Dabei muss das Immunsystem in der Lage sein, den Organismus sowohl vor Angriffen, z. B. durch Bakterien oder Viren als auch vor körpereigenen, entarteten Zellen zu schützen und zwischen Eigen- und Fremdan antigenen zu unterscheiden. Sobald eine solche Bedrohung wahrgenommen wird, reagiert der Organismus mit einer entsprechenden Immunantwort, die in zwei unterschiedliche Effektormechanismen untergliedert ist. Zum einen steht die unspezifische, angeborene Immunantwort, zum anderen die spezifische, adaptive Immunantwort zur Verfügung. Gerade bei Neugeborenen spielt die angeborene Immunantwort eine wichtige Rolle, da hier das adaptive Immunsystem noch nicht ausreichend ausgebildet ist.

Allgemein bewirkt das angeborene Immunsystem eine frühe und ungerichtete Abwehrreaktion gegen z. B. eindringende Mikroorganismen, während sich das adaptive Immunsystem erst durch den Kontakt mit Krankheitserregern entwickelt, dann aber eine sehr spezifische und wirkungsvolle Waffe gegen Krankheitserreger darstellt.

Als erste Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems sind Epithel, Mukosa und in diesem Zusammenhang antimikrobielle Substanzen als physikalische und chemische Barriere zu nennen. Pathogene, die diese Barriere einmal durchdrungen haben, werden von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs) und Neutrophilen, aber auch von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bekämpft. Dabei sind Phagozyten in der Lage, z. B. Bakterien aufzunehmen, zu verdauen und deren Antigene diversen Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren, während NK-Zellen z. B. mit Viren infizierte Zellen erkennen und deren Apoptose induzieren können. Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist im Blut zu finden. Das Komplementsystem schützt den Organismus durch Markierung von Keimen und die Ausbildung des sogenannten *membrane attack complex* (MAC), der die Zellmembran perforiert und Bakterien dadurch tötet. Körpereigene Zellen hingegen besitzen spezielle Mechanismen, um sich vor dem Angriff durch den MAC zu schützen, wie z. B. die

Aktivität des CD59, das durch die Bindung der Komplementfaktoren C8 und C9 die Entstehung des MAC an Zelloberflächen körpereigener Zellen verhindert. Diese Komponenten sind konstitutiv vorhanden und spielen in den ersten Stunden einer Infektion eine wichtige Rolle.

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine sehr spezifische Erkennung von Pathogenen und durch ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis aus, das dafür verantwortlich ist, dass eine spätere Infektion mit dem gleichen Erreger schneller und effizienter beseitigt werden kann. Maßgebende Funktionen übernehmen dabei B- und T-Lymphozyten. Nach dem durch antigenpräsentierende Zellen (APC) vermittelten Kontakt mit dem Antigen sind die vorher naiven Lymphozyten aktiviert und können entsprechend der Art der Infektion angemessen reagieren. Während B-Zellen Antikörper produzieren, können T-Zellen z. B. andere Immunzellen unterstützen (T-Helfer-Zellen) oder infizierte Zellen töten (zytotoxische T-Zellen).

Das angeborene und das adaptive Immunsystem sind in der Weise miteinander verbunden, dass zum einen die angeborene Immunantwort auch die adaptive Immunantwort stimuliert und beeinflusst, und dass zum anderen das adaptive Immunsystem sich einiger Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems zur Eliminierung von Pathogenen bedient. Bei der Kommunikation zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem spielen gerade Chemokine und Zytokine, sowie deren Rezeptoren eine bedeutende Rolle (Abbas et al., 2003; Sompayrac, 2003; Janeway et al., 2005).

1.2 Familie der β -Defensine

Die Existenz von kationischen Proteinen mit antibakteriellen Eigenschaften wurde erstmals 1963 anhand von lysosomalen Präparationen aus polymorphonukleären Leukozyten des Meerschweinchens beschrieben, die antimikrobiell auf die untersuchten Mikroorganismen wirkten. Diese kationischen, antimikrobiellen Proteine unterschieden sich deutlich von Lysozym oder anderen bis dahin bekannten antimikrobiellen Enzymen (Spitznagel et al., 1963; Zeya et al., 1966). Die Bezeichnung „Defensin“ wurde 1985 eingeführt, als gezeigt wurde, dass die bislang als „kationische antimikrobielle Proteine“ oder „*human neutrophil peptide*“ (HNP) bezeichneten Peptide wie z. B. HNP-1, HNP-2 und HNP-3 antimikrobielle Aktivität gegen die Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und

Escherichia coli, gegen den Pilz *Cryptococcus neoformans* und sogar gegen das Virus Herpes Simplex Typ 1 aufweisen (Ganz et al., 1985). Als 1993 aus Neutrophilen des Rindes weitere antimikrobielle Peptide isoliert und untersucht wurden, die sich von den bis dahin bekannten klassischen Defensinen strukturell unterschieden, wurden diese als „*bovine neutrophil β -defensins*“ (BNBD) bezeichnet und somit in der Familie der β -Defensine zusammengefasst (Selsted et al., 1993). Zu dieser neuen Familie wurde auch das zwei Jahre zuvor aus der Trachea des Rindes isolierte „*tracheal antimicrobial peptide*“ (TAP) hinzugefügt, das damit das erste beschriebene β -Defensin darstellt (Diamond et al., 1991).

Allen bisher bekannten α -Defensinen und β -Defensinen sind ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt und kationische, hydrophobe und amphiphile Eigenschaften gemeinsam. Für die beiden Defensin-Familien charakteristisch sind auch die sechs hoch konservierten Cysteinreste. Der entscheidende Unterschied zwischen α - und β -Defensinen ist in der Verknüpfung der Disulfidbrücken zu finden. Die sechs Cysteine der α -Defensine sind in der Reihenfolge Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys5 zu Disulfidbrücken verknüpft (Selsted et al., 1989; Hill et al., 1991), während die Cysteine der β -Defensine in der Reihenfolge Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys6 miteinander verbunden sind (Tang et al., 1993; Zimmermann et al., 1995). Des Weiteren besitzen β -Defensine im Gegensatz zu α -Defensinen im N-terminalen Bereich vor dem β -Faltblatt noch eine α -Helix (Hoover et al., 2000; Sawai et al., 2001; Schibli et al., 2002). Im Gegensatz zu α -Defensinen, die hauptsächlich in Neutrophilen und Panethzellen exprimiert werden (Ganz et al., 1985; Wilde et al., 1989), sind β -Defensine vornehmlich in verschiedenen Epithelien, Keratinozyten, aber auch in Blutplasma und skelettaler Muskulatur zu finden (Bensch et al., 1995; Zhao et al., 1996; Harder et al., 1997; Valore et al., 1998; Garcia et al., 2001). NMR-Strukturanalysen zeigten, dass die humanen β -Defensine 1 und 2 (hBD1 und hBD2) in Lösung als Monomer, das hBD3 hingegen als Homodimer vorliegt (Schibli et al., 2002). Anhand von Röntgenstrukturanalysen einer anderen Studie wurde im Gegensatz dazu gezeigt, dass hBD2 Homodimere bildet, die sich wiederum zu Oktameren zusammenschließen (Hoover et al., 2000).

Auf genomischer Ebene wurde als erstes Defensin das HNP-1 (*DEFA1*), gefolgt von HNP-3 (*DEFA3*) auf dem Chromosom 8p23 lokalisiert (Sparkes et al., 1989; Linzmeier et al., 1993). In der gleichen Region wurden auch die Gene von hBD1 (*DEFB1*) und hBD2 (*DEFB2*) gefunden (Harder et al., 1997; Liu et al., 1997; Linzmeier et al., 1999). Weitere Analysen dieser Region führten zur Identifikation von hBD3 (*DEFB103A*) und hBD4 (*DEFB104A*) (Garcia et al., 2001; Garcia et al., 2001; Jia et al., 2001), sowie hBD5 (*DEFB105A*) und hBD6 (*DEFB106A*). Letztere kommen allerdings nur in der Epididymis (Nebenhoden) vor

(Yamaguchi et al., 2002). Allgemein scheinen die Mitglieder der Familie der β -Defensine hauptsächlich in einem Cluster auf Chromosom 8 lokalisiert zu sein, obwohl es auch Ausnahmen wie das mBD19 (*Defb19*) auf Chromosom 2 gibt (Yamamoto et al., 2002).

Die Gensequenz der β -Defensine ist durch zwei Exons charakterisiert. Exon 1 und die ersten Nukleotide von Exon 2 kodieren für das Signalpeptid, aufgrund dessen die β -Defensine sekretiert werden, während die Sequenz des Exon 2 für das sogenannte reife oder aktive β -Defensin kodiert (Liu et al., 1997; Liu et al., 1998; Garcia et al., 2001). Es wird diskutiert, dass neben der Signalsequenz noch ca. fünf weitere Aminosäuren des N-terminalen Endes proteolytisch entfernt werden und dass β -Defensine somit als Präpro-Peptide exprimiert werden (Valore et al., 1998). Seit kurzem wird allerdings kontrovers dazu diskutiert, dass nur ein Enzym, eine Signalpeptidase, für die Abspaltung des Signalpeptids verantwortlich sein könnte, und dass keine weitere Prozessierung des β -Defensins stattfindet (Beckloff et al., 2008).

Die bisher untersuchten Vertreter der β -Defensine werden nicht nur in unterschiedlichen Geweben oder Zellen exprimiert, sondern auch unterschiedlich reguliert. Während hBD1 in Epithelzellen konstitutiv produziert wird, ist die Expression der meisten anderen β -Defensine durch proinflammatorische Stimuli induzierbar (Russell et al., 1996; Harder et al., 1997; Diamond et al., 2000). Die Expression von hBD2 ist z. B. durch Bakterien, TNF und IL-1, nicht aber durch IFN γ induzierbar (Singh et al., 1998; Harder et al., 2004). Diese Induktion ist NF- κ B abhängig (Liu et al., 1998; Becker et al., 2000). Im Gegensatz zu hBD2 ist die Expression von hBD3 auch durch IFN γ und durch Hitze-inaktivierte Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* in Keratinozyten und im Epithel der Trachea induzierbar (Harder et al., 2001; Jia et al., 2001; Harder et al., 2004). Nach Stimulierung mancher *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), wie z. B. TLR2 mit Peptidoglykan, Zymosan oder Hitze-getöteter *Candida albicans*, TLR3 mit Poly (I:C) oder TLR4 mit LPS konnte ebenfalls eine gesteigerte hBD2-Expression nachgewiesen werden (Becker et al., 2000; Pivarcsi et al., 2005; Schaefer et al., 2005). Speziell für TLR2 konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Expression von hBD2 durch Stimulierung dieses Rezeptors mit *Haemophilus influenzae* von MyD88, IRAK, TRAF6 und schließlich auch p38MAPK abhängig ist (Lee et al., 2008).

Obwohl die Mitglieder der β -Defensin-Familie demnach strukturell viele Gemeinsamkeiten aufweisen, gehören ihr eine Vielzahl unterschiedlich regulierter und unterschiedlich wirksamer Peptide an, deren Funktionen größtenteils noch unbekannt sind.

1.3 Bedeutung der β -Defensine für die angeborene Immunantwort

Die erste beschriebene Eigenschaft von Defensinen, die auch für die Namensgebung verantwortlich war, ist ihre antimikrobielle Wirkung. Die Interaktion von Defensinen mit Bakterien führt zu einer Destabilisierung sowie Permeabilisierung und letztlich zu einer Zerstörung der Zellmembran (Lehrer et al., 1989). Versuche mit Hilfe der *Differential scanning* Mikrokalorimetrie zeigten, dass Defensine aufgrund ihrer hydrophoben Regionen in bakteriellen Membranen integrieren können, die mehr negativ geladene Phospholipide beinhalten als die Membranen der Klasse der Mammalia (Lohner et al., 1997). Diese Interaktion mit bakteriellen Zellmembranen, gezeigt am Beispiel des α -Defensins HNP-2, resultiert in der Bildung von Poren (Abb. 1) mit einem Durchmesser von 2,5 nm (Wimley et al., 1994).



Abb. 1: Permeabilisierung der inneren und äußeren Membran von *E. coli* nach Behandlung mit HNP-1 und -2. Ansammlung von elektronendichtem Material im Periplasma (Stern) und der äußeren Membran (Pfeile) nach 60 min Inkubation mit HNP-1 und -2 (Quelle: *Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity*, Lehrer et al., 1989).

Ebenso sind β -Defensine, wie z. B. hBD3, in der Lage, in der Zellmembran von z. B. *Staphylococcus aureus* Poren zu bilden. Die Perforation von Bakterien scheint jedoch von der Lipid-Zusammensetzung ihrer Zellmembran abhängig zu sein. Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Lipid-Zusammensetzung der Membran und der Empfindlichkeit gegenüber hBD3 hergestellt werden (Bohling et al., 2006). Die bakterizide Wirkung von hBD3 ist auch unter physiologischen Bedingungen zu messen (Harder et al., 2001). Die Perforation der Zellmembran ist aber offensichtlich nicht die einzige direkte Wirkungsweise, denn die Behandlung von *Candida albicans* zeigt zwar, dass hBD2 und

hBD3 die Zellmembran angreifen, dies aber in diesem Fall nicht ausreicht, um den Erreger zu töten. Zusätzlich scheint auch die Salzkonzentration v. a. von zweiwertigen Kalzium- und Magnesium-Ionen eine wichtige Rolle zu spielen. Der zugrunde liegende antimikrobielle Mechanismus ist aber noch unklar (Vylkova et al., 2007). Obwohl für hBD1 und hBD2 berichtet wurde, dass deren antibakterielle Wirkung mit physiologischen Salzkonzentrationen (Natriumchlorid) *in vitro* stark beeinträchtigt ist (Bals et al., 1998; Singh et al., 1998), konnte mittels einer hBD2-transgenen Mauslinie gezeigt werden, dass hBD2 seine antimikrobielle Aktivität *in vivo* entfalten kann (Huang et al., 2002). Weitere Hinweise für die antibakterielle Wirkung von β -Defensinen *in vivo* erbrachte die erste β -Defensin defiziente Maus, deren Gen für mBD1 (*Defb1*) deletiert wurde. Die antimikrobielle Wirkung des mBD1 ist zwar ebenfalls Salz-sensitiv, aber anhand der *Defb1*^{-/-} Mäuse konnte gezeigt werden, dass *in vivo* mBD1 eine antibakterielle Aktivität besitzt, da die mBD1 defizienten Mäuse eine signifikant erhöhte Menge an *Staphylococcus sp.* in der Blase bzw. dem Urin beherbergten (Morrison et al., 2002). Des Weiteren ist auch die antimikrobielle Aktivität gegenüber *Haemophilus influenzae* in der Lunge dieser Mäuse beeinträchtigt (Moser et al., 2002).

Somit stellen antimikrobielle Proteine allgemein und speziell β -Defensine aufgrund ihrer antimikrobiellen Aktivität eine wichtige Effektorfunktion des angeborenen Immunsystems dar. Sie gehören zur ersten Barriere an epithelialen Grenzflächen, die von Pathogenen überwunden werden muss.

Das Potenzial der β -Defensine beschränkt sich aber nicht nur auf die antimikrobielle Wirkung. Sie sind zusätzlich auch in der Lage, chemotaktisch auf antigenpräsentierende Zellen und Mastzellen zu wirken. Allgemein findet die Rekrutierung von Leukozyten entlang eines Gradienten von chemotaktischen Faktoren wie z. B. Chemokinen statt (Baggiolini, 1998; Zlotnik et al., 2000). Das hBD2 ist beispielsweise in der Lage, Mastzellen chemotaktisch über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und abhängig von Phospholipase C anzulocken (Niyonsaba et al., 2002). Diese rekrutierten Mastzellen werden durch hBD2 aktiviert, und es folgt die Degranulation und Ausschüttung von Histamin und Prostaglandin D₂ (Niyonsaba et al., 2001). Zudem induzieren hBD3 und hBD4 chemotaktische Aktivität von Monozyten bzw. Makrophagen (Garcia et al., 2001; Garcia et al., 2001). Besonders unreife dendritische Zellen, nicht aber reife DCs, reagieren auf hBD1-3 sowie mBD2 und mBD3 mit Chemotaxis. Versuche mit der Pro-Form und der aktiven Form der Defensine zeigten, dass diese aber hierfür als aktive Defensine vorliegen müssen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der CC-Chemokin-Rezeptor 6 (CCR6) notwendig ist für die durch

β -Defensine induzierte Chemotaxis (Yang et al., 1999; Biragyn et al., 2001; Yang et al., 2002). Offensichtlich können neben dem ursprünglich als Liganden von CCR6 beschriebenen CCL20 (Baba et al., 1997; Dieu et al., 1998) auch manche β -Defensine als Liganden fungieren. Die chemotaktische Aktivität der β -Defensine wird durch Zerstörung der Disulfidbrücken aufgehoben, obwohl die antimikrobielle Aktivität dabei erhalten bleibt. Daher scheint die Interaktion von β -Defensinen mit CCR6 von der korrekten Ausbildung der β -Defensin-Tertiärstruktur abhängig zu sein (Wu et al., 2003). Vergleicht man die anhand von NMR-Strukturanalysen ermittelten Tertiärstrukturen von hBD2 und CCL20, so erkennt man Gemeinsamkeiten, wie z. B. das dreisträngige antiparallele β -Faltblatt und die α -Helix. Letztere ist allerdings bei CCL20 am C-terminalen Ende zu finden (Perez-Canadillas et al., 2001; Sawai et al., 2001). Betrachtet man jedoch die Chemotaxis von Monozyten, wird klar, dass diese noch von mindestens einem weiteren, bisher unbekanntem Rezeptor induziert werden muss, da Monozyten keinen funktionellen CCR6-Rezeptor exprimieren (Yang et al., 1999; Yang et al., 2002)

Zusätzlich zum chemotaktischen Effekt auf CCR6 exprimierende unreife DCs kann mBD2 die phänotypische und funktionelle Reifung der DCs über TLR4 induzieren. Dies führt zur Expression von kostimulatorischen Molekülen und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-12, IL-1 α , IL-1 β und IL-6, entsprechend einem T_H1-Zytokinprofil (Biragyn et al., 2002).

Im Falle einer bakteriellen Infektion bekämpfen β -Defensine diese also im Rahmen der angeborenen Immunantwort sowohl direkt durch ihre antimikrobielle Aktivität als auch indirekt durch die Rekrutierung von antigenpräsentierenden Zellen. Über die Grenzen der angeborenen Immunität hinaus sind manche β -Defensine in der Lage, die angelockten DCs zu aktivieren und in Richtung einer T_H1-Immunantwort zu polarisieren. Aufgrund dieser Eigenschaft verbinden β -Defensine das angeborene Immunsystem mit der adaptiven Immunantwort.

1.4 Bedeutung der β -Defensine für die adaptive Immunantwort

Primär kann die Familie der β -Defensine als Komponente des angeborenen Immunsystems angesehen werden. Ihr Einfluss auf die Abwehr von Pathogenen ist aber nicht nur auf ihre antimikrobielle Aktivität und auf die Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems beschränkt, sondern reicht bis zu den Zellen des adaptiven Immunsystems. So konnte gezeigt werden, dass hBD2 ebenso chemotaktisch auf CCR6⁺ CD4⁺ CD45RO⁺ T-Zellen wirken kann (Yang et al., 1999).

In einem Maus-Modell der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) konnte gezeigt werden, dass mBD2 einen Anti-Leukämie-Effekt aufweist. Dabei verstärkt mBD2 die Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie die zytotoxische Aktivität sowohl von NK-Zellen als auch von CD8⁺ T-Zellen (Ma et al., 2006). Die Kombination von mBD2 und IL-18, einem wichtigen Zytokin bei der Entwicklung einer T_H1-Immunantwort (Micallef et al., 1996), konnte die Bekämpfung der Leukämie in diesem Modell noch verbessern und zusätzlich vor einer erneuten Etablierung der Leukämie schützen (Xu et al., 2007).

Im Rahmen einer Vakzinierung können β -Defensine auch als Adjuvans für eine effektive humorale Immunantwort verantwortlich sein. In einer Studie wurde die cDNA von mBD2 mit der cDNA von gp120, dem Glykoprotein 120 des HIV-1, fusioniert und damit DNA-Immunisierungen durchgeführt. Daraufhin wurden hohe Titer virusneutralisierender Antikörper nachgewiesen, ebenso wie eine Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen. Beide Effekte traten jedoch nur bei der DNA-Immunisierung mit dem Fusionskonstrukt auf, nicht aber, wenn mBD2 und gp120 einzeln als lösliche Proteine appliziert wurden (Biragyn et al., 2002). Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass Mäuse, die gleichzeitig mit OVA und hBD1 oder hBD2 immunisiert wurden, signifikant höhere OVA-spezifische IgG-Spiegel im Serum aufwiesen, als Mäuse, die ausschließlich mit OVA immunisiert wurden (Brogden et al., 2003). Sowohl ein hoher Antikörper-Titer als auch die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen sind wichtige Abwehrmechanismen in der Bekämpfung von Virusinfektionen, die in den beschriebenen Studien durch β -Defensine oder deren Fusionskonstrukte induziert werden konnten.

1.5 Erkrankungen im Zusammenhang mit β -Defensinen

Da β -Defensine sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle spielen, können sich Fehlfunktionen z. B. in der Genregulation oder der Proteinbiosynthese im Zusammenhang mit β -Defensinen z. T. schwerwiegend auf die Immunantwort des betroffenen Organismus auswirken.

1.5.1 Psoriasis und atopische Dermatitis

Ursprünglich wurde die Expression von hBD2 in Biopsien der Haut von Patienten mit Psoriasis nachgewiesen (Harder et al., 1997; Liu et al., 1998; Schroder et al., 1999). Psoriasis, auch Schuppenflechte genannt, ist eine erbliche Autoimmunerkrankung, die eine nicht-infektiöse entzündliche Hautreaktion darstellt und übermäßiges Wachstum der Keratinozyten und somit Schuppenbildung zur Folge hat. Im Vergleich zu Biopsien von Patienten mit atopischer Dermatitis oder gesunden Personen ist die hBD2-Expression, aber auch die Expression von CCR6 signifikant erhöht (Li et al., 2004; Gambichler et al., 2008). Aufgrund der antibakteriellen Wirkung und einer CCR6-abhängigen chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten durch hBD2, könnte dies auch ein Grund dafür sein, warum an Psoriasis erkrankte Hautpartien seltener bakterielle Infektionen erleiden (Christophers et al., 1987). Trotzdem können aus Psoriasis-Biopsien häufig Keime wie *Staphylococcus sp.* oder *Streptococcus sp.* isoliert werden, die auch die gesunde Haut besiedeln, und es wird diskutiert, dass *Staphylococcus aureus* in den betroffenen Hautregionen infizierter Patienten ein Superantigen produziert, das eine starke T_H1 -Immunantwort auslösen könnte. Jedoch konnten innerhalb dieser Studie in Psoriasis-Biopsien der meisten untersuchten Patienten keine Superantigen exprimierenden *S. aureus* Keime nachgewiesen werden (Sayama et al., 1998). Im Gegensatz dazu hemmen mehrere Superantigene von *Streptococcus sp.* wiederum die T_H1 -Immunantwort gegenüber Superantigenen von *S. aureus* in Psoriasis-Patienten (Horiuchi et al., 1998; Noble, 1998).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte außerdem, dass mit steigender Kopienzahl von β -Defensin-Genen im Genom von Psoriasis-Patienten das Risiko für eine Erkrankung an Psoriasis steigt (Hollox et al., 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass hBD2 in Keratinozyten dosisabhängig die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-18 stark erhöht (Sampantharak et al., 2005). IL-18 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung

einer proinflammatorischen Immunantwort, indem es die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie z. B. $\text{IFN}\gamma$ in $\text{T}_{\text{H}1}$ -Lymphozyten stimuliert (Micallef et al., 1996). Diese $\text{T}_{\text{H}1}$ -Immunantwort ist maßgeblich an der entzündlichen Ausprägung dieser Krankheit beteiligt (Lew et al., 2004). Folglich könnte hBD2 einerseits an der bakteriellen Abwehr in den entzündeten Hautpartien beteiligt sein, andererseits aber wegen seiner stimulatorischen Wirkung auf die $\text{T}_{\text{H}1}$ -Immunreaktion auch einen großen Einfluss auf die überschießende Entzündungsreaktion im Krankheitsverlauf haben.

In der atopischen Dermatitis konnte ebenfalls eine veränderte Expression von β -Defensinen in den betroffenen Hautregionen festgestellt werden. Die atopische Dermatitis, auch bekannt als Neurodermitis, weist eine ähnliche Symptomatik wie Psoriasis auf. Die Expression von hBD2 ist hier im Vergleich zu Psoriasis deutlich reduziert, verglichen mit gesunder Haut aber immer noch erhöht, während die Expression von hBD1 wiederum relativ gering ausfällt. Nach einer Behandlung der betroffenen Hautpartien mit UVB-Bestrahlung konnte eine signifikante Erhöhung der hBD1-Expression und Verringerung der hBD2-Expression in Korrelation mit einer Reduktion der Läsionen festgestellt werden, während sich die Produktion von hBD3 nicht veränderte (Ong et al., 2002; Gambichler et al., 2006; Gambichler et al., 2008). In der atopischen Dermatitis scheint hBD3 durch die Expression von Zytokinen der $\text{T}_{\text{H}2}$ -Immunantwort, wie z. B. IL-4, IL-10 und IL-13 herunterreguliert und damit eine effiziente Bekämpfung von *S. aureus* verhindert zu werden (Howell et al., 2005; Howell et al., 2006; Kisich et al., 2008). Neben der verminderten Expression von antimikrobiellen Peptiden konnte auch eine verminderte Produktion der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS) sowie proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF, $\text{IFN}\gamma$ und IL-1 β , in den Läsionen bei atopischer Dermatitis nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür scheint ebenfalls die Expression der $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zytokine zu sein, da diese die Produktion der antimikrobiellen Peptide und der proinflammatorischen Zytokine unterdrücken (Nomura et al., 2003). In der atopischen Dermatitis ist offensichtlich die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, β -Defensinen und weiteren antimikrobiellen Peptiden infolge einer $\text{T}_{\text{H}2}$ -Immunreaktion stark gehemmt. Daher scheint eine Infektion der betroffenen Haut, deren natürliche Barriere in den Läsionen nicht mehr intakt ist, durch Bakterien, Viren oder Pilze begünstigt zu sein. Ein möglicher immunregulatorischer Effekt von β -Defensinen wie in der Psoriasis, der über eine antimikrobielle Wirkung hinausgeht, wurde im Zusammenhang mit atopischer Dermatitis bislang nicht beschrieben.

1.5.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Unter diesem Begriff sind chronische Entzündungen des Darmes zusammengefasst, deren bekannteste Vertreter Colitis ulcerosa und Morbus Crohn darstellen. Während die Entzündung in der Colitis ulcerosa im Rektum beginnt und sich auf das ganze Kolon erstrecken kann, ist Morbus Crohn vom Rektum über Ileum bis hin zur Mundhöhle segmental vorzufinden, d. h. es können mehrere Bereiche gleichzeitig entzündet sein, die von gesunden Bereichen unterbrochen werden. Die Ursachen für diese Darmerkrankungen sind bislang weitestgehend unbekannt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass sich die mukosale Immunantwort im Zuge der chronischen Entzündung des Darmes gegen die üblichen luminalen Bakterien richtet. Dafür spricht die Beobachtung, dass Mäuse, die defizient für IL-2 oder IL-10 sind, nur eine experimentelle Kolitis entwickelten, wenn sie unter unsterilen Bedingungen gehalten wurden. Mäuse, die unter sterilen Bedingungen gehalten wurden, entwickelten keine experimentelle Kolitis (Sellon et al., 1998). Des Weiteren konnte in Seren von Morbus Crohn Patienten eine Immunreaktivität gegenüber Darmbakterien und Autoantigenen festgestellt werden. Dies unterstützt einerseits die These, dass entzündliche Darmerkrankungen durch eine gestörte Toleranz gegenüber luminaler Bakterien verursacht wird, andererseits deuten Antikörper gegen Autoantigene aber auch auf eine Autoimmunerkrankung hin (Landers et al., 2002). Offensichtlich besteht jedoch auch ein Zusammenhang zwischen diesen Darmerkrankungen und der Expression von β -Defensinen. In der Lamina propria des entzündeten Kolons von Colitis ulcerosa Patienten wurden im Vergleich zu Morbus Crohn oder gesundem Kolon mehr Plasmazellen gefunden, die vermehrt hBD2 exprimieren (Rahman et al., 2007). Zusätzlich zur verstärkten Expression von hBD2 wurde auch eine erhöhte Produktion von hBD3 und hBD4 in der entzündeten Kolon-Mukosa von Colitis ulcerosa Patienten nachgewiesen (Fahlgren et al., 2004; Chang et al., 2008; Li et al., 2008). Es wird davon ausgegangen, dass hier die Expression der β -Defensine infolge der verstärkten Produktion proinflammatorischer Zytokine erhöht ist (McDermott et al., 2003; Tsutsumi-Ishii et al., 2003; Pioli et al., 2006).

Auf genomischer Ebene konnte gezeigt werden, dass das Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken, von der Kopienzahl des hBD2-Gens abhängig ist. Gesunde Personen oder Personen mit Colitis ulcerosa haben eine durchschnittliche Anzahl von 4 oder mehr Kopien, Personen mit Morbus Crohn besitzen dagegen durchschnittlich 3 oder weniger Kopien des hBD2-Gens. Darüber hinaus korreliert die reduzierte Anzahl der hBD2-Kopien im Genom von Morbus Crohn Patienten mit der verminderten Expression von hBD2 in der Mukosa

(Fellermann et al., 2006). Neben der Anzahl der Genkopien des hBD2 spielt aber auch die Aktivierung der Expression von hBD2 eine wichtige Rolle. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Aktivierung des intrazellulären *Pattern-recognition*-Rezeptors NOD2/CARD15 durch Muramyldipeptid (MDP), einem Bestandteil des Peptidoglykans, die Expression von hBD2 induziert. Die Expression von hBD2 ist mit NOD2/CARD15, welches eine 3020insC *frameshift*-Mutation enthält und nicht mehr auf die Stimulierung mit MDP anspricht, beeinträchtigt (Girardin et al., 2003; Voss et al., 2006) und korreliert mit einer erhöhten Anfälligkeit für Morbus Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Eine beeinträchtigte Stimulierung des NOD2/CARD15 im intestinalen Epithel durch bakterielle Produkte führt also möglicherweise zu einer verminderten Produktion antimikrobieller Peptide, wie z. B. hBD2, und kann damit aufgrund der eingeschränkten Abwehr zu einer chronischen Entzündung des Darms führen. Basierend auf dieser Möglichkeit wird derzeit diskutiert, dass Morbus Crohn aufgrund der beeinträchtigten chemischen Barriere ein „Defensin-Mangelsyndrom“ sei, d. h. die verminderte Expression von Defensinen könnte für die Erkrankung mitverantwortlich sein (Fellermann et al., 2003; Wehkamp et al., 2005; Dann et al., 2007).

1.5.3 *Helicobacter pylori*-induzierte Gastritis

Als weitere Erkrankung im gastrointestinalen Bereich ist die Infektion mit *Helicobacter pylori* und der damit assoziierten Entstehung einer Gastritis oder von *Ulcus ventriculi*, dem Magenulkus, zu nennen. Mitte der 1980er Jahre konnten B. Marshall, J. R. Warren und C. S. Goodwin dieses Bakterium aus Biopsien von Magenulkus kultivieren und identifizieren. Es zeigte sich, dass *H. pylori*, damals noch als *Campylobacter pyloridis* bezeichnet, in den meisten Fällen für eine persistierende Magenschleimhautentzündung verantwortlich gemacht werden kann (Marshall et al., 1984; Goodwin et al., 1987). Da eine chronische Infektion mit *H. pylori* einen Risikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms oder MALT-Lymphoms darstellt, wurde es 1994 von der WHO als kanzerogen eingestuft.

Epithelzellen des Magens exprimieren *in vitro* und *in vivo* nach Infektion mit *H. pylori* in erhöhtem Maße hBD2 und hBD3, während die Expression von hBD1 unbeeinflusst bleibt (O'Neil et al., 2000; Bajaj-Elliott et al., 2002; George et al., 2003; Wehkamp et al., 2003). Die verstärkte hBD2-Expression findet in Abhängigkeit von der Stimulierung des *Pattern-recognition*-Rezeptor NOD1 sowie durch die Stimulierung von Magenellen mit *H. pylori*, welcher die sogenannte Pathogenitätsinsel *cag* trägt, statt (Wada et al., 1999; Boughan et al.,

2006). Außerdem konnte die durch *H. pylori* induzierte hBD2-Produktion auf die Aktivierung von NF- κ B zurückgeführt werden (Wada et al., 2001). Sowohl hBD2 als auch hBD3 weisen gegen dieses Pathogen eine bakterizide Wirkung auf (Hamanaka et al., 2001; Kawauchi et al., 2006). Überdies konnte in immunhistochemischen Versuchen mit Magen-Biopsien eine Kolo-kalisation des hBD2 und des *H. pylori* in der infizierten Magenschleimhaut nachgewiesen werden. In Biopsien, die nach Eradikation des Pathogens entnommen wurden, war die Expression des hBD2 wieder stark reduziert (Hamanaka et al., 2001). Daraus ergibt sich, dass β -Defensine wichtige Effektormoleküle darstellen, welche die Bakterienlast in der Magenschleimhautentzündung in Grenzen halten können.

1.5.4 Erkrankungen der Lunge

Die kontinuierliche Exposition des respiratorischen Epithels gegenüber Pathogenen, die mit der Luft eingeatmet werden, erfordert besondere Abwehrmechanismen. Antimikrobielle Proteine spielen gerade hier als erste Maßnahme zur Bekämpfung der Keime eine wichtige Rolle. Neben Cathelicidinen, die eine weitere Gruppe antimikrobieller Proteine darstellen (Gallo et al., 1997; Bals et al., 1998), sind hier β -Defensine zu nennen, die zahlreich im respiratorischen Epithel exprimiert werden (Goldman et al., 1997; Bals et al., 1998; Bals et al., 1999; Garcia et al., 2001; Harder et al., 2001).

Bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* konnte eine verstärkte Expression von β -Defensinen im respiratorischen Gewebe aber auch im Serum nachgewiesen werden (Hiratsuka et al., 1998; Hiratsuka et al., 2003; Ishimoto et al., 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bakterielles Lipoprotein über TLR-2 und LPS über TLR4 die Expression von β -Defensinen induzieren (Morrison et al., 1999; Birchler et al., 2001; MacRedmond et al., 2005). Wird die Expression von antimikrobiellen Peptiden in Lungenepithelzellen durch anti-inflammatorische Zytokine der T_H2 -Immunantwort reduziert, kann dies die Abwehr von Pathogenen stark beeinträchtigen (Beisswenger et al., 2006).

Ein Beispiel für eine eingeschränkte Abwehr stellt die Zystische Fibrose dar. Die Ursache für diese Krankheit ist eine Mutation im Gen des Chloridkanals CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Die resultierende Fehlfunktion bedingt eine veränderte Zusammensetzung der Sekrete aller exokriner Drüsen. Das Sekret der Atemwegsepithelzellen von Patienten, die an dieser Krankheit leiden, weist eine übermäßig

hohe Salzkonzentration auf, die Salz-sensitive β -Defensine inaktiviert und somit die Bekämpfung von *P. aeruginosa* stark beeinträchtigt (Goldman et al., 1997).

Ebenso konnte bei Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* eine gesteigerte Expression von β -Defensinen in Lungenepithelzellen und alveolaren Makrophagen in humanem Biospiematerial nachgewiesen werden. Im entsprechenden Maus-Modell ist die Expression von mBD3 und mBD4 ebenfalls induziert. Zudem ist hBD2 nicht nur in der Lage an die Membran von *M. tuberculosis* zu adhären, sondern wirkt auch antimikrobiell gegenüber *M. tuberculosis* (Kisich et al., 2001; Rivas-Santiago et al., 2005; Rivas-Santiago et al., 2008).

1.5.5 Die β -Defensine im Tumorwachstum

Tumoren sind Gewebeveränderungen, die aufgrund ihres Wachstumsverhaltens und des Gewebes, in dem sie entstehen, unterschieden werden. In Abhängigkeit von ihrer Fähigkeit, Metastasen zu bilden, unterscheidet man benigne, maligne und semimaligne Tumoren. Da Tumoren aus entarteten körpereigenen Zellen entstehen, ist das Immunsystem in besonderem Maße gefordert, diese zu erkennen und zu bekämpfen. Als chemotaktische Faktoren zur Rekrutierung von dendritischen Zellen und Subpopulationen von T-Zellen können β -Defensine hierbei die adaptive Immunantwort unterstützen (Yang et al., 1999). Am Beispiel des Lungenkarzinoms konnte gezeigt werden, dass im Serum der betroffenen Patienten mehr hBD1- und hBD2-Protein nachgewiesen werden konnte (Arimura et al., 2004). In unterschiedlichen Maus-Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass mBD2 und mBD3, die mit einem nicht immunogenen Tumorantigen fusioniert wurden, einerseits chemotaktisch auf unreife dendritische Zellen wirken und andererseits eine humorale Antwort gegen das Tumorantigen induzieren und somit einen protektiven Effekt gegenüber erneutem Tumorwachstum induzieren können (Biragyn et al., 2001; Biragyn et al., 2002; Wang et al., 2007).

Ebenso ist mBD29 in der Lage, abhängig von CCR6 chemotaktisch auf unreife dendritische Zellen zu wirken. Im Tumor führt jedoch die Expression von mBD29 bei gleichzeitig verstärkter Expression von VEGF α in Abhängigkeit von den mittels CCR6-abhängiger Chemotaxis rekrutierten dendritischen Zellen zu vermehrter Vaskularisation und damit zu einem besseren Wachstum des Tumors (Conejo-Garcia et al., 2004).

1.6 Ziel der Arbeit

Defensine sind wirtseigene, antimikrobielle Peptide, die eine wichtige Rolle in der angeborenen antimikrobiellen Immunantwort spielen. Aufgrund der Anordnung ihrer Disulfidbrücken werden die Defensine in α - oder β -Defensin-Subklassen unterteilt. Alle bisher bekannten Mitglieder der β -Defensine besitzen das Potenzial, bestimmte Arten von Bakterien, Viren und Pilzen zu töten und werden generell als Effektormoleküle der antimikrobiellen Immunantwort verstanden. Zusätzlich zum antimikrobiellen Effekt dieser Peptide wurde kürzlich für einige Mitglieder der humanen β -Defensin-Familie (hBD3 und hBD4) die Fähigkeit zur Verstärkung einer lokalen Entzündungsreaktion sowie zur Initiierung und Verstärkung der systemischen, adaptiven Immunantwort beschrieben. Diese beiden Funktionen scheinen durch die Bindung der β -Defensine an den Chemokinrezeptor CCR6 auf antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten vermittelt zu sein.

Wir haben ein neues Mitglied der β -Defensin-Familie in der Maus identifiziert (mBD14), welches ortholog zu hBD3 ist. Zunächst sollte das Expressionsmuster von mBD14 in verschiedenen Zellpopulationen sowie unterschiedlichen Mausgeweben bestimmt werden. Daran anschließend sollte die transkriptionelle Regulation der mBD14-Expression durch unterschiedliche Stimulanzen, wie z. B. proinflammatorische Zytokine sowie Liganden verschiedener *Pattern-recognition*-Rezeptoren, untersucht werden.

Zudem sollte die antimikrobielle Effektorfunktion von mBD14 bestimmt werden. Hierfür sollte die antimikrobielle Aktivität des rekombinant exprimierten mBD14:Ig-Fusionsproteins gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien untersucht werden.

Neuste Arbeiten zeigen, dass β -Defensine zusätzlich zu ihrer antimikrobiellen Wirkung in der Lage sind, mittels des Chemokinrezeptors CCR6 chemotaktisch antigenpräsentierende Zellen und Lymphozyten zu rekrutieren und somit Einfluss auf die angeborene und adaptive Immunantwort zu nehmen. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, inwieweit mBD14 in der Lage ist, mit dem CCR6-Rezeptor zu interagieren und welche Rolle eine mögliche Interaktion mit CCR6 in der Immunregulation spielt. Hierfür sollte einerseits eine CCR6 überexprimierende Zelllinie hergestellt werden und mittels durchflusszytometrischer Methoden die Bindung von mBD14 an CCR6 analysiert werden. Andererseits sollte eine mögliche Interaktion anhand von Chemotaxisversuchen mit CCR6 exprimierenden Zellen charakterisiert werden.

Aufgrund der durch mBD14 induzierten chemotaktischen Aktivität gegenüber CCR6-exprimierenden Zellen, sollten die biologischen Konsequenzen dieser chemotaktischen Wirkung in Bezug auf das Tumorwachstum in einem syngenem Fibrosarkom-Tumormodell überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	PAN Biotech, Aidenbach
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose, <i>electrophoresis grade</i>	Bio&SELL, Nürnberg
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA Standard 100 bp / 1 kb Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach
Hygromycin B	PAA Laboratories, Cölbe
Insect-Xpress™ FertigmEDIUM	Lonza, Köln
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ketaminhydrochlorid 5 %	WDT, Garbsen
LPS (<i>Salmonella enterica</i> Serotyp abortus equi)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver Frema Reform	Granovita, Lüneburg
Molecular Weight Marker X und XIV	Roche Diagnostics, Mannheim
N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine hydrate (MDP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neomycin (G418/G420)	PAN Biotech, Aidenbach
NOWA Solution A und B	MoBiTec, Göttingen

Nukleasefreies Wasser	Promega, Mannheim
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Metabion, Martinsried
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
Poly (I:C)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Precision Plus Protein All Blue Standard	Bio-Rad Laboratories, München
Rinderserum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe
RNase-ExitusPlus™	AppliChem, Darmstadt
RPMI 1640 Fertigmedium	PAN Biotech, Aidenbach
TRIZOL® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
Tween®20	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylacinhydrochlorid 2 %	CP-Pharma, Burgdorf

Nicht aufgeführte laborübliche Lösungsmittel und Feststoffe wurden von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München
Dialysemembran Typ 20	Biomol, Hamburg
Eindeckmedium Entellan®	Merck, Darmstadt
Eppendorfcups (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen BD Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg
Fettstift DakoCytomationPen	Dako Deutschland, Hamburg
Gel-Blotting-Papier Whatman®	A. Hartenstein, Würzburg
Gewebekulturschalen	Greiner BIO-ONE, Frickenhausen
HiTrap™ Protein G HP Sepharosesäule	GE Healthcare, München
Kanülen BD Microlance™3	BD Biosciences, Heidelberg
Killik Einbettmedium	Bio-Optica, Milano, I
Korkplättchen	BioVendor, Heidelberg
Kryoröhrchen Cryo Tubes™	Nunc, Langenselbold

MACS Separation Columns 25 MS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikrotiterplatten MicroWell	Nunc, Langenselbold
Multiwell-Platten	BD Biosciences, Heidelberg
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polycarbonat-Filtermembran (5 µm, 10 µm)	Osmonics, Livermore, CA, USA
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
PVDF Transfermembran Immobilon™	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Greiner BIO-ONE, Frickenhausen
Serologische (sterile) Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sigma Fast™ Substrat für alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spritzen (steril)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter Bottle Top 75 mm Nalgene®	Nunc, Langenselbold
Zellkulturflaschen BD Falcon™ (25, 75 und 175 cm ²)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellsieb Cell Strainer 40 µm (Nylon) BD Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.3 Oligonukleotide

Sämtliche in PCR-Reaktionen verwendete Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) in einer Konzentration von 100 µM bezogen. Die Primer wurden in der PCR-Reaktion, soweit nicht anders angegeben, in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt, so dass pro Ansatz und Primer 10 pmol vorhanden waren. Schnittstellen von Restriktionsenzymen wurden hervorgehoben.

In Stimulierungen eingesetzte CpG- oder GpG-Oligonukleotide wurden lyophilisiert von Metabion (Martinsried) bezogen und mit sterilem und LPS-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt.

Die *accession numbers* zu den jeweiligen ORFs lauten: hBD2 NM_004942, hBD3 NM_018661, mBD4 NM_019728, mBD14 NM_183026, mCCL20 NM_016960 und MIP-2 NM_009140.

Oligonukleotid	Sequenz
Klonierungen und mRNA-Expression	
mBD14 Start	5' GAAGCAGTCAACTATGAGGC 3'
mBD14 Stop	5' GAGTCAGGGTCTTCTACTTC 3'
mBD14 pMT 5' BglII	5' GGAAGATCTCGAAAATTTTCTGCAGAATAAGA GGT 3'
mBD4 pMT 5' BglII	5' CCCAGATCTAATCCAATAACATGCATG 3'
hBD2 pMT 5' BglII	5' CCCAGATCTGTTACGTGCCTGAAAAGCGG 3'
hBD3 pMT 5' BglII	5' CCCAGATCTCAGAAATACTACTGCCGTG 3'
mCCL20 pMT 5' BglII	5' CCCAGATCTATGGCCTGCGGTGGCAAGCG 3'
mBD14 SIg+ 5' HindIII	5' CCCAAGCTTCGAAAATTTTCTGCAGA 3'
mBD14 SIg+ 3' BamHI	5' CCCGGGATCCGCCTTCTTCTTCGGCAGCA 3'
mBD4 SIg+ 5' HindIII	5' CCCAAGCTTAATCCAATAACATGCATG 3'
mBD4 SIg+ 3' BamHI	5' CGGGATCCGCTTTATCTTACAGCATCTG 3'
hBD2 SIg+ 5' HindIII	5' CCCAAGCTTGTTACGTGCCTGAAAAGC 3'
hBD2 SIg+ 3' BamHI	5' CGGGGATCCGCCGTTTCTTACAACACTTG 3'
hBD3 SIg+ 5' HindIII	5' CCCAAGCTTCAGAAATACTACTGCCGTG 3'
hBD3 SIg+ 3' BamHI	5' CGGGGATCCGCTTTTTTACGACGGCAGCA 3'
mCCL20 SIg+ 5' NheI	5' GCTAGCATGGCCTGCGGTGGCAAGCG 3'
mCCL20 SIg+ 3' BamHI	5' CGGGGATCCGCCATCTTCTTGACTCTTAGG 3'
mBD14pr pGL4 5' SacI	5' GGGGGGGAGCTCTTAGAAAGGCCTCTCAGA 3'
mBD14pr pGL4 3' XhoI	5' CCCCTCGAGAGTTGACTGCTTCCCAACAAGCTGAG ACTGGG 3'
Hygromycin B 5'	5' GAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCG 3'
Hygromycin B 3'	5' TCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTCT 3'
human-Ig pMT 3' NotI	5' CGCGGCCGCCATCATTACCCGGAGACAGG 3'
MIP-2 5' BamHI	5' GGGGGATTCGCCATGGCCCCTCCACCTGCCG 3'
MIP-2 3'	5' TCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTTCAGTATCTT 3'
Real Time PCR	
mBD14 5'	5' GTATTCCTCATCTTGTCTTGG 3'
mBD14 3'	5' AAGTACAGCACACCGGCCAC 3'
Haushaltsgene	
GAPDH 5'	5' ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACGG 3'
GAPDH 3'	5' TTAATCCTTGGAGGCCATGTAGG 3'

β-Aktin 5'	5' AATCCTGTGGCATCCATGAAAC 3'
β-Aktin 3'	5' CGCAGCTCAGTAACAGTCCG 3'
18S rRNA 5'	5' GTAACCCGTTGAACCCCAT 3'
18S rRNA 3'	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'
Oligonukleotide für Stimulierungen	
CpG ODN 1668	5' TCCATGACGTTTCCTGATGCT 3'
GpG ODN 1668	5' TCCATGAGGTTTCCTGATGCT 3'
Sequenzierprimer	
T7 forward	5' AATACGACTCACTATAG 3'
BGH reverse	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'
MT forward	5' CATCTCAGTGCAACTAAA 3'

Die Primer für quantitative Realtime-PCR für MIP-2 (Katalog-Nummer: PPM02969E) und VEGF α (Katalog-Nummer: PPM03041E) wurden von SABiosciences (Frederick, MD, USA) bezogen.

2.1.4 Plasmide

pcDNA3.1 Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pCoHygro Hygromycin-Resistenzplasmid	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM [®] -T Easy Vektor für Zwischenklonierungen	Promega, Mannheim
pGL4.11 Firefly Luciferase Reporter Vektor	Promega, Mannheim
phRL-TK Renilla Luciferase Vektor	Promega, Mannheim
pMT / BiP / V5-His A Proteinexpressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
Signal pIgplus (SIg+) Proteinexpressionsvektor	R&D, Wiesbaden

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Collagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I	Promega, Mannheim
GoTaq [®] Hot Start Polymerase	Promega, Mannheim

iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
Pronase E	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Antikörper

Anti human IgG (H+L) HRP, PE oder APC (Esel)	Dianova, Hamburg
Anti Maus CCR6, Klon 140706 (Ratte)	R&D, Wiesbaden
Anti Maus CD4 PerCP, Klon RM4-5 (Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti Maus CD8a PerCP oder biotinyliert, Klon 53-6.7 (Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti Maus CD11c PE, Klon N418 (Hamster)	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti Maus CD19 MicroBeads (MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach
Anti Maus CD31, Klon MEC 13.3 (Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti Maus CD45R/B220 PE, PerCP oder biotinyliert, Klon RA3-6B2 (Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti Maus CD80 biotinyliert, Klon 16-10A1 (Hamster)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti Maus CD86 FITC, Klon GL1 (Ratte)	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti Maus MHCII APC, Klon M5/114.15.2 (Ratte)	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach
Anti Ratte IgG (H+L) Alexa 488 (Ziege)	Molecular Probes® Invitrogen, Karlsruhe
Anti Ratte IgG AP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti V5 Antibody HRP (Maus)	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin APC, PE, PerCP	BD Biosciences, Heidelberg

Als entsprechende Kontrollen wurden IgG1, IgG2a oder IgG2b κ Isotyp-Kontrollen aus der Ratte oder dem Hamster von BD Biosciences (Heidelberg) verwendet.

2.1.7 Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Mycoplasma Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
pGEM®-T Easy Vector System	Promega, Mannheim
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems	Promega, Mannheim

2.1.8 Puffer und Lösungen

ABA-Puffer	16 mM Na ₂ HPO ₄ 5 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 150 mM NaCl 1 % LB-Medium
ACK-RBC Hämolysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA pH 7,4
Coomassie-Entfärbelösung (SDS-PAGE)	10 % Essigsäure 40 % Ethanol

Coomassie-Färbelösung (SDS-PAGE)	10 % Essigsäure 40 % Ethanol 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250
Einfriermedium für Zellen (2 x)	20 % DMSO 80 % FKS
Elutionspuffer für HiTrap™ Protein G Säule	0,1 M Glycin pH 2,5
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
FACS-Puffer	2 % FKS in PBS
Gewebe-Lysepuffer	100 mM Tris, pH 8,5 1 mM EDTA, pH 8 500 mM NaCl 1 % SDS
Kupfersulfat-Stammlösung	0,5 M CuSO ₄
Lämmli-Auftragspuffer (SDS-PAGE, 4 x)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 40 % Glycerin 0,04 % 2-Mercaptoethanol 4 % SDS 0,005 % Bromphenolblau
Lämmli-Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE, 5 x)	15,1 g Tris-Base 72 g Glycin 5 g SDS H ₂ O _{bidest} ad 1 l

Loading Dye 6 x	40 g Saccharose 250 mg Bromphenolblau 250 mg Xylencyanol H ₂ O _{bidest} ad 1 l
MACS-Puffer (entgast)	0,5 % BSA 2 mM EDTA in PBS pH 7,3
Methylgrün-Lösung	0,1 M Natriumacetat, pH 4,2 0,5 % Methylgrün
Neutralisationspuffer für HiTrap™ Protein G Säule	1 M Tris-HCl pH 9,0
PBS (pH 7,3)	137 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
Pronase E Lösung	100 mg Pronase 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM NaCl in 10 ml H ₂ O _{bidest} 1 h bei 37° C voraktiviert
Proteinase K Lösung	10 µg Proteinase K 10 mM Tris, pH 8,0 10 mM NaCl 1 % Triton® X-100 10 mM EDTA 1 % SDS in 500 µl H ₂ O _{bidest}

TAE-Puffer	40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA
TBS-Puffer	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,5
TBS-T	TBS mit 0,05 % Tween®20
Tris-Puffer für SDS-PAGE	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 und 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
Trypanblau-Lösung	0,16 % (w/v) Trypan-Blau 150 mM NaCl pH 7,4
Westernblot-Puffer (10 x)	2 M Glycin 250 mM Tris

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

2.1.9 Geräte

Analysenwaage CP 224S	Sartorius, Göttingen
Bakterienschüttler mit Heizhaube	Vitaris, Baar, CH
BD LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Begasungsbrutschrank Cell Safe	Integra Biosciences, Fernwald
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Proteinaufreinigungsanlage Bio-Rad Econo System	Bio-Rad Laboratories, München
Emax Microplate Reader	Molecular Devices, München
FACSAria™ Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg

Fastblot B34	Biometra, Göttingen
Filmentwickler Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg
Filmkassette 18 x 24 cm	Siemens, München
Geldokumentation GeneGenius	Syngene, Cambridge, UK
Gelkammern Sub-Cell® GT	Bio-Rad Laboratories, München
Geltrockner Slab Dryer Model 483	Bio-Rad Laboratories, München
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
iQ™ 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, München
Kryostat CM3050 S	Leica Microsystems, Wetzlar
Luminometer Fusion™	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Mikro-Chemotaxiskammer (48-Loch)	NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA
Mikroskop Leitz Diaplan	Ernst Leitz Wetzlar, Wetzlar
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Netzgerät PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories, München
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
PCR-Gerät My Cycler™	Bio-Rad Laboratories, München
pH-Meter Inolab	WTW, Weilheim
Pipettensatz (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Accu-Jet® Pro	Brand, Wertheim
Schieblehre	Kern, Balingen-Frommern
SDS-Gelkammer Mini-Protean Tank	Bio-Rad Laboratories, München
Sterilbank HERAsafe® KS	Thermo Scientific, Langenselbold
Stickstofftank MVE 810 Eterne / MVE Euro Cyl	German-Cryo, Jülich
ThermoShaker TS-100	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin, Mörfelden-Walldorf
Ultrazentrifuge Sorvall® RC6	Thermo Scientific, Langenselbold
Vakuumentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortex MS2 Minishaker	IKA®, Staufen
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Gießen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.1.10 Bakterienstämme

<i>Bacillus subtilis</i> (Gram-positiv)	ATCC 6633
<i>Escherichia coli</i> (Gram-negativ)	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i> DH10B (Gram-negativ)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram-negativ)	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positiv)	ATCC 25923

Alle hier verwendeten Bakterienstämme mit Ausnahme des *E. coli* DH10B wurden freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt.

2.1.11 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kultur
A20	B-Zell-Lymphomzelllinie, nicht adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS
BFS-1	Methylcholanthren-induzierte Fibrosarkomzelllinie, syngen zu C57BL/6, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS
DS-2	Drosophila Schneider 2 (S2) Insektenzelllinie, semi-adhärent	Insekt-Xpress™
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS
LA-4	Lungenepithelzelllinie aus der Maus, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS

2.1.12 Tiere

C57BL/6 Wildtyp

Charles River, Sulzfeld

2.1.13 Software und Internet-Ressourcen

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2004 erstellt. Diagramme wurden mit Microsoft Office Excel 2004 oder GraphPad Prism Version 4.0a angefertigt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen (FACS-Analysen) fand mit FlowJo 8.7.1 statt. Alignments der Gensequenzen wurden mit Hilfe des ClustalW Algorithmus durchgeführt. Das Literaturverzeichnis konnte mit Hilfe des Programms Endnote X erstellt werden. Des Weiteren wurden folgende Internet-Ressourcen genutzt:

Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
Entrez Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/
NCBI Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation genomischer DNA

Zur Isolation genomischer DNA wurde der Maus ein ca. 0,5 cm langes Stück des Schwanzendes abgetrennt und in 500 µl Gewebe-Lysepuffer mit 10 µl Proteinase K Lösung und 25 µl aktivierter Pronase E Lösung ü. N. bei 56° C verdaut. Anschließend wurde das Lysat bei 18500 g und Raumtemperatur (RT) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Phenol durch leichtes Schwenken gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der klare Überstand wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Phenolschritt wiederholt. Daraufhin folgten zwei Schritte mit Phenol/Chloroform und weitere zwei Schritte nur noch mit Chloroform wie bereits beschrieben. Nachdem schließlich der klare Überstand wieder in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde, konnte die DNA mit dem doppelten Volumen 99 % Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) bei -20° C über 20 min gefällt werden. Es wurde für 30 min bei 18500 g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 18500 g und RT für 5 min wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet bei RT für 5-10 min getrocknet bevor es in 50 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und bei 4°C gelagert wurde.

2.2.2 Präparation von Gesamt-RNA

Zum Schutz vor Kontaminationen mit RNasen erfolgten alle Arbeiten mit RNA mit gestopften Pipettenspitzen und Latexhandschuhen. Außerdem wurde ausschließlich mit 0,1 % Diethylcarbonat autoklaviertes Wasser verwendet und die Arbeitsfläche vorher mit RNase-ExitusPlus™ gereinigt. Sämtliche Arbeiten mit RNA erfolgten auf Eis oder in gekühlten Zentrifugen. Die RNA wurde schließlich bei -80° C aufbewahrt.

Die Präparation der Gesamt-RNA aus vorher abzentrifugierten Zellen erfolgte mit TRIzol® Reagent. Dazu wurde das Zellpellet mit $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen in 1 ml TRIzol® Reagent aufgenommen und die Zellen dabei lysiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chlorophorm zugegeben und die Lösung zweimal kräftig geschüttelt. Nach 15-minütiger Zentrifugation mit 12000 g bei 4° C konnte die obere klare Phase, welche die RNA enthielt, abgenommen und in ein frisches Eppendorfcup überführt werden. Daraufhin wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und das Ganze nach erneutem kräftigem Schütteln für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 12000 g für 10 min bei 4° C. Das nun sichtbare RNA-Pellet wurde nach dem Abdekantieren des Überstands mit 1 ml eiskaltem 75 % Ethanol gewaschen und mit 7500 g für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Zuletzt wurde das RNA-Pellet in der Vakuumzentrifuge 2 min lang bei RT leicht getrocknet und schließlich in RNase freiem Wasser resuspendiert.

2.2.3 Reverse Transkription

Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H Minus, Point Mutant) des Reverse Transcription System (Promega, Mannheim) in *complementary* DNA (cDNA) transkribiert. Hierfür wurde die RNA in einer Konzentration von 1 µg pro Ansatz zusammen mit 0,5 µg Oligo(dT)₁₅ Primer in 10 µl RNase freiem Wasser in einem ersten Schritt über 5 min bei 65° C denaturiert und anschließend kurz auf Eis inkubiert. Im zweiten Schritt wurden 4 µl des 5 x cDNA-Synthese Puffers sowie der dNTP-Mix mit einer Endkonzentration (EK) von 10 mM und 50 U der Transkriptase zugegeben und mit RNase freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach 5 min Annealing der Primer bei 37° C fand die reverse Transkription innerhalb von 30 min bei 48° C statt und wurde über 5 min bei 85° C terminiert. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

2.2.4 Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Ansatz für die jeweilige Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde unter Verwendung spezifischer Primer immer mit der GoTaq® Hot Start DNA-Polymerase von Promega (Mannheim) wie folgt pipettiert:

GoTaq® Mastermix (enthält 5 x Green Flexi Buffer, dNTP-Mix, MgCl ₂ und GoTaq® Hot Start Polymerase)	25 µl
5' Primer (10 pmol/µl)	1 µl
3' Primer (10 pmol/µl)	1 µl
DNA	5 µl
nukleasefreies Wasser	18 µl

Nach dem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95° C wurden 35 Zyklen mit den nachfolgend aufgeführten Schritten durchlaufen:

DNA-Denaturierung	95° C, 1 min
Primer-Annealing	50 – 65° C, 30 s
Elongation	72° C, 1 min/1 kb

Nach dem letzten Zyklus folgte ein letzter Schritt zur Termination der PCR-Reaktion für 7 min bei 72° C. Anschließend wurde die DNA bei 4° C aufbewahrt.

2.2.5 Quantitative Real Time PCR (RT-PCR)

In der quantitativen Real Time PCR (RT-PCR) wurden die jeweiligen Primer immer in einer Verdünnung von 1:20 und cDNA in einer Konzentration von 2,5 ng/µl eingesetzt. Als Polymerase-Mastermix wurde iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, München) verwendet, der den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green enthält. Dieser kann, sobald er in doppelsträngige DNA eingelagert wird, mit Licht einer Wellenlänge von 498 nm angeregt werden, woraufhin er Licht mit der Wellenlänge 522 nm emittiert. Mit zunehmender Zyklenzahl und damit steigender Menge an dsDNA kann folglich

auch mehr emittiertes Licht gemessen werden. Die Proben wurden in 96-Loch-Platten pipettiert und im iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Cycler (Bio-Rad Laboratories, München) vermessen. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben keinem direkten Licht ausgesetzt und ständig auf Eis gehalten wurden. Der Ansatz (25 µl EV) setzte sich wie folgt zusammen:

iQ™ SYBR® Green Supermix	12,5 µl
5' Primer (5 pmol/µl)	1 µl
3' Primer (5 pmol/µl)	1 µl
nukleasefreies Wasser	5,5 µl
cDNA	5 µl

Die Reaktion erfolgte mit folgender Programmierung des PCR-Gerätes:

1. Schritt	DNA-Denaturierung	95° C, 3 min
2. Schritt (50 Zyklen)	DNA-Denaturierung	95° C, 10 s
	Primer-Annealing und Elongation	63,5° C, 30 s
3. Schritt	Termination	95° C, 1 min
4. Schritt	Vorbereitung Schmelzkurve	55° C, 1 min
5. Schritt (81 Zyklen)	Schmelzkurve (in 0,5° C Schritten)	55° C - 95° C

Grundlage für die Quantifizierung der Genexpression ist der C_T -Wert (*threshold cycle*). Dieser Wert gibt den Zyklus der PCR-Reaktion an, bei dem die Fluoreszenz signifikant über den Wert der Hintergrundfluoreszenz steigt. Ein höherer C_T -Wert bedeutet, dass eine höhere Amplifikation nötig war, um die gleiche Fluoreszenzintensität zu erreichen. D. h. es war weniger cDNA und somit weniger mRNA im Ausgangsmaterial vorhanden. Aus der Differenz des C_T -Wertes der Probe und der Kontrolle wurde der ΔC_T -Wert berechnet:

$$\Delta C_T = C_{T, \text{Probe}} - C_{T, \text{Kontrolle}}$$

Anhand einer Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:32 mit cDNA einer Probe, in der die Expression des untersuchten Gens zu erwarten war, sowie mit cDNA des internen Standards, wurde die Amplifikationseffizienz der PCR-Reaktion bestimmt:

$$\text{Effizienz } f = 10^{\frac{-1}{\text{slope}}}$$

Der Wert der Amplifikationseffizienz der Probe und der Kontrolle sollte für die zugrunde liegende Berechnung, die unter der Annahme gleicher Effizienz stattfand, keine große Differenz aufweisen. Der *slope* gibt die Steigung der Geraden an, die aus den C_T -Werten der Verdünnungsreihen erstellt wurde. Schließlich wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert berechnet:

$$\Delta\Delta C_T = \frac{f^{\Delta C_{T, \text{Gen}}}}{f^{\Delta C_{T, \text{interner Standard}}}}$$

Dieser $\Delta\Delta C_T$ -Wert stellt somit den anhand des internen Standards normalisierten ΔC_T -Wert der untersuchten Probe dar und wurde im Diagramm als relativer Anstieg aufgetragen. Alle Proben wurden als Triplikate pipettiert.

2.2.6 Ligation

Zuerst wurden die Vektoren, um Religation zu verhindern, mit alkalischer Phosphatase nach Anleitung des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim) am 5' Ende dephosphoryliert. Die Ligationsansätze enthielten neben Insert und Vektor im Verhältnis von 3:1 noch 1 μl T4 DNA-Ligase und 2 μl T4 DNA-Ligasepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) und wurden mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 20 μl eingestellt. Die Reaktion fand ü. N. bei 4° C oder innerhalb von 4 h bei RT statt. Das Produkt der Ligation wurde anschließend zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien eingesetzt.

2.2.7 Transformation

Zu 50 μl chemisch kompetenten *E. coli* DH10B wurden jeweils 0,5 μl DNA aus einer Plasmid-Präparation oder 20 μl eines Ligationsansatzes zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 90 s Hitzeschock bei 42° C, 10 min auf Eis und der darauf folgenden Zugabe von 1 ml LB-Medium, wurden die Bakterien 1 h bei 37° C geschüttelt. Je 100 μl der Ansätze wurden auf LB-Platten mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ausplattiert und ü. N. bei 37° C inkubiert.

2.2.8 Bakterienkultur

Nach der Transformation gewachsene Bakterienkolonien wurden in frisches LB-Flüssigmedium mit 200 µg/ml Ampicillin überimpft und ü. N. bei 37° C und 220 rpm geschüttelt. Im Anschluss daran konnte die Präparation der Plasmid-DNA durchgeführt werden.

2.2.9 Antibakterieller Assay

Alle für den antibakteriellen Assay verwendeten Bakterienstämme wurden nach dem Animpfen in LB-Medium ohne Antibiotikum ü. N. bei 37° C und 220 rpm herangezüchtet. Aus dieser Vorkultur wurde ein Aliquot in frisches Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37° C und 220 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien mit ABA-Puffer auf 1×10^3 Zellen in 100 µl (EV) eingestellt und mit 1, 2 oder 5 µg/ml β-Defensin:Ig-Fusionsprotein in PBS-Puffer versetzt. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Menge PBS-Puffer ohne β-Defensin:Ig-Fusionsprotein eingesetzt. Zusätzlich wurde als weitere Kontrolle das hIgG₁ (hIg-Teil) ohne β-Defensin verwendet. Die so behandelten Bakterien konnten nach 3 h Inkubation bei 37° C und 220 rpm in einer 1:10 Verdünnung auf LB-Platten ausgestrichen und ü. N. bei 37° C inkubiert werden. Schließlich wurden die jeweils gewachsenen Kolonien gezählt und fotografiert. Die Versuche wurden immer in Triplikaten durchgeführt.

2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH10B erfolgte mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems oder dem PureYield™ Plasmid Midiprep System Kit von Promega (Mannheim) nach Protokoll des Herstellers.

2.2.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Sequenzierungen wurden von Geneart, Regensburg durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 300 ng DNA sowie 1 pmol Primer verwendet und das Gesamtvolumen mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl eingestellt. Die verwendeten Sequenzierprimer sind unter 2.1.3 aufgelistet.

2.2.12 Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 1-1,5 % (w/v) Agarosegelen. Hierfür wurde die Agarose in 0,5 x TAE-Puffer aufgekocht, in die Gelapparatur gegossen und mit 20 µg Ethidiumbromid pro 100 ml Gel versetzt. Nach dem Erstarren konnte das Gel in die dafür vorgesehene Laufkammer überführt und mit 0,5 x TAE-Puffer überschichtet werden. Daraufhin wurden die mit Loading Dye im Verhältnis 1:5 gemischten DNA-Proben neben dem DNA-Längenstandard 100 bp oder 1 kb Ladder (New England Biolabs, Frankfurt am Main) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 10 V/cm Gellänge. Anschließend wurden entsprechende DNA-Banden auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm aus dem Gel ausgeschnitten oder bei 254 nm betrachtet und fotografiert.

2.2.13 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von PCR-Produkten bzw. restriktionsverdauter DNA erfolgte mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega (Mannheim) nach Protokoll des Herstellers.

2.2.14 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktionsverdaue wurden Enzyme der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) verwendet. Dazu wurden jeweils 10 U des oder der entsprechenden Enzyme und der vom Hersteller empfohlene Puffer in einer 1:10 Verdünnung zusammen mit 1 µg DNA in einem Volumen von 30 µl mit nukleasefreiem Wasser angesetzt. Nach ca. 3 h bei 37° C konnten die verdauten DNA-Proben in einem Agarosegel aufgetrennt und gereinigt werden.

2.2.15 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von DNA oder RNA in wässriger Lösung wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei 260 nm mittels Photometer bestimmt. Zudem wurde die OD bei 280 nm ermittelt und der Quotient OD_{260}/OD_{280} als Maßstab für die Reinheit der Probe herangezogen.

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

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

2.2.16 Proteinaufreinigung

Die exprimierten Proteine sind mit einem hIgG₁ Fc-Teil versehen, der es erlaubt, diese Fusionsproteine mit Hilfe von Protein G aus *S. aureus*, das an Sepharose-Harz gekoppelt ist, aufzureinigen.

Der gesammelte und sterilfiltrierte Überstand (0,5-2 l) von Protein-exprimierenden *Drosophila Schneider 2 Zellen* (DS-2) wurde mit Hilfe des Econo System von Bio-Rad (München) über eine HiTrap™ Protein G HP Sepharosesäule (GE Healthcare, München) mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min gepumpt. Die Säule wurde vorher mit PBS-Puffer äquilibriert. Das an die Protein G Sepharosesäule gebundene Protein wurde mit 50 ml PBS-Puffer gewaschen, mit dem Elutionspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,5) von der Säule zu 1 ml pro Fraktion eluiert und anschließend mit Neutralisationspuffer (1 M Tris, pH 9,0) auf pH 7,2 eingestellt. Es wurden vom Durchlauf der Säule, bei Beginn und Ende des Waschens und von jeder Elutionsfraktion ein Aliquot von 30 µl für die SDS-PAGE und Western-Blot Analyse entnommen. Schließlich wurde das Protein in der Dialysemembran Typ 20 (Biomol, Hamburg) innerhalb von 24 h gegen 10 l PBS-Puffer dialysiert.

2.2.17 Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose

Für den schnellen Nachweis der Expression von hIgG₁-Fusionsproteinen nach Transfektion der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare, München) durchgeführt. Dazu wurden 50-100 ml gesammelter und sterilfiltrierter Zellkulturüberstand ü. N. bei 4° C und unter ständigem Schwenken mit 20-40 µl Protein G Sepharose inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 4° C und 3000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Protein G Sepharose wurde zweimal in 500 µl PBS-Puffer gewaschen und schließlich nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 20-40 µl 2 x Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert. Nach dem Aufkochen für 5 min bei 95° C konnte eine SDS-PAGE mit den Proben durchgeführt werden.

2.2.18 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA™ Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, IL, USA) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die dabei entstandene Farbreaktion wurde in dem Emax Microplate Reader (Molecular Devices, München) bei einer OD von 540 nm vermessen.

2.2.19 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für analytische SDS-PAGE wurden Gele mit einer Konzentration von 5 % Acrylamid/Bisacrylamid im Sammelgel und 12,5 % Acrylamid/Bisacrylamid im Trenngel verwendet. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 200 V und 40 mA für ca. 1 h in der Gelkammer Sub-Cell® GT (Bio-Rad Laboratories, München). Die Anfärbung der Proteinbanden in den Gelen erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R250. Dazu wurde das Polyacrylamidgel in Coomassie-Färbelösung über 15 min geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Entfärbelösung solange geschwenkt bis der Hintergrund vollständig entfärbt war und nur noch die Proteinbanden zu erkennen waren. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele im Gelrockner Slab Dryer Model 483 (Bio-Rad Laboratories, München) bei 80° C unter Vakuum auf Whatman®-Papier getrocknet.

2.2.20 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-PAGE Gel in dem Semi-Dry Blotter Fast Blot B34 (Biometra, Göttingen) über der PVDF Transfermembran Immobilon™ (Millipore, Schwalbach) bei 200 V mit 1 mA / 1 cm² Gel für 75 min geblottet. Der Transfer der Proteine fand unter Verwendung des Westernblot-Puffers statt. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT in 5 % Magermilchpulver (5 g Magermilchpulver in 50 ml TBS-T) auf einem Schüttler geblockt. Der HRP-konjugierte anti human IgG (H+L) Antikörper wurde in frischer 2 % Magermilchpulverlösung in einer Verdünnung von 1:10000 auf die Membran gegeben und für 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach 2 x Waschen mit 2 % Magermilchpulverlösung und 1 x Waschen mit TBS-T folgte die Chemilumineszenz-Reaktion. Dazu wurde die Membran für 1 min in der NOWA Solution A und B, die das Substrat für die Peroxidase enthält, nach Angabe des Herstellers (MoBiTec, Göttingen)

geschwenkt. Sofort im Anschluss wurde die Membran in einer Dunkelkammer auf einen Film (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare, München) aufgelegt. Die Expositionszeiten lagen dabei zwischen 30 s und 10 min. Zuletzt konnte der Film im Filmentwickler Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt werden.

2.2.21 Luciferase Reportergen-Assay

Im Rahmen des Luciferase Reportergen-Assays wurde ein 1,7 kb langes DNA-Fragment der regulatorischen Region vor dem mBD14-Gen (*Defb14*) in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Dafür wurden die Primer mBD14pr pGL4 5' mit einer Schnittstelle des Sac I Restriktionsenzym und mBD14pr pGL4 3' mit einer Schnittstelle des Xho I Enzyms verwendet. Anschließend wurde das Promotor-Fragment in den pGEM®-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) zwischenkloniert und schließlich mittels Sac I und Xho I in den pGL4.11 Firefly Luciferase Reporter Vektor (Promega, Mannheim) kloniert.

Im Anschluss wurden Maus LA-4 Lungenepithelzellen in 24-Loch-Platten zu 5×10^5 Zellen pro ml und Loch ausgesät. Mit einer Konfluenz von 60-80 % konnten die Zellen mittels DOTAP (Roche Diagnostics, Mannheim) mit 50 ng mBD14-Promotor Firefly Luciferase Reporter Vektor zusammen mit 10 ng phRL-TK Renilla Luciferase Vektor als Transfektionskontrolle, 50 ng NOD2-Expressionsplasmid (pcDNA3.1) und 1 µg/ml Muramyldipeptid (MDP) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) transfiziert werden. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und die Aktivität der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase in dem Luminometer Fusion™ (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) gemessen. Die Aufbereitung der Zellen und die Durchführung des Luciferase-Assays fand mit Hilfe des Dual-Glo™ Luciferase Assay Systems (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers statt. Zuerst wurde die Firefly-Luciferase Aktivität, anschließend die Aktivität der Renilla-Luciferase gemessen. Die gemessenen Firefly-Luciferase Werte wurden gegen die Messwerte der Renilla-Luciferase nach folgender Formel normalisiert:

$$\text{Relative Luciferase-Aktivität} = \frac{\text{Messwert Firefly - Luciferase}}{\text{Messwert Renilla - Luciferase}}$$

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkulturbedingungen

Zellbiologische Arbeiten wurden stets unter Verwendung steriler Reagenzien, Pipetten und Gefäße in der Sterilbank HERAsafe® KS (Thermo Scientific, Langenselbold) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien und Primärzellkulturen wurden in unter 2.1.2 aufgeführten Zellkulturflaschen oder Gewebekulturschalen mit RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin oder einem entsprechend angegebenen Medium bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Begasungsbrutschrank Cell Safe (Integra Biosciences, Fernwald) kultiviert. Die Zelllinien wurden 2 x wöchentlich im Verhältnis 1:10 geteilt. Zentrifugationen mit Zellen wurden bei 300 g für 5 min durchgeführt und das Zellpellet in der jeweils benötigten Lösung resuspendiert. Zur Gewinnung von Zellüberständen wurden die Zellen bei 3200 g und 4° C für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet verworfen.

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen abzentrifugiert und in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50 % RPMI 1640, 40 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots von 1 ml in Kryoröhrchen gefüllt, bei -80° C schonend tiefgefroren und nach wenigen Tagen in den Stickstoff-Tiefkühltank überführt und bei -196° C aufbewahrt.

Im Stickstoff gelagerte Zellen, die wieder in Kultur genommen werden sollten, wurden aufgetaut, zügig in 10 ml kaltem Medium gewaschen und daraufhin in frisches Kulturmedium überführt.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zelllinien mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) auf eine Kontamination mit Mycoplasmen untersucht.

2.3.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Anzahl lebender Zellen wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Gießen) bestimmt. Hierfür wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:10 mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Tote Zellen wurden dabei blau gefärbt, lebende blieben ungefärbt. Es wurden 4 große Quadrate mit jeweils 16 kleinen Quadraten ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet.

Die Zellkonzentration wurde wie folgt berechnet:

Mittelwert der Zellzahl pro großes Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellzahl/ml

2.3.3 Transfektion

Transiente oder stabile Transfektionen von Zellen wurden mittels DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angabe des Herstellers erzielt.

2.3.4 Gewinnung von Splenozyten

Für die Präparation und Kultivierung von Splenozyten wurde immer RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin verwendet. Aus den Mäusen nach dem Töten durch zervikale Dislokation entnommene Milzen wurden in diesem Medium bis zur Präparation auf Eis aufbewahrt. Die Milzen wurden mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von 70 μ m (BD Biosciences, Heidelberg) in ein 50 ml Reaktionsgefäß passiert. Anschließend wurde mit Medium nachgespült bis nur noch Bindegewebe im Sieb zurückblieb. Die so isolierten Milzzellen wurden 10 min bei RT und 300 g zentrifugiert, anschließend in 5 ml ACK-RBC-Hämolysepuffer pro Milz resuspendiert und 5 min bei RT zur Hämolyse inkubiert. Daraufhin wurde das Reaktionsgefäß mit Medium aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 5 ml Medium pro Milz aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

2.3.5 Generierung und Stimulierung von BMDCs

Während der Isolation und Kultivierung von *bone marrow-derived dendritic cells* (BMDCs) wurde stets RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 50 μ M 2-Mercaptoethanol und 30 ng/ml GM-CSF (aus eigener Herstellung) verwendet. Aus den Mäusen wurden nach dem Töten durch zervikale Dislokation Femur (Oberschenkelknochen), Tibia (Schienbeinknochen) und gegebenenfalls auch Humerus (Oberarmknochen) entfernt, für 1 min in Isopropanol sterilisiert, in sterilen PBS-Puffer

überführt und schließlich dekapitiert. Aus den so eröffneten Knochen konnte nun mit Hilfe einer Kanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm mit sterilem PBS-Puffer das Knochenmark in ein 50 ml Reaktionsgefäß gespült werden. Die Knochenmarkszellen wurden bei 300 g und RT für 10 min zentrifugiert, 1 x mit Medium gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt die Lebendzellzahl bestimmt. Daraufhin wurden die Zellen in 24-Loch-Platten zu je 1 ml/Loch und 2×10^5 Zellen/ml ausgesät. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt (Inaba et al., 1992).

An Tag 8 der Kultur wurden die BMDCs immer in Triplikaten mit 100 ng/ml LPS von *Salmonella enterica* Serotyp abortus equi (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 1 μ M CpG ODN 1668 (Metabion, Martinsried) und 10 μ g/ml Poly (I:C) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) sowie MDP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in Konzentrationen von 1 bis 50 μ g/ml über 24 h stimuliert.

2.3.6 Lymphozytenisolation aus soliden BFS-1 Fibrosarkomen

An Tag 22 nach der Injektion von BFS-1 Fibrosarkomzellen (siehe 2.4.2) wurde der dorsal auf der Maus gewachsene Tumor entfernt nachdem die Maus durch zervikale Dislokation getötet wurde. Ein kleiner Teil des Tumors wurde für eine RNA-Präparation verwendet. Für den Collagenase D-Verdau musste der Tumor zuerst mit einer Schere zerkleinert werden. Daraufhin konnte das Tumorgewebe mit 10 mg Collagenase D und 100 μ g DNase I in 10 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin über 30 min bei 37° C verdaut werden. Anschließend wurde die Gewebesuspension auf ein Nylonsieb über einem 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Spritzenstopfen einer 5 ml Spritze weiter zerkleinert. Nach mehrmaligem Spülen des Siebes wurden die Zellen bei 300 g und 4° C für 5 min zentrifugiert. Die auf diese Weise isolierten Zellen wurden in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert und die Lebendzellzahl ermittelt. Schließlich konnten die Zellen für durchflusszytometrische Analysen mit entsprechenden Antikörpern gefärbt werden.

2.3.7 Isolation von residenten Monozyten aus dem Peritoneum

Zur Gewinnung von residenten peritonealen Monozyten wurden 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse verwendet. Nach dem Töten der Maus wurde das Peritoneum mit 5 ml eiskaltem PBS-Puffer mit Heparin (20 U/ml) und EDTA (5 μ M) gespült. Die Isolation der Zellen aus der

Peritoneal-Lavage wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. J. J. Oppenheim (Laboratory of Molecular Immunoregulation, Division of Basic Science, NCI, National Institutes of Health, Frederick, MA, USA) im Rahmen der Chemotaxis Assays durchgeführt.

2.3.8 Chemotaxis Assay

In den Chemotaxis Assays eingesetzte Zellen wurden in RPMI-Medium mit 1 % BSA auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Versuche wurden in 48-Loch Mikro-Chemotaxiskammern (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) durchgeführt. Die obere Kammer wurde von der unteren Kammer durch eine unbeschichtete Polycarbonat-Filtermembran mit einer Porenweite von $5 \mu\text{m}$ für die Monozyten und durch eine mit Collagen beschichtete Polycarbonat-Filtermembran (Osmonics, Livermore, CA, USA) mit einer Porenweite von $10 \mu\text{m}$ für die mCCR6⁺ oder hCCR6⁺ HEK-293 Zellen getrennt. Die Zellsuspensionen wurden in die oberen Kammern, das jeweilige β -Defensin:Ig aus den entsprechenden HEK-293 Zellüberständen oder das hIgG₁ zur Kontrolle wurde in die untere Kammer gegeben und bei 37° C für 1,5 h im Fall der Monozyten und für 5 h im Fall der HEK-293 Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Filter entfernt, gefärbt und die durch die Filter gewanderten Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt. Alle Ergebnisse wurden als Zellzahl pro *high power field* (HPF) dargestellt. Die Chemotaxisversuche wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. J. J. Oppenheim (Laboratory of Molecular Immunoregulation, Division of Basic Science, NCI, National Institutes of Health, Frederick, MA, USA) durchgeführt.

2.3.9 MACS-Reinigung

Die Anreicherung von B-Zellen aus präparierten Milzzellen anhand von magnetischen MicroBeads, die mit einem Antikörper gegen CD19 markiert sind, wurde nach den Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) durchgeführt. Dabei wurde eine Reinheit von > 95 % erreicht. Die Analyse der so isolierten B-Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

2.3.10 MTT-Assay

Zur Bestimmung der Vitalität der transfizierten BFS-1 Zellen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Hierbei wird gelbes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in Mitochondrien lebender Zellen durch die mitochondriale Reduktase in Abhängigkeit der metabolischen Aktivität in violette Formazan reduziert. Dafür wurden die unterschiedlich transfizierten BFS-1 Zellen in 96-Loch-Platten in unterschiedlichen Konzentrationen und immer in Triplikaten ausgesät und in 200 µl Medium über 24 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden pro Loch 10 µl MTT einer Stammlösung (5 mg/ml) zugegeben und 4 h lang bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurden 70 µl einer 20 % SDS-Lösung zugegeben und die Zellen ü. N. wieder in den Inkubator gegeben. Dabei wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen lysiert. Letztlich konnte die Zellvitalität kolorimetrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm im Spektrometer Emax Microplate Reader (Molecular Devices, München) bestimmt werden.

2.3.11 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden an dem BD LSR II Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo 8.7.1. Färbung und Vermessung der Zellen fand in FACS-Röhrchen BD Falcon™ (BD Biosciences, Heidelberg) und in FACS-Puffer statt. Dabei wurden die Zellen immer auf Eis und aufgrund fluoreszenzmarkierter Antikörper unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung gehalten. In welchen Konzentrationen die entsprechenden Antikörper einzusetzen waren wurde zuvor mittelst Titrationen ermittelt.

Das allgemeine Färbeprotokoll beinhaltet zuerst einen Blockier-Schritt über 15 min mit Serum (1:10 mit FACS-Puffer verdünnt) aus der gleichen Spezies, aus welcher der erste Antikörper gewonnen wurde, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an Fcγ-Rezeptoren zu vermeiden. Die Zellen wurden dann in einem Endvolumen von 100 µl mit der Antikörpermischung für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Im Fall einer Färbung mit einem Antikörper, der nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit Biotin konjugiert war, musste nach dem Wasch-Schritt mit einem sekundären Antikörper oder Streptavidin, mit dem jeweils benötigten Fluorophor konjugiert, gefärbt werden. Schließlich wurden die Zellen noch

einmal gewaschen, in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und vermessen. Zur Diskriminierung toter Zellen wurde den Proben kurz vor der Messung DAPI-Lösung (10 µg/ml) im Verhältnis von 1:10 zugegeben.

2.3.12 Zellsortierung

Die Sortierung der generierten und stimulierten BMDCs erfolgte am FACSAria™ Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg). Dabei wurden die Zellen mit einer Reinheit von > 98 % gewonnen.

2.4 Tierexperimentelle Methoden

2.4.1 Tierhaltung

Alle verwendeten weiblichen C57BL/6 Mäuse waren entsprechend den Haltungsvorschriften zu maximal 10 Tieren pro Käfig untergebracht und wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere erhielten als Nahrung die speziesspezifische Standarddiät V1534 R/M-H (ssniff Spezialdiäten, Soest) sowie Leitungswasser *ad libitum* und waren einem Licht-Dunkel-Rhythmus von je 12 h ausgesetzt. Sie wurden frühestens 3 Wochen nach Ankunft in einem Experiment eingesetzt. Die beschriebenen Experimente wurden bei der zuständigen Behörde am 10.01.2008 zur Anzeige gebracht.

2.4.2 Erzeugung von Fibrosarkomen mit BFS-1 Zellen

Zur Erzeugung von soliden Fibrosarkomen auf C57BL/6 Mäusen wurden syngene BFS-1 Fibrosarkomzellen *in vitro* in RPMI-Medium mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angezogen. Die BFS-1 Zelllinie wurde wie bereits beschrieben erzeugt (Mannel et al., 1979). Dem Kulturmedium von BFS-1 Zellen, die mBD14-Ig oder das Kontroll-Fusionsprotein p55:Ig rekombinant exprimieren, wurde zusätzlich 500 µg/ml Neomycin beigefügt. Als die benötigte Zellzahl herangewachsen war, konnten die BFS-1

Zellen nach Entfernen des Mediums unter Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung (2 ml / 75 cm²) nach 2 min Inkubation mit PBS-Puffer vom Flaschenboden gespült werden. Anschließend wurden sie mit PBS-Puffer gewaschen und bei 300 g und RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml pro 75 cm²-Zellkulturflasche resuspendiert und die Lebendzellzahl mit Hilfe der Trypanblau-Färbung und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Daraufhin konnte die Zellzahl nach einer weiteren Zentrifugation auf 3×10^7 Zellen/ml eingestellt werden.

Die Mäuse wurden zunächst mit einer Lösung aus 15 % Ketamin 5 % (Ketaminhydrochlorid) und 8 % Xylazin 2 % (Xylazinhydrochlorid) in PBS-Puffer, welche i. p. in einer Menge von 10 µl pro g Maus injiziert wurde, anästhesiert. Nach Feststellung der vollständigen Anästhesie mittels Drucktest an der Hinterpfote konnten schließlich dorsal $1,5 \times 10^6$ BFS-1 Zellen in einem Volumen von 50 µl subkutan appliziert werden.

2.4.3 Messung des BFS-1 Tumorwachstums

Das Tumorwachstum wurde von Tag 3 bis Tag 22 nach der Applikation regelmäßig alle 2-3 Tage mit einer Schieblehre (Kern, Balingen-Frommern) verfolgt und jeweils Länge und Breite des Tumors vermessen. Die Tumorgrößen wurden in cm² angegeben.

2.5 Immunhistologische Methoden

2.5.1 Herstellung histologischer Schnitte aus kryokonserviertem Gewebe

Den im Rahmen der Leukozytenisolation entfernten BFS-1 Tumoren wurde ein kleines Stück Gewebe für die Anfertigung von Kryopräparaten entnommen. Dieses wurde in Killik Einbettmedium (Bio-Optica, Milano, I) auf Korkplättchen (Bio Vendor, Heidelberg) fixiert, mit Einbettmedium luftblasenfrei überschichtet und in der Gasphase über flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Kryopräparate bei -80° C gelagert. Die Gewebepräparate wurden an einem Kryostat von Leica mit einer Dicke von 5 µm geschnitten und auf SuperFrost® Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) platziert. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte in einem immunhistochemischen Verfahren gefärbt.

2.5.2 Immunhistochemische Färbung von CD31

Die kryokonservierten Gewebeschnitte wurden in -20°C kaltem Aceton 10 min entwässert. Nach 15 min trocknen bei RT wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einer hydrophoben Emulsion (DakoCytomationPen, DakoDeutschland, Braunschweig) umrandet. Anschließend wurden die Schnitte in Waschpuffer (1 x TBS mit 0,05 % Tween[®]20) für 10 min gewaschen und in Blockpuffer (1 x TBS, 3 % FCS, 10 % Mausserum) für 30 min geblockt. Daraufhin konnten die Schnitte mit dem anti Maus CD31 Antikörper aus der Ratte oder dem entsprechenden Isotyp-Antikörper 1:500 verdünnt in 1 x TBS-Puffer mit 3 % FCS für 30 min bei RT markiert werden. Nach dreimaligem Waschen wurden die Schnitte mit dem sekundären anti Ratte IgG AP Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung wieder für 30 min bei RT markiert. Erneut wurde dreimal gewaschen und danach mit der Substratlösung Sigma Fast[™] (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 15 min bei RT inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und daraufhin die Zellkerne mit Methylgrün-Lösung 5 min bei RT gefärbt. Schließlich wurde die restliche Methylgrünlösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgespült und die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe beginnend bei 90% Ethanol, dann 96% Ethanol und letztlich in Xylol für je 10 min entwässert. Nachdem die Gewebepräparate mit Entellan[®] Eindeckmedium (Merck, Darmstadt) und einem Deckglas eingedeckt wurden, konnten diese unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

2.6 Statistik

Ergebnisse aus Experimenten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) angegeben. Statistische Analysen wurden unter Verwendung des Student's *t*-Test mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0a durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und mit * gekennzeichnet

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation des *Defb14*-Gens

Zur Identifizierung und Charakterisierung des Maus-Gens, das ortholog zum humanen β -Defensin 3 (*DEFB103*) ist, wurde die Ensembl Gendatenbank herangezogen. Anhand von DNA- und Proteinsequenzvergleichen konnte das *Defb14*-Gen identifiziert werden, das im β -Defensin Gen-Cluster auf dem Chromosom 8 an der Position 19.194.357-19.195.212 lokalisiert ist. Es zeigt den für die Familie der β -Defensine charakteristischen Aufbau von zwei Exons mit einer Größe von 58 bp für Exon 1 und 146 bp für Exon 2 sowie einem Intron mit einer Größe von 652 bp (Abb. 2a).

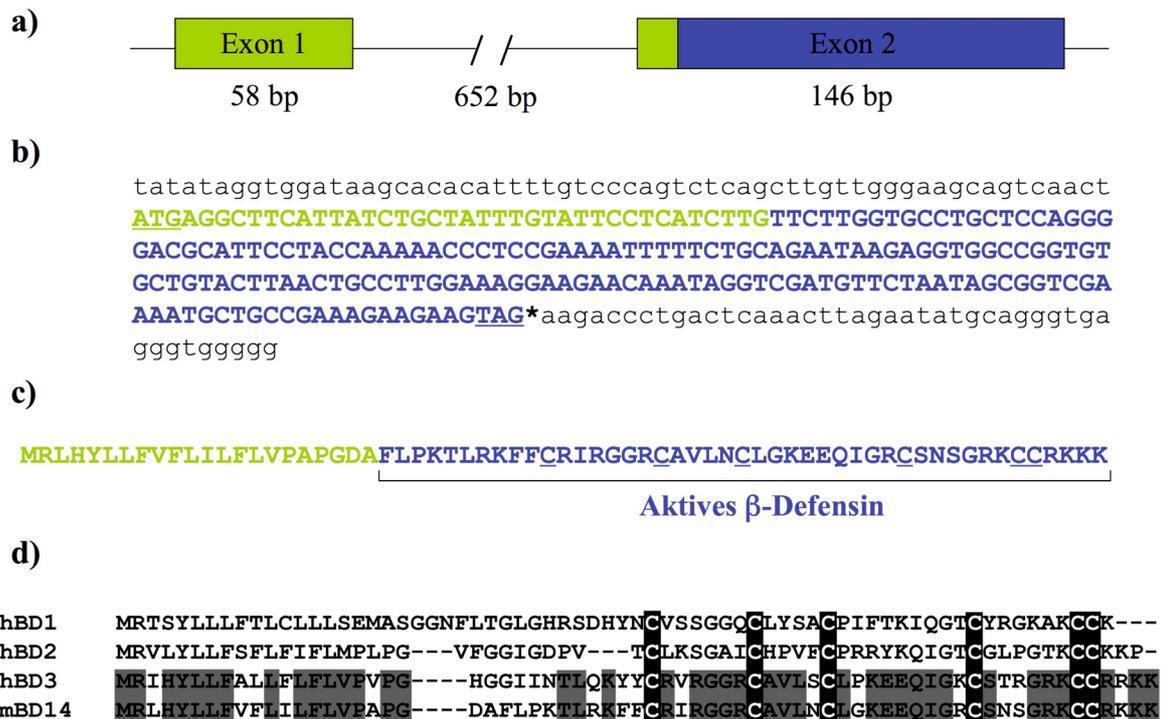


Abb. 2: Identifizierung des *Defb14*-Gens und Alignment der Proteinsequenz mit den Sequenzen von hBD1, hBD2 und hBD3. a) Genomische Organisation des *Defb14*-Gens auf dem Chromosom 8 an der Position 19.194.357-19.195.212. b) Nukleotidsequenz des ORF von mBD14. Die 5' UTR und 3' UTR sind in schwarz dargestellt. Die mittels Sequenzanalysen strukturell vorhergesagte Signalsequenz ist in grün gezeigt und die Sequenz, die für das reife mBD14 Polypeptid kodiert ist in blau dargestellt. c) Die anhand der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode). d) Mittels ClustalW durchgeführtes Alignment der vorhergesagten Aminosäuresequenz von mBD14 mit den Sequenzen hBD1, hBD2 und hBD3. Der Vergleich der Aminosäuresequenz von hBD3 mit der von mBD14 zeigt eine Homologie beider Sequenzen von 68 %. Konservierte Cystein-Reste sind schwarz hinterlegt und konservierte Aminosäuren zwischen hBD3 und mBD14 sind grau hinterlegt. *Accession numbers*: hBD1 NM_005218, hBD2 NM_004942, hBD3 NM_018661 und mBD14 NM_183026.

Der hieraus postulierte *open reading frame* (ORF) umfasst 204 bp und kodiert für ein Polypeptid mit 67 As, das nach posttranslationaler Modifikation in Form einer proteolytischen Abspaltung des anhand von Sequenzanalysen als Signalpeptid definierten N-terminalen Endes das reife β -Defensin darstellt (Abb. 2b und c). Das reife mBD14 hat folglich eine Länge von 45 As und ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 5,2 kDa.

Zudem wurde sowohl die postulierte cDNA-Sequenz als auch die Peptidsequenz des mBD14 mit den Sequenzen von hBD1, hBD2 und hBD3 anhand von Alignments mit Hilfe des ClustalW Algorithmus miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz des mBD14 im Vergleich mit den humanen β -Defensinen 1-3 gegenüber hBD3 mit 68 % Homologie die größte Sequenzkonservierung aufweist (Abb. 2d), während sich im Vergleich der cDNA-Sequenzen sogar eine Homologie von 72 % ergibt (Abb. 3). Des Weiteren ist anhand der Alignments auch die speziesübergreifende Konservierung der Cystein-Reste und damit der intramolekularen Disulfidbrücken, die wiederum charakteristisch für die Familie der β -Defensine sind, zu erkennen (Abb. 2d).

```

hBD3   ATGAGGATCCATTATCTTCTGTTTGCTTTGCTCTTCCTGTTTTTGGTGCCTGTTCCAGGT
mBD14  ATGAGGCTTCATTATCTGCTATTTGTATTCTCATCTTGTTCTTGGTGCCTGCTCCAGGG

hBD3   CATGGAGGAATCATAAACACATTACAGAAATATTATTGCAGAGTCAGAGGCGGCCGGTGT
mBD14  GACGCATTCCACCACAAACCCCTCCGAAAATTTTTCTGCAGAATAAGAGGTGGGCCGGTGT

hBD3   GCTGTGCTCAGCTGCCTTCCAAAGGAGGAACAGATCGGCAAGTGCTCGACGCGTGGCCGA
mBD14  GCTGTACTTAACTGCCTTGGAAAGGAAGAACAATAGGTCGATGTTCTAATAGCGGTCTGA

hBD3   AAATGCTGCCGAAGAAAGAAATAA
mBD14  AAATGCTGCCGAAAGAAGAAGTAG

```

Abb. 3: Alignment der cDNA-Sequenzen von hBD3 mit mBD14. Die vorhergesagte cDNA-Sequenz von mBD14 wurde mit der Sequenz von hBD3 mit Hilfe des ClustalW Algorithmus verglichen. Der Vergleich ergab eine Homologie der beiden Sequenzen von 72 %. Konservierte Nukleotide zwischen hBD3 und mBD14 sind grau hinterlegt. *Accession numbers*: hBD3 NM_018661 und mBD14 NM_183026.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse aller Alignments der Aminosäuresequenzen der Maus β -Defensine 2, 3, 4, 5 und 14 mit den Sequenzen der humanen β -Defensine 1-4 in Prozent übereinstimmender Aminosäuren (Identität) dargestellt.

	mBD2	mBD3	mBD4	mBD5	mBD14
hBD1	24,3	32,8	31,4	31,4	26,7
hBD2	28,1	43,7	45,3	40,0	38,2
hBD3	25,6	39,7	30,8	38,2	68,6
hBD4	15,8	22,6	20,0	22,6	23,3

3.2 Nachweis der Expression von mBD14 *in vivo*

3.2.1 Nachweis der Expression von mBD14 in verschiedenen Organen

Die Expression bisher beschriebener β -Defensine der Maus ist jeweils auf spezifische Organe oder Gewebe beschränkt. Zur Identifikation der Expressionsorte des mBD14 wurde Gesamt-RNA aus den entsprechenden Organen von C57BL/6 Mäusen isoliert (siehe 2.2.2) und mittels Oligo(dT)₁₅ und M-MLV Reverse Transcriptase in cDNA revers transkribiert (siehe 2.2.3). Mit 5 μ l dieser cDNA konnte eine PCR-Reaktion (siehe 2.2.4) mit dem Primer-Paar mBD14 5' und mBD14 3' (siehe 2.1.3) durchgeführt werden. Die Primer wurden so gewählt, dass das mBD14 5' Oligonukleotid im Bereich des Exon 1 und das mBD14 3' Oligonukleotid im Bereich des Exon 2 liegt. Als interne Kontrolle wurde die Expression des Haushaltsgens β -Aktin mit den Primern β -Aktin 5' und β -Aktin 3' (siehe 2.1.3) überprüft. Als Positivkontrolle, d. h. um den Erfolg der PCR-Reaktion mit diesen Oligonukleotiden zu dokumentieren, wurde auch der ORF des reifen mBD14-Gens (*Defb14*) im pGEM-Vektor (100 ng) als Template eingesetzt. Als DNA-Längenstandard dienten 5 μ l des 100 bp Ladder. Das Produkt der PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden für mBD14 hat eine Größe von 120 bp.

In allen untersuchten Geweben wie z. B. Lunge, Trachaea, Oesophagus und Zunge konnte die Expression von mBD14 unterschiedlich stark nachgewiesen werden (Abb. 4).

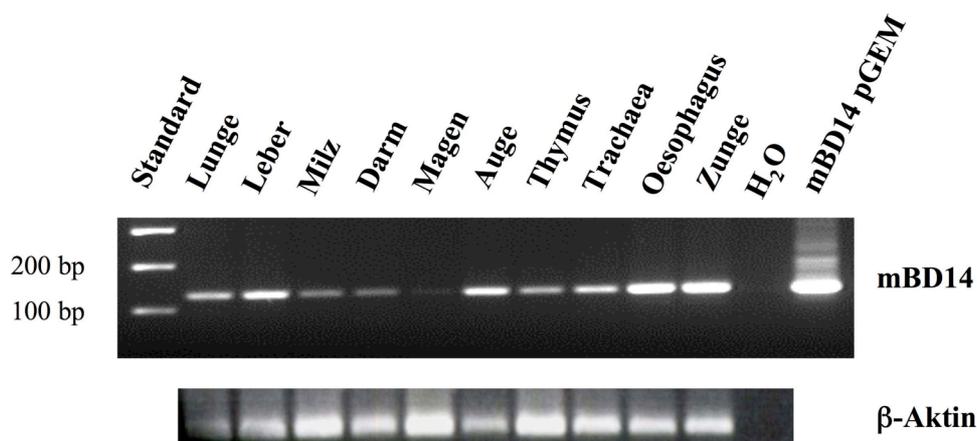


Abb. 4: Expression von mBD14 in verschiedenen Organen der Maus. Aus den verschiedenen Organen von C57BL/6 Mäusen isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA (5 μ l) in einer PCR-Reaktion mit den Primern mBD14 5', mBD14 3', β -Aktin 5' und β -Aktin 3' eingesetzt. DNA-Längenstandard: 100 bp Ladder (5 μ l); Positivkontrolle: mBD14 in pGEM (100 ng).

3.2.2 Nachweis der Expression von mBD14 in BMDCs

Aus Knochenmark von C57BL/6 Mäusen isolierte Zellen wurden *in vitro* über 8 Tage unter Verwendung von GM-CSF zu dendritischen Zellen differenziert und z. T. mit 100 ng/ml LPS von *Salmonella enterica* Serotyp abortus equi über 24 h stimuliert (siehe 2.3.5). Daraufhin konnten die unstimulierten und stimulierten BMDCs anhand einer Positivselektion auf den Zelloberflächenmarker CD11c mit dem entsprechenden Antikörper sowie anhand einer Selektion mit den Antikörpern gegen CD86 und MHCII (siehe 2.1.6), um unreife von reifen BMDC zu unterscheiden, im Zellsorter isoliert werden (siehe 2.3.12). Aus den auf diese Weise gewonnenen Zellen wurde wiederum Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.2) und mittels Oligo(dT)₁₅ und M-MLV Reverse Transcriptase in cDNA revers transkribiert (siehe 2.2.3). Mit 5 µl dieser cDNA konnte eine PCR-Reaktion (siehe 2.2.4) mit dem Primer-Paar mBD14 5' und mBD14 3' (siehe 2.1.3) durchgeführt werden. Als interne Kontrolle wurde die Expression des Haushaltsgens β -Aktin mit den Primern β -Aktin 5' und β -Aktin 3' (siehe 2.1.3) überprüft.

Sowohl mit LPS behandelte BMDCs als auch BMDCs, die nicht stimuliert wurden, wiesen eine Expression von mBD14 auf, und es ist zu erkennen, dass in stimulierten BMDCs mehr mBD14 exprimiert wurde als in unstimulierten Zellen. Des Weiteren ist mBD14 sowohl in unreifen ($CD11c^+ MHCII^{low} CD86^{low}$) als auch in reifen ($CD11c^+ MHCII^{high} CD86^{high}$) BMDCs zu finden. Hier zeigte sich wiederum, dass reife BMDCs mehr mBD14 produzierten als unreife Zellen (Abb. 5).

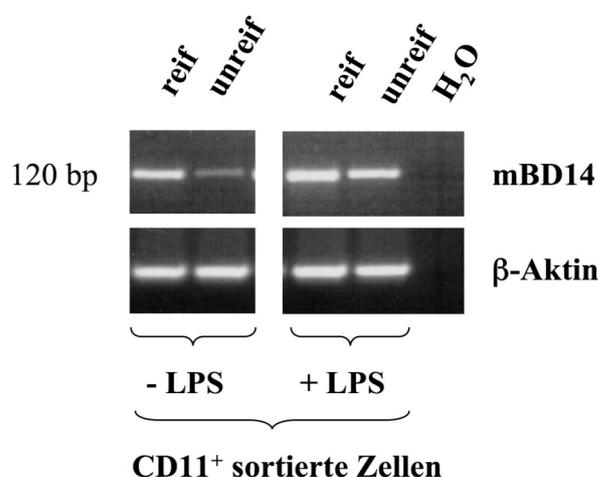


Abb. 5: Expression von mBD14 in BMDCs. Aus Knochenmark von C57BL/6 Mäusen isolierte Zellen differenzierten *in vitro* mit GM-CSF zu BMDCs und wurden an Tag 8 der Kultur mit 100 ng/ml LPS stimuliert (+ LPS) oder blieben unstimuliert (- LPS). Im Zellsorter wurden $CD11c^+ CD86^{high} MHCII^{high}$ Zellen (reif) und $CD11c^+ CD86^{low} MHCII^{low}$ Zellen (unreif) angereichert, deren Gesamt-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte mit je 5 µl cDNA und den Primern mBD14 5', mBD14 3', β -Aktin 5' und β -Aktin 3'.

3.3 Regulation der Expression von mBD14

Im Anschluss an die Identifikation mBD14 exprimierender Organe und Gewebe sollten erste Erkenntnisse bezüglich Art und Weise der Regulation der Expression des mBD14-Gens gewonnen werden. Dazu wurden sowohl BMDCs als auch die Maus Lungenepithelzelllinie LA-4, die ebenfalls mBD14 exprimiert, verwendet. Im Folgenden wurde speziell die Expression von mBD14 nach Stimulierung verschiedener *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) untersucht.

3.3.1 Verstärkte Expression von mBD14 nach Stimulierung von BMDCs

Die Generierung von BMDCs aus Knochenmark von C57BL/6 wt Mäusen wurde, wie unter 2.3.5 beschrieben, durchgeführt. Diese dendritischen Zellen wurden an Tag 8 mit 100 ng/ml LPS von *Salmonella enterica* Serotyp *abortus equi*, 10 µg/ml Poly (I:C) und 1 µM CpG ODN 1668 über 24 h stimuliert. Daraufhin konnten die BMDCs geerntet, deren Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.2) und mittels Oligo(dT)₁₅ und M-MLV Reverse Transcriptase in cDNA revers transkribiert werden (siehe 2.2.3). Mit 5 µl dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR-Reaktion (siehe 2.2.5) mit den Primer-Paaren mBD14 5' und mBD14 3' sowie 18S rRNA 5' und 18S rRNA 3' (siehe 2.1.3) durchgeführt. Die 18S rRNA diente hierbei als interner Standard. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche jeweils in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt wurden die Mittelwerte ± Standardabweichung (SD).

Nach Stimulierung der dendritischen Zellen mit LPS als Ligand des TLR4, Poly (I:C) als Ligand des TLR3 und CpG ODN 1668 als Ligand des TLR9 konnte eine leichte Erhöhung der Expression von mBD14 auf transkriptioneller Ebene beobachtet werden. Die stärkste Stimulierung mit einer sechsfach höheren Expression von mBD14 zeigte Poly (I:C) ($6,36 \pm 0,15$), welches das synthetische Analogon zu viraler dsRNA darstellt. Aber auch LPS ($3,53 \pm 0,13$) und CpG ($3,39 \pm 0,08$) führten zu einer erhöhten Expression von mBD14 in BMDCs (Abb. 6).

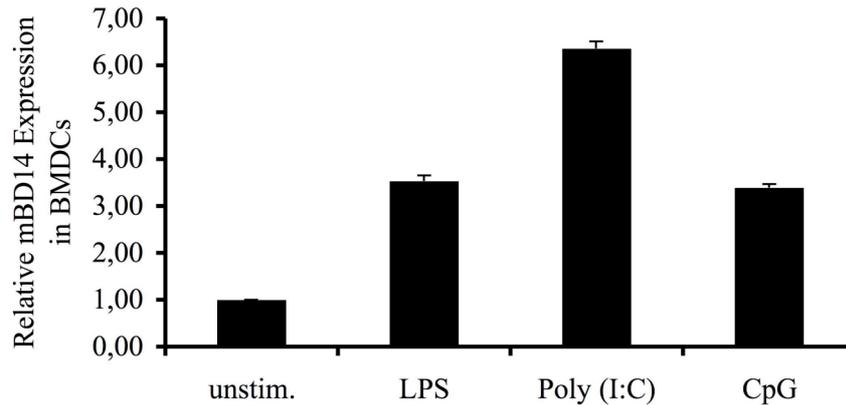


Abb. 6: Relative Expression von mBD14 in BMDCs nach Stimulierung mit verschiedenen TLR-Liganden. *In vitro* aus Knochenmarkszellen generierte BMDCs wurden an Tag 8 der Kultur mit 100 ng/ml LPS, 10 µg/ml Poly (I:C) oder 1 µM CpG ODN 1668 über 24 h stimuliert. Die aus diesen Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und je 5 µl der cDNA in eine quantitative RT-PCR-Reaktion mit den Primer-Paaren mBD14 5' und mBD14 3' sowie 18S rRNA 5' und 18S rRNA 3' durchgeführt. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD (repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente).

3.3.2 NOD2/CARD15-Signaling induzierte Expression von mBD14

Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Aktivierung des NOD2/CARD15-Signalings und der Induktion der Expression von mBD14 wurde die 1700 bp lange regulatorische Promotor-Region stromaufwärts des Gens *Defb14* in den pGL4.11 Firefly Luciferase Reporter Vektor (siehe 2.1.4) kloniert. Zuvor wurde die gesuchte Promotor-Region mit Hilfe des Ensembl Genome Browsers identifiziert (Abb. 7).



Abb. 7: Klonierte regulatorische Promotor-Region des *Defb14*. Die Promotor-Region wurde mit Hilfe des Ensembl Genome Browsers identifiziert. Darstellung nicht maßstabgetreu.

Das in einer PCR-Reaktion mit genomischer DNA aus C57BL/6 Mäusen als Template und mit dem Primer-Paar mBD14pr pGL4 5' SacI und mBD14pr pGL4 3' XhoI (siehe 2.1.3) amplifizierte Promotor-Fragment wurde in den pGEM[®]-T Easy Vektor zwischenkloniert, sequenziert und konnte anschließend mit den entsprechenden DNA-Restriktionsenzymen herausgeschnitten und daraufhin in den pGL4.11 Firefly Luciferase Reporter Vektor ligiert werden. Der Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen SacI und XhoI zeigt zwei DNA-

Banden in den jeweils für das pGL4.11 Plasmid und den mBD14-Promotor erwarteten Größen von ca. 4 kb für das Plasmid und ca. 1,7 kb für das Insert (Abb. 8).

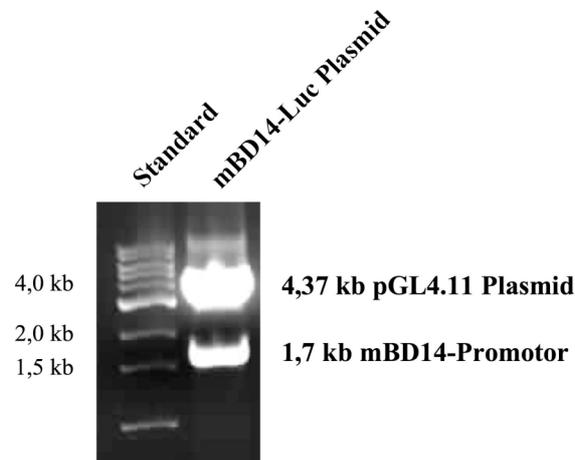


Abb. 8: Kontrollverdau des mBD14-Promotor-Fragments im pGL4.11 Plasmid. Der Kontrollverdau wurde mit den Restriktionsenzymen SacI und XhoI durchgeführt. DNA-Längenstandard: 1 kb Ladder.

Dieses mBD14-Promotor Firefly Luciferase Plasmid (mBD14-Luc) wurde in die Lungenepithelzelllinie LA-4 aus der Maus zusammen mit dem NOD2/CARD15 pcDNA3.1 Expressionsplasmid (NOD2), dem phRL-TK Renilla Luciferase Vektor als Transfektionskontrolle und Muramyldipeptid (MDP), das einen Bestandteil der bakteriellen Zellwand und somit einen Liganden des intrazellulären *Pattern-recognition*-Rezeptors NOD2/CARD15 darstellt, transfiziert. Das MDP kann nur mit Hilfe des Transfektionsmittels die Zellmembran effektiv passieren. Nach 48 h Inkubation wurde ein Luciferase Reporter Assay durchgeführt (siehe 2.2.21). Als Kontrollen dienten zum einen untransfizierte und unstimulierte LA-4 Zellen, zum anderen Zellen, die nur mit dem mBD14-Luc Konstrukt transfiziert wurden. Des Weiteren wurden die LA-4 Zellen mit dem mBD14-Luc Konstrukt und NOD2/CARD15 oder MDP transfiziert, um die basale Aktivierung des Promotors zu überprüfen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Das Modell sieht vor, dass das in die Zellen eingebrachte MDP den intrazellulären NOD2/CARD15-Rezeptor aktiviert. Die ausgelöste Signalkaskade aktiviert wiederum das mBD14-Promotor-Fragment und dies führt zur Expression der Firefly-Luciferase (Abb. 9).

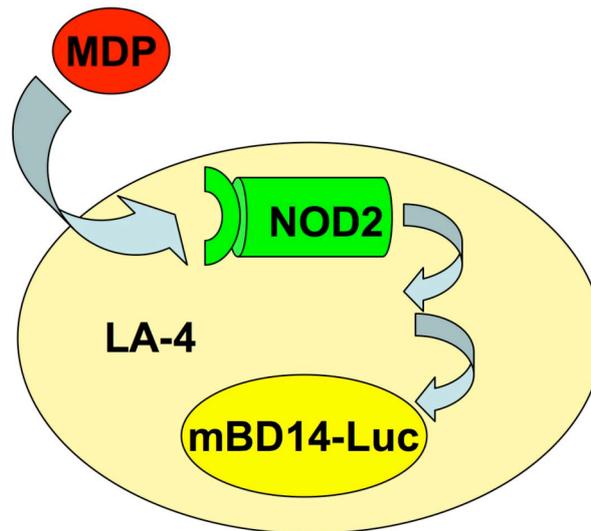


Abb. 9: Modell zur NOD2/CARD15-Signaling induzierten Aktivierung des mBD14-Pomoters. MDP wird in die LA-4 Zellen eingebracht und aktiviert dort NOD2/CARD15. Der Signalkaskade folgt die mBD14-Pomotor regulierte Expression der Luciferase.

Nach Stimulierung der LA-4 Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ MDP konnte in Zusammenhang mit NOD2/CARD15 eine erhöhte Luciferase-Aktivität gemessen werden ($2,89 \pm 0,31$, $p=0,042$), während die Kontrollen nur eine sehr geringe basale Luciferase-Aktivität zeigten ($0,97-1,41 \pm 0,02-0,17$) (Abb. 10).

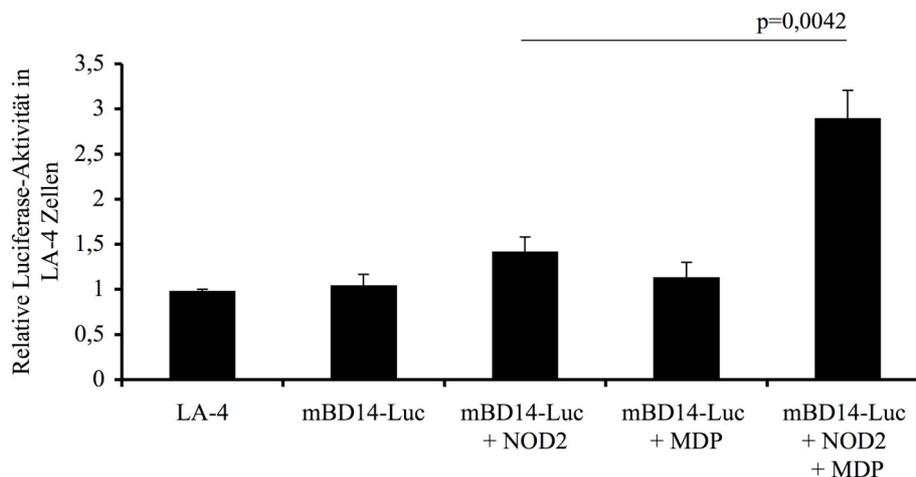


Abb. 10: Durch NOD2/CARD15-Signaling erhöhte Expression der durch den mBD14-Promotor regulierten Luciferase. Die Lungenepithelzelllinie LA-4 aus der Maus wurde untransfiziert und unstimuliert (LA-4) oder transfiziert mit 50 ng/ml mBD14-Promotor Firefly-Luciferase Konstrukt (mBD14-Luc), 50 ng/ml NOD2/CARD15 pcDNA3.1 Expressionsplasmid (NOD2), 10 ng/ml phRL-TK Renilla Luciferase Vektor als Transfektionskontrolle und dem Stimulans MDP (1 $\mu\text{g/ml}$) auf Luciferase-Aktivität hin untersucht. Die dargestellten Daten wurden in 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen erhalten. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der Versuche \pm SD.

Des Weiteren wurde überprüft, ob dieses Modell auch auf Primärzellen übertragbar ist. Dazu wurden wieder BMDCs aus Knochenmark von C57BL/6 Mäusen, wie unter 2.3.5 beschrieben, generiert und mit verschiedenen Konzentrationen von MDP über 24 h stimuliert. Daraufhin konnten die BMDCs geerntet, deren Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.2) und mittels Oligo(dT)₁₅ und M-MLV Reverse Transcriptase in cDNA revers transkribiert werden (siehe 2.2.3). Mit 5 µl dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR-Reaktion (siehe 2.2.5) mit den Primer-Paaren mBD14 5' und mBD14 3' sowie 18S rRNA 5' und 18S rRNA 3' (siehe 2.1.3) durchgeführt. Die 18S rRNA diente hierbei als interner Standard. Die Versuche wurden in Triplikaten aus unterschiedlichen Proben durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (SD).

Die Stimulierung von BMDCs mit MDP zeigte erst mit einer hohen Konzentration von 50 µg/ml eine erhöhte mBD14-Expression ($3,49 \pm 0,23$) (Abb. 11).

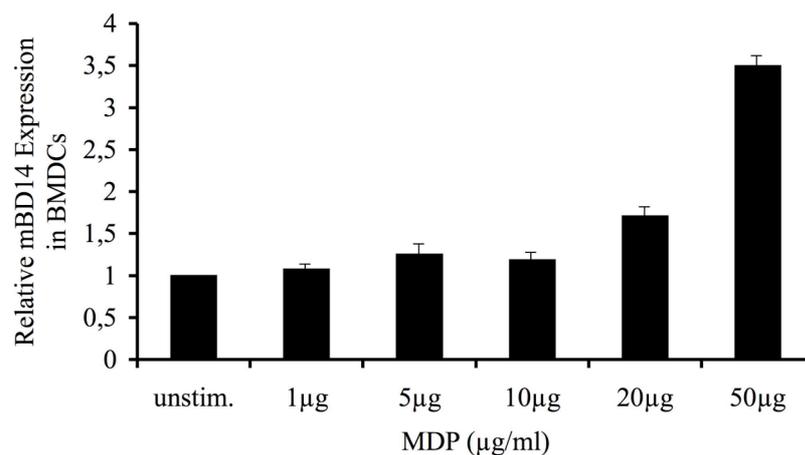


Abb. 11: Relative Expression von mBD14 in BMDCs nach Stimulierung mit MDP. *In vitro* aus Knochenmarkszellen generierte BMDCs wurden an Tag 8 der Kultur mit 1, 5, 10, 20 oder 50 µg/ml MDP über 24 h stimuliert. Die aus diesen Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und je 5 µl der cDNA in eine quantitative RT-PCR-Reaktion mit den Primer-Paaren mBD14 5' und mBD14 3' sowie 18S rRNA 5' und 18S rRNA 3' durchgeführt. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD.

3.4 Klonierung und Expression rekombinanter β -Defensine

Weitere funktionelle Untersuchungen wurden mit rekombinant exprimiertem mBD14 und mBD4 sowie deren humane Orthologe hBD3 und hBD2 durchgeführt. β -Defensine sind mit einem Molekulargewicht von 4-6 kDa kleine Polypeptide. Daher wurden sie mit einem humanen IgG₁ Fc-Teil fusioniert, der die Halbwertszeit der Polypeptide erhöht und eine gute Aufreinigung der Fusionsproteine ermöglicht.

3.4.1 Hergestellte Expressionsvektoren

Anhand von Gesamt-RNA, die aus dem Lungengewebe (mBD14) und der Trachea (mBD4) einer Maus isoliert und in cDNA transkribiert wurde, konnte als nächstes eine Standard-PCR-Reaktion mit entsprechenden Primern für mBD14 und mBD4, welche die Sequenzen der Restriktionsenzyme HindIII und BamHI enthielten, durchgeführt werden (siehe 2.2.2-2.2.4 und 2.1.3). Die cDNA von mCCL20 war im Labor bereits vorhanden, die sequenzoptimierte cDNA von hBD2 und hBD3 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Joost Oppenheim (Laboratory of Molecular Immunoregulation, Division of Basic Science, NCI, National Institutes of Health, Frederick, MA, USA) zur Verfügung gestellt und ebenfalls in einer Standard-PCR-Reaktion mit entsprechenden Primern eingesetzt. Im Fall von mCCL20 wurde anstelle der HindIII Schnittstelle eine NheI Schnittstelle verwendet. Die Amplifikate wurden nach einer Zwischenklonierung in den pGEM[®]-T Easy Vektor in den Signal pIgplus (SIg+) Expressionsvektor ligiert (Abb. 12).

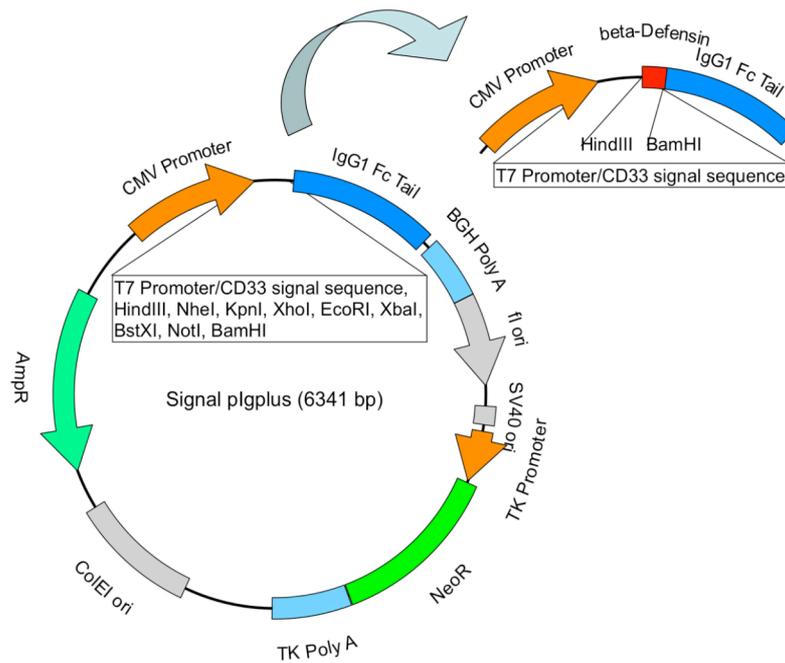


Abb. 12: Klonierungsstrategie mit dem Signal pIgplus Vektor. Vor der *multiple cloning site* (MCS) liegt die CD33 Signal Sequenz, die eine Sekretion des Proteins ermöglicht. Über die Restriktionsenzymstellen HindIII oder NheI und BamHI wurde die jeweilige β -Defensin- oder mCCL20-Sequenz in den SIg⁺-Vektor ligiert. Das in die MCS klonierte Gen wurde folglich als Fusionsprotein mit dem humanen IgG₁ Fc-Teil exprimiert.

Der Testverdau der SIg⁺-Konstrukte mit HindIII und BamHI oder mit NheI und BamHI zeigte Banden in der erwarteten Größe von ca. 120 bp für mBD14, mBD4, hBD3 und hBD2 sowie von ca. 300 bp für mCCL20 (Abb. 13). Sequenzanalysen der hergestellten Konstrukte bestätigten die Fusion der ORFs von mBD14, mBD4, hBD3, hBD2 und mCCL20 mit dem Fc-Teil des humanen IgG₁.

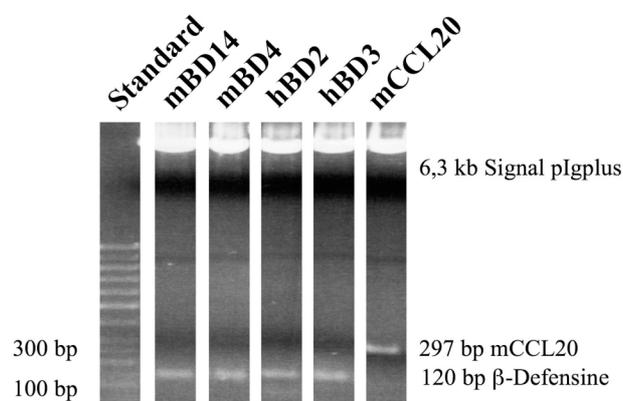


Abb. 13: Kontrollverdau der β -Defensine und des mCCL20 im Signal pIgplus Vektor. Die klonierten β -Defensin Konstrukte wurden mit HindIII und BamHI, das mCCL20 Konstrukt wurde mit NheI und BamHI verdaut. DNA-Längenstandard: Molecular Weight Marker XIV.

Mit diesen Defensin-SIg+- oder mCCL20-SIg+-Konstrukten als Template konnte eine Standard-PCR zur Amplifikation der jeweiligen Sequenz mit den Primern mBD14 pMT 5' BglII, mBD4 pMT 5' BglII, hBD2 pMT 5' BglII, hBD3 pMT 5' BglII oder mCCL20 pMT 5' BglII und human-Ig pMT 3' NotI durchgeführt werden (siehe 2.1.3 und 2.2.4). Anhand der entsprechenden Restriktionsenzymststellen wurden die Amplifikate nach einer Zwischenklonierung in den pGEM®-T Easy Vektor in den pMT/BiP/V5-His A Drosophila Expressionsvektor integriert. Mittels der Enzymststellen AccI und SapI wurde auch die Hygromycin-Resistenzkassette aus dem pCoHygro Vektor geschnitten und in den pMT/BiP/V5-His A ligiert (Abb. 14). Auf diese Weise konnte eine höhere Expressionseffizienz erzielt werden als mit einer Kotransfektion des Expressionsvektors und des Resistenzplasmids.

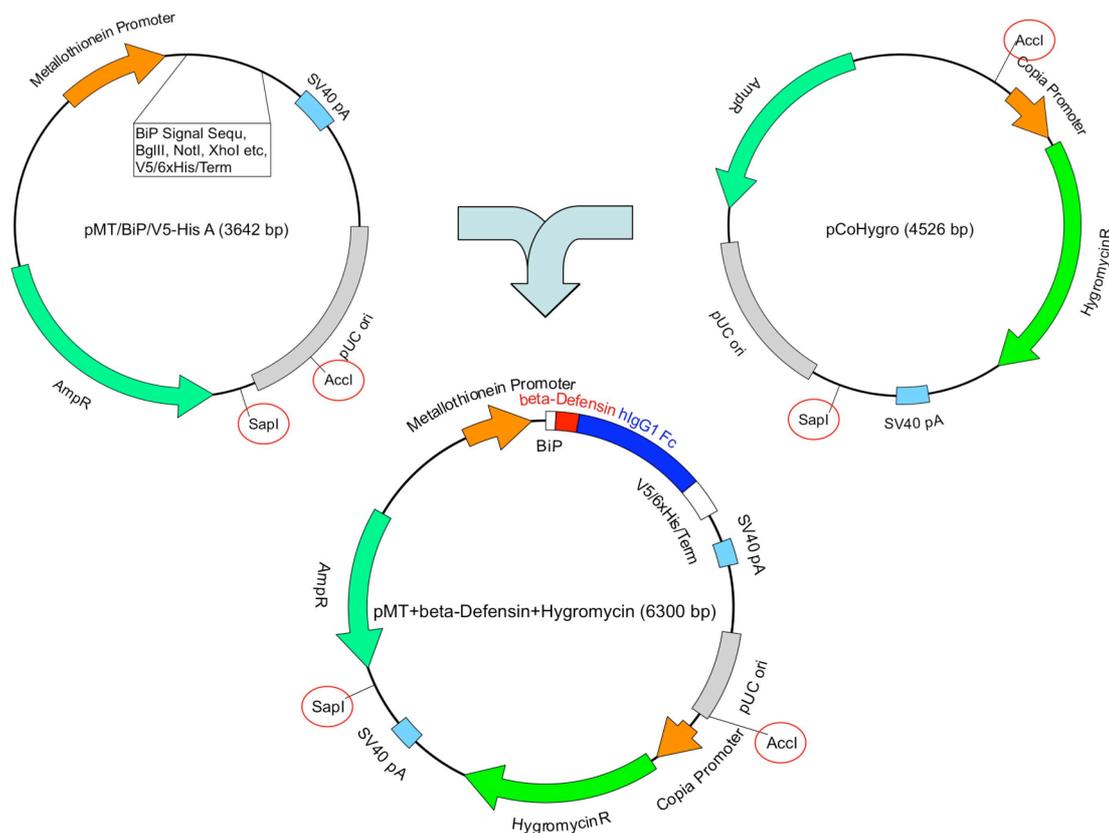


Abb. 14: Klonierungsstrategie zur Herstellung eines pMT/BiP/V5-His A Vektors mit Hygromycin-Resistenz. Die Expression des Defensin:Ig-Fusionsproteins, das über die Restriktionsenzymststellen BglII und NotI in die MCS des pMT/BiP/V5-His A Vektors kloniert wurde, findet unter der Kontrolle des durch Kupfer induzierbaren Drosophila Metallothionein Promotors statt. Die BiP-Signalsequenz ist für die Sezernierung des Proteins in das Kulturmedium verantwortlich. Für eine bessere Selektion wurde die Hygromycin-Kassette aus dem pCoHygro Vektor in den pMT/BiP/V5-His A Vektor über AccI und SapI integriert.

Der Kontrollverdau der Defensin-Fusionskonstrukte im pMT/BiP/V5-His A-Hygro mit den Restriktionsenzymen BglII und NotI zeigte die erwarteten Banden bei ca. 840 bp für die Defensin:Ig-Fragmente und bei ca. 1,0 kb für mCCL20:Ig (Abb. 15). Die Sequenzierungen belegten, dass die Konstrukte richtig und ohne *frame shift*- oder Punktmutationen etc. im Vektor integriert sind.

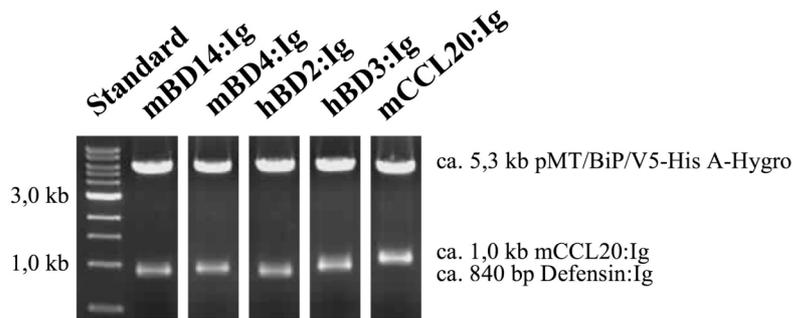


Abb. 15: Kontrollverdau der β -Defensin:Ig-Konstrukte und des mCCL20:Ig in pMT/BiP/V5-His A-Hygro. Die klonierten β -Defensin und mCCL20 Konstrukte wurden mit BglII und NotI verdaut. DNA-Längenstandard: 1 kb Ladder.

3.4.2 Expression der hIgG₁-Fusionsproteine in HEK-293 und BFS-1 Zellen

Die hergestellten SIg⁺-Expressionsvektoren mit den Sequenzen von mBD14, mBD4, hBD2, hBD3 und mCCL20 sowie der SIg⁺-Leervektor als Ig-Kontrolle (hIg) oder das p55:Ig-Konstrukt wurden in HEK-293 und BFS-1 Zellen transfiziert (siehe 2.3.3). Der p55-SIg⁺-Expressionsvektor war im Labor bereits vorhanden. Nach einer ca. 3 Wochen andauernden Selektion der transfizierten Zellen mit Neomycin (G418) in einer Konzentration von 200-1000 μ g/ml konnte der Zellkulturüberstand gewonnen und auf die Expression der Fusionsproteine hin überprüft werden. Nach der Immunpräzipitation der hIgG₁-Fusionsproteine mit Protein G Sepharose wurde eine SDS-PAGE und ein Western-Blot mit dem anti human IgG (H+L) HRP Antikörper durchgeführt (siehe 2.2.17-2.2.20 und 2.1.6).

Anhand der Western-Blots konnte nachgewiesen werden, dass die transfizierten HEK-293 Zellen hIgG₁-Fusionsproteine mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 40 kDa exprimieren (Abb. 16a). Das Expressionsprodukt des SIg⁺-Leervektors hIgG₁ zeigt eine Bande bei ca. 34 kDa. Auch für die transfizierten BFS-1 Zellen konnte eine Expression der Fusionsproteine gezeigt werden (Abb. 16b). Die Höhe der Bande des p55:Ig-Fusionsproteins entspricht einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa.

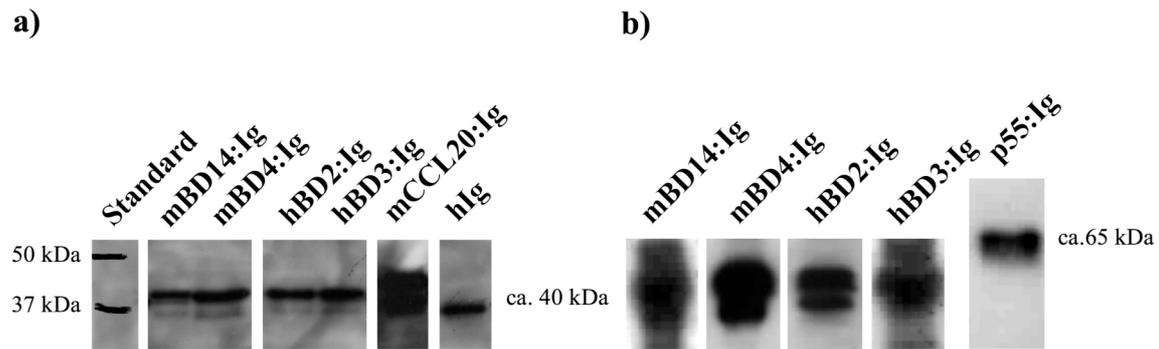


Abb. 16: Western-Blot zum Nachweis der Defensin-Ig-, mCCL20-Ig-, hIgG₁- oder p55-Ig-Expression in HEK-293 und BFS-1 Zellen. a) Expression von mBD14:Ig, mBD4:Ig, hBD2:Ig, hBD3:Ig, mCCL20:Ig und hIgG₁ in HEK-293 Zellen. b) Expression von mBD14:Ig, mBD4:Ig, hBD2:Ig, hBD3:Ig und p55:Ig in BFS-1 Zellen. Der Zellkulturüberstand stabil exprimierender Zellen wurde nach Sterilfiltration einer Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose unterzogen. Daraufhin wurde eine SDS-PAGE und ein Western-Blot mit dem anti human IgG (H+L) HRP Antikörper durchgeführt. SDS-PAGE Protein Standard: Precision Plus Protein All Blue.

3.4.3 Expression der hIgG₁-Fusionsproteine in *Drosophila* Schneider 2 (S2) Zellen

Die pMT/BiP/V5-His A-Hygro Expressionsvektoren mit den cDNA-Sequenzen von mBD14:Ig, mBD4:Ig, hBD2:Ig, hBD3:Ig und mCCL20:Ig, wurden in *Drosophila* S2 Zellen transfiziert (siehe 2.3.3). Nach einer ca. 4 Wochen andauernden Selektion mit Hygromycin in einer Konzentration von 100-300 µg/ml konnte die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von Kupfersulfat (CuSO₄) mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml induziert werden. Der anschließend gesammelte und sterilfiltrierte Zellkulturüberstand wurde nach einer Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit dem anti human IgG (H+L) HRP Antikörper auf die Expression der Fusionsproteine hin überprüft (siehe 2.2.17-2.2.20 und 2.1.6).

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen *Drosophila* S2 Zelllinien ein hIgG₁-Fusionsprotein mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 40 kDa exprimieren (Abb. 17).

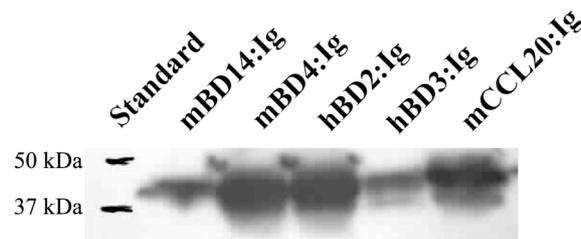


Abb. 17: Western-Blot zum Nachweis der Defensin:Ig- oder mCCL20:Ig-Expression in Drosophila S2 Zellen. Expression von mBD14:Ig, mBD4:Ig, hBD2:Ig, hBD3:Ig und mCCL20:Ig in Drosophila S2 Zellen. Der Zellkulturüberstand stabil exprimierender Zellen wurde nach Sterilfiltration einer Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose unterzogen. Daraufhin wurde eine SDS-PAGE und ein Western-Blot mit dem anti human IgG (H+L) HRP Antikörper durchgeführt. SDS-PAGE Protein Standard: Precision Plus Protein All Blue.

3.4.4 Aufreinigung rekombinant exprimierter hIgG₁-Fusionsproteine

Im Rahmen der Aufreinigung der Fusionsproteine wurden 0,5-2 l Zellkulturüberstand gesammelt, sterilfiltriert und über eine äquilibrierte Protein G Sepharose gepumpt. Nach dem Waschen mit PBS-Puffer und der Elution mit Elutionspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,5) wurde das Eluat mit Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl, pH 9,0) neutralisiert und anschließend gegen PBS-Puffer dialysiert. Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurde von der Säulendurchlaufaktion (DF), bei Beginn (WF 1) und Ende (WF 2) des Waschens und von jeder Elutionsfraktion (EF n) ein Aliquot von 30 µl entnommen (siehe 2.2.16). Schließlich wurde der Proteingehalt der Elutionsfraktionen photometrisch bestimmt (siehe 2.2.18).

Der Western-Blot zeigt die einzelnen Schritte der Proteinaufreinigung über die Protein G Sepharosesäule. In der Durchlaufaktion war nach dem Lauf über die Säule meist kein Fusionsprotein mehr vorhanden, sondern war offensichtlich vollständig an die Protein G Sepharosesäule gebunden. Sowohl zu Beginn als auch zum Ende des Waschens hat sich das Protein nicht von der Säule gelöst. Erst ab der zweiten Elutionsfraktion war das jeweilige hIgG₁-Fusionsprotein nachweisbar. Je nach Expressionseffizienz war in der Elutionsfraktion 6 weniger bis kein Fusionsprotein mehr zu finden. Der in Abb. 18 oben dargestellte Western-Blot der Aufreinigung von mBD14:Ig aus Drosophila S2 Zellkulturüberstand ist repräsentativ für die Aufreinigungen der in HEK-293 und Drosophila S2 Zellen exprimierten hIgG₁-Fusionsproteine. Das mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbte SDS-PAGE Gel dokumentiert die erzielte Reinheit (Abb. 18 unten).

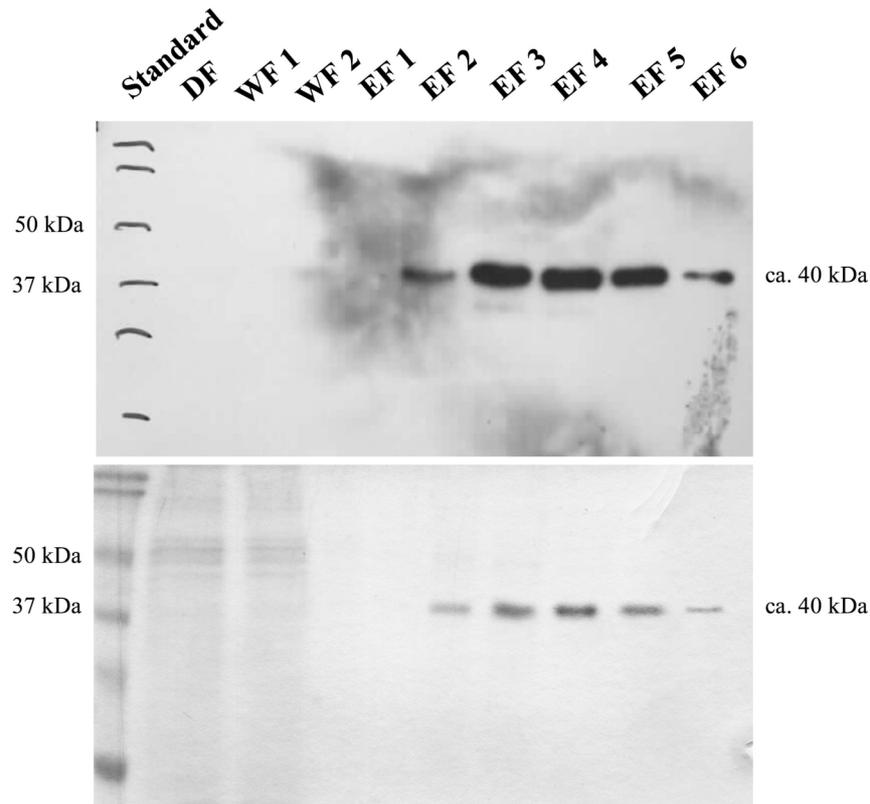


Abb. 18: Western-Blot zum Nachweis der Aufreinigung der hIgG₁-Fusionsproteine am Beispiel des mBD14:Ig aus *Drosophila* S2 Zellkulturüberstand. Oben: Western-Blot; unten: Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbtes SDS-PAGE Gel. Über eine Protein G Sepharosesäule aufgereinigte hIgG₁-Fusionsproteine wurden nach dem Waschen mit 50 ml PBS-Puffer mit 1 ml Elutionspuffer pro Fraktion eluiert und anschließend mit 1M Tris-HCl pH=9 neutralisiert. Es wurden von jeder Fraktion 30 µl Aliquots auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Der Western-Blot wurde mit dem anti human IgG (H+L) HRP Antikörper durchgeführt. DF Säulendurchlauffraktion, WF Waschfraktion, EF Elutionsfraktion. SDS-PAGE Protein Standard: Precision Plus Protein All Blue.

3.5 Antibakterielle Aktivität der β -Defensin:Ig-Fusionsproteine

Zum Nachweis, dass die rekombinant exprimierten β -Defensin:Ig-Fusionsproteine die für die Familie der β -Defensine charakteristische antibakterielle Wirkung besitzen, wurden antibakterielle Assays mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienstämmen durchgeführt.

In den Tests wurde jeweils ein Stamm von *E. coli* (ATCC 25922), *B. subtilis* (ATCC 6633), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) und *S. aureus* (ATCC 25923) eingesetzt (siehe 2.1.10). Aus den ü. N. herangezogenen Kulturen wurde ein Aliquot in frisches und antibiotikumfreies LB-Medium angeimpft und bei 37° C geschüttelt. Hat die Kultur eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht, konnte die Bakterienlösung mit ABA-Puffer auf eine Zellzahl von 1×10^3 Zellen in 100 μ l eingestellt und mit 1, 2 oder 5 μ g/ml β -Defensin:Ig-Fusionsprotein versetzt werden. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Menge PBS-Puffer ohne β -Defensin:Ig-Fusionsprotein eingesetzt. Zusätzlich wurde als weitere Kontrolle das hIgG₁ ohne β -Defensin verwendet, um auszuschließen, dass der Fc-Teil das Überleben der Bakterien beeinflusst. Nach 3 h Inkubation bei 37° C wurde eine 1:10 Verdünnung des jeweiligen Ansatzes auf LB-Platten ausgestrichen und ü. N. bei 37° C inkubiert. Schließlich wurden die jeweils gewachsenen Kolonien gezählt (siehe 2.2.9). Die Versuche wurden stets in Triplikaten durchgeführt und die daraus erhaltenen Mittelwerte \pm SD grafisch dargestellt.

Gegen *E. coli* (Gram-negativ) zeigte das Fusionsprotein mBD14:Ig eine deutliche antibakterielle Wirkung. Schon ab einer Konzentration von 2 μ g/ml waren keine Kolonien mehr auf den LB-Agarplatten gewachsen, d. h. die Bakterien wurden vollständig abgetötet (Abb. 19a+b). Gegen *S. aureus* (Gram-positiv) hingegen zeigte sich keine antibakterielle Aktivität des eingesetzten mBD14:Ig (Abb. 19c). Der Gram-negative Keim *P. aeruginosa* reagiert wiederum empfindlich auf mBD14:Ig, lässt sich aber auch mit einer Konzentration von 5 μ g/ml mBD14:Ig nicht vollständig am Wachstum hindern (Abb. 19d). *B. subtilis* (Gram-positiv) zeigte nach der Behandlung mit mBD14:Ig in einer Konzentration von 5 μ g/ml keine Kolonien mehr auf den LB-Agarplatten d. h. alle Bakterien wurden abgetötet (Abb. 19e).

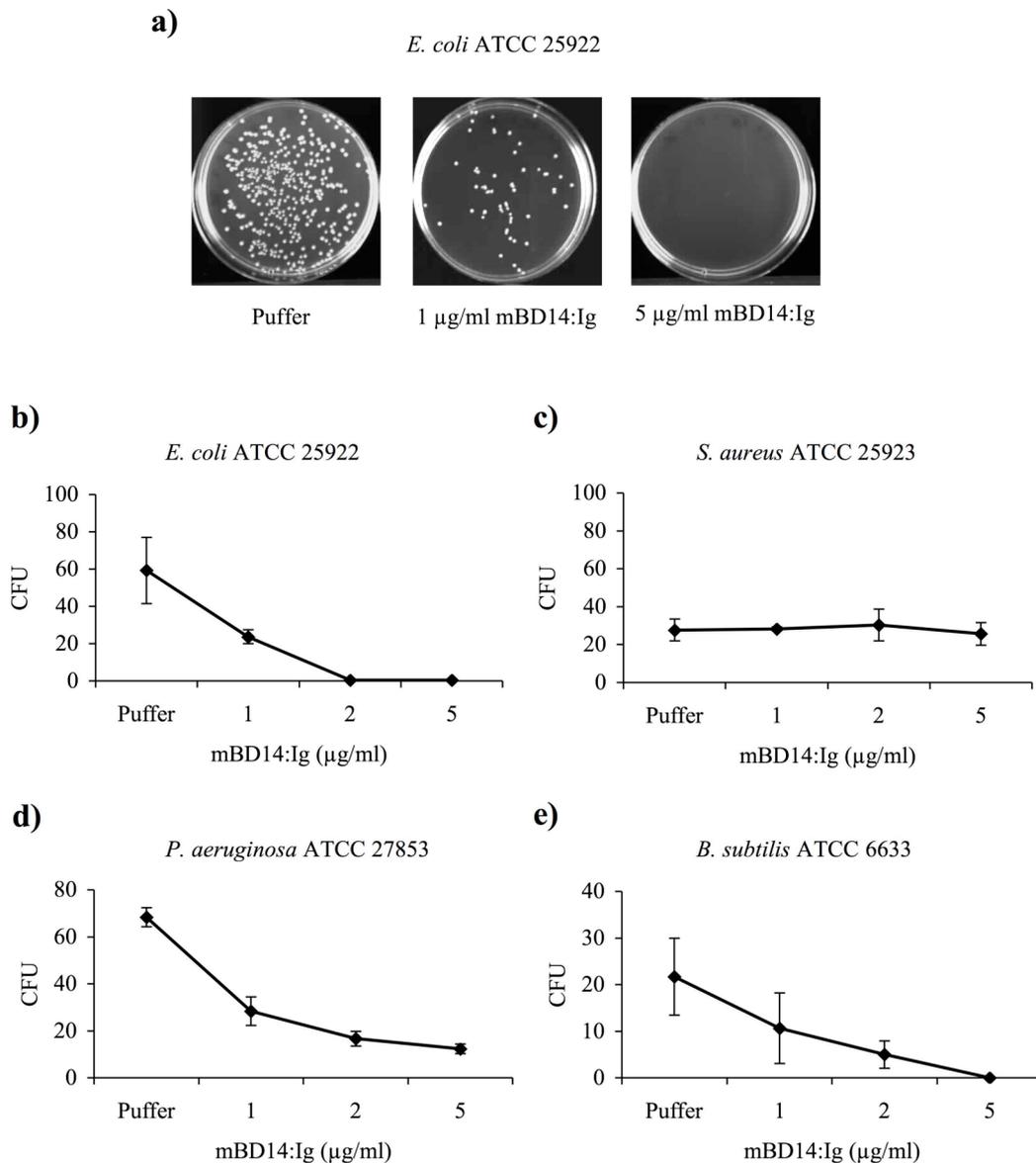


Abb. 19: Antibakterielle Aktivität des mBD14:Ig. a) *E. coli* ATCC 25922 auf LB-Agarplatten, b) *E. coli* ATCC 25922, c) *S. aureus* ATCC 25923, d) *P. aeruginosa* ATCC 27853, e) *B. subtilis* ATCC 6633. Aus einer Vorkultur wurden die Bakterien bis zu einer OD_{600} von 1,0 herangezogen und auf 1×10^3 Zellen in einem Volumen von 100 µl eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien mit 1, 2 oder 5 µg/ml mBD14:Ig oder mit PBS-Puffer (Puffer) über 3 h bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung auf LB-Agarplatten ausplattiert und ü. N. bei 37° C inkubiert. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und die Mittelwerte \pm SD aufgetragen.

Das mBD4:Ig demonstrierte ebenfalls antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *E. coli*, wie in Abb. 20a gezeigt. *S. aureus* hingegen zeigte wieder keine veränderte Überlebensrate nachdem mBD4:Ig zugegeben wurde (Abb. 20b). Die Überlebensrate von *P. aeruginosa* sinkt wiederum mit steigender mBD4:Ig Konzentration, aber auch mit 5 µg/ml mBD4:Ig überlebten noch einzelne Bakterien (Abb. 20c). *B. subtilis* wurde wiederum mit der höchsten eingesetzten mBD4:Ig Konzentration vollständig abgetötet, sodass keine einzige Kolonie mehr gewachsen war (Abb. 20d).

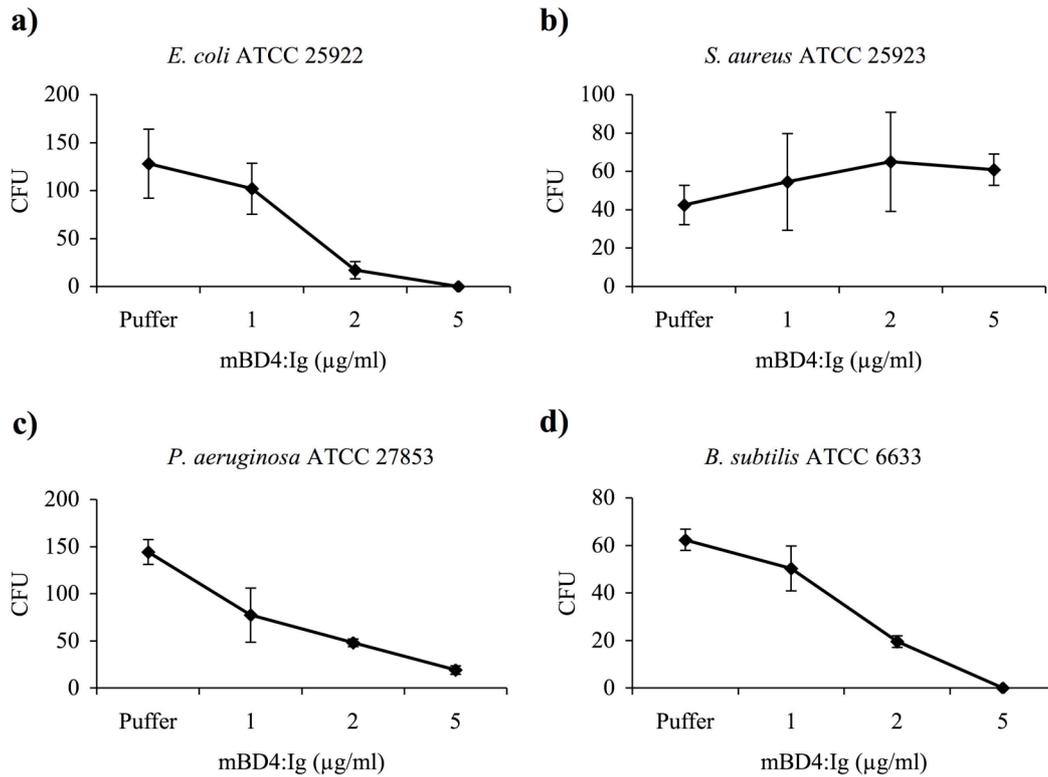


Abb. 20: Antibakterielle Aktivität des mBD4:Ig. a) *E. coli* ATCC 25922, b) *S. aureus* ATCC 25923, c) *P. aeruginosa* ATCC 27853, d) *B. subtilis* ATCC 6633. Aus einer Vorkultur wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 herangezogen und auf 1×10^3 Zellen in einem Volumen von 100 µl eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien mit 1, 2 oder 5 µg/ml mBD4:Ig oder mit PBS-Puffer (Puffer) über 3 h bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung auf LB-Agarplatten ausplattiert und ü. N. bei 37° C inkubiert. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und die Mittelwerte \pm SD aufgetragen.

Die Versuche zur antibakteriellen Aktivität des hBD3:Ig zeigten, dass *E. coli* erst mit einer Konzentration von 5 µg/ml hBD3:Ig vollständig abgetötet wurde (Abb. 21a). Die Versuche mit *S. aureus* zeigten auch hier wieder keine bakterizide Wirkung des verwendeten hBD3:Ig-Fusionsproteins (Abb. 21b).

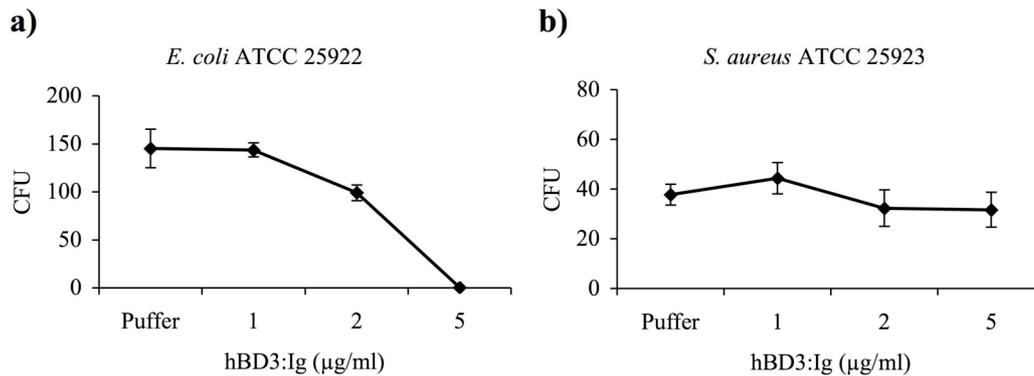


Abb. 21: Antibakterielle Aktivität des hBD3:Ig. a) *E. coli* ATCC 25922, b) *S. aureus* ATCC 25923. Aus einer Vorkultur wurden die Bakterien bis zu einer OD_{600} von 1,0 herangezogen und auf 1×10^3 Zellen in einem Volumen von 100 µl eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien mit 1, 2 oder 5 µg/ml hBD3:Ig oder mit PBS-Puffer (Puffer) über 3 h bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung auf LB-Agarplatten ausplattiert und ü. N. bei 37° C inkubiert. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und die Mittelwerte \pm SD aufgetragen.

Auch das hBD2:Ig-Fusionsprotein wurde bezüglich einer antibakteriellen Wirkung überprüft. Im Test mit *E. coli* waren schon ab einer hBD2:Ig Konzentration von 2 µg/ml keine Kolonien mehr auf den LB-Agarplatten gewachsen (Abb. 22a). Im Gegensatz dazu zeigt das hBD2:Ig gegen *S. aureus* auch in der höchsten eingesetzten Konzentration von 5 µg/ml kein vollständiges Abtöten der Bakterien. Allerdings nimmt mit steigender Konzentration die Zahl an Kolonien ab (Abb. 22b).

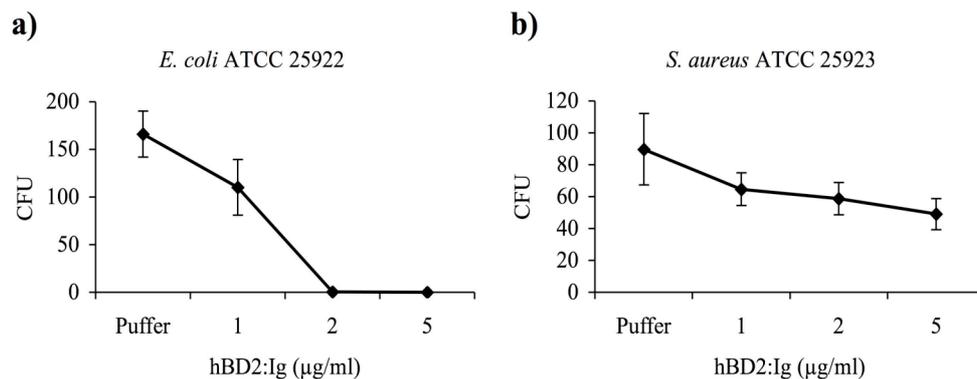


Abb. 22: Antibakterielle Aktivität des hBD2:Ig. a) *E. coli* ATCC 25922, b) *S. aureus* ATCC 25923. Aus einer Vorkultur wurden die Bakterien bis zu einer OD_{600} von 1,0 herangezogen und auf 1×10^3 Zellen in einem Volumen von 100 µl eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien mit 1, 2 oder 5 µg/ml hBD2:Ig oder mit PBS-Puffer (Puffer) über 3 h bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung auf LB-Agarplatten ausplattiert und ü. N. bei 37° C inkubiert. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und die Mittelwerte \pm SD aufgetragen.

Als Kontrolle wurden *E. coli* und *S. aureus* mit hIgG₁, dem Expressionsprodukt des SIg⁺-Leervektors auf die gleiche Art und Weise behandelt wie zuvor mit den β -Defensin:Ig-Konstrukten. Die Ergebnisse demonstrieren, dass der Fc-Teil keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Bakterien hat (Abb. 23).

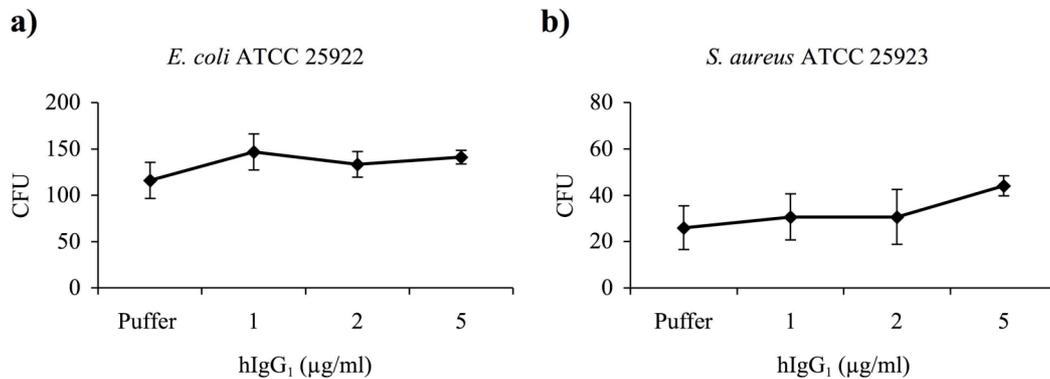


Abb. 23: Antibakterielle Versuche mit hIgG₁. a) *E. coli* ATCC 25922, b) *S. aureus* ATCC 25923. Aus einer Vorkultur wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 herangezogen und auf 1×10^3 Zellen in einem Volumen von 100 µl eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien mit 1, 2 oder 5 µg/ml hIgG₁ oder mit PBS-Puffer (Puffer) über 3 h bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung auf LB-Agarplatten ausplattiert und ü. N. bei 37° C inkubiert. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und die Mittelwerte \pm SD aufgetragen.

In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht über die antibakterielle Wirkung der β -Defensin-Fusionsproteine gezeigt. Die Stärke der antibakteriellen Aktivität ist unterteilt in vollständiges Abtöten der Bakterien (+ + +), unvollständiges Abtöten, aber deutlich bakterizider Effekt (+ +), leicht bakterizider Effekt (+) und keine bakterizide Wirkung (-). Nicht getestete Kombinationen wurden mit (x) gekennzeichnet.

	mBD14:Ig	mBD4:Ig	hBD3:Ig	hBD2:Ig	hIgG ₁
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+ +	+ +	x	x	x
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+ + +	+ + +	x	x	x

3.6 Expression von mCCR6 in HEK-293 Zellen

Für die β -Defensine hBD1, hBD2, mBD2 und mBD3 wurde bereits gezeigt, dass diese an den Chemokin-Rezeptor CCR6 binden (Yang et al., 1999; Biragyn et al., 2001). Zur Untersuchung der Interaktion von verschiedenen weiteren β -Defensinen mit CCR6 der Maus wurden HEK-293 Zellen, welche weder hCCR6 noch mCCR6 exprimieren, mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1, welches den vollständigen ORF von mCCR6 enthält, transfiziert (siehe 2.3.3). Das mCCR6-pcDNA3.1-Expressionsplasmid war im Labor bereits vorhanden. Nach der Selektion der transfizierten Zellen mit 200-1000 $\mu\text{g/ml}$ Neomycin über 3 Wochen konnte die Expression des mCCR6 auf der Zelloberfläche der HEK-293 Zellen mittels Durchflusszytometrie überprüft werden (siehe 2.3.11). Dazu wurde als primärer Antikörper der anti mCCR6 aus der Ratte und als sekundärer Antikörper der anti Ratte IgG (H+L) Alexa 488 in einer Verdünnung von jeweils 1:200 eingesetzt (siehe 2.1.6).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt anhand eines starken Fluoreszenzsignals (MFI=500), dass die HEK-293 Zellen auf ihrer Oberfläche mCCR6 exprimieren, während die Kontrollen mit den untransfizierten HEK-293 Zellen und die Isotyp-Kontrolle nur ein basales Fluoreszenzsignal (MFI=6) zeigen und damit eine unspezifische Bindung des primären oder sekundären Antikörpers an die transfizierten Zellen ausschließen (Abb. 24).

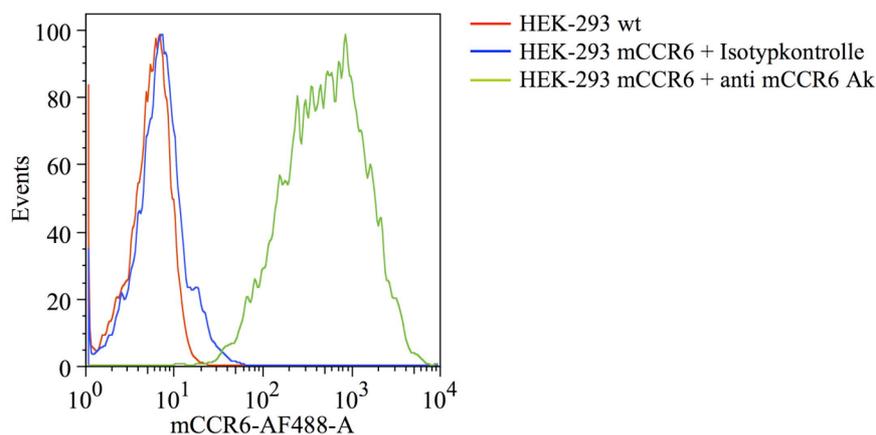


Abb. 24: Nachweis der Expression von mCCR6 auf der Oberfläche von HEK-293 Zellen. Mit mCCR6-pcDNA3.1 transfizierte HEK-293 Zellen wurden nach der Selektion über 3 Wochen mit 200-1000 $\mu\text{g/ml}$ Neomycin mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von mCCR6 hin überprüft. Antikörper: Ratte IgG2a/ κ Isotyp, Ratte anti Maus CCR6, anti Ratte IgG (H+L) Alexa 488, jeweils 1:200 verdünnt.

3.7 Das mBD14:Ig-Fusionsprotein bindet an CCR6

Bisher wurde für die Maus β -Defensine mBD2 und mBD3 gezeigt, dass diese mit dem CC-Chemokin Rezeptor CCR6 interagieren (Biragyn et al., 2001). In den folgenden Versuchen sollte überprüft werden, ob auch mBD14 an diesen Rezeptor bindet. Daher wurden die zuvor mit einem Expressionsvektor für mCCR6 stabil transfizierten HEK-293 Zellen mit mBD14:Ig und mCCL20:Ig als Positivkontrolle jeweils in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ für 20 min bei RT inkubiert. Hierfür wurde FACS-Puffer mit 0,05% Natriumazid verwendet, um eine Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes zu verhindern. Die Bindung des Fusionsproteins an mCCR6 auf HEK-293 Zellen wurde mit Hilfe des PE-konjugierten anti human IgG (H+L) Antikörpers (siehe 2.1.6) in durchflusszytometrischen Messungen untersucht.

Unter den genannten Bedingungen zeigte das mBD14:Ig-Fusionsprotein mit einer MFI von 122 (Kontrollen MFI=10) ähnlich wie das als Positivkontrolle eingesetzte mCCL20:Ig (mCCL20:Ig MFI=1901, Kontrollen MFI=10) Bindung an mCCR6 exprimierende HEK-293 Zellen, die allerdings schwächer ausfällt, als die des mCCL20:Ig (Abb. 25a+b).

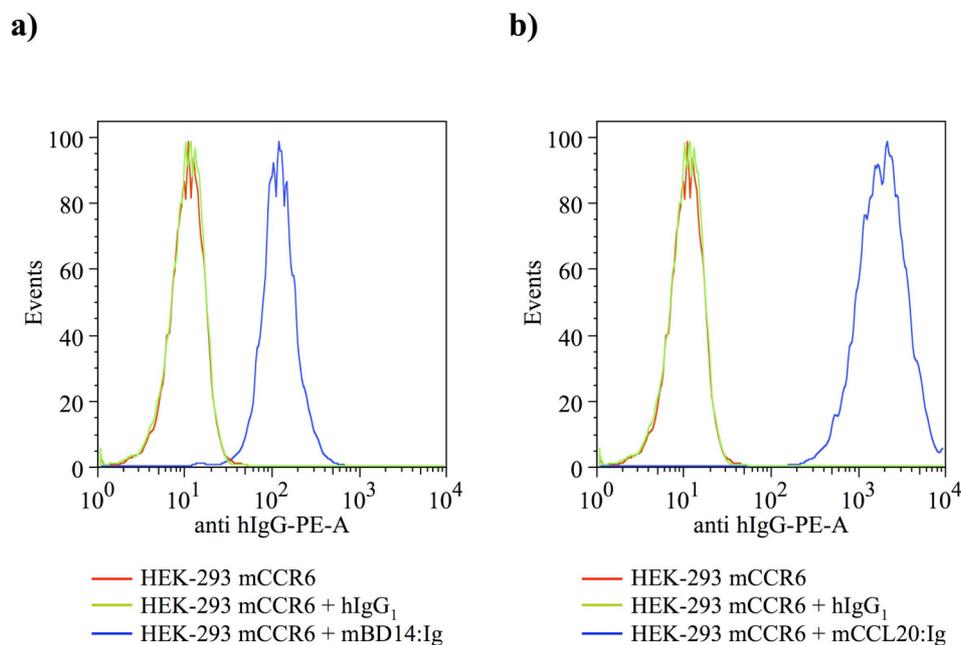


Abb. 25: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindung von mBD14:Ig an mCCR6. a) mBD14:Ig oder b) mCCL20:Ig als Positivkontrolle auf mCCR6 exprimierenden HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden in FACS-Puffer mit 0,05% Natriumazid mit mBD14:Ig oder mCCL20:Ig jeweils in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ 20 min bei RT inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde der anti hIgG (H+L) Ak eingesetzt.

3.8 β -Defensin:Ig-Fusionsproteine induzieren Chemotaxis

Die Interaktion von β -Defensinen mit dem Chemokinrezeptor CCR6 wurde mit β -Defensin:Ig-Fusionsproteinen, die aus HEK-293 Zellüberständen aufgereinigt wurden, überprüft. Dazu wurden mCCR6⁺ oder hCCR6⁺ HEK-293 Zellen sowie residente Monozyten von C57BL/6 Mäusen aus einer Peritoneal-Lavage oder humane periphere Blutmononukleare Zellen (PBMCs) verwendet. Die Zellen wurden in die obere Kammer, die potentiellen chemotaktischen Liganden wurden in die untere Kammer einer 48-Loch Mikrochemotaxisplatte gegeben. Die Kammern waren durch eine Polycarbonat-Filtermembran getrennt. Nach 1,5 h Inkubation unter Verwendung von Monozyten oder 5 h Inkubation unter Verwendung von HEK-293 Zellen konnten die Filtermembranen entfernt und gefärbt werden. Unter dem Lichtmikroskop wurden die durch die Filtermembran gewanderten Zellen gezählt und die Mittelwerte \pm SD als Zellzahl/HPF grafisch dargestellt (siehe 2.3.8). Die Chemotaxisversuche wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. J. J. Oppenheim (Laboratory of Molecular Immunoregulation, Division of Basic Science, NCI, National Institutes of Health, Frederick, MA, USA) durchgeführt. Residente periphere Monozyten der Maus aus Peritoneal-Lavage, humane PBMCs und hCCR6⁺ HEK-293 Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. J. J. Oppenheim zur Verfügung gestellt. Die mCCR6⁺ HEK-293 Zellen sowie die β -Defensin:Ig-Fusionsproteine und das hIgG₁ als Kontrolle wurden, wie unter 2.3.3 und 2.2.16 beschrieben, hergestellt.

Mit mBD14:Ig und hBD3:Ig als chemotaktische Liganden zeigen die mCCR6 exprimierenden HEK-293 Zellen den für Chemotaxis Experimente typischen glockenförmigen und dosisabhängigen Verlauf, d. h. sowohl mBD14:Ig als auch das orthologe hBD3:Ig können gegenüber HEK-293 Zellen, die mCCR6 exprimieren, Chemotaxis induzieren. Die stärkste Aktivität wurde unter Verwendung von mBD14:Ig bzw. hBD3:Ig mit einer Konzentration von 100 ng/ml (70 ± 7 bzw. 55 ± 2 Zellen/HPF) beobachtet. Als Kontrolle wurde das hIgG₁ in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt, um einen chemotaktischen Effekt des Fc-Teils der Fusionsproteine auszuschließen (Abb. 26a). In allen Versuchen zeigte das hIgG₁ keinen Einfluss auf die Migration der untersuchten Zellen. Wie in Abb. 26b dargestellt, zeigte sich, dass das hBD3:Ig, nicht aber das mBD14:Ig, chemotaktisch auf Zellen wirkt, die den humanen CCR6-Rezeptor exprimieren. Die maximale Migrationsrate mit 74 ± 4 Zellen/HPF liegt hier bei einer Konzentration von 1000 ng/ml. Interessanterweise scheint das mBD14:Ig speziesspezifisch mit dem CCR6 Rezeptor der Maus wechselwirken zu können, während das hBD3:Ig sowohl spezifisch mit dem humanen CCR6 Rezeptor als auch kreuzspezifisch mit

dem CCR6-Rezeptor der Maus wechselwirkt. Zusätzlich wurden Monozyten der Maus oder des Menschen im Chemotaxis Assay eingesetzt. Obwohl die Monozyten beider Spezies CCR6 nicht exprimieren, sind sie in der Lage, chemotaktische Aktivität gegenüber beiden Fusionsproteinen zu zeigen. Die Peritonealzellen der Maus weisen mit mBD14:Ig (speziesspezifisch) bzw. hBD3:Ig (kreuzspezifisch) maximale Migration bei einer Konzentration von 1000 ng/ml auf (137 ± 3 bzw. 97 ± 5 Zellen/HPF), wobei hier mit mBD14:Ig mehr gewanderte Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 26c). Die humanen PBMCs zeigen mit mBD14:Ig (kreuzspezifisch) oder hBD3:Ig (speziesspezifisch) maximale Migration bei einer Konzentration von 100 ng/ml (186 ± 18 bzw. 137 ± 20), wobei auch hier mBD14:Ig eine stärkere Migration induziert, während die PBMCs mit hBD3:Ig auch noch in höheren Konzentrationen vermehrt wandern (Abb. 26d).

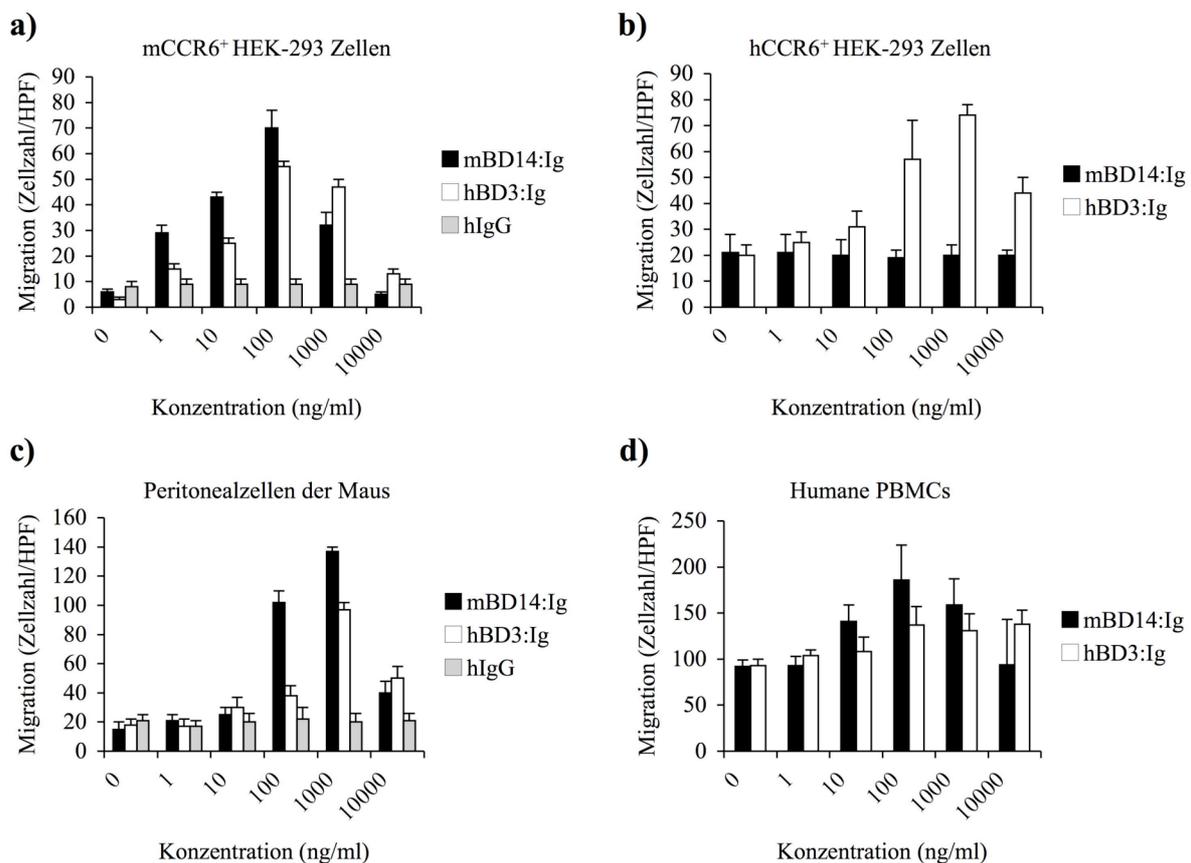


Abb. 26: Migration verschiedener Zellen gegen mBD14:Ig und hBD3:Ig. a) mCCR6⁺ HEK-293 Zellen, b) hCCR6⁺ HEK-293 Zellen, c) residente Peritonealzellen der Maus, d) humane PBMCs. Die Zellen wurden in die obere Kammer, mBD14:Ig und hBD3:Ig sowie hIgG₁ als Kontrolle in die untere Kammer einer 48-Loch Mikro-Chemotaxisplatte gegeben. Die Kammern waren durch eine Polycarbonat-Filtermembran getrennt. Nach 1,5-5 h Inkubation wurden die Filtermembranen entfernt und gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die durch die Filtermembran gewanderten Zellen gezählt und die Mittelwerte der Triplikate \pm SD als Zellzahl/HPF aufgetragen (repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche).

Des Weiteren wurden die Fusionsproteine mBD4:Ig und hBD2:Ig in Chemotaxisversuchen untersucht. Diese demonstrierten ähnliche Eigenschaften wie mBD14:Ig und hBD3:Ig. Das als chemotaktisches Agens eingesetzte mBD4:Ig induzierte unter Verwendung von mCCR6⁺ HEK-293 Zellen bei einer Konzentration von 100 ng/ml maximale Migration (148 ± 23 Zellen/HPF), das hBD2:Ig erst ab einer Konzentration von 1000 ng/ml (164 ± 7 Zellen/HPF) (Abb. 27a). Wurden hCCR6⁺ HEK-293 Zellen als Zielzellen verwendet, war im Gegensatz zu mBD4:Ig nur das hBD2:Ig (67 ± 17 Zellen/HPF) spezifisch in der Lage, Migration hervorzurufen mit einem Maximum bei 1000 ng/ml (Abb. 27b). Von residenten Peritonealzellen der Maus wanderten die meisten Zellen mit einer Konzentration von 100 ng/ml mBD4:Ig oder hBD2:Ig (127 ± 4 bzw. 139 ± 8 Zellen/HPF) (Abb. 27c). Humane PBMCs wiederum migrierten besonders zahlreich mit 1000 ng/ml mBD4:Ig oder hBD2:Ig, sodass 371 ± 28 bzw. 372 ± 29 Zellen/HPF gezählt wurden (Abb. 27d).

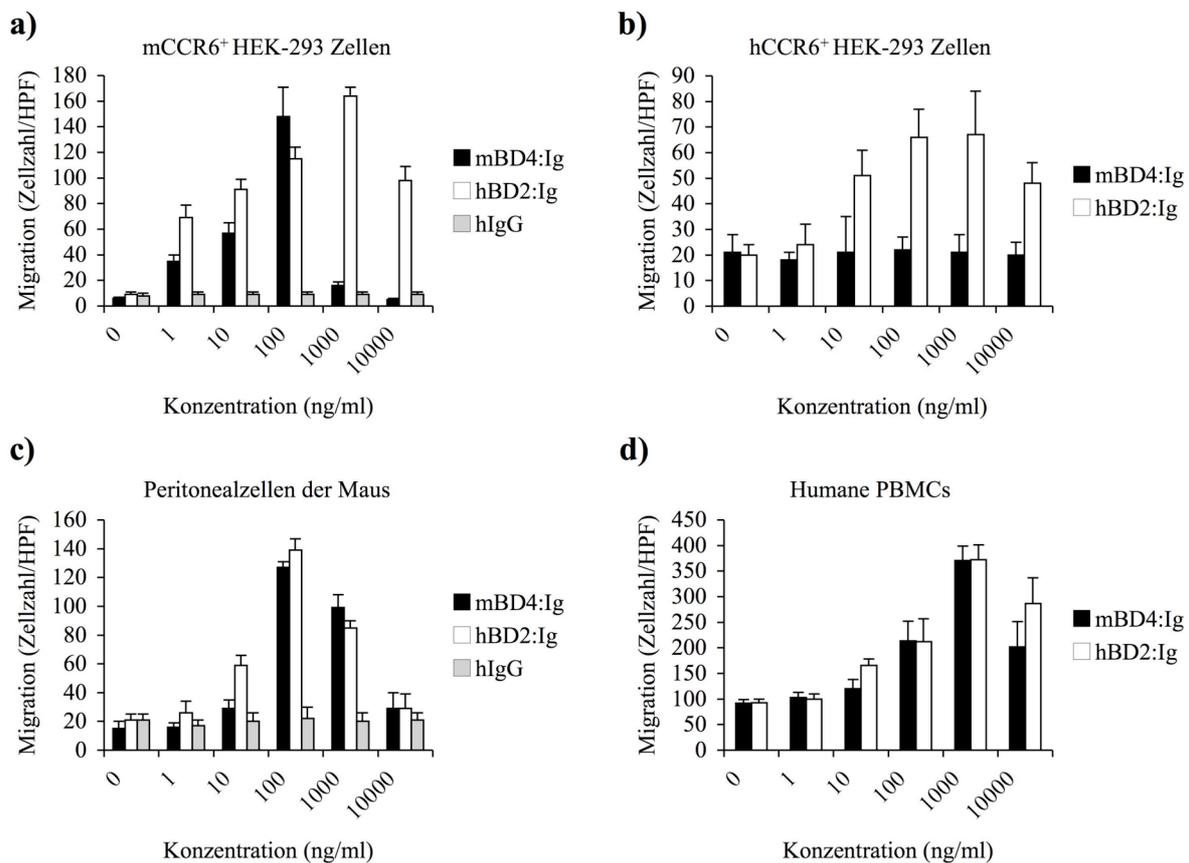


Abb. 27: Migration verschiedener Zellen gegen mBD4:Ig und hBD2:Ig. a) mCCR6⁺ HEK-293 Zellen, b) hCCR6⁺ HEK-293 Zellen, c) residente Peritonealzellen der Maus, d) humane PBMCs. Die Zellen wurden in die obere Kammer, mBD4:Ig und hBD2:Ig sowie hIgG₁ als Kontrolle in die untere Kammer einer 48-Loch Mikro-Chemotaxisplatte gegeben. Die Kammern waren durch eine Polycarbonat-Filtermembran getrennt. Nach 1,5-5 h Inkubation wurden die Filtermembranen entfernt und gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die durch die Filtermembran gewanderten Zellen gezählt und die Mittelwerte der Triplikate \pm SD als Zellzahl/HPF aufgetragen (repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die untersuchten Maus β -Defensin-Fusionsproteine mBD14:Ig und mBD4:Ig ausschließlich auf Zellen chemotaktisch wirken, die den CCR6-Rezeptor der Maus exprimieren. Im Gegensatz dazu induzieren die humanen β -Defensin-Fusionsproteine hBD2:Ig und hBD3:Ig chemotaktische Aktivität sowohl gegenüber Zellen, die humanen CCR6-Rezeptor exprimieren, als auch gegenüber Zellen, die den CCR6-Rezeptor der Maus exprimieren. Des Weiteren zeigen Monozyten beider Spezies CCR6-unabhängige Chemotaxis gegenüber mBD14:Ig, mBD4:Ig, hBD2:Ig und hBD3:Ig.

3.9 Interaktion von mBD14 mit B-Lymphozyten

In Chemotaxisversuchen mit den β -Defensin:Ig-Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, dass mBD14:Ig wie auch das orthologe hBD3:Ig über den Chemokinrezeptor CCR6⁺ Zellen zur Migration anregen. Daher sollte als nächstes überprüft werden, ob mBD14:Ig an B-Zellen bindet, die CCR6 exprimieren. Hierfür wurde zuerst die B-Zell-Lymphomzelllinie A20 verwendet. Die Zellen wurden der Kulturflasche entnommen und einem Standard Durchflusszytometrie-Färbeprotokoll unterzogen (siehe 2.3.11). Zum Nachweis, dass A20 Zellen CCR6 exprimieren, wurden diese zuerst mit dem anti CCR6 Antikörper oder zur Kontrolle mit dessen Isotyp-Antikörper IgG2a und anschließend mit dem Anti Ratte IgG (H+L) Alexa 488 markiert (siehe 2.1.6). Außerdem wurden die Zellen mit mBD14:Ig, mCCL20:Ig als Positivkontrolle oder hIgG₁ als Negativkontrolle jeweils in einer Konzentration von 1 μ g/ml und anschließend mit dem anti human IgG (H+L) PE als Sekundärantikörper markiert. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen sind als Histogramme dargestellt, die sich ausschließlich auf die Zellen in der zuvor gesetzten Lebend-Zell-Region beziehen (Abb. 28a).

Im FSC/SSC-Diagramm ist die Population lebender A20 Zellen, umgeben von der erstellten Lebend-Zell-Region, um tote Zellen und Dubletten auszuschließen, dargestellt (Abb. 28a). Im Histogramm in Abb. 28b ist gezeigt, dass A20 Zellen CCR6 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Isotyp MFI=2,79 und mCCR6 MFI=10,8). Die Markierung der Zellen mit mCCL20:Ig, dem bislang einzigen Liganden des CCR6, demonstrierte die erwartete Bindung an die A20 Zellen (hIgG₁ MFI=4,26 und mCCL20:Ig MFI=69,4) (Abb. 28c). Wurden die Zellen mit mBD14:Ig markiert, zeigten die durchflusszytometrischen Analysen ebenfalls eine Bindung an A20 Zellen mit MFI-Werten von 2,38 für hIgG₁ und 13,2 für mBD14:Ig (Abb. 28d).

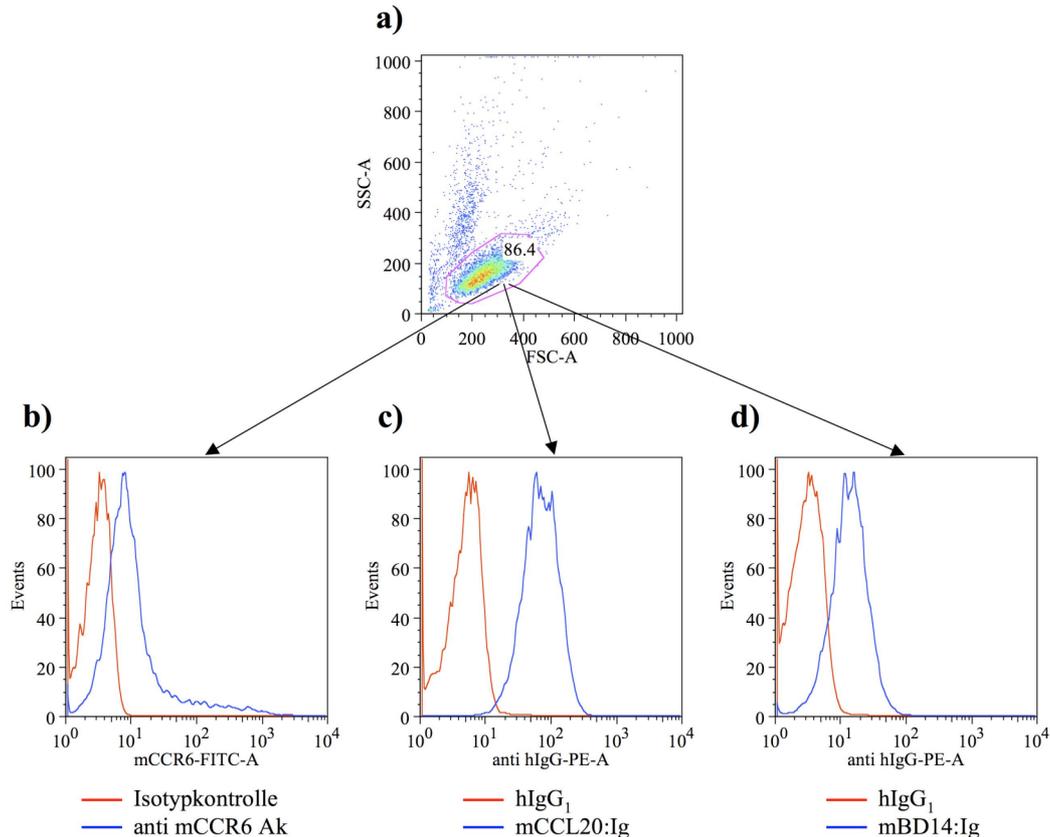


Abb. 28: Bindung von mBD14:Ig und mCCL20:Ig an A20 Zellen. a) Lebende A20 Zellpopulation in der Lebend-Zell-Region im FSC/SSC-Diagramm, b) Zellen markiert mit anti mCCR6 Antikörper oder Isotyp-Antikörper IgG2a als Primärantikörper und anti Ratte IgG (H+L) Alexa 488 als Sekundärantikörper, c) und d) Zellen markiert mit mCCL20:Ig sowie hIgG₁ (c) oder mBD14:Ig sowie hIgG₁ (d) und anti human IgG (H+L) PE als Sekundärantikörper. Die aus der Kulturflasche entnommenen Zellen wurden dem Standard Durchflusszytometrie-Färbeprotokoll unterzogen. Die dargestellten Diagramme sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche.

Im Anschluss an die Versuche mit A20 Zellen wurden Primärzellen aus der Milz von C57BL/6 Mäusen getestet. Die isolierten Zellen (siehe 2.3.4) wurden in einer Standard Durchflusszytometrie-Färbung mit anti Maus B220 PerCP, anti Maus CD19 PE und anti Maus CCR6 oder den entsprechenden Isotypkontrollen markiert.

Die im FSC/SSC-Diagramm dargestellten Milzzellpopulationen wurden mit einer Lebend-Zell-Region umgeben (Abb. 29a). In der weiteren Betrachtung werden ausschließlich die in dieser Region enthaltenen Zellen berücksichtigt. Als nächstes wurde im Diagramm die Fluoreszenz des B220 Markers gegen die Fluoreszenz des CD19 Markers aufgetragen und die für beide Marker positive Population in eine neue Region eingefasst. Hierbei zeigte sich, dass 52,8 % der lebenden Splenozyten die B-Zell Marker B220 und CD19 tragen (Abb. 29b). Diese Population wurde wiederum auf die Expression des CCR6 hin überprüft, und wie in Abb. 29c zu sehen ist, exprimierten diese Zellen auch CCR6 (Isotyp MFI=3,38 bzw. CCR6 MFI=35,1).

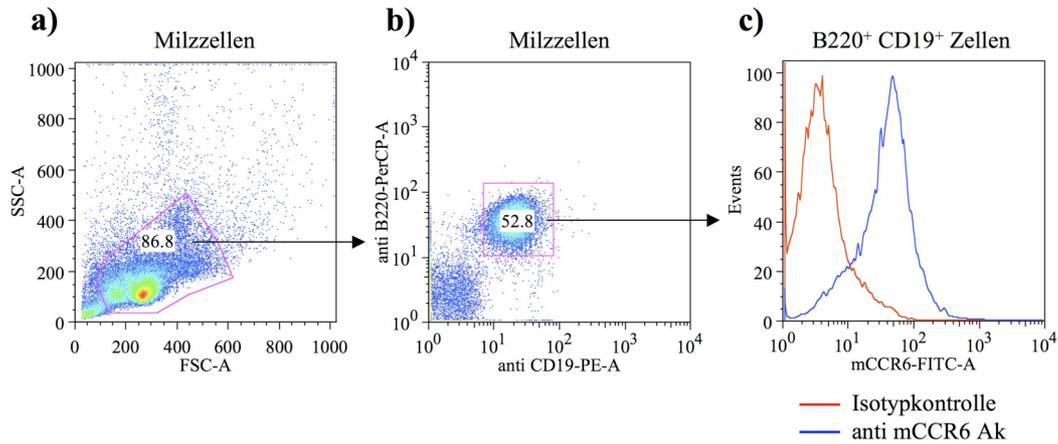


Abb. 29: Nachweis der Expression von CCR6 auf B220⁺ CD19⁺ Zellen aus der Milz. a) Spleonzyten innerhalb der Lebend-Zell-Region im FSC/SSC-Diagramm, b) Milzzellen markiert mit anti B220 PerCP und anti CD19 PE; die doppelt positive Zellpopulation wurde in eine neue Region eingefasst, c) Zellen markiert mit anti mCCR6 Antikörper oder Isotyp-Antikörper IgG2a als Primärantikörper und anti Ratte IgG (H+L) Alexa 488 als Sekundärantikörper. Die Milzzellen wurden dem Standard Durchflusszytometrie-Färbeprotokoll unterzogen. Die dargestellten Diagramme sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche.

Für Versuche zum Nachweis der Bindung von mBD14 an B-Zellen wurden die CD19⁺ Zellen aus den präparierten Milzzellen mit Hilfe der CD19 Microbeads anhand der MACS-Säule isoliert (siehe 2.3.9). Daraufhin wurden die isolierten B-Zellen zusätzlich in einer Standard-Färbung mit anti B220 PerCP, anti Maus CCR6, mCCL20:Ig, mBD14:Ig oder hIgG₁ als Kontrolle markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Das Histogramm in Abb. 30a zeigt die Bindung von mCCL20:Ig an B220⁺ CCR6⁺ Zellen (hIgG₁ MFI=2,45 und mCCL20:Ig MFI=15,1). In Abb. 30b ist die Bindung von mBD14:Ig an B220⁺ CCR6⁺ Zellen dargestellt (hIgG₁ MFI=2,45 und mBD14:Ig MFI=96,8).

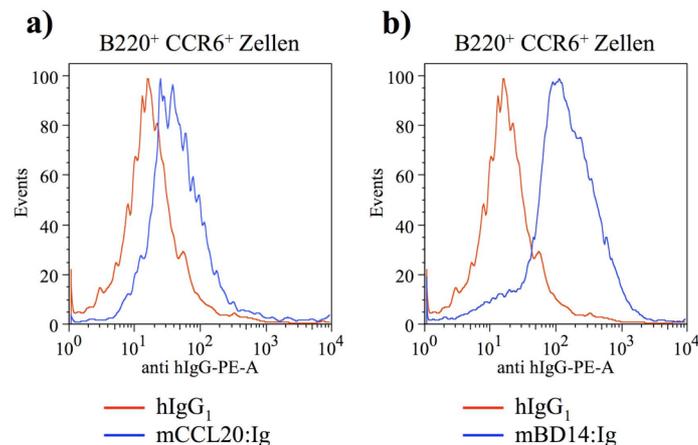


Abb. 30: Bindung von mBD14:Ig und mCCL20:Ig an B220⁺ CCR6⁺ Zellen. a) B220⁺ CCR6⁺ Zellen markiert mit mCCL20:Ig oder hIgG₁ und anti human IgG (H+L) PE als Sekundärantikörper, b) B220⁺ CCR6⁺ Zellen markiert mit mBD14:Ig oder hIgG₁ und anti human IgG (H+L) PE als Sekundärantikörper. Die Milzzellen wurden mit Hilfe der CD19 Microbeads über eine MACS-Säule isoliert, anschließend im Standard-Färbeprotokoll mit anti B220 PerCP und anti Maus CCR6 Ak markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.10 Die Rolle des mBD14 im Tumorwachstum

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wie z. B. die Expression von mBD14 in dendritischen Zellen, die Aktivierung von Chemotaxis über den Chemokinrezeptor CCR6 oder die Interaktion von mBD14 mit B-Zellen, stellte sich die Frage, welche Rolle mBD14 im adaptiven Immunsystem spielt. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von β -Defensinen auf ein in unserem Labor etabliertes syngenes Tumormodell untersucht. RT-PCR Versuche mit RNA von BFS-1 Fibrosarkomen und BFS-1 Fibrosarkomzellen zeigten, dass mBD14 zwar im BFS-1 Tumor *in vivo*, nicht aber in BFS-1 Zellen *in vitro* zu finden ist. Daher wurde ein Tumormodell entwickelt, in dem die Bedeutung von mBD14 für das Tumorwachstum in Zusammenhang mit dem adaptiven Immunsystem untersucht werden konnte.

3.10.1 Nachweis der mBD14-Expression im BFS-1 Fibrosarkom

Mittels RT-PCR sollte überprüft werden, ob Zellen der BFS-1 Fibrosarkomzelllinie oder von BFS-1 Zellen in syngenem C57BL/6 Mäusen erzeugte Fibrosarkome mBD14 exprimieren. Dazu wurde aus den Zellen oder Biopsien der Fibrosarkome die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA revers transkribiert und diese in einer PCR-Reaktion mit den entsprechenden Primern für mBD14 und β -Aktin amplifiziert (siehe 2.1.3 und 2.2.2-2.2.4).

Auf diese Weise konnte die Expression von mBD14 in Biopsien von BFS-1 Tumoren, aber nicht in BFS-1 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 31). Möglicherweise wird das in den Tumorbiospien nachgewiesene mBD14 von tumorinfiltrierenden Leukozyten exprimiert.

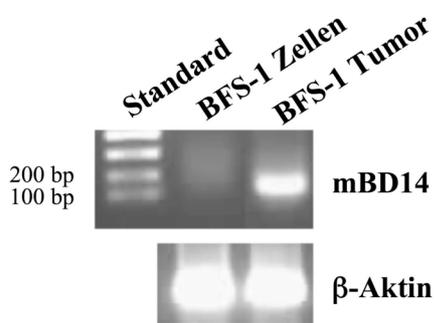


Abb. 31: Nachweis der Expression von mBD14 im BFS-1 Tumor. Aus den syngenem BFS-1 Zellen oder Biopsien von BFS-1 Tumoren in C57BL/6 wt Mäusen isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA (5 μ l) in einer PCR-Reaktion mit den Primern mBD14 5', mBD14 3', β -Aktin 5' und β -Aktin 3' eingesetzt. DNA-Längenstandard: 100 bp Ladder (5 μ l).

3.10.2 Einfluss des mBD14 auf das Tumorwachstum

Im Rahmen der Versuche zum Einfluss von mBD14 auf das Tumorwachstum oder auf tumorinfiltrierende Leukozyten wurde die BFS-1 Fibrosarkomzelllinie verwendet. Diese Zellen wurden mit den zuvor hergestellten Expressionsvektoren für mBD14:Ig, mBD4:Ig und p55:Ig transfiziert. Als Kontrollen dienten einerseits nicht transfizierte BFS-1 wt Zellen, andererseits BFS-1 Zellen, die mit dem p55:Ig-Expressionskonstrukt transfiziert wurden. Das p55:Ig diente als Kontrolle, um einen Einfluss des hIgG₁-Teils ausschließen zu können. In diesem Zusammenhang wurde schon früher gezeigt, dass das p55TNFR- (TNF-Rezeptor 1, CD120a) Fusionsprotein das Tumorwachstum nicht beeinflusst (Hehlhans et al., 2002). Den syngenen C57BL/6 Mäusen wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 50 μ l dorsal subkutan appliziert (siehe 2.4.2). In regelmäßigen Abständen von 2-3 Tagen wurde das Wachstum der Fibrosarkome auf den Mäusen durch das Vermessen von Länge und Breite bestimmt. Die auf diese Weise ermittelten Mittelwerte \pm SD der Tumorfläche in cm^2 wurden im Diagramm dargestellt. Die Gruppen bestanden aus jeweils 5 Tieren.

Während der ersten 8 Tage zeigten alle Tumoren einen gleichmäßigen Verlauf im Tumorwachstum mit einem Zuwachs von ca. 0,05-0,09 cm^2 pro Messintervall. An den folgenden Tagen stagnierte dieser Zuwachs leicht, da die Tumoren eine Größe erreichten, in der die Versorgung des Gewebes durch Diffusion alleine nicht mehr ausreichte und es folglich zum Einsetzen der Vaskularisation kam. Ab diesem Zeitpunkt zeigten die Tumoren, die von mBD14:Ig exprimierenden BFS-1 Zellen gebildet wurden, eine deutlich gesteigerte Größenzunahme mit einem Zuwachs pro Messintervall von ca. 0,31 cm^2 . Im Gegensatz dazu zeigten auch nach Beginn der Gefäßbildung die nicht transfizierten Tumoren oder mit p55:Ig transfizierten Tumoren keine signifikante Zunahme des Tumorwachstums mit einem Zuwachs von ca. 0,18 cm^2 pro Messintervall. An Tag 22 nach Inokulation der Tumorzellen zeigten die mBD14:Ig exprimierenden Tumoren ein signifikant ($p \leq 0,0079$) größeres Tumorwachstum (Abb. 32a+b).

Zudem wurde dieser Versuch auch mit mBD4:Ig exprimierenden BFS-1 Zellen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass mBD4:Ig im Gegensatz zu mBD14:Ig keinen Effekt auf das Wachstum der Tumoren hat. Der Versuch wurde daher an Tag 18 nach der Tumorzell-Inokulation beendet (Abb. 33a+b).

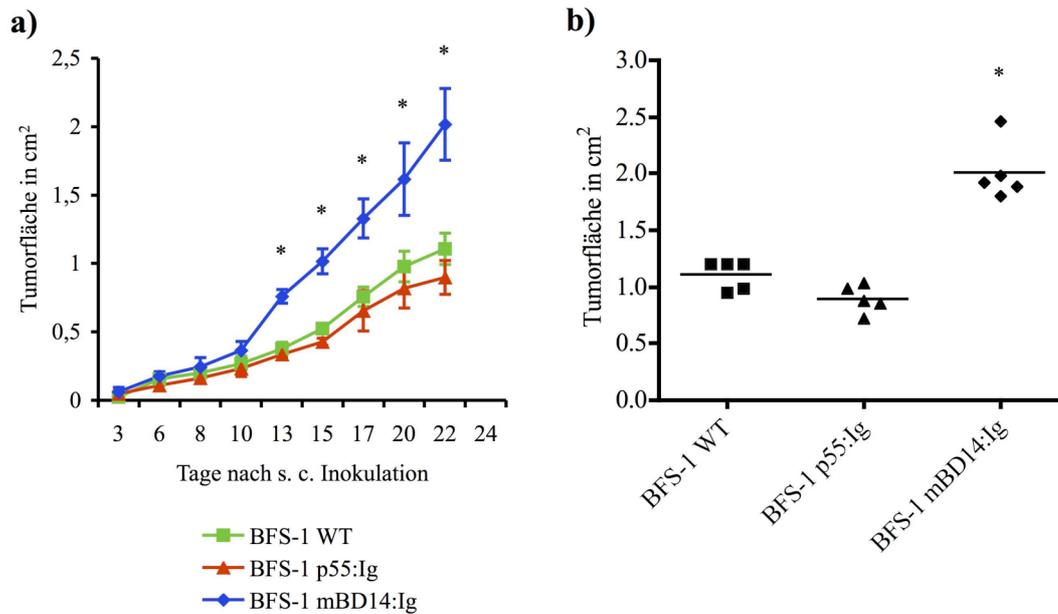


Abb. 32: Wachstum der BFS-1 Tumoren in C57BL/6 Mäusen. a) Liniendiagramm, b) Punktwolken- diagramm. Von BFS-1 Zellen, die zuvor mit dem Expressionsvektor für mBD14:Ig (BFS-1 mBD14:Ig) oder p55:Ig (BFS-1 p55:Ig) transfiziert wurden, und Wildtyp Zellen (BFS-1 WT) wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in $50 \mu\text{l}$ den C57BL/6 Mäusen dorsal subkutan appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen (je $n=5$) \pm SD (repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche), * $p \leq 0,0079$.

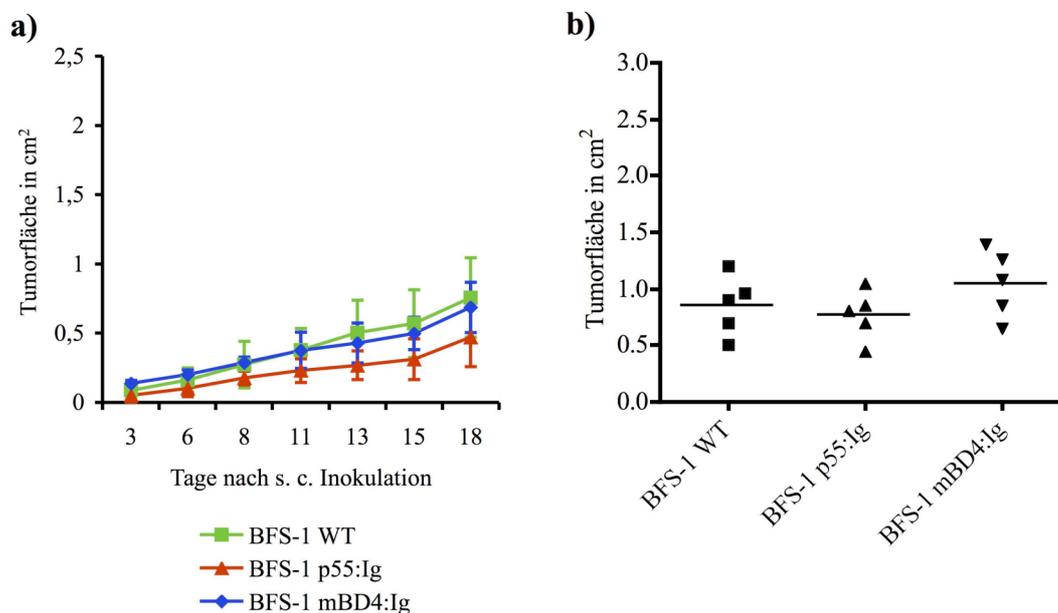


Abb. 33: Wachstum der BFS-1 Tumoren in C57BL/6 Mäusen. a) Liniendiagramm, b) Punktwolken- diagramm. Von BFS-1 Zellen, die zuvor mit dem Expressionsvektor für mBD4:Ig (BFS-1 mBD4:Ig) oder p55:Ig (BFS-1 p55:Ig) transfiziert wurden, und Wildtyp Zellen (BFS-1 WT) wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in $50 \mu\text{l}$ den C57BL/6 Mäusen dorsal subkutan appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen (je $n=5$) \pm SD.

Da das verstärkte Tumorwachstum der mBD14:Ig exprimierenden BFS-1 Zellen mit einer veränderten Zellproliferation begründet werden könnte, wurden die unterschiedlich transfizierten Zellen in 96-Loch-Platten in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend konnte ein MTT-Assay durchgeführt werden (siehe 2.3.10). Dabei korreliert der OD₅₄₀ Wert mit der metabolischen Aktivität der Zellen im jeweiligen Loch. Die Versuche wurden in Triplikaten angesetzt und deren Mittelwerte \pm SD im Diagramm aufgetragen.

Die in Abb. 34 dargestellte Grafik zeigt, dass mit dem mBD14:Ig-Expressionsvektor transfizierte BFS-1 Zellen die gleiche Proliferationsrate aufweisen wie mit p55:Ig-Expressionsvektor transfizierte oder nicht transfizierte Zellen. Folglich kann ein verstärktes Tumorwachstum aufgrund einer veränderten Zellproliferation *in vitro* ausgeschlossen werden.

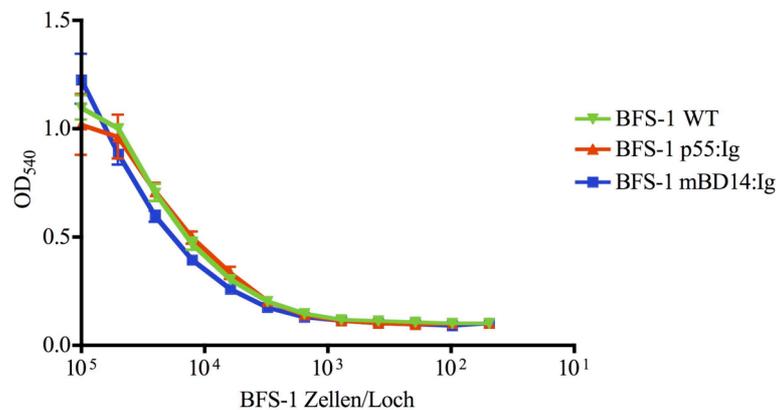


Abb. 34: MTT-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität. BFS-1 Zellen, die mit dem mBD14:Ig-Expressionsvektor (BFS-1 mBD14:Ig) oder dem p55:Ig-Expressionsvektor (BFS-1 p55:Ig) transfiziert wurden und nicht transfizierte BFS-1 Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgesät und über 24 h inkubiert. Nach der Zugabe von MTT wurden die Zellen weitere 4 h inkubiert, anschließend mit SDS ü. N. lysiert und schließlich die OD bei 540 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

3.10.3 Analyse der tumorinfiltrierenden Leukozyten

Da für mBD14 u. a. bereits gezeigt wurde, dass es über CCR6 Chemotaxis induziert und an B-Zellen bindet, sollte nun überprüft werden, welchen Einfluss die Expression von mBD14 im BFS-1 Tumor auf die Zusammensetzung der tumorinfiltrierenden Zellen ausübt. Daher wurde aus den an Tag 22 nach Inokulation entnommenen soliden Tumoren mittels Collagenase D-Verdau Einzelzellsuspensionen hergestellt (siehe 2.3.6), die einer standardgemäßen durchflusszytometrischen Färbung unterzogen wurden. Hierfür wurden die Antikörper gegen CD4, CD8, CD11c, CD45R/B220, CD80 und MHCII der Maus verwendet (siehe 2.1.6). Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse wurde zuerst durch den Ausschluss toter Zellen, die mit DAPI gefärbt wurden, eine Lebend-Zell-Region festgelegt. Anschließend wurden die jeweiligen Leukozytenpopulationen anhand ihrer Marker untersucht. Die im Folgenden dargestellten Diagramme zeigen den Mittelwert \pm SD des jeweiligen Anteils der untersuchten Leukozytenpopulation aller lebender Leukozyten der jeweiligen Gruppe in Prozent (Abb. 35). Jede Gruppe bestand aus 5 C57BL/6 Mäusen. In der Suspension enthaltene Tumorzellen konnten aufgrund ihrer Größe schon vorher ausgeschlossen werden. Der dargestellte BFS-1 Tumorversuch ist repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.

In der Untersuchung der Zusammensetzung tumorinfiltrierender Lymphozyten stellte sich heraus, dass der Anteil an $CCR6^+ B220^+$ B-Zellen (BFS-1 wt $7,17 \pm 0,94$, BFS-1 p55:Ig $9,5 \pm 1,05$, BFS-1 mBD14:Ig $17,57 \pm 3,3$) in den mBD14:Ig exprimierenden Tumoren signifikant ($p=0,03$) erhöht war (Abb. 35a). Der prozentuale Anteil an aktivierten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) (BFS-1 wt $15,43 \pm 1,69$, BFS-1 p55:Ig $17,83 \pm 3,27$, BFS-1 mBD14:Ig $14,73 \pm 2,38$) war hingegen in allen untersuchten Tumoren annähernd gleich (Abb. 35b). Die $CD4^+$ T-Zellpopulation war im mBD14:Ig exprimierenden Tumor wiederum geringer (BFS-1 wt $28,67 \pm 0,86$, BFS-1 p55:Ig $27,57 \pm 7,31$, BFS-1 mBD14:Ig $15,0 \pm 1,53$) als in den Kontrolltumoren (Abb. 35 c). Schließlich wurde noch die $CD8^+$ T-Zellpopulation in den jeweiligen Tumoren untersucht (BFS-1 wt $20,27 \pm 4,09$, BFS-1 p55:Ig $15,95 \pm 6,17$, BFS-1 mBD14:Ig $16,03 \pm 3,1$), doch hier zeigte sich wiederum kein Unterschied in den verschiedenen Tumoren (Abb. 35d).

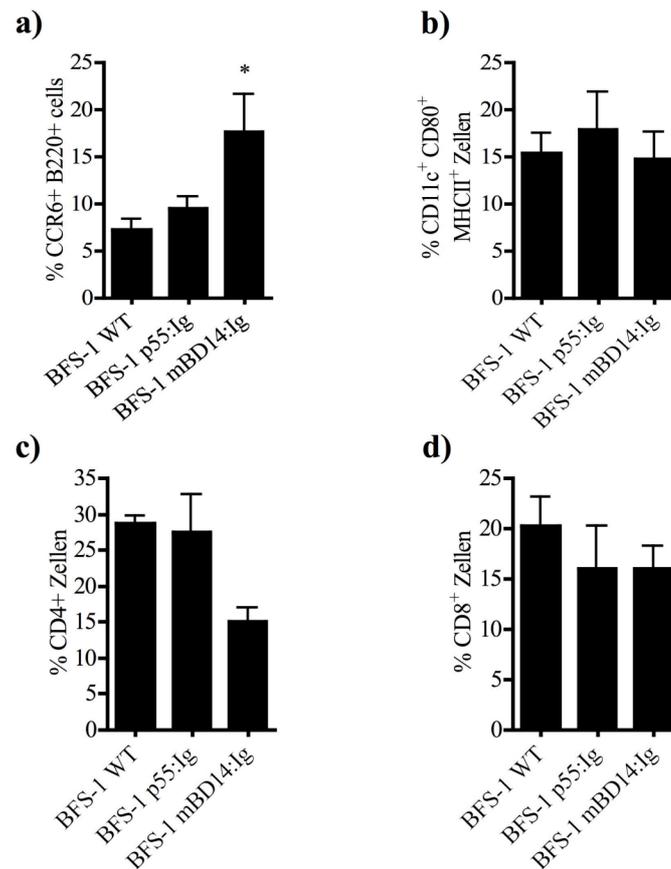


Abb. 35: Untersuchung der Zusammensetzung tumorinfiltrierender Leukozyten. a) Prozentualer Anteil CCR6⁺ B220⁺ B-Zellen, $p=0,03$, b) Anteil CD11c⁺ CD80⁺ MHCII⁺ antigenpräsentierender Zellen, c) Anteil CD4⁺ Zellen, d) Anteil CD8⁺ Zellen. Aus C57BL/6 Mäusen an Tag 22 nach Inokulation entnommenen soliden Tumoren wurden mittels Collagenase D-Verdau Einzelzellsuspensionen hergestellt. Diese wurden nach einer standardgemäßen Färbung mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD11c, CD45R/B220, CD80 und MHCII der Maus markiert und durchflusszytometrisch untersucht (repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche).

3.10.4 Expression der proangiogenen Faktoren MIP-2 und VEGF α

Aufgrund dessen, dass das Tumorwachstum u. a. auch von der Angiogenese abhängig ist, wurde mittels RT-PCR und quantitativer RT-PCR die Expression der proangiogenen Faktoren MIP-2 und VEGF α untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus BFS-1 wt Zellen, BFS-1 wt Tumoren oder mBD14:Ig exprimierenden BFS-1 Tumoren isoliert, in cDNA transkribiert und damit eine Standard PCR-Reaktion mit den Primern MIP-2 5' und MIP-2 3' sowie dem entsprechenden Primer-Paar für β -Aktin (siehe 2.1.3. und 2.2.2-2.2.4) oder eine quantitative RT-PCR den Primer-Paaren für MIP-2 (Katalog-Nummer: PPM02969E) oder VEGF α (Katalog-Nummer: PPM03041E) von SABiosciences (Frederick, MD, USA) sowie 18S rRNA 5' und 18S rRNA 3', wie unter 2.2.5, beschrieben, durchgeführt. Die Entnahme der

Tumorbiopsien wurde an Tag 22 nach Inokulation der Tumorzellen durchgeführt. Die Versuche wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Die Überprüfung der MIP-2-Expression mittels RT-PCR zeigte, dass BFS-1 wt Zellen bereits *in vitro* MIP-2 exprimieren. Folglich konnte auch in soliden BFS-1 wt Tumoren, die in einer Maus wuchsen, MIP-2-Expression festgestellt werden. In Tumoren, die mBD14:Ig exprimieren, wurde im Vergleich zu den BFS-1 wt Tumoren eine vermehrte Expression des MIP-2 beobachtet (Abb. 36).

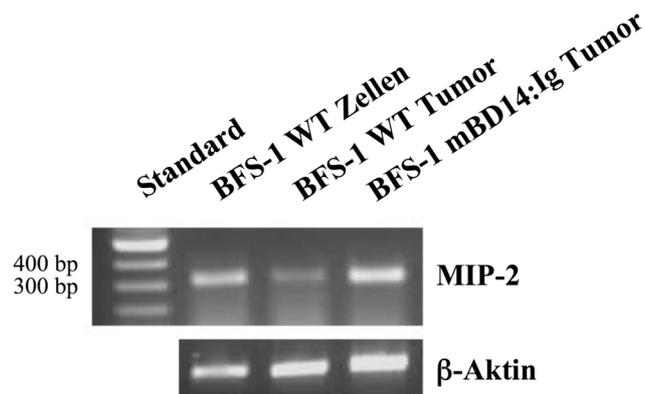


Abb. 36: Nachweis der MIP-2-Expression in BFS-1 wt Zellen, BFS-1 wt Tumoren und BFS-1 mBD14:Ig Tumoren. Aus den syngenesischen BFS-1 Zellen oder Biopsien von BFS-1 wt Tumoren sowie mBD14:Ig exprimierenden BFS-1 Tumoren, die in C57BL/6 wt Mäusen wuchsen, isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA (5 μ l) in einer PCR-Reaktion mit den Primern MIP-2 5', MIP-2 3', β -Aktin 5' und β -Aktin 3' eingesetzt. DNA-Längenstandard: 100 bp Ladder (5 μ l). Repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde die Expression von MIP-2 und VEGF α in den Tumorbiopsien überprüft. Dabei konnte, wie in Abb. 37a dargestellt, gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Entnahme eine erhöhte Expression von MIP-2 in Tumoren, die mBD14:Ig exprimieren, zu finden war (Median-Werte der relativen Expression: BFS-1 wt=1,42; BFS-1 p55:Ig=4,23; BFS-1 mBD14:Ig=26,91). In Abb. 37b ist gezeigt, dass in keiner der Tumorbiopsien eine erhöhte Expression von VEGF α nachzuweisen war (Median-Werte der relativen Expression: BFS-1 wt=7,01; BFS-1 p55:Ig=7,41; BFS-1 mBD14:Ig=6,73).

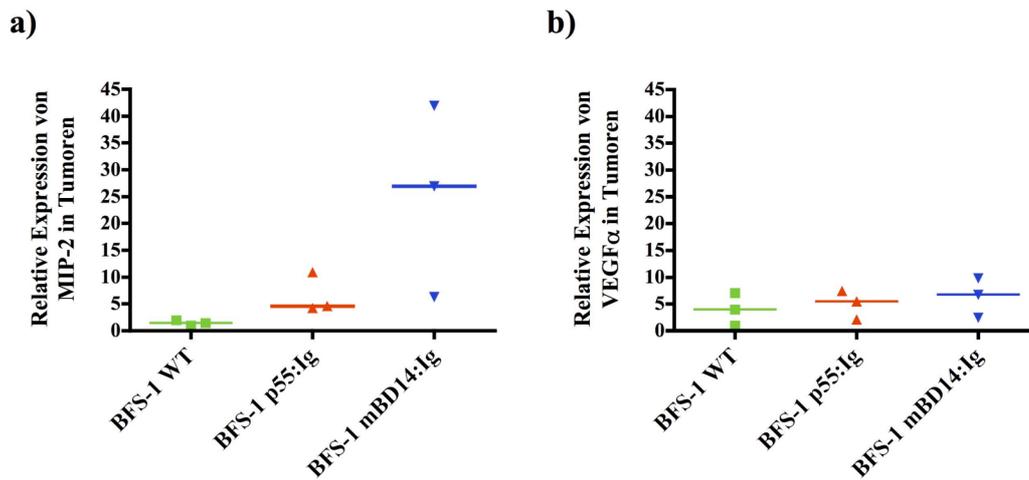


Abb. 37: Nachweis der Expression von MIP-2 und VEGF α in BFS-1 wt, BFS-1 p55:Ig und BFS-1 mBD14:Ig Tumoren. Aus Biopsien von BFS-1 wt Tumoren oder Tumoren, die p55:Ig oder mBD14:Ig exprimieren und auf C57BL/6 Mäusen wuchsen, isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und je 5 μ l der cDNA in eine quantitative RT-PCR-Reaktion mit den Primer-Paaren für MIP-2 (Kat.-Nr.: PPM02969E) und VEGF α (Kat.-Nr.: PPM03041E) sowie 18S rRNA 5' und 18S rRNA 3' durchgeführt. Aufgetragen sind die Einzelwerte und deren Median.

3.10.5 Untersuchung der Gefäßbildung im Tumor

Nachdem im mBD14:Ig exprimierenden Tumor eine erhöhte MIP-2-Expression zu sehen war, wurde die Gefäßverteilung in den jeweiligen Tumoren immunhistochemisch überprüft. Hierfür wurden den an Tag 22 nach Inokulation entnommenen Tumoren kleine Gewebeproben für histologische Analysen entfernt und cryokonserviert. Von diesen Proben wurden daraufhin 5 μ m dicke Gewebeschnitte angefertigt und diese einer immunhistochemischen Färbung unterzogen. Dabei wurden die Gefäße mit dem anti CD31 Antikörper oder dem Isotyp-Antikörper in einer 1:200 Verdünnung und dieser wiederum mit einem sekundären AP-konjugierten Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung markiert. Zellkerne wurden mit Methylgrün sichtbar gemacht (siehe 2.1.6 und 2.5). Nachdem die Histo-Präparate der Tumoren eingebettet waren, konnten diese unter dem Mikroskop bei einer 160 x Vergrößerung betrachtet werden. Von jedem Tumor-Präparat wurden mindestens drei Gesichtsfelder fotografiert.

In den histologischen Präparaten der BFS-1 wt Tumoren und der BFS-1 p55:Ig Tumoren wurden CD31⁺ Gefäßstrukturen gefunden. Der Vergleich mit den histologischen Präparaten der BFS-1 mBD14:Ig Tumoren zeigt jedoch einen deutlich höheren Anteil an CD31⁺ Gefäßstrukturen in Tumoren, die mBD14:Ig exprimieren. Die Isotyp-Kontrollen waren stets negativ (Abb. 38).

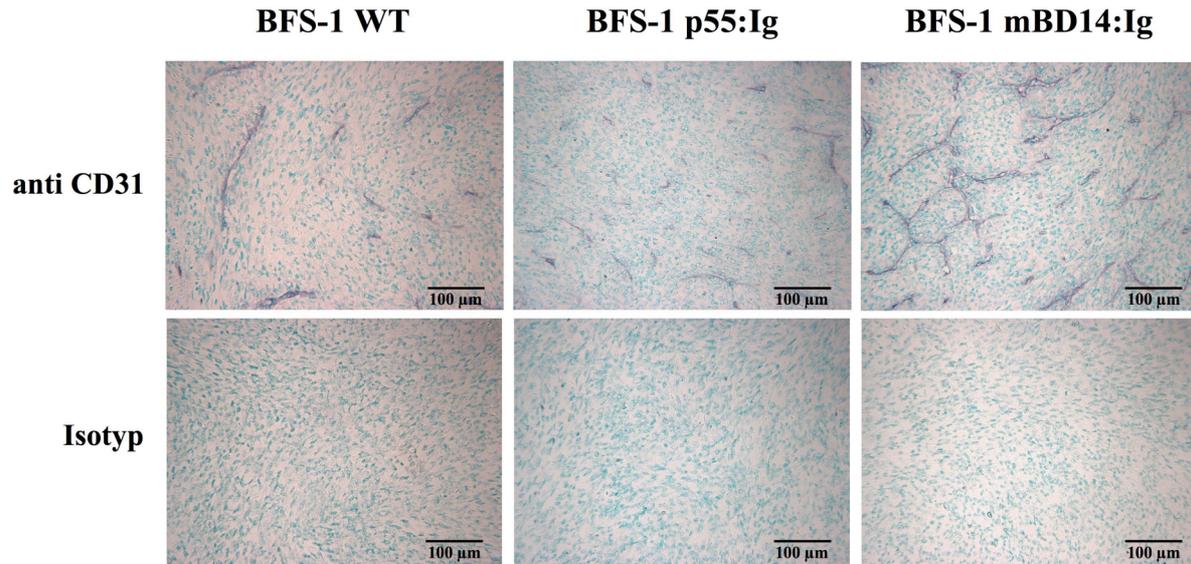


Abb. 38: Immunhistochemische Untersuchung der Vaskularisation im BFS-1 Tumor. BFS-1 wt, BFS-1 p55:Ig, BFS-1 mBD14:Ig (von links nach rechts). Anti CD31 Färbung (oben), Isotypkontrollen (unten). Von an Tag 22 nach Inokulation entnommenen Tumoren wurden kleine Gewebeproben entfernt und kryokonserviert. Anschließend wurden davon 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und diese in einer immunhistochemischen Färbung mit einem anti CD31 Antikörper oder dessen Isotyp-Antikörper und mit einem AP-konjugierten sekundären Antikörper markiert. Zellkerne wurden mit Methylgrün angefärbt (repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche). Vergrößerung 160 x, die Balkenlänge entspricht 100 µm.

Der in den histologischen Präparaten gezeigte höhere Anteil an Gefäßstrukturen in mBD14:Ig exprimierenden Tumoren im Vergleich zu p55:Ig exprimierenden oder nicht transfizierten Tumoren korreliert mit der erhöhten Expression des Vaskularisationsfaktors MIP-2 in mBD14:Ig exprimierenden Tumoren. Die Expression von VEGF α war jedoch in allen untersuchten Tumoren gering.

4 Diskussion

4.1 Identifikation des *Defb14*-Gens

Bislang wurde das mBD14-Gen als neues Mitglied der β -Defensin-Familie nicht näher charakterisiert. Die Sequenz des *Defb14* ORF wurde erstmals 2003 von A. Maxwell in der Gendatenbank *Mouse Genome Informatics* (MGI) veröffentlicht. In einer Publikation über die antimikrobielle Aktivität von Lungenzellen der Maus gegenüber *Staphylococcus aureus* von 2005 wurde das *Defb14* als ein Ortholog des *DEFB103*, dem Gen des hBD3, postuliert (McMichael et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmals anhand der Daten aus Sequenzvergleichen, die mittels des ClustalW Algorithmus durchgeführt wurden, gezeigt, dass die Aminosäuresequenz des mBD14 zu 68 % mit der Sequenz des hBD3 übereinstimmt. Vergleicht man die cDNA-Sequenzen miteinander, so ergibt sich sogar eine Homologie von 72 %.

Ebenso wie der ORF von hBD3 zusammen mit den anderen β -Defensin-Genen im humanen Genom auf Chromosom 8 in der Region p22-p23.1 lokalisiert ist (Harder et al., 1997; Linzmeier et al., 1999; Garcia et al., 2001), so ist auch der ORF des mBD14 zusammen mit den meisten anderen β -Defensin-Genen im Genom der Maus auf Chromosom 8 in der homologen Region A lokalisiert (Huttner et al., 1997; Jia et al., 2000). Des Weiteren weist das *Defb14*-Gen den für die Familie der β -Defensine charakteristischen Aufbau von zwei Exons und einem Intron auf (Liu et al., 1998; Bals et al., 1999). Ebenfalls charakteristisch für die Familie der β -Defensine ist die Anzahl und Anordnung der sechs Cystein-Reste und ihre Verknüpfung zu Disulfidbrücken in der Reihenfolge Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys6 (Tang et al., 1993; Zimmermann et al., 1995). Im Alignment der Aminosäuresequenz des mBD14 in Abb. 2d ist zu sehen, dass auch hier die Cystein-Reste in gleicher Anzahl sowie in der gleichen Anordnung vorhanden sind. Ein weiteres hoch konserviertes Motiv Gly-X-Cys4, das im zweiten β -Strang liegt und eine β -Schleife bildet (Hoover et al., 2000), ist ebenfalls vorhanden. Es wird angenommen, dass diese β -Schleife für eine Drehung im β -Faltblatt verantwortlich ist und damit notwendig ist für die Strukturbildung und die korrekte Faltung (Xie et al., 2005).

Obwohl die Aminosäuresequenzen der verschiedenen β -Defensine auch zwischen verschiedenen Spezies wie z. B. Mensch und Maus relativ wenig konserviert erscheinen, ist die Sekundär- und Tertiärstruktur hoch konserviert (Bauer et al., 2001). Aus diesen Gründen ist anzunehmen, dass Sekundär- und Tertiärstruktur des mBD14 äquivalent zu den bisher analysierten Lösungsstrukturen von hBD1-3 und mBD7/8 sind (Bauer et al., 2001; Schibli et al., 2002). Als Peptidsequenz des aktiven mBD14 wurde die in Abb. 2c indizierte Aminosäuresequenz (blau) angesehen, die mit Hilfe des *Markov Cluster* Algorithmus ermittelt wurde und die Kernsequenz der Proteinfamilie der β -Defensine darstellt (Enright et al., 2002). Die anhand Computer-basierter Methoden prognostizierte Sequenz des Signalpeptids (grün) wurde hierbei ausgeschlossen.

4.2 Nachweis der Expression von mBD14 *in vivo*

Bisher untersuchte β -Defensine der Maus sind in ihrer Expression auf bestimmte Zellen oder Gewebetypen bzw. Organe beschränkt. Hierbei muss jedoch der Immunstatus berücksichtigt werden, da sich im Falle einer Infektion oder einer Entzündung das Expressionsmuster verändern kann. Die Produktion der humanen Defensine hBD1-4 ist in Epithelien und zahlreichen Gewebetypen und Organen zu finden (Pazgiera et al., 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass distinkte hämatopoetische Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen hBD1 und hBD2 exprimieren (Duits et al., 2002). Die Expression von mBD4 ist wiederum auf Zunge, Trachea, Ösophagus, Lunge und Magen begrenzt (Jia et al., 2000; Schofield et al., 2004; Rivas-Santiago et al., 2006). Interessanterweise ist die Expression der mBD14-mRNA in allen hier untersuchten Organen nachweisbar (Abb. 4). Eine andere kürzlich veröffentlichte Studie bestätigt die im Organismus der Maus weit verbreitete Expression von mBD14 (Hinrichsen et al., 2008). Die Expression in Trachea, Ösophagus und Zunge scheint konserviert zu sein, da für hBD3 ebenfalls die Expression in diesen Organen nachgewiesen werden konnte (Harder et al., 2001). Mit wenigen Ausnahmen sind die meisten dieser Organe üblicherweise verschiedensten Umweltfaktoren, darunter auch Bakterien, Viren und Pilze, ausgesetzt. Vermutlich stellt daher die Expression des mBD14 in diesen Organen einen weiteren Bestandteil der antimikrobiellen Abwehr der Maus dar. Des Weiteren wurde die mRNA-Expression des mBD14, im Gegensatz zu dessen Ortholog hBD3, auch in dendritischen Zellen gefunden (Abb. 5). Somit konnte erstmals die Expression eines

β -Defensins der Maus in diesen Zellen nachgewiesen werden. Diese Expression findet nicht konstitutiv sondern reguliert statt, da BMDCs, die nicht mit TLR-Liganden, wie z. B. LPS, stimuliert wurden, weniger mBD14-mRNA exprimieren, als Zellen, die mit TLR-Liganden stimuliert wurden. Folglich führt die Stimulierung von TLR4 mit LPS in dendritischen Zellen zu einer Erhöhung der mBD14-Expression. Allgemein führt die Aktivierung von TLR4 durch LPS zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs und damit zur Expression proinflammatorischer Zytokine (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001; Beutler et al., 2003). Aufgrund Computer-basierter Promotoranalysen, die jedoch keine NF- κ B-Bindestellen im mBD14-Promotor nachweisen konnten, ist davon auszugehen, dass die mBD14-Expression in BMDCs unabhängig von dem NF- κ B-Signalweg induziert wird. Welche Transkriptionsfaktoren bei der Expression von mBD14 aktiviert werden, ist noch zu klären.

Der Nachweis der Expression und Regulation von mBD14 in BMDCs korreliert mit Ergebnissen aus früheren Studien, die zeigen, dass nach Stimulierung von Epithelzellen mit TLR-Liganden die Expression von β -Defensinen induziert oder noch verstärkt werden kann (MacRedmond et al., 2005; Huang et al., 2006; Uehara et al., 2007).

4.3 Regulation der Expression von mBD14

Nachdem in BMDCs nach Stimulierung mit LPS eine gesteigerte Expression von mBD14 beobachtet werden konnte, sollten weitere *Pattern-recognition*-Rezeptoren identifiziert werden, die nach ihrer Aktivierung zur Induktion der mBD14-Expression führen. Hierfür wurden zunächst BMDCs mit verschiedenen TLR-Liganden, wie z. B. LPS, stimuliert. Anschließend wurde die relative Expression von mBD14 mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich nach Stimulierung mit den untersuchten Liganden für TLR3 (Poly (I:C)), TLR4 (LPS) und TLR9 (CpG) eine erhöhte Expression von mBD14-mRNA (Abb. 6). Interessanterweise ist diese relative Expression auch nach Stimulierung mit Poly (I:C) zu beobachten. Poly (I:C) ist strukturell ähnlich zu doppelsträngiger RNA, wie sie in manchen Viren zu finden ist, und damit deren synthetisches Analogon. Es aktiviert über TLR3 den Promotor von NF- κ B und IFN β und führt zur erhöhten Expression von IL-6 und TNF (Fortier et al., 2004; Okahira et al., 2005). Möglicherweise spielt damit mBD14 auch in der Abwehr von Viren eine wichtige Rolle. Für hBD1 und hBD2 konnte bereits gezeigt werden, dass in Epithelzellen nach Stimulierung mit Poly (I:C) neben IFN β auch die

Expression der β -Defensine induziert wird (Schaefer et al., 2005). In dendritischen Zellen wiederum wurde nachgewiesen, dass die Poly (I:C)-induzierte und TLR3-abhängige IFN β -Expression über den Transkriptionsfaktor IRF-7 reguliert wird (Coccia et al., 2004). Anhand Computer-basierter Analysen zeigte sich, dass in der Promotor-Region des mBD14 Erkennungssequenzen für IRF-7 vorhanden sind. Inwieweit diese über die Poly (I:C)/TLR3-induzierte Signalkaskade mit der verstärkten Expression von mBD14-mRNA möglicherweise zusammenhängen bleibt noch zu klären.

Ein weiterer *Toll-like*-Rezeptor, TLR9, ist ebenfalls an der Regulation der Expression von mBD14 beteiligt. Die Stimulierung des TLR9 mit CpG-DNA führt zur Produktion von IFN α und IFN β (Coccia et al., 2004). Während jedoch TLR3 ausschließlich virale Komponenten erkennt, kann TLR9 sowohl auf virale als auch auf bakterielle Strukturen reagieren und über IRF-5 und IRF-7 die Expression von IFN α und IFN β sowie proinflammatorischer Zytokine (Lee et al., 2007) und offensichtlich auch mBD14 induzieren. Möglicherweise sind wie im Fall von hBD2 auch noch weitere *Toll-like*-Rezeptoren, wie z. B. TLR2, an der Regulation der Expression von mBD14 beteiligt (Wang et al., 2003; Vora et al., 2004; Lee et al., 2008).

Während die *Toll-like*-Rezeptoren im extrazellulären und vesikulären Kompartiment Pathogen-assoziierte Moleküle erkennen, übernehmen diese Aufgabe im Zytosol u. a. die NOD-Rezeptoren, eine weitere Familie innerhalb der Gruppe der *Pattern-recognition*-Rezeptoren. Der NOD1-Rezeptor detektiert eine meso-Diaminopimelinsäure im Peptidoglykan Gram-negativer Bakterien. Der NOD2-Rezeptor erkennt hingegen Muramyl-dipeptid (MDP), das ein Bestandteil des Peptidoglykans Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien ist (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003; Girardin et al., 2003; Inohara et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine *frame-shift* Mutation (3020insC) im Gen des NOD2 häufig assoziiert ist mit Morbus Crohn und zudem in einer stark beeinträchtigten Expression von hBD2 und hBD3 resultiert. Daher wird diskutiert, dass die β -Defensin-Defizienz aufgrund des fehlenden NOD2-Signalings entscheidend an der Ausprägung der Krankheit beteiligt ist (Fellermann et al., 2003; Voss et al., 2006). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob auch für das dem hBD3 orthologe mBD14 eine Assoziation mit dem NOD2/CARD15-Signaling nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurde die 1700 bp lange Sequenz der 5'-Promotor-Region des *Defb14*-Gens in einem Luziferase-Reporter-System nach Aktivierung des NOD2 durch MDP in der Lungenepithelzelllinie LA-4 aus der Maus untersucht. In diesen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass nach Stimulierung von LA-4 Zellen mit MDP eine NOD2-abhängige Aktivierung des mBD14-Promotors stattfindet. Da die Promotor-Region keine

NF- κ B-Bindestelle aufweist, jedoch mehrere AP-1-Bindestellen nachgewiesen werden konnten, ist anzunehmen, dass der MDP-induzierte NOD2-Signalweg über den Transkriptionsfaktor AP-1 zur mBD14-Promotoraktivität führt. Versuche in diesem Zusammenhang mit hBD2 zeigten bereits, dass sowohl NF- κ B als auch AP-1 den hBD2-Promotor aktivieren (Voss et al., 2006). Weiterhin besteht allerdings noch die Möglichkeit, dass durch den NF- κ B-Signalweg die Produktion proinflammatorischer Zytokine induziert wird, aufgrund dieser die Expression von mBD14 induziert wird. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass das proinflammatorische Zytokin IFN γ in der Lage ist, die Expression von mBD14 zu induzieren (Hinrichsen et al., 2008).

Dieses Signaltransduktionsmodell wurde in BMDCs überprüft, mit dem Unterschied, dass hier NOD2 nicht überexprimiert wird. Es stellte sich heraus, dass sich auch BMDCs mit MDP stimulieren lassen und daraufhin eine erhöhte mBD14-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 11). Es war jedoch eine vergleichsweise hohe Menge an MDP notwendig. Dies lässt sich möglicherweise mit der schlechten Membrangängigkeit dieses Moleküls ohne Vehikel wie z. B. ein Lipofektionsmittel oder eine Wasser-Öl-Emulsion erklären (Kotani et al., 1977). Die Bedeutung des NOD2-Rezeptors für die Funktion antigenpräsentierender Zellen zeigt folgendes Beispiel, in dem als Folge einer Mutation im NOD2-Gen (z. B. 3020insC), die zum Verlust der Funktion des Rezeptors führt, dendritische Zellen in der Präsentation kostimulatorischer Moleküle beeinträchtigt sind (Kramer et al., 2006). Ein Defekt in der NOD2-Signaltransduktion könnte in der Maus ebenfalls die Expression des mBD14 beeinträchtigen. Somit könnten dendritische Zellen mit defektem NOD2 nicht nur in ihrer Antigenpräsentation, sondern auch in ihrer Expression von antimikrobiellen Peptiden beeinträchtigt sein. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass NOD2-defiziente Mäuse in der Expression antimikrobieller Proteine und der Bekämpfung von Bakterien beeinträchtigt sind (Kobayashi et al., 2005; Wehkamp et al., 2005).

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre *Pattern-recognition*-Rezeptoren, die Pathogen-assoziierte Strukturen von Viren und Bakterien erkennen, an der Regulation der mBD14-Expression beteiligt sind. Außerdem zeigte sich, dass das β -Defensin 14 der Maus ein ähnliches Expressionsmuster wie das humane β -Defensin 3 aufweist.

4.4 Antibakterielle Aktivität der rekombinant exprimierten β -Defensin:Ig-Fusionsproteine

Eine weitere Charakterisierung der biologischen Funktionen sollte mit einem rekombinant exprimierten Fusionsprotein durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde das mBD14 mit dem nicht immunstimulatorischen Fc-Teil des humanen IgG₁ fusioniert. Als Referenz-Proteine wurden zusätzlich mBD4, hBD2 und hBD3 als Fusionsproteine hergestellt. Mit Hilfe des Fc-Teils ist die Halbwertszeit der Polypeptide erhöht und eine effiziente Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Protein G-Sepharose möglich (Zheng et al., 1995). Zum Nachweis, dass diese rekombinant exprimierten β -Defensin:Ig-Fusionsproteine die für die Familie der β -Defensine charakteristische antibakterielle Aktivität besitzen, wurden antibakterielle Assays mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienstämmen durchgeführt. Gegen die Gram-negativen Bakterienstämme *E. coli* ATCC 25922 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 zeigten die untersuchten β -Defensin:Ig-Fusionsproteine schon ab einer geringen Konzentration von 1 μ g/ml ihre typische antibakterielle Wirkung. Auch der Gram-positive *B. subtilis* ATCC 6633 zeigt sich empfindlich gegenüber den rekombinanten β -Defensin:Ig-Fusionsproteinen (Abb. 19-Abb. 22). Der Fc-Teil des humanen IgG₁ zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien (Abb. 23). Für das mBD14:Ig konnte erstmals nachgewiesen werden, dass auch dieses Defensin die für diese Familie charakteristische antibakterielle Wirkung aufweist. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte außerdem zeigen, dass es der N-terminale Bereich des mBD14-Polypeptids ist, der für die antibakterielle Aktivität notwendig ist (Taylor et al., 2008). Die mit Hilfe dieser Versuche nachgewiesene antibakterielle Wirkung der untersuchten β -Defensin:Ig-Fusionsproteine, die unabhängig von der Gram-Färbung ist, bestätigt die Ergebnisse früherer Studien mit hBD2 und hBD3 (Bals et al., 1998; Garcia et al., 2001).

Im Gegensatz dazu sind alle hier untersuchten β -Defensin:Ig-Fusionsproteine nicht in der Lage *S. aureus* ATCC 25923 abzutöten (Abb. 19-Abb. 22). Im Fall von hBD2 und hBD3 konnte in früheren Studien jedoch eine antimikrobielle Wirkung gegen *S. aureus* nachgewiesen werden (Harder et al., 2001; Midorikawa et al., 2003; Maisetta et al., 2006). Ursächlich für die nicht vorhandene bakterizide Wirkung ist möglicherweise der hIgG₁ Fc-Teil der Fusionsproteine. Ähnlich wie *Streptococcus sp.* trägt auch *S. aureus* auf seiner Oberfläche Protein G, das in der Lage ist IgG-Antikörper über ihren Fc-Teil zu binden, um sich somit vor einer möglichen Opsonierung zu schützen (Bjorck et al., 1984; Gatlin et al., 2006). Da also in den hier durchgeführten antibakteriellen Versuchen mit *S. aureus* die

verwendeten hIgG₁-Fusionsproteine mit ihrem Fc-Teil möglicherweise an das Protein G der Bakterienoberfläche gebunden waren, konnte das jeweilige β -Defensin die Zellhülle nicht mehr angreifen (Abb. 39). Ein im Rahmen einer bakteriellen Infektion therapeutisch eingesetztes β -Defensin:Ig-Fusionsprotein hätte folglich nur ein eingeschränktes Wirkungsspektrum.

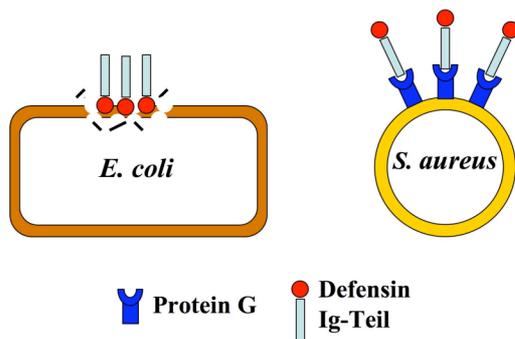


Abb. 39: Modell zum Schutz von *S. aureus* vor β -Defensin:Ig-Fusionsproteinen. Schematische Darstellung der Hypothese zum Schutz des *S. aureus*. *E. coli* ohne Protein G kann von β -Defensin:Ig-Fusionsproteinen angegriffen werden. *S. aureus* fängt mittels Protein G das Fusionsprotein ab und inaktiviert es damit. Darstellung nicht maßstabgetreu.

Inwieweit die antibakterielle Aktivität der β -Defensine 4 und 14 der Maus von der Salzkonzentration abhängig ist, wie für die beiden humanen Defensine hBD1 und hBD2 gezeigt (Bals et al., 1998; Singh et al., 1998), wurde nicht untersucht. Allerdings wurde in dieser Arbeit, wie beschrieben, ein Puffer mit physiologischen Salzkonzentrationen von Natriumchlorid, Natriumhydrogenphosphat und LB-Nährmedium verwendet. Offensichtlich ist die beschriebene Salzsensitivität neben der Natriumchlorid-Konzentration noch von weiteren Faktoren abhängig. Überdies deutet die antimikrobielle Wirkung der β -Defensin:Ig-Fusionsproteine unter physiologischen Bedingungen darauf hin, dass sowohl mBD4 und mBD14 als auch hBD2 und hBD3 auch *in vivo* antimikrobielles Potenzial besitzen. Versuche mit transgenen Mäusen könnten in diesem Zusammenhang zur Klärung beitragen. Im Fall von hBD2 konnte bereits gezeigt werden, dass es *in vitro* zwar unter physiologischen Kochsalzbedingungen nicht mehr antibakteriell aktiv ist, *in vivo* aber seine volle antibakterielle Wirkung besitzt (Huang et al., 2002).

4.5 Bindung und Aktivierung des Chemokin-Rezeptors CCR6 durch mBD14

Der bislang einzige Chemokin-Ligand des CC-Chemokin-Rezeptor 6 (CCR6) ist CCL20 (auch MIP-3 α oder LARC genannt) (Baba et al., 1997; Liao et al., 1997). Eine Vielzahl proinflammatorischer Stimuli wie z. B. TNF, IL-1, IL-17 und IFN γ führt zu einer starken Expression von CCL20 in verschiedenen Geweben und Zellen, wie beispielsweise im intestinalen Epithel oder in Keratinozyten der Haut (Homey et al., 2000; Kwon et al., 2002). Der Chemokin-Rezeptor CCR6 wird von B-Zellen, von Untergruppen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und von dendritischen Zellen exprimiert (Baba et al., 1997; Liao et al., 1999; Kucharzik et al., 2002). Im Zusammenhang mit β -Defensinen ist bereits bekannt, dass einige Vertreter dieser Familie wie beispielsweise hBD1 und hBD2 sowie mBD2 und mBD3 über den CCR6-Rezeptor Chemotaxis induzieren können (Yang et al., 1999; Biragyn et al., 2001). Bisher war es jedoch noch nicht möglich, die Bindung von β -Defensinen an CCR6 direkt nachzuweisen.

Zur Untersuchung der Interaktion von mBD4:Ig und mBD14:Ig mit CCR6 wurde eine mCCR6 exprimierende HEK-293 Zelllinie hergestellt. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden (FACS) konnte die Expression des mCCR6 auf der Oberfläche der HEK-293 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 24). Diese mCCR6-exprimierenden Zellen wurden anschließend verwendet, um die Bindung des rekombinant exprimierten mBD14:Ig an mCCR6 mittels FACS-Analysen zu überprüfen. Als Positivkontrolle diente rekombinant exprimiertes mCCL20:Ig-Fusionsprotein. Die Ergebnisse zeigten erstmals eine spezifische Bindung eines β -Defensin:Ig-Fusionsproteins an mit mCCR6 transfizierten HEK-293 Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen die Interaktion von hBD2, hBD3, mBD2 und mBD3 mit CCR6, die in bisherigen Arbeiten aufgrund der beobachteten CCR6-abhängigen chemotaktischen Aktivität dieser β -Defensine postuliert wurde (Yang et al., 1999; Biragyn et al., 2001; Wu et al., 2003). Wie der Vergleich des MFI-Wertes (*mean fluorescence intensity*) mit dem von mCCL20:Ig zeigt, ist diese Bindung des mBD14:Ig allerdings nicht so stark ausgeprägt wie bei dem Liganden mCCL20:Ig (Abb. 25). Mit diesen Versuchen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die rekombinant exprimierten β -Defensin:Ig-Fusionsproteine neben ihrer antimikrobiellen Wirkung weitere biologische Aktivitäten aufweisen. Im Vergleich zur Überprüfung der biologischen Aktivität der exprimierten Proteine mittels antibakterieller Assays, in denen die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine keine Rolle spielt (Kluver et al., 2005), konnte hier nachgewiesen werden, dass die rekombinant

exprimierten Proteine die für die Interaktion mit dem CCR6 benötigte korrekte Faltung aufweisen, da ansonsten eine Bindung an CCR6 nicht möglich wäre (Wu et al., 2003). Eine aktuelle Forschungsarbeit zeigt in diesem Zusammenhang, dass die chemotaktische Aktivität des mBD14 und des hBD3 nicht von der Summe der Cystein-Reste oder der Disulfidbrückenbindungen abhängig ist, sondern, dass speziell das fünfte Cystein in der Aminosäuresequenz eine entscheidende Rolle spielt (Taylor et al., 2008).

Nachdem die Bindung von mBD14:Ig an mCCR6 nachgewiesen werden konnte, galt es nun herauszufinden, ob diese Bindung auch eine biologische Funktion hat. Hierfür wurden Chemotaxisversuche sowohl mit mCCR6- oder hCCR6-exprimierenden HEK-293 Zellen als auch mit Monozyten von Mensch oder Maus, die nachweislich CCR6 nicht exprimieren (Baba et al., 1997; Yang et al., 1999), durchgeführt. Wie in Abb. 26 und Abb. 27 gezeigt ist, sind mBD4 und mBD14 ausschließlich speziesspezifisch in der Lage, mCCR6-exprimierende Zellen zur Chemotaxis anzuregen, während deren humane Orthologe hBD2 und hBD3 sowohl speziesspezifisch als auch kreuzspezifisch die Migration mCCR6- und hCCR6-exprimierender Zellen induzieren können. Im Gegensatz dazu kann in Monozyten des Menschen und der Maus CCR6-unabhängig durch mBD4, mBD14, hBD2 und hBD3 Chemotaxis induziert werden. Hierbei spielt es jedoch keine Rolle, von welcher Spezies die Monozyten stammen. Die Daten korrelieren mit Studien, in denen gezeigt wurde, dass β -Defensine Chemotaxis von Monozyten induzieren können (Garcia et al., 2001; Yang et al., 2002; Conejo-Garcia et al., 2004). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mBD14 über mCCR6, nicht aber über hCCR6, sowie mindestens einen weiteren, noch unbekanntem Rezeptor Chemotaxis induzieren kann.

Der von unreifen dendritischen Zellen exprimierte Chemokinrezeptor CCR6 ist entscheidend daran beteiligt, dass diese Zellen zum Infektions- oder Entzündungsherd wandern und dort ihre Funktion als Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen wahrnehmen können (Dieu et al., 1998; Cook et al., 2000; Osterholzer et al., 2005). Aufgrund bakterieller Strukturen in solchen Infektionsherden werden β -Defensine verstärkt exprimiert. Dort sind sie möglicherweise als weiterer chemotaktischer Faktor an der Rekrutierung von DCs und anderen CCR6-exprimierenden Zellen beteiligt. Defensine wie beispielsweise hBD3 oder mBD2 sind zudem auch in der Lage die angelockten DCs über TLR1/2 oder TLR4 zu aktivieren und somit eine T_H1 -polarisierte Immunantwort hervorzurufen (Biragyn et al., 2002; Funderburg et al., 2007).

4.6 Die Interaktion von mBD14 mit CCR6⁺ B-Lymphozyten

In den beschriebenen Chemotaxisversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass mBD14:Ig über den Chemokinrezeptor CCR6 Zellen zur Migration anregen kann. Da B220⁺ CD19⁺ B-Lymphozyten ebenfalls CCR6 exprimieren (Baba et al., 1997), sollte schließlich überprüft werden, ob mBD14:Ig über CCR6 mit B-Zellen interagieren kann. Mittels FACS-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Maus-Zelllinie A20 CCR6 auf der Zelloberfläche trägt. MBD14:Ig zeigt eine Bindung an diese Zellen und wie schon in den Versuchen mit CCR6-exprimierenden HEK-293 Zellen fällt die Bindung im Vergleich zu mCCL20:Ig schwächer aus (Abb. 28).

Im Weiteren wurden primäre, CCR6⁺ B-Zellen untersucht, die anhand ihrer spezifischen Marker B220 und CD19 identifiziert werden konnten. Interessanterweise bindet in diesem Fall offensichtlich mCCL20:Ig schwächer an die primären B-Zellen als mBD14:Ig (Abb. 30). Möglicherweise liegt dies in der Konkurrenz des mCCL20:Ig mit dem anti-mCCR6-Antikörper begründet, da beide Reagenzien gleichzeitig zugegeben wurden. Dies würde aber auch bedeuten, dass das mBD14:Ig nicht ausschließlich an CCR6 bindet, wie ebenfalls die Chemotaxisversuche zeigten, da es bei gleichzeitiger Zugabe des anti-mCCR6-Antikörpers immer noch eine deutliche Bindung an B-Lymphozyten zeigt. Andererseits könnten auch *Toll-like*-Rezeptoren für eine Bindung von mBD14:Ig an B-Zellen in Frage kommen, da mehrere β -Defensine bereits als TLR-Liganden beschrieben wurden (Biragyn et al., 2002; Funderburg et al., 2007; Minguet et al., 2008). B-Zellen aus CCR6-defizienten Mäusen könnten hier entscheidend zur Klärung beitragen. Bezüglich der Interaktion von β -Defensinen mit B-Zellen konnte gezeigt werden, dass β -Defensine, als Adjuvans eingesetzt, zu einer vermehrten Proliferation und Antikörperproduktion der B-Zellen bzw. zur Antikörperproduktion gegen ansonsten nicht immunogene Proteine beitragen (Tani et al., 2000; Wang et al., 2007). Betrachtet man aber wieder die Bindung von mBD14 an CCR6, ergibt sich eine weitere potenzielle immunmodulatorische Funktion. Im Zusammenhang mit der Entstehung von Lymphfollikeln z. B. in entzündeter Mukosa konnte nachgewiesen werden, dass gerade CCR6 auf B-Zellen an der Ausbildung follikulärer Strukturen entscheidend beteiligt ist (Williams, 2006; McDonald et al., 2007). Somit könnte in entzündetem Gewebe exprimiertes mBD14 möglicherweise zur Etablierung von Lymphfollikeln und damit zur Entwicklung einer lokalen, adaptiven Immunantwort beitragen.

Zusammenfassend kann man zu den bisher identifizierten Funktionen die Hypothese aufstellen, dass mBD14 als antimikrobielles Peptid die erste Barriere für pathogene Keime darstellt. Durch proinflammatorische bakterielle Strukturen wie LPS und MDP wird es in verschiedensten Organen sowie in dendritischen Zellen verstärkt exprimiert. Dies führt zu einer effizienten Bekämpfung der Bakterien einerseits direkt durch dessen antimikrobielle Eigenschaft, andererseits durch die chemotaktische Rekrutierung von CCR6-exprimierenden antigenpräsentierenden Zellen und B-Lymphozyten zum Ort der Infektion (Abb. 40).

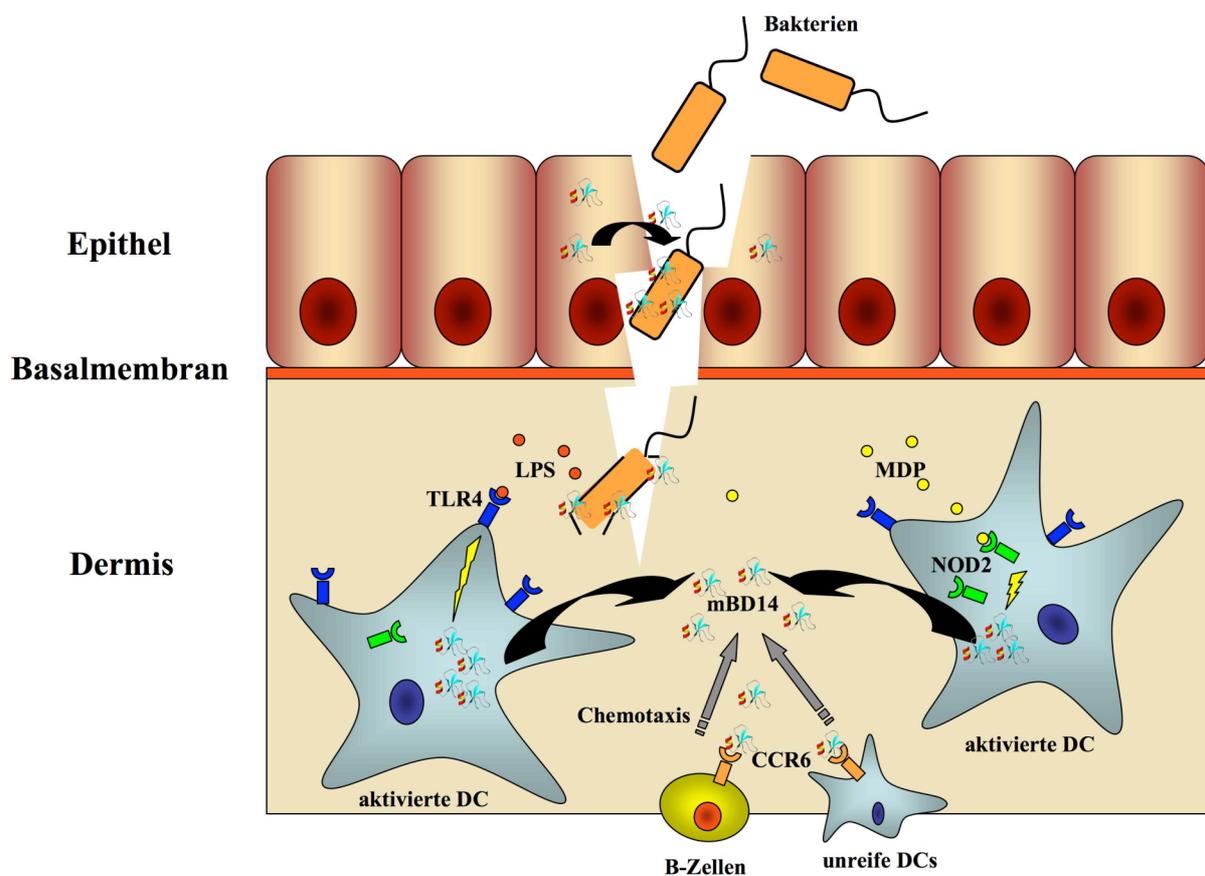


Abb. 40: Schematische Darstellung der Hypothese zum bisher identifizierten Wirkungsspektrum von mBD14. Am Ort einer Infektion induzieren bakterielle Strukturen wie LPS und MDP über TLR4 und NOD2 die Expression des mBD14. Dies führt zur Bekämpfung der Pathogene sowohl direkt aufgrund der antibakteriellen Eigenschaften als auch indirekt durch die Rekrutierung von CCR6-exprimierenden dendritische Zellen und B-Zellen. Darstellung nicht maßstabgetreu.

4.7 Die Rolle des mBD14 im Tumorwachstum

Die bisher beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen, dass β -Defensine nicht nur aufgrund ihrer antimikrobiellen Aktivität, sondern auch wegen ihrer Wirkung auf Zellen des adaptiven Immunsystems einen wesentlichen Einfluss auf eine induzierte Immunantwort haben können. Aufgrund der durch mBD14 induzierten chemotaktischen Aktivität gegenüber CCR6-exprimierenden Zellen sollte der Einfluss dieser chemotaktischen Wirkung in Bezug auf das Tumorwachstum in einem syngenem BFS-1-Fibrosarkom-Tumormodell überprüft werden.

Interessanterweise konnte in Biopsien von BFS-1 Tumoren die Expression von mBD14-mRNA nachgewiesen werden, in BFS-1 Zellen *in vitro* wurde jedoch keine mBD14-mRNA-Expression festgestellt (Abb. 31). Damit ist davon auszugehen, dass im Tumor mBD14 von tumorinfiltrierenden Leukozyten exprimiert wird, vor allem aufgrund des Nachweises der mBD14-Expression in BMDCs. Zur Überprüfung der Funktion des mBD14 während der Tumorentwicklung wurden BFS-1 Zellen, die mBD4:Ig, mBD14:Ig oder als Kontrolle p55:Ig exprimieren, syngenem C57BL/6 Mäusen subkutan appliziert. Die Tumoren, die aus mBD4:Ig- oder p55:Ig-exprimierenden BFS-1 Zellen generiert wurden, zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie Tumoren, die aus BFS-1 wt Zellen entstanden (Abb. 33). Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass mBD14:Ig-exprimierende Tumoren ab dem Eintreten der Vaskularisation einen deutlich schnelleren Wachstumsverlauf als die entsprechenden Kontrolltumoren aufweisen (Abb. 32). Anhand daraufhin durchgeführter MTT-Assays konnte eine Veränderung der Zellproliferation oder der Zellvitalität aufgrund der Transfektion mit β -Defensin-Expressionsvektoren ausgeschlossen werden (Abb. 34). Der Vergleich von mBD4:Ig-exprimierenden Tumoren mit mBD14:Ig-exprimierenden Tumoren verdeutlicht, dass das verstärkte Tumorwachstum kein allgemeiner Effekt der Familie der β -Defensine ist, sondern auf ein distinktes Protein, das mBD14, zurückzuführen ist.

Aufgrund der durch mBD14:Ig induzierten chemotaktischen Aktivität von CCR6-exprimierenden Zellen sollte die Zusammensetzung der Leukozyten in den Tumoren überprüft werden. Die Analyse der tumorinfiltrierenden Leukozyten in den BFS-1 Tumoren zeigte, dass der prozentuale Anteil an reifen dendritischen Zellen (Abb. 35) und unreifen DCs, sowie NK-Zellen (Daten nicht gezeigt) sich zwischen den verschiedenen Tumorentitäten nicht unterscheidet. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied in der infiltrierenden CD8⁺ Zellpopulation gemessen werden. Im Gegensatz dazu war jedoch in mBD14-exprimierenden Tumoren ein geringerer Anteil an CD4⁺ Zellen zu finden. In Korrelation zu den CCR6-Bindungsversuchen und den Chemotaxis-Assays mit mBD14 konnte aber vor allem ein

signifikant höherer Anteil an CCR6⁺ B220⁺ Zellen in mBD14-exprimierenden Tumoren nachgewiesen werden (Abb. 35). Das verdeutlicht, dass sich der chemotaktische Effekt des mBD14 auf CCR6-exprimierende Zellen auch *in vivo* nachweisen lässt. Im Zusammenhang mit einem verstärkten Tumorwachstum konnte in früheren Studien bereits gezeigt werden, dass B-Lymphozyten einen negativen Effekt auf die Bekämpfung eines Tumors haben können (Qin et al., 1998; Perricone et al., 2004; Shah et al., 2005). Warum allerdings der Anteil unreifer DCs, die ebenfalls CCR6 exprimieren, sich nicht erhöhte, ist unklar. Vermutlich müsste man hierfür die durchflusszytometrischen Analysen mittels weiterer zellspezifischer Marker noch weiter differenzieren, um Unterschiede sichtbar zu machen.

Die verstärkte Zunahme des Tumorwachstums tritt in den Versuchen mit BFS-1 Tumoren erst nach Beginn der Angiogenese in Erscheinung. Es ist bekannt, dass während des Tumorwachstums die Angiogenese einsetzt, sobald der Tumor eine Größe erreicht hat, in der die Versorgung durch Diffusion nicht mehr gewährleistet ist (Hanahan et al., 1996). Daher liegt es nahe, dass die Expression des mBD14 direkt oder indirekt die Angiogenese beeinflusst. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von mBD29 bei gleichzeitig vermehrter Produktion des Wachstumsfaktors VEGF α im Ovarialkarzinom zu einer verstärkten Vaskularisation und damit zu einem verbesserten Tumorwachstum führt. Dabei stellte sich heraus, dass mittels mBD29 rekrutierte tumorinfiltrierende DC-Vorläuferzellen sich in gefäßbildende Endothel-ähnliche Zellen umorganisieren und damit auch Endothel-Marker wie z. B. CD31 und CD34 tragen. Auf diese Weise tragen sie entscheidend an der Gefäßbildung in diesen Tumoren bei. Außerdem exprimiert etwa die Hälfte dieser DC-Vorläuferzellen, die als vaskulären Leukozyten (VLCs, *vascular leukocytes*) bezeichnet werden, auch CCR6 (Conejo-Garcia et al., 2004; Conejo-Garcia et al., 2005). Diese scheinen an der Neovaskularisation entscheidend beteiligt zu sein, denn wenn diese Zellen durch den Einsatz eines an anti-CCR6-Antikörper gekoppelten Toxins getötet werden, ist das Tumorwachstum wieder deutlich reduziert (Coukos et al., 2005). Eine Überexpression von mBD14 im BFS-1 Tumor könnte folglich über eine CCR6-induzierte Chemotaxis proangiogene Leukozyten in den Tumor einwandern lassen. Allerdings konnte in den mBD14-exprimierenden BFS-1-Tumoren keine erhöhte VEGF α -Expression festgestellt werden. Jedoch konnte eine erhöhte Expression von MIP-2, welches proangiogene Eigenschaften aufweist und ortholog ist zum humanen IL-8, nachgewiesen werden (Abb. 36 und Abb. 37). Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass MIP-2 eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese spielt (Kollmar et al., 2006). In Korrelation zu diesen Ergebnissen, wurde in einer anderen Forschungsarbeit gezeigt, dass CCL20-exprimierende Tumorzellen ebenfalls

ein schnelleres Tumorwachstum aufweisen und mehr unreife dendritische Zellen den Tumor infiltrieren. Die Expression von Wachstumsfaktoren wurde hier jedoch nicht überprüft (Bonnotte et al., 2004). Eine Interpretation der Summe der Daten lässt also die Schlussfolgerung zu, dass mittels CCL20 und mBD14 proangiogene Zellpopulationen den Tumor infiltrieren und dort mit Hilfe von proangiogenen Faktoren, wie z. B. VEGF α oder MIP-2, das Tumorwachstum begünstigen. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass man das Tumorwachstum möglicherweise einschränken könnte, wenn man CCL20 und/oder mBD14 als Liganden des CCR6 aus dem System entfernen und damit die Rekrutierung proangiogener Zellpopulationen verhindern würde. Derzeit werden proangiogene Zellpopulationen, wie z. B. vaskuläre Leukozyten, als Grundlage für eine zelluläre Tumor-Therapie im Zusammenhang mit der Hemmung von Wachstumsfaktoren diskutiert (Wang et al., 2007; Fainaru et al., 2008; McLean et al., 2008; Osada et al., 2008). In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass auch gerade die vermehrte Expression von CCR6 die Ausprägung von Karzinomen beeinflusst. In Karzinomen mit starker CCR6-Expression entstehen beispielsweise häufiger Metastasen, als in Karzinomen mit geringer CCR6-Expression. Ebenso korreliert die Stärke der CCR6-Expression mit der Entwicklung und Aggressivität eines Karzinoms. Daher wird auch speziell CCR6 als ein weiteres Ziel der Tumor-Therapie diskutiert (Ghadjar et al., 2006; Uchida et al., 2006; Ghadjar et al., 2008).

Immunhistochemische Untersuchungen der Gewebeschnitte von Biopsien der BFS-Tumoren zeigen Unterschiede in der Gefäßbildung. Die histologischen Präparate der mBD14-exprimierenden Tumoren zeigen einen deutlich höheren Anteil an CD31⁺ Gefäßstrukturen im Vergleich zu Präparaten der anderen Tumorentitäten (Abb. 38). Allerdings findet die Expression des VEGF α sowohl in mBD14:Ig-exprimierenden Tumoren als auch in den anderen Tumorentitäten auf dem gleichen Niveau statt. Die MIP-2-Expression ist hingegen in mBD14:Ig-exprimierenden Tumoren erhöht. Das bedeutet, dass hier die verstärkte Angiogenese mit der vermehrten Produktion von MIP-2 korreliert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Expression von mBD14 im Tumorgewebe zu einer erhöhten Expression von proangiogenem MIP-2 führt und diese mit einer erhöhten Ausbildung vaskulärer Gefäßstrukturen einhergeht, die wiederum die Voraussetzung für das beobachtete, verbesserte Tumorwachstum darstellt. Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass neben den in der Literatur bisher beschriebenen antitumoralen Eigenschaften von β -Defensinen (Biragyn et al., 2001; Wang et al., 2007; Xu et al., 2007; Bullard et al., 2008) auch, wie hier für mBD14 gezeigt, proangiogene, Tumor-unterstützende Wirkungen von β -Defensinen möglich sind.

4.8 Ausblick

Aus der umfangreichen Familie der β -Defensine der Maus wurde das mBD14 als neues antimikrobielles Peptid dieser Familie erstmals identifiziert und funktionell charakterisiert. In zukünftigen Experimenten gilt es, die bisher erhaltenen Ergebnisse noch weiter zu differenzieren. So ist beispielsweise noch zu untersuchen, welche anderen Faktoren neben der Aktivierung von *Pattern-recognition*-Rezeptoren die Expression des mBD14 beeinflussen und welche Signalwege und Transkriptionsfaktoren daran beteiligt sind.

Während der Untersuchungen bezüglich der Interaktion von mBD14 mit CCR6 stellte sich interessanterweise heraus, dass es auf Monozyten noch mindestens einen weiteren Chemotaxis-induzierenden Rezeptor geben muss, der β -Defensine als Liganden nutzt. Um weitere biologische Funktionen von mBD14 zu untersuchen, ist es notwendig, diesen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Nachdem gezeigt wurde, dass mBD14 das Tumorwachstum begünstigt, müssen die hierfür ursächlichen Mechanismen geklärt werden. Dabei ist z. B. die Frage zu beantworten, welchen Einfluss die vermehrte Infiltration von CCR6⁺ B220⁺ Zellen in mBD14-exprimierenden Tumoren auf das Tumorwachstum hat. Ebenso ist noch unklar, wodurch die erhöhte MIP-2 Expression in diesen Tumoren hervorgerufen wird. Ein besonderes Augenmerk gilt hierbei CCR6-exprimierenden Zellen. In diesem Zusammenhang könnte z. B. die Untersuchung CCR6-defizienter Mäuse im BFS-1 Tumormodell zur Klärung der Rolle dieses Chemokinrezeptors im beschleunigten Tumorwachstum beitragen.

5 Zusammenfassung

Die Familie der β -Defensine der Maus umfasst eine große Zahl an bisher meist nur auf genomischer Ebene identifizierter Gene. Erst wenige dieser β -Defensine wurden bisher synthetisiert oder rekombinant exprimiert und bezüglich ihrer biologischen Funktion untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun erstmals das neue β -Defensin 14 der Maus als Ortholog des humanen β -Defensin 3 beschrieben werden. Der ORF des *Defb14* weist die für die Familie der β -Defensine charakteristische Organisation in zwei Exons auf. Das mBD14-Polypeptid enthält am N-terminalen Ende eine Signalpeptidsequenz, die zur Sekretion des Proteins führt. Außerdem ist die für die β -Defensin-Familie typische Anordnung der sechs Cystein-Reste, die für die Ausbildung der Tertiärstruktur entscheidend sind, im mBD14-Polypeptid konserviert.

Entsprechend der Expression von hBD3 wurde die mRNA-Expression von mBD14 in verschiedenen Organen der Maus, darunter Trachea, Lunge, Magen und Darm nachgewiesen. Diese Organe sind aufgrund ihrer Funktion unterschiedlichen Umweltfaktoren ausgesetzt und benötigen daher besonderen antimikrobiellen Schutz. Erstmals wurde hier auch die Expression eines β -Defensins in BMDCs der Maus beschrieben. Die verstärkte mBD14-mRNA-Expression nach Stimulierung mit LPS, einem TLR4-Liganden, deutete auf eine Regulation der Expression durch *Pattern-recognition*-Rezeptoren hin. Daher wurde Poly (I:C) als synthetisches Analogon zu doppelsträngiger viraler RNA und Ligand für TLR3 sowie CpG als bakterielles DNA-Motiv und Ligand für TLR9 zur Stimulierung von BMDCs eingesetzt. Bei den Stimulierungen mit TLR-Liganden konnte eine verstärkte mBD14-Expression nachgewiesen werden.

Als weiterer intrazellulärer *Pattern-recognition*-Rezeptor wurde NOD2/CARD15 untersucht. Reporter-gen-Analysen zeigten, dass NOD2/CARD15-Aktivierung nach Stimulierung mit dessen Ligand MDP, einem Bestandteil des Peptidoglykans bakterieller Zellwände, zur Induktion der mBD14-Expression führt.

Das mBD14:Ig-Fusionsprotein zeigte in antimikrobiellen Assays die für die β -Defensin-Familie charakteristische antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien. *S. aureus* zeigte sich jedoch geschützt vor der antibakteriellen Aktivität der untersuchten β -Defensin:Ig-Fusionsproteine. Ein Grund hierfür ist möglicherweise das Protein G, das auf der Zelloberfläche von *S. aureus* zu finden ist und den Ig-Teil der

Fusionsproteine binden kann, wodurch die antibakterielle Wirkung der β -Defensin:Ig-Fusionsproteine aufgehoben werden kann.

Überdies wurde der Chemokinrezeptor CCR6 der Maus als potenzieller Rezeptor für mBD14 in HEK-293 Zellen exprimiert und anschließend die Bindung von mBD14:Ig an mCCR6 mittels durchflusszytometrischer Analysen nachgewiesen. In Chemotaxisversuchen mit hCCR6- oder mCCR6-exprimierenden HEK-293 Zellen sowie humanen PBMCs und residenten Peritonealzellen der Maus wurde eine speziesspezifische Interaktion von mBD14 und von mBD4 mit mCCR6 festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass hBD2 und hBD3 sowohl mit mCCR6 als auch mit hCCR6 interagieren können. Zudem wurde die Bindung von mBD14:Ig an B-Zellen, die endogen CCR6 exprimieren, nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass auf Monozyten, die keinen funktionellen CCR6-Rezeptor exprimieren, noch ein weiterer chemotaktischer Rezeptor für β -Defensine exprimiert werden muss.

Im BFS-1-Fibrosarkom-Tumormodell konnte nachgewiesen werden, dass die intratumorale mBD14:Ig-Expression das Tumorstadium fördert, ohne jedoch das Wachstumsverhalten der BFS-1-Fibrosarkomzellen *in vitro* zu verändern. In Korrelation zu den Versuchen zur Interaktion von mBD14:Ig mit mCCR6 konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil an CCR6⁺ B220⁺ B-Lymphozyten, gemessen an der Gesamtheit tumorinfiltrierender Zellen, signifikant erhöht war. Die Expression von mBD14:Ig im Tumorgewebe führt zu einer erhöhten Expression des proangiogenen MIP-2, während die Expression von weiteren proangiogenen Faktoren, wie z. B. VEGF α , unbeeinflusst bleibt. Anhand immunhistochemischer Untersuchungen wurde in mBD14:Ig-exprimierenden Tumoren ein erhöhter Anteil vaskulärer Gefäßstrukturen nachgewiesen, die eine Voraussetzung für das beobachtete verbesserte Tumorstadium darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mBD14 als neues Mitglied der β -Defensin-Superfamilie identifiziert und charakterisiert werden. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass mBD14 nicht nur als antimikrobielles Peptid im Rahmen der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt, sondern, dass mBD14 ebenso Einfluss nimmt auf antigenpräsentierende Zellen sowie auf Lymphozyten des adaptiven Immunsystems und somit immunmodulatorisch wirken kann.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Permeabilisierung der inneren und äußeren Membran von <i>E. coli</i> nach Behandlung mit HNP-1	5
Abb. 2: Identifizierung des <i>Defb14</i> -Gens und Alignment der Proteinsequenz mit den Sequenzen von hBD1, hBD2 und hBD3.....	47
Abb. 3: Alignment der cDNA-Sequenzen von hBD3 mit mBD14.....	48
Abb. 4: Expression von mBD14 in verschiedenen Organen der Maus.....	49
Abb. 5: Expression von mBD14 in BMDCs.....	50
Abb. 6: Relative Expression von mBD14 in BMDCs nach Stimulierung mit verschiedenen TLR-Liganden.....	52
Abb. 7: Klonierte regulatorische Promotor-Region des <i>Defb14</i>	52
Abb. 8: Kontrollverdau des mBD14-Promotor-Fragments im pGL4.11 Plasmid.....	53
Abb. 9: Modell zur NOD2/CARD15-Signaling induzierten Aktivierung des mBD14- Promotors.....	54
Abb. 10: Durch NOD2/CARD15-Signaling erhöhte Expression der durch den mBD14- Promotor regulierten Luciferase.....	54
Abb. 11: Relative Expression von mBD14 in BMDCs nach Stimulierung mit MDP.....	55
Abb. 12: Klonierungsstrategie mit dem Signal pIgplus Vektor.....	57
Abb. 13: Kontrollverdau der β -Defensine und des mCCL20 im Signal pIgplus Vektor.....	57
Abb. 14: Klonierungsstrategie zur Herstellung eines pMT/BiP/V5-His A Vektors mit Hygromycin-Resistenz.....	58
Abb. 15: Kontrollverdau der β -Defensin:Ig Konstrukte und des mCCL20:Ig in pMT/BiP/V5-His A-Hygro.....	59
Abb. 16: Western-Blot zum Nachweis der Defensin:Ig-, mCCL20:Ig-, hIgG ₁ - oder p55:Ig-Expression in HEK-293 und BFS-1 Zellen.....	60
Abb. 17: Western-Blot zum Nachweis der Defensin:Ig- oder mCCL20:Ig-Expression in <i>Drosophila</i> S2 Zellen.....	61
Abb. 18: Western-Blot zum Nachweis der Aufreinigung der hIgG ₁ -Fusionsproteine am Beispiel des mBD14:Ig aus <i>Drosophila</i> S2 Zellkulturüberstand.....	62
Abb. 19: Antibakterielle Aktivität des mBD14:Ig.....	64
Abb. 20: Antibakterielle Aktivität des mBD4:Ig.....	65
Abb. 21: Antibakterielle Aktivität des hBD3:Ig.....	66

Abb. 22: Antibakterielle Aktivität des hBD2:Ig.	66
Abb. 23: Antibakterielle Versuche mit hIgG ₁	67
Abb. 24: Nachweis der Expression von mCCR6 auf der Oberfläche von HEK-293 Zellen.	68
Abb. 25: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindung von mBD14:Ig an mCCR6.	69
Abb. 26: Migration verschiedener Zellen gegen mBD14:Ig und hBD3:Ig.	71
Abb. 27: Migration verschiedener Zellen gegen mBD4:Ig und hBD2:Ig.	72
Abb. 28: Bindung von mBD14:Ig und mCCL20:Ig an A20 Zellen.....	74
Abb. 29: Nachweis der Expression von CCR6 auf B220 ⁺ CD19 ⁺ Zellen aus der Milz.....	75
Abb. 30: Bindung von mBD14:Ig und mCCL20:Ig an B220 ⁺ CCR6 ⁺ Zellen.....	75
Abb. 31: Nachweis der Expression von mBD14 im BFS-1 Tumor.	76
Abb. 32: Wachstum der BFS-1 Tumoren in C57BL/6 Mäusen.....	78
Abb. 33: Wachstum der BFS-1 Tumoren in C57BL/6 Mäusen.....	78
Abb. 34: MTT-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität.	79
Abb. 35: Untersuchung der Zusammensetzung tumorinfiltrierender Leukozyten.	81
Abb. 36: Nachweis der MIP-2-Expression in BFS-1 wt Zellen,82 BFS-1 wt Tumoren und BFS-1 mBD14:Ig Tumoren.....	82
Abb. 37: Nachweis der Expression von MIP-2 und VEGF α in BFS-1 wt, BFS-1 p55:Ig und BFS-1 mBD14:Ig Tumoren.....	83
Abb. 38: Immunhistochemische Untersuchung der Vaskularisation im BFS-1 Tumor.....	84
Abb. 39: Modell zum Schutz von <i>S. aureus</i> vor β -Defensin:Ig-Fusionsproteinen.....	91
Abb. 40: Schematische Darstellung der Hypothese zum bisher identifizierten Wirkungsspektrum des mBD14.	95

7 Literaturverzeichnis

1. **Abbas, A. K., and A. H. Lichtman** (2003). Cellular and Molecular Immunology. Saunders Fifth Edition.
2. **Arimura, Y., J. Ashitani, S. Yanagi, M. Tokojima, K. Abe, H. Mukae, and M. Nakazato** (2004). Elevated serum beta-defensins concentrations in patients with lung cancer. *Anticancer Res* **24**:4051-4057.
3. **Baba, M., T. Imai, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, K. Hieshima, H. Nomiyama, and O. Yoshie** (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem* **272**:14893-14898.
4. **Baggiolini, M.** (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**:565-568.
5. **Bajaj-Elliott, M., P. Fedeli, G. V. Smith, P. Domizio, L. Maher, R. S. Ali, A. G. Quinn, and M. J. Farthing** (2002). Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression during gastritis. *Gut* **51**:356-361.
6. **Bals, R., X. Wang, R. L. Meegalla, S. Wattler, D. J. Weiner, M. C. Nehls, and J. M. Wilson** (1999). Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs. *Infect.Immun.* **67**:3542-3547.
7. **Bals, R., X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, and J. M. Wilson** (1998). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J.Clin.Invest* **102**:874-880.
8. **Bals, R., X. Wang, M. Zasloff, and J. M. Wilson** (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9541-9546.
9. **Bauer, F., K. Schweimer, E. Kluver, J. R. Conejo-Garcia, W. G. Forssmann, P. Rosch, K. Adermann, and H. Sticht** (2001). Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci* **10**:2470-2479.
10. **Becker, M. N., G. Diamond, M. W. Verghese, and S. H. Randell** (2000). CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J.Biol.Chem.* **275**:29731-29736.
11. **Beckloff, N., and G. Diamond** (2008). Computational analysis suggests beta-defensins are processed to mature peptides by signal peptidase. *Protein Pept Lett* **15**:536-540.
12. **Beisswenger, C., K. Kandler, C. Hess, H. Garn, K. Felgentreff, M. Wegmann, H. Renz, C. Vogelmeier, and R. Bals** (2006). Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *J Immunol* **177**:1833-1837.
13. **Bensch, K. W., M. Raida, H. J. Magert, P. Schulz-Knappe, and W. G. Forssmann** (1995). hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**:331-335.
14. **Beutler, B., K. Hoebe, X. Du, and R. J. Ulevitch** (2003). How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* **74**:479-485.
15. **Biragyn, A., I. M. Belyakov, Y. H. Chow, D. S. Dimitrov, J. A. Berzofsky, and L. W.**

- Kwak** (2002). DNA vaccines encoding human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 fusions with proinflammatory chemoattractants induce systemic and mucosal immune responses. *Blood* **100**:1153-1159.
16. **Biragyn, A., P. A. Ruffini, C. A. Leifer, E. Klyushnenkova, A. Shakhov, O. Chertov, A. K. Shirakawa, J. M. Farber, D. M. Segal, J. J. Oppenheim, and L. W. Kwak** (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* **298**:1025-1029.
17. **Biragyn, A., M. Surenhu, D. Yang, P. A. Ruffini, B. A. Haines, E. Klyushnenkova, J. J. Oppenheim, and L. W. Kwak** (2001). Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J.Immunol.* **167**:6644-6653.
18. **Birchler, T., R. Seibl, K. Buchner, S. Loeliger, R. Seger, J. P. Hossle, A. Aguzzi, and R. P. Lauener** (2001). Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur.J.Immunol.* **31**:3131-3137.
19. **Bjorck, L., and G. Kronvall** (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol* **133**:969-974.
20. **Bohling, A., S. O. Hagge, S. Roes, R. Podschun, H. Sahly, J. Harder, J. M. Schroder, J. Grotzinger, U. Seydel, and T. Gutschmann** (2006). Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3. *Biochemistry* **45**:5663-5670.
21. **Bonnotte, B., M. Crittenden, N. Larmonier, M. Gough, and R. G. Vile** (2004). MIP-3alpha transfection into a rodent tumor cell line increases intratumoral dendritic cell infiltration but enhances (facilitates) tumor growth and decreases immunogenicity. *J Immunol* **173**:4929-4935.
22. **Boughan, P. K., R. H. Argent, M. Body-Malapel, J. H. Park, K. E. Ewings, A. G. Bowie, S. J. Ong, S. J. Cook, O. E. Sorensen, B. A. Manzo, N. J. Klein, G. Nunez, J. C. Atherton, and M. Bajaj-Elliott** (2006). Nucleotide-binding oligomerisation domain-1 (NOD-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR): Critical regulators of beta -defensins during helicobacter pylori infection. *J.Biol.Chem.*
23. **Brogden, K. A., M. Heidari, R. E. Sacco, D. Palmquist, J. M. Guthmiller, G. K. Johnson, H. P. Jia, B. F. Tack, and P. B. McCray** (2003). Defensin-induced adaptive immunity in mice and its potential in preventing periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* **18**:95-99.
24. **Bullard, R. S., W. Gibson, S. K. Bose, J. K. Belgrave, A. C. Eaddy, C. J. Wright, D. J. Hazen-Martin, J. M. Lage, T. E. Keane, T. A. Ganz, and C. D. Donald** (2008). Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: New insight into its potential role in cancer. *Mol Immunol* **45**:839-848.
25. **Chamailard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez, and N. Inohara** (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* **4**:702-707.
26. **Chang, Y. Y., and Q. Ouyang** (2008). [Expression and significance of mucosal beta-defensin-2, TNFalpha and IL-1beta in ulcerative colitis]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **47**:11-14.
27. **Christophers, E., and T. Henseler** (1987). Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* **279** Suppl:S48-51.

28. **Coccia, E. M., M. Severa, E. Giacomini, D. Monneron, M. E. Remoli, I. Julkunen, M. Cella, R. Lande, and G. Uze** (2004). Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* **34**:796-805.
29. **Conejo-Garcia, J. R., F. Benencia, M. C. Courreges, E. Kang, A. Mohamed-Hadley, R. J. Buckanovich, D. O. Holtz, A. Jenkins, H. Na, L. Zhang, D. S. Wagner, D. Katsaros, R. Carroll, and G. Coukos** (2004). Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med* **10**:950-958.
30. **Conejo-Garcia, J. R., R. J. Buckanovich, F. Benencia, M. C. Courreges, S. C. Rubin, R. G. Carroll, and G. Coukos** (2005). Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization. *Blood* **105**:679-681.
31. **Cook, D. N., D. M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N. A. Kuklin, S. J. Abbondanzo, X. D. Niu, S. C. Chen, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, L. M. Sullivan, S. R. Smith, H. B. Greenberg, S. K. Narula, M. Lipp, and S. A. Lira** (2000). CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* **12**:495-503.
32. **Coukos, G., F. Benencia, R. J. Buckanovich, and J. R. Conejo-Garcia** (2005). The role of dendritic cell precursors in tumour vasculogenesis. *Br J Cancer* **92**:1182-1187.
33. **Dann, S. M., and L. Eckmann** (2007). Innate immune defenses in the intestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* **23**:115-120.
34. **Diamond, G., V. Kaiser, J. Rhodes, J. P. Russell, and C. L. Bevins** (2000). Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* **68**:113-119.
35. **Diamond, G., M. Zasloff, H. Eck, M. Brousseau, W. L. Maloy, and C. L. Bevins** (1991). Tracheal Antimicrobial Peptide, A Cysteine-Rich Peptide from Mammalian Tracheal Mucosa: Peptide Isolation and Cloning of a cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**:3952-3956.
36. **Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux** (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* **188**:373-386.
37. **Duits, L. A., B. Ravensbergen, M. Rademaker, P. S. Hiemstra, and P. H. Nibbering** (2002). Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* **106**:517-525.
38. **Enright, A. J., S. Van Dongen, and C. A. Ouzounis** (2002). An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Res* **30**:1575-1584.
39. **Fahlgren, A., S. Hammarstrom, A. Danielsson, and M. L. Hammarstrom** (2004). beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* **137**:379-385.
40. **Fainaru, O., A. Adini, O. Benny, I. Adini, S. Short, L. Bazinet, K. Nakai, E. Pravda, M. D. Hornstein, R. J. D'Amato, and J. Folkman** (2008). Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *Faseb J* **22**:522-529.
41. **Fellermann, K., D. E. Stange, E. Schaeffeler, H. Schmalzl, J. Wehkamp, C. L. Bevins, W.**

- Reinisch, A. Teml, M. Schwab, P. Lichter, B. Radlwimmer, and E. F. Stange** (2006). A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* **79**:439-448.
42. **Fellermann, K., J. Wehkamp, K. R. Herrlinger, and E. F. Stange** (2003). Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **15**:627-634.
43. **Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill** (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**:78-83.
44. **Fortier, M. E., S. Kent, H. Ashdown, S. Poole, P. Boksa, and G. N. Luheshi** (2004). The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**:R759-766.
45. **Funderburg, N., M. M. Lederman, Z. Feng, M. G. Drage, J. Jadowsky, C. V. Harding, A. Weinberg, and S. F. Sieg** (2007). Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18631-18635.
46. **Gallo, R. L., K. J. Kim, M. Bernfield, C. A. Kozak, M. Zanetti, L. Merluzzi, and R. Gennaro** (1997). Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem* **272**:13088-13093.
47. **Gambichler, T., M. Skrygan, N. S. Tomi, P. Altmeyer, and A. Kreuter** (2006). Changes of antimicrobial peptide mRNA expression in atopic eczema following phototherapy. *Br J Dermatol* **155**:1275-1278.
48. **Gambichler, T., M. Skrygan, N. S. Tomi, N. Othlinghaus, N. H. Brockmeyer, P. Altmeyer, and A. Kreuter** (2008). Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int Arch Allergy Immunol* **147**:17-24.
49. **Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer** (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* **76**:1427-1435.
50. **Garcia, J. R., F. Jaumann, S. Schulz, A. Krause, J. Rodriguez-Jimenez, U. Forssmann, K. Adermann, E. Kluver, C. Vogelmeier, D. Becker, R. Hedrich, W. G. Forssmann, and R. Bals** (2001). Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* **306**:257-264.
51. **Garcia, J. R., A. Krause, S. Schulz, F. J. Rodriguez-Jimenez, E. Kluver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R. Bals, and W. G. Forssmann** (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**:1819-1821.
52. **Gatlin, C. L., R. Pieper, S. T. Huang, E. Mongodin, E. Gebregeorgis, P. P. Parmar, D. J. Clark, H. Alami, L. Papazisi, R. D. Fleischmann, S. R. Gill, and S. N. Peterson** (2006). Proteomic profiling of cell envelope-associated proteins from *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* **6**:1530-1549.
53. **George, J. T., P. K. Boughan, H. Karageorgiou, and M. Bajaj-Elliott** (2003). Host antimicrobial response to *Helicobacter pylori* infection. *Mol Immunol* **40**:451-456.
54. **Ghadjar, P., S. E. Coupland, I. K. Na, M. Noutsias, A. Letsch, A. Stroux, S. Bauer, H. J.**

- Buhr, E. Thiel, C. Scheibenbogen, and U. Keilholz** (2006). Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastases in colorectal cancer. *J Clin Oncol* **24**:1910-1916.
55. **Ghadjar, P., C. Loddenkemper, S. E. Coupland, A. Stroux, M. Noutsias, E. Thiel, F. Christoph, K. Miller, C. Scheibenbogen, and U. Keilholz** (2008). Chemokine receptor CCR6 expression level and aggressiveness of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**:1181-1189.
56. **Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, and P. J. Sansonetti** (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**:8869-8872.
57. **Girardin, S. E., L. H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I. G. Boneca, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, and D. Mengin-Lecreulx** (2003). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* **278**:41702-41708.
58. **Goldman, M. J., G. M. Anderson, E. D. Stolzenberg, U. P. Kari, M. Zasloff, and J. M. Wilson** (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**:553-560.
59. **Goodwin, C. S., E. Blincow, G. Peterson, C. Sanderson, W. Cheng, B. Marshall, J. R. Warren, and R. McCulloch** (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay for *Campylobacter pyloridis*: correlation with presence of *C. pyloridis* in the gastric mucosa. *J Infect Dis* **155**:488-494.
60. **Hamanaka, Y., M. Nakashima, A. Wada, M. Ito, H. Kurazono, H. Hojo, Y. Nakahara, S. Kohno, T. Hirayama, and I. Sekine** (2001). Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*. *Gut* **49**:481-487.
61. **Hanahan, D., and J. Folkman** (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**:353-364.
62. **Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder** (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**:861.
63. **Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder** (2001). Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*. **276**:5707-5713.
64. **Harder, J., U. Meyer-Hoffert, K. Wehkamp, L. Schwichtenberg, and J. M. Schroder** (2004). Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* **123**:522-529.
65. **Harder, J., R. Siebert, Y. Zhang, P. Matthiesen, E. Christophers, B. Schlegelberger, and J. M. Schroder** (1997). Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* **46**:472-475.
66. **Hehlgans, T., B. Stoelcker, P. Stopfer, P. Muller, G. Cernaianu, M. Guba, M. Steinbauer, S. A. Nedospasov, K. Pfeffer, and D. N. Mannel** (2002). Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. *Cancer Res* **62**:4034-4040.
67. **Hill, C. P., J. Yee, M. E. Selsted, and D. Eisenberg** (1991). Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* **251**:1481-1485.

68. **Hinrichsen, K., R. Podschun, S. Schubert, J. M. Schroder, J. Harder, and E. Proksch** (2008). Mouse beta-defensin-14, an antimicrobial ortholog of human beta-defensin-3. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1876-1879.
69. **Hiratsuka, T., H. Mukae, H. Iiboshi, J. Ashitani, K. Nabeshima, T. Minematsu, N. Chino, T. Ihi, S. Kohno, and M. Nakazato** (2003). Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Thorax* **58**:425-430.
70. **Hiratsuka, T., M. Nakazato, Y. Date, J. Ashitani, T. Minematsu, N. Chino, and S. Matsukura** (1998). Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* **249**:943-947.
71. **Hollox, E. J., U. Huffmeier, P. L. Zeeuwen, R. Palla, J. Lascorz, D. Rodijk-Olthuis, P. C. van de Kerkhof, H. Traupe, G. de Jongh, M. den Heijer, A. Reis, J. A. Armour, and J. Schalkwijk** (2008). Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet* **40**:23-25.
72. **Homey, B., M. C. Dieu-Nosjean, A. Wiesenborn, C. Massacrier, J. J. Pin, E. Oldham, D. Catron, M. E. Buchanan, A. Muller, R. deWaal Malefyt, G. Deng, R. Orozco, T. Ruzicka, P. Lehmann, S. Lebecque, C. Caux, and A. Zlotnik** (2000). Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* **164**:6621-6632.
73. **Hoover, D. M., K. R. Rajashankar, R. Blumenthal, A. Puri, J. J. Oppenheim, O. Chertov, and J. Lubkowski** (2000). The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J.Biol.Chem.* **275**:32911-32918.
74. **Horiuchi, N., S. Aiba, H. Ozawa, S. Sugawara, H. Rikiishi, K. Kumagai, and H. Tagami** (1998). Peripheral blood lymphocytes from psoriatic patients are hyporesponsive to beta-streptococcal superantigens. *Br J Dermatol* **138**:229-235.
75. **Horng, T., G. M. Barton, and R. Medzhitov** (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**:835-841.
76. **Howell, M. D., M. Boguniewicz, S. Pastore, N. Novak, T. Bieber, G. Girolomoni, and D. Y. Leung** (2006). Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *Clin Immunol* **121**:332-338.
77. **Howell, M. D., N. Novak, T. Bieber, S. Pastore, G. Girolomoni, M. Boguniewicz, J. Streib, C. Wong, R. L. Gallo, and D. Y. Leung** (2005). Interleukin-10 downregulates antimicrobial peptide expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **125**:738-745.
78. **Huang, G. T., H. B. Zhang, D. Kim, L. Liu, and T. Ganz** (2002). A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities in vivo. *Hum.Gene Ther.* **13**:2017-2025.
79. **Huang, X., W. Du, S. A. McClellan, R. P. Barrett, and L. D. Hazlett** (2006). TLR4 is required for host resistance in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:4910-4916.
80. **Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas** (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:599-603.

81. **Huttner, K. M., C. A. Kozak, and C. L. Bevins** (1997). The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human beta-defensin 1. *FEBS Lett* **413**:45-49.
82. **Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman** (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* **176**:1693-1702.
83. **Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S. J. Foster, A. P. Moran, J. L. Fernandez-Luna, and G. Nunez** (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**:5509-5512.
84. **Ishimoto, H., H. Mukae, Y. Date, T. Shimbara, M. S. Mondal, J. Ashitani, T. Hiratsuka, S. Kubo, S. Kohno, and M. Nakazato** (2006). Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur.Respir.J.* **27**:253-260.
85. **Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik** (2005). *Immunobiology - The immune system in health and disease.* Garland Science Publishing **Sixth Edition**.
86. **Jia, H. P., B. C. Schutte, A. Schudy, R. Linzmeier, J. M. Guthmiller, G. K. Johnson, B. F. Tack, J. P. Mitros, A. Rosenthal, T. Ganz, and P. B. McCray, Jr.** (2001). Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* **263**:211-218.
87. **Jia, H. P., S. A. Wowk, B. C. Schutte, S. K. Lee, A. Vivado, B. F. Tack, C. L. Bevins, and P. B. McCray, Jr.** (2000). A novel murine beta -defensin expressed in tongue, esophagus, and trachea. *J.Biol.Chem.* **275**:33314-33320.
88. **Kawauchi, K., A. Yagihashi, N. Tsuji, N. Uehara, D. Furuya, D. Kobayashi, and N. Watanabe** (2006). Human beta-defensin-3 induction in *H. pylori*-infected gastric mucosal tissues. *World J Gastroenterol* **12**:5793-5797.
89. **Kisich, K. O., C. W. Carspecken, S. Fieve, M. Boguniewicz, and D. Y. Leung** (2008). Defective killing of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis is associated with reduced mobilization of human beta-defensin-3. *J Allergy Clin Immunol* **122**:62-68.
90. **Kisich, K. O., L. Heifets, M. Higgins, and G. Diamond** (2001). Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **69**:2692-2699.
91. **Kliver, E., S. Schulz-Maronde, S. Scheid, B. Meyer, W. G. Forssmann, and K. Adermann** (2005). Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity. *Biochemistry* **44**:9804-9816.
92. **Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, and R. A. Flavell** (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**:731-734.
93. **Kollmar, O., C. Scheuer, M. D. Menger, and M. K. Schilling** (2006). Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. *Ann Surg Oncol* **13**:263-275.
94. **Kotani, S., F. Kinoshita, I. Morisaki, T. Shimono, T. Okunaga, H. Takada, M. Tsujimoto, Y. Watanabe, K. Kato, T. Shiba, S. Kusumoto, and S. Okada** (1977). Immunoadjuvant activities of synthetic 6-O-acyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with special reference to the effect of its administration with liposomes. *Biken J* **20**:95-103.

95. **Kramer, M., M. G. Netea, D. J. de Jong, B. J. Kullberg, and G. J. Adema** (2006). Impaired dendritic cell function in Crohn's disease patients with NOD2 3020insC mutation. *J Leukoc Biol* **79**:860-866.
96. **Kucharzik, T., J. T. Hudson, III, R. L. Waikel, W. D. Martin, and I. R. Williams** (2002). CCR6 expression distinguishes mouse myeloid and lymphoid dendritic cell subsets: demonstration using a CCR6 EGFP knock-in mouse. *Eur.J.Immunol.* **32**:104-112.
97. **Kwon, J. H., S. Keates, L. Bassani, L. F. Mayer, and A. C. Keates** (2002). Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* **51**:818-826.
98. **Landers, C. J., O. Cohavy, R. Misra, H. Yang, Y. C. Lin, J. Braun, and S. R. Targan** (2002). Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* **123**:689-699.
99. **Lee, H. Y., T. Takeshita, J. Shimada, A. Akopyan, J. I. Woo, H. Pan, S. K. Moon, A. Andalibi, R. K. Park, S. H. Kang, S. S. Kang, R. Gellibolian, and D. J. Lim** (2008). Induction of beta defensin 2 by NTHi requires TLR2 mediated MyD88 and IRAK-TRAF6-p38MAPK signaling pathway in human middle ear epithelial cells. *BMC Infect Dis* **8**:87.
100. **Lee, M. S., and Y. J. Kim** (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* **76**:447-480.
101. **Lehrer, R. I., A. Barton, K. A. Daher, S. S. Harwig, T. Ganz, and M. E. Selsted** (1989). Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. *J.Clin.Invest* **84**:553-561.
102. **Lew, W., A. M. Bowcock, and J. G. Krueger** (2004). Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and "Type 1" inflammatory gene expression. *Trends Immunol* **25**:295-305.
103. **Li, D., J. Li, Y. Duan, and X. Zhou** (2004). Expression of LL-37, human beta defensin-2, and CCR6 mRNA in patients with psoriasis vulgaris. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **24**:404-406.
104. **Li, M. R., K. Jiang, and Q. Y. Zhang** (2008). [Expression of human beta-defensin 2 and tumor necrosis factor-A in colonic mucosae of ulcerative colitis and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **88**:957-960.
105. **Liao, F., R. Alderson, J. Su, S. J. Ullrich, B. L. Kreider, and J. M. Farber** (1997). STRL22 is a receptor for the CC chemokine MIP-3alpha. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **236**:212-217.
106. **Liao, F., R. L. Rabin, C. S. Smith, G. Sharma, T. B. Nutman, and J. M. Farber** (1999). CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol* **162**:186-194.
107. **Linzmeier, R., C. H. Ho, B. V. Hoang, and T. Ganz** (1999). A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* **233**:205-211.
108. **Linzmeier, R., D. Michaelson, L. Liu, and T. Ganz** (1993). The structure of neutrophil defensin genes. *FEBS Lett* **321**:267-273.
109. **Liu, L., L. Wang, H. P. Jia, C. Zhao, H. H. Heng, B. C. Schutte, P. B. McCray, Jr., and T. Ganz** (1998). Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* **222**:237-244.

110. **Liu, L., C. Zhao, H. H. Heng, and T. Ganz** (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. *Genomics* **43**:316-320.
111. **Lohner, K., A. Latal, R. I. Lehrer, and T. Ganz** (1997). Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* **36**:1525-1531.
112. **Ma, X. T., B. Xu, L. L. An, C. Y. Dong, Y. M. Lin, Y. Shi, and K. F. Wu** (2006). Vaccine with beta-defensin 2-transduced leukemic cells activates innate and adaptive immunity to elicit potent antileukemia responses. *Cancer Res.* **66**:1169-1176.
113. **MacRedmond, R., C. Greene, C. C. Taggart, N. McElvaney, and S. O'Neill** (2005). Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respir.Res.* **6**:116.
114. **Maisetta, G., G. Batoni, S. Esin, W. Florio, D. Bottai, F. Favilli, and M. Campa** (2006). In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:806-809.
115. **Mannel, D. N., D. L. Rosenstreich, and S. E. Mergenhagen** (1979). Mechanism of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis: requirement for lipopolysaccharide-sensitive lymphoreticular cells. *Infect Immun* **24**:573-576.
116. **Marshall, B. J., and J. R. Warren** (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**:1311-1315.
117. **McDermott, A. M., R. L. Redfern, B. Zhang, Y. Pei, L. Huang, and R. J. Proske** (2003). Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1beta stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* **44**:1859-1865.
118. **McDonald, K. G., J. S. McDonough, C. Wang, T. Kucharzik, I. R. Williams, and R. D. Newberry** (2007). CC chemokine receptor 6 expression by B lymphocytes is essential for the development of isolated lymphoid follicles. *Am J Pathol* **170**:1229-1240.
119. **McLean, K., and R. J. Buckanovich** (2008). Myeloid cells functioning in tumor vascularization as a novel therapeutic target. *Transl Res* **151**:59-67.
120. **McMichael, J. W., A. I. Maxwell, K. Hayashi, K. Taylor, W. A. Wallace, J. R. Govan, J. R. Dorin, and J. M. Sallenave** (2005). Antimicrobial activity of murine lung cells against *Staphylococcus aureus* is increased in vitro and in vivo after elafin gene transfer. *Infect.Immun.* **73**:3609-3617.
121. **Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto** (1996). Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* **26**:1647-1651.
122. **Midorikawa, K., K. Ouhara, H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, T. Fujiwara, K. Yamazaki, K. Sayama, M. A. Taubman, H. Kurihara, K. Hashimoto, and M. Sugai** (2003). *Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect.Immun.* **71**:3730-3739.
123. **Minguet, S., E. P. Dopfer, C. Pollmer, M. A. Freudenberg, C. Galanos, M. Reth, M. Huber, and W. W. Schamel** (2008). Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR

- crosstalk. *Eur J Immunol* **38**:2475-2487.
124. **Morrison, G., F. Kilanowski, D. Davidson, and J. Dorin** (2002). Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model. *Infect.Immun.* **70**:3053-3060.
125. **Morrison, G. M., D. J. Davidson, and J. R. Dorin** (1999). A novel mouse beta defensin, Defb2, which is upregulated in the airways by lipopolysaccharide. *FEBS Lett* **442**:112-116.
126. **Moser, C., D. J. Weiner, E. Lysenko, R. Bals, J. N. Weiser, and J. M. Wilson** (2002). beta-Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect Immun* **70**:3068-3072.
127. **Niyonsaba, F., K. Iwabuchi, H. Matsuda, H. Ogawa, and I. Nagaoka** (2002). Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int.Immunol.* **14**:421-426.
128. **Niyonsaba, F., A. Someya, M. Hirata, H. Ogawa, and I. Nagaoka** (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. *Eur J Immunol* **31**:1066-1075.
129. **Noble, W. C.** (1998). Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus* in infection. *Br J Dermatol* **139 Suppl 53**:9-12.
130. **Nomura, I., E. Goleva, M. D. Howell, Q. A. Hamid, P. Y. Ong, C. F. Hall, M. A. Darst, B. Gao, M. Boguniewicz, J. B. Travers, and D. Y. Leung** (2003). Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J.Immunol.* **171**:3262-3269.
131. **O'Neil, D. A., S. P. Cole, E. Martin-Porter, M. P. Housley, L. Liu, T. Ganz, and M. F. Kagnoff** (2000). Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect Immun* **68**:5412-5415.
132. **Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nunez, and J. H. Cho** (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:603-606.
133. **Okahira, S., F. Nishikawa, S. Nishikawa, T. Akazawa, T. Seya, and M. Matsumoto** (2005). Interferon-beta induction through toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol* **24**:614-623.
134. **Ong, P. Y., T. Ohtake, C. Brandt, I. Strickland, M. Boguniewicz, T. Ganz, R. L. Gallo, and D. Y. Leung** (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N.Engl.J.Med.* **347**:1151-1160.
135. **Osada, T., G. Chong, R. Tansik, T. Hong, N. Spector, R. Kumar, H. I. Hurwitz, I. Dev, A. B. Nixon, H. K. Lysterly, T. Clay, and M. A. Morse** (2008). The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **57**:1115-1124.
136. **Osterholzer, J. J., T. Ames, T. Polak, J. Sonstein, B. B. Moore, S. W. Chensue, G. B. Toews, and J. L. Curtis** (2005). CCR2 and CCR6, but not endothelial selectins, mediate the accumulation of immature dendritic cells within the lungs of mice in response to particulate antigen. *J Immunol* **175**:874-883.
137. **Pazgiera, M., D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, and J. Lubkowski** (2006). Human beta-defensins. *Cell Mol.Life Sci.* **63**:1294-1313.

138. **Perez-Canadillas, J. M., A. Zaballos, J. Gutierrez, R. Varona, F. Roncal, J. P. Albar, G. Marquez, and M. Bruix** (2001). NMR solution structure of murine CCL20/MIP-3alpha, a chemokine that specifically chemoattracts immature dendritic cells and lymphocytes through its highly specific interaction with the beta-chemokine receptor CCR6. *J.Biol.Chem.* **276**:28372-28379.
139. **Perricone, M. A., K. A. Smith, K. A. Claussen, M. S. Plog, D. M. Hempel, B. L. Roberts, J. A. St George, and J. M. Kaplan** (2004). Enhanced efficacy of melanoma vaccines in the absence of B lymphocytes. *J Immunother* **27**:273-281.
140. **Pioli, P. A., L. K. Weaver, T. M. Schaefer, J. A. Wright, C. R. Wira, and P. M. Guyre** (2006). Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2. *J.Immunol.* **176**:6647-6655.
141. **Pivarcsi, A., I. Nagy, A. Koreck, K. Kis, A. Kenderessy-Szabo, M. Szell, A. Dobozy, and L. Kemeny** (2005). Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes Infect* **7**:1117-1127.
142. **Qin, Z., G. Richter, T. Schuler, S. Ibe, X. Cao, and T. Blankenstein** (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* **4**:627-630.
143. **Rahman, A., A. Fahlgren, B. Sitohy, V. Baranov, A. Zirakzadeh, S. Hammarstrom, A. Danielsson, and M. L. Hammarstrom** (2007). Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **13**:847-855.
144. **Rivas-Santiago, B., J. C. Contreras, E. Sada, and R. Hernandez-Pando** (2008). The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis. *Scand J Immunol* **67**:448-452.
145. **Rivas-Santiago, B., E. Sada, V. Tsutsumi, D. Aguilar-Leon, J. L. Contreras, and R. Hernandez-Pando** (2006). beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J.Infect.Dis.* **194**:697-701.
146. **Rivas-Santiago, B., S. K. Schwander, C. Sarabia, G. Diamond, M. E. Klein-Patel, R. Hernandez-Pando, J. J. Ellner, and E. Sada** (2005). Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun* **73**:4505-4511.
147. **Russell, J. P., G. Diamond, A. P. Tarver, T. F. Scanlin, and C. L. Bevins** (1996). Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* **64**:1565-1568.
148. **Sampantharak, P., F. Niyonsaba, H. Ushio, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura, and H. Ogawa** (2005). The effect of antibacterial peptide human beta-defensin-2 on interleukin-18 secretion by keratinocytes. *J.Dermatol.Sci.* **37**:188-191.
149. **Sawai, M. V., H. P. Jia, L. Liu, V. Aseyev, J. M. Wiencek, P. B. McCray, Jr., T. Ganz, W. R. Kearney, and B. F. Tack** (2001). The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. *Biochemistry* **40**:3810-3816.
150. **Sayama, K., K. Midorikawa, Y. Hanakawa, M. Sugai, and K. Hashimoto** (1998). Superantigen production by Staphylococcus aureus in psoriasis. *Dermatology* **196**:194-198.
151. **Schaefer, T. M., J. V. Fahey, J. A. Wright, and C. R. Wira** (2005). Innate immunity in the

- human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol* **174**:992-1002.
152. **Schibli, D. J., H. N. Hunter, V. Aseyev, T. D. Starner, J. M. Wienczek, P. B. McCray, Jr., B. F. Tack, and H. J. Vogel** (2002). The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **277**:8279-8289.
153. **Schofield, D. A., C. Westwater, and E. Balish** (2004). beta-defensin expression in immunocompetent and immunodeficient germ-free and *Candida albicans*-monoassociated mice. *J.Infect.Dis.* **190**:1327-1334.
154. **Schroder, J. M., and J. Harder** (1999). Human beta-defensin-2. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **31**:645-651.
155. **Sellon, R. K., S. Tonkonogy, M. Schultz, L. A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D. M. Rennick, and R. B. Sartor** (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* **66**:5224-5231.
156. **Selsted, M. E., and S. S. Harwig** (1989). Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *J Biol Chem* **264**:4003-4007.
157. **Selsted, M. E., Y. Q. Tang, W. L. Morris, P. A. McGuire, M. J. Novotny, W. Smith, A. H. Henschen, and J. S. Cullor** (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem* **268**:6641-6648.
158. **Shah, S., A. A. Divekar, S. P. Hilchey, H. M. Cho, C. L. Newman, S. U. Shin, H. Nechustan, P. M. Challita-Eid, B. M. Segal, K. H. Yi, and J. D. Rosenblatt** (2005). Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int J Cancer* **117**:574-586.
159. **Singh, P. K., H. P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B. A. Conway, E. P. Greenberg, E. V. Valore, M. J. Welsh, T. Ganz, B. F. Tack, and P. B. McCray, Jr.** (1998). Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:14961-14966.
160. **Sompayrac, L.** (2003). *How the Immune System Works*. Blackwell Publishing **Second Edition**.
161. **Sparkes, R. S., M. Kronenberg, C. Heinzmann, K. A. Daher, I. Klisak, T. Ganz, and T. Mohandas** (1989). Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23. *Genomics* **5**:240-244.
162. **Spitznagel, J. K., and H. Y. Chi** (1963). Cationic Proteins and Antibacterial Properties of Infected Tissues and Leukocytes. *Am J Pathol* **43**:697-711.
163. **Tang, Y. Q., and M. E. Selsted** (1993). Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *J Biol Chem* **268**:6649-6653.
164. **Tani, K., W. J. Murphy, O. Chertov, R. Salcedo, C. Y. Koh, I. Utsunomiya, S. Funakoshi, O. Asai, S. H. Herrmann, J. M. Wang, L. W. Kwak, and J. J. Oppenheim** (2000). Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idiootype and carrier antigens. *Int.Immunol.* **12**:691-700.
165. **Taylor, K., D. J. Clarke, B. McCullough, W. Chin, E. Seo, D. Yang, J. Oppenheim, D. Uhrin, J. R. Govan, D. J. Campopiano, D. Macmillan, P. Barran, and J. R. Dorin** (2008).

- Analysis and Separation of Residues Important for the Chemoattractant and Antimicrobial Activities of β -Defensin 3. *J Biol Chem* **283**:6631-6639.
166. **Tsutsumi-Ishii, Y., and I. Nagaoka** (2003). Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J.Immunol.* **170**:4226-4236.
167. **Uchida, H., Y. Iwashita, A. Sasaki, K. Shibata, T. Matsumoto, M. Ohta, and S. Kitano** (2006). Chemokine receptor CCR6 as a prognostic factor after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* **21**:161-168.
168. **Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada** (2007). Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* **44**:3100-3111.
169. **Valore, E. V., C. H. Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, P. B. McCray, Jr., and T. Ganz** (1998). Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J.Clin.Invest* **101**:1633-1642.
170. **Vora, P., A. Youdim, L. S. Thomas, M. Fukata, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, A. Wada, T. Hirayama, M. Arditi, and M. T. Abreu** (2004). Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J.Immunol.* **173**:5398-5405.
171. **Voss, E., J. Wehkamp, K. Wehkamp, E. F. Stange, J. M. Schroder, and J. Harder** (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J.Biol.Chem.* **281**:2005-2011.
172. **Vylkova, S., N. Nayyar, W. Li, and M. Edgerton** (2007). Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:154-161.
173. **Wada, A., N. Mori, K. Oishi, H. Hojo, Y. Nakahara, Y. Hamanaka, M. Nagashima, I. Sekine, K. Ogushi, T. Niidome, T. Nagatake, J. Moss, and T. Hirayama** (1999). Induction of human beta-defensin-2 mRNA expression by *Helicobacter pylori* in human gastric cell line MKN45 cells on cag pathogenicity island. *Biochem Biophys Res Commun* **263**:770-774.
174. **Wada, A., K. Ogushi, T. Kimura, H. Hojo, N. Mori, S. Suzuki, A. Kumatori, M. Se, Y. Nakahara, M. Nakamura, J. Moss, and T. Hirayama** (2001). *Helicobacter pylori*-mediated transcriptional regulation of the human beta-defensin 2 gene requires NF-kappaB. *Cell Microbiol* **3**:115-123.
175. **Wang, X., Z. Zhang, J. P. Louboutin, C. Moser, D. J. Weiner, and J. M. Wilson** (2003). Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *Faseb J* **17**:1727-1729.
176. **Wang, Y. S., G. Q. Wang, Y. J. Wen, L. Wang, X. C. Chen, P. Chen, B. Kan, J. Li, C. Huang, Y. Lu, Q. Zhou, N. Xu, D. Li, L. Y. Fan, T. Yi, H. B. Wu, and Y. Q. Wei** (2007). Immunity against Tumor Angiogenesis Induced by a Fusion Vaccine with Murine β -Defensin 2 and mFlk-1. *Clin Cancer Res* **13**:6779-6787.
177. **Wehkamp, J., M. Schmid, K. Fellermann, and E. F. Stange** (2005). Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J.Leukoc.Biol.* **77**:460-465.
178. **Wehkamp, J., K. Schmidt, K. R. Herrlinger, S. Baxmann, S. Behling, C. Wohlschlagler, A. C. Feller, E. F. Stange, and K. Fellermann** (2003). Defensin pattern in chronic gastritis:

- HBD-2 is differentially expressed with respect to *Helicobacter pylori* status. *J Clin Pathol* **56**:352-357.
179. **Wehkamp, J., and E. F. Stange** (2005). NOD2 mutation and mice: no Crohn's disease but many lessons to learn. *Trends Mol Med* **11**:307-309.
180. **Wilde, C. G., J. E. Griffith, M. N. Marra, J. L. Snable, and R. W. Scott** (1989). Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem* **264**:11200-11203.
181. **Williams, I. R.** (2006). CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphohomogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1072**:52-61.
182. **Wimley, W. C., M. E. Selsted, and S. H. White** (1994). Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* **3**:1362-1373.
183. **Wu, Z., D. M. Hoover, D. Yang, C. Boulegue, F. Santamaria, J. J. Oppenheim, J. Lubkowski, and W. Lu** (2003). Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:8880-8885.
184. **Xie, C., A. Prah, B. Ericksen, Z. Wu, P. Zeng, X. Li, W. Y. Lu, J. Lubkowski, and W. Lu** (2005). Reconstruction of the conserved beta-bulge in mammalian defensins using D-amino acids. *J Biol Chem* **280**:32921-32929.
185. **Xu, B., C. Y. Dong, F. Zhang, Y. M. Lin, K. F. Wu, and X. T. Ma** (2007). Synergistic antileukemia effect of combinational gene therapy using murine b-defensin 2 and IL-18 in L1210 murine leukemia model. *Gene Ther* **14**:1181-1187.
186. **Yamaguchi, Y., T. Nagase, R. Makita, S. Fukuhara, T. Tomita, T. Tominaga, H. Kurihara, and Y. Ouchi** (2002). Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J.Immunol.* **169**:2516-2523.
187. **Yamamoto, M., and Y. Matsui** (2002). Testis-specific expression of a novel mouse defensin-like gene, Tdl. *Mech Dev* **116**:217-221.
188. **Yang, D., A. Biragyn, L. W. Kwak, and J. J. Oppenheim** (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**:291-296.
189. **Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim** (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**:525-528.
190. **Yang, D., O. M. Howard, Q. Chen, and J. J. Oppenheim** (1999). Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J Immunol* **163**:1737-1741.
191. **Zeya, H. I., and J. K. Spitznagel** (1966). Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. I. Resolution of antibacterial and enzymatic activities. *J Bacteriol* **91**:750-754.
192. **Zhao, C., I. Wang, and R. I. Lehrer** (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* **396**:319-322.
193. **Zheng, X. X., A. W. Steele, P. W. Nickerson, W. Steurer, J. Steiger, and T. B. Strom** (1995). Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J Immunol* **154**:5590-5600.

-
194. **Zimmermann, G. R., P. Legault, M. E. Selsted, and A. Pardi** (1995). Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry* **34**:13663-13671.
195. **Zlotnik, A., and O. Yoshie** (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**:121-127.

8 Anhang

Manuskript, das im Rahmen dieser Promotion entstanden ist:

Identification and Biological Characterization of Mouse β -Defensin 14, the Orthologue of Human β -Defensin 3

Johann Röhrl, De Yang, Joost J. Oppenheim, and Thomas Hehlhans

(The Journal of Biological Chemistry, Vol. 283, No.9, pp. 5414-5419, February 29, 2008)

Vorträge und Poster:

Vortrag und Posterpräsentation:

37. Annual Meeting of the German Society for Immunology, 7. September 2007, Heidelberg

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI),
03. September 2008, Wien

Poster:

4. Spring School on Immunology of the German Society for Immunology, 2.-7. März 2008,
Ettal

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlhans, der mir dieses überaus interessante Thema zusammen mit den benötigten Mitteln zur Verfügung stellte und mich bei der Umsetzung immer hervorragend unterstützte. Unsere gemeinsamen Besprechungen waren stets produktiv und von konstruktiven Diskussionen begleitet.

Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel möchte ich besonders für Ihre konstruktive Diskussionsbereitschaft während meiner Seminare danken.

Herrn Prof. Dr. Richard Warth möchte ich herzlich danken für die stets freundliche Kommunikation und für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Joost J. Oppenheim danke ich für die großartige Unterstützung, auch über diese Dissertation hinaus.

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

Außerdem möchte ich mich bei Barbara Daller, Johann Pötzl, Louay Jouma und Nadin Wimmer für die vielen anregenden und unterhaltsamen Gespräche sowie die angenehme Atmosphäre im Labor und Büro bedanken.

Ich danke auch Veronika Hochleitner, Sabine Laberer, Karin Holz, Dorothea Weber-Steffens und Catherine Botteron für die tolle Unterstützung im Labor und die ebenfalls unterhaltsamen Gespräche.

Luise Kroher möchte ich ganz besonders für ihre gewissenhafte Arbeit danken, die mir viel Arbeit bezüglich Formalitäten erspart hat.

Ein ganz großer Dank gilt meiner Frau Birgit, die immer ein offenes Ohr für meine Geschichten aus dem Laboralltag hatte.

Zu guter Letzt möchte ich mich besonders herzlich bei meiner Mutter bedanken, die mich Zeit meines Lebens bestens unterstützte. Ohne sie wäre diese erfolgreiche Ausbildung nicht möglich gewesen.

