

Identifizierung und funktionelle
Charakterisierung von hBD3,
einem neuen antimikrobiellen Peptid aus
der Gruppe der humanen β -Defensine

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biologin Sandra Schulz-Maronde

geboren am 30.06.1970 in Langenhagen

2003

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: PD Dr. Knut Adermann

Tag der Promotion: 16.05.2003

Meinen Eltern, meinem Opa und Erik

Zusammenfassung: Antimikrobielle Peptide sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr bei der Bekämpfung von eingedrungenen Mikroorganismen. Antimikrobielle Peptide sind kleine, aus 12-50 Aminosäuren aufgebaute Peptide mit einer positiven Nettoladung und einem breiten Wirkspektrum gegen Bakterien, Pilze, Viren und Protozoen. Eine sowohl bei Pflanzen und Insekten als auch bei Säugetieren vorkommende Gruppe sind die Defensine. Da bislang beim Menschen nur wenige antimikrobielle Peptide bekannt sind, war es das Ziel dieser Arbeit, ein neues Peptid aus der Gruppe der humanen β -Defensine zu identifizieren und zu charakterisieren. Mit Hilfe eines bioinformatischen Ansatzes wurde im humanen Genom mit dem für β -Defensine-typischen Cysteinmotiv das neue humane β -Defensin hBD3 auf Chromosom 8p23 identifiziert. Die Expressionsanalyse ergab, dass das hBD3-Gen sowohl in epithelialen als auch nicht-epithelialen Geweben transkribiert wird. Die höchste Expression wurde in Plazenta und Hoden gefunden. hBD3 zeigt in einer humanen Keratinozyten-Zelllinie eine durch IFN- γ induzierbare Expression, während die Stimulation mit TNF- α in diesem Zelltyp keinen Effekt hat. Synthetisches hBD3 weist in ionenschwachen Medien antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene pathogene und nicht-pathogene Bakterien auf. Die antimikrobielle Wirksamkeit von hBD3 wird nur in geringem Maße durch eine steigende NaCl-Konzentration des Testmediums herabgesetzt, in komplexeren Medien wie z.B. Mueller-Hinton-Broth jedoch deutlich reduziert. In Kombination mit Lysozym wird ein synergistischer Effekt beobachtet, während die Kombination von hBD3 und hBD4 einen additiven antimikrobiellen Effekt ergibt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine disulfidhaltige Form von hBD3 in nanomolarer Konzentration chemotaktisch auf humane Monozyten wirkt. Weitere Versuche ergaben, dass im Gegensatz zu einigen anderen antimikrobiellen Peptiden dieses hBD3-Peptid keine LPS-Bindungsaktivität besitzt und auch keinen hemmenden Einfluss auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α hat. Untersuchungen zur Struktur-Aktivitätsrelation mit verschiedenen hBD3-Peptiden zeigen, dass die Disulfidverbrückung keine prinzipielle Voraussetzung für eine antimikrobielle Wirkung des Peptids darstellt. Durch Austausch der Cysteine gegen aromatische Tryptophanreste wird die antimikrobielle, aber auch die zytotoxische Aktivität erhöht, während die original synthetisierte, disulfidhaltige Molekülform von hBD3 nur schwach hämolytisch bzw. zytotoxisch ist. Durch zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus in Kombination mit der für β -Defensine erwarteten Disulfidverbrückung wurde eine gesteigerte biologische Aktivität von hBD3 festgestellt.

Schlagworte: Immunsystem - antimikrobielle Peptide - β -Defensine

Abstract: Antimicrobial peptides are important components of the innate immune defense directly acting on invading pathogenic microorganisms. Antimicrobial peptides are widespread among the animal kingdom and are structurally diverse small, positively charged peptides of 12-50 amino acid residues with a broad range of activity against bacteria, fungi, viruses and protozoa. The largest subfamily of antimicrobial peptides are the defensins. The goal of the present work was to identify a new human β -defensin. Using a bioinformatic approach to screen the human genome for a β -defensin-specific cysteine pattern, the new human β -defensin hBD3 was discovered on chromosome 8p23. Expression analysis showed that hBD3 is expressed in epithelial and non-epithelial tissues with the highest expression in placenta and testis. hBD3 expression is inducible by γ -interferon stimulation of a human keratinocyte cell line, whereas application of TNF- α has no effect on these cells. Synthetic hBD3 is antimicrobially active against pathogenic and non-pathogenic bacteria in culture media with low ion strength. The antimicrobial activity is insensitive against an increased sodium chloride concentration of the test medium, but is strongly reduced in more complex media such as Müller-Hinton broth. In combination with lysozyme, hBD3 shows synergistic microbicidal activity, whereas the combination of hBD3 with another recently identified human defensin (hBD4) shows an additive effect. In addition, it has been shown that hBD3 is a chemotractive for human monocytes. Further experiments reveal that hBD3, in contrast to some other antimicrobial peptides, does neither bind LPS nor inhibits LPS-mediated TNF- α release. Studies on the structure-activity relation with different hBD3 derivatives demonstrate that disulfide bonds are not required for antimicrobial activity. An hBD3 peptide with the cysteine residues replaced by aromatic tryptophan residues exhibits microbicidal activity, but also increased cytotoxicity and hemolytic activity. Additional amino acid residues at the N-terminus in combination with the disulfide bridge pattern predicted for β -defensins causes an increased biological activity.

Keywords: Immune system – antimicrobial peptides – β -defensins

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar
μg	Mikrogramm
Acc.-No.	Nummer einer Nukleotidsequenz, die in <i>GenBank</i> hinterlegt wurde
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
Cam	Carboxamidomethyl
cDNA	komplementäre DNA
CF	Cystische Fibrose
CFU	<i>colony forming unit</i> (koloniebildende Einheit)
Da	Dalton
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
et al.	et altera
EU	<i>Endotoxin units</i>
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IFN-γ	Interferon- γ
IL-1	Interleukin-1
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAL	Limulus Amoebocyten Lysat
LB	Luria-Bertani-Vollmedium
LBP	<i>LPS-binding protein</i> (LPS-bindendes Protein)
LPS	Lipopolysaccharid
MHB	Mueller-Hinton-Broth
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i> (minimale Hemmkonzentration)
min	Minute/n
M	Molar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTP	Mikrotestplatte(n)
NaCl	Natriumchlorid
n.b.	nicht bestimmt
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	<i>potentium hydrogenii</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RDH	Radial-Diffusions-Hemmtest
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SAR	Struktur-Aktivitätsrelation
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
TFA	Trifluoressigsäure
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	<i>Tryptic-Soy-Broth</i>
TSR	<i>template supression reagent</i>
U	Units (definierte Einheiten)
u.a.	unter anderem
ÜNK	über Nacht-Kultur
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat
z.B.	zum Beispiel

Zur Abkürzung von Aminosäuren und Nukleotiden wurde die Einbuchstaben-Nomenklatur verwendet.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	6
1.1 Aufbau des Immunsystems.....	6
1.2 Antimikrobielle Peptide.....	8
1.3 Die Gruppe der Defensine	12
1.4 Antimikrobielle Peptide als multifunktionelle Moleküle.....	16
1.5 Antimikrobielle Peptide als neues Wirkprinzip in der Therapie bakterieller Infektionen.....	19
1.6 Ziel der Arbeit.....	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen.....	23
2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen.....	23
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Molekularbiologische Testsysteme und Enzyme.....	24
2.1.4 Verwendete Organismen und Plasmide.....	24
2.1.5 Verwendete Oligonukleotide.....	25
2.2 Isolierung von RNA und Erststrangsynthese	26
2.2.1 Isolierung von RNA.....	26
2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	26
2.2.3 Entfernung von DNA aus RNA-Präparationen.....	27
2.2.4 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese).....	27
2.3 Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	28
2.3.1 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
2.3.2 Gelelektrophoretische Trennung von DNA.....	29
2.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	29
2.3.4 Ligation	30
2.3.5 Herstellung von transformationskompetenten Zellen	30
2.3.6 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
2.3.7 Kolonie-PCR	32

2.3.8	<i>Mini-Präparation von Plasmid-DNA</i>	33
2.3.9	<i>Sequenzierung von DNA</i>	33
2.4	Transkriptanalyse.....	35
2.4.1	<i>Relative Quantifizierung von Transkripten durch Echtzeit-PCR</i>	35
2.4.2	<i>Quantifizierung der Transkriptionshöhe von hBD3</i>	36
2.5	Kultivierung und Lagerung von prokaryotischen Zellen und Hefen	37
2.5.1	<i>Verwendete Mikroorganismen</i>	37
2.5.2	<i>Nährmedien</i>	38
2.5.3	<i>Lagerung von Bakterien/Hefen</i>	39
2.6	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität.....	40
2.6.1	<i>Radial-Diffusions-Hemmtest</i>	40
2.6.2	<i>Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration</i>	40
2.6.3	<i>Bestimmung des FIC-Wertes (fractional inhibitory concentration)</i>	41
2.6.4	<i>Bestimmung der Salzabhängigkeit der MIC-Werte</i>	42
2.7	Kultivierung von Säuger-Zelllinien.....	43
2.7.1	<i>Allgemeine Zellkulturbedingungen</i>	43
2.7.2	<i>Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung</i>	44
2.7.3	<i>Stimulation von Zellen</i>	45
2.8	Bestimmung der zytotoxischen Aktivität	45
2.8.1	<i>Bestimmung der hämolytischen Aktivität</i>	45
2.8.2	<i>WST-1-Test</i>	46
2.9	Nachweis der LPS-Bindungsaktivität.....	48
2.10	Bestimmung der TNF- α -Produktion	49
2.10.1	<i>Isolation und Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen</i>	49
2.10.2	<i>TNF-α-Bestimmung durch ELISA</i>	50
2.11	Nachweis der chemotaktischen Aktivität von hBD3	50
2.12	Synthese von hBD3 und seinen Derivaten	51
2.13	Datenbankrecherche	53
2.13.1	<i>Genutzte Datenbanken und Software</i>	53
2.13.2	<i>In silico-Identifizierung der Nukleotidsequenz von hBD3</i>	53

3. ERGEBNISSE	55
3.1 <i>In silico</i> -Identifizierung des hBD3-Gens.....	55
3.2 Expressionsanalyse von hBD3	57
3.2.1 <i>Endogene Expression von hBD3 in humanen Geweben</i>	57
3.2.2 <i>Stimulation der hBD3-Expression in humanen Keratinozyten</i>	58
3.3 Peptidsynthese	60
3.4 Antimikrobielle Aktivität von hBD3.....	62
3.4.1 <i>Radial-Diffusions-Hemmtest</i>	62
3.4.2 <i>Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von hBD3</i>	63
3.4.3 <i>Einfluss der Salzkonzentration auf die antimikrobielle Aktivität von hBD3</i>	65
3.4.4 <i>Interaktion von hBD3 mit anderen antimikrobiell aktiven Substanzen</i>	66
3.5 Antimikrobielle Aktivität von hBD3-Peptiden	67
3.6 Hämolytische Aktivität von hBD3-Peptiden.....	72
3.7 Zytotoxische Wirkung von hBD3-Peptiden.....	76
3.8 LPS-Bindungsaktivität von hBD3	81
3.9 Abhängigkeit der Freisetzung von TNF- α in Gegenwart von hBD3 und LPS.....	83
3.10 Chemotaktische Aktivität von hBD3	85
4. DISKUSSION	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	101
6. LITERATURVERZEICHNIS	102

1. Einleitung

Jeder Organismus ist ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten ausgesetzt, die ihn schädigen können. Bis in das 20. Jahrhundert konnten selbst kleinste Verletzungen tödlich enden, da aufgrund mangelnder Kenntnisse eine Diagnose und Behandlung von mikrobiellen Infektionen nicht möglich war. Erst der von Louis Pasteur und Robert Koch vor über 125 Jahren erbrachte Nachweis, dass Bakterien definierte Krankheitsbilder verursachen, ermöglichte die zuverlässige Diagnose von Infektionskrankheiten sowie die Suche nach deren Ursache. Seit Anfang des letzten Jahrhunderts wurden viele verschiedene Stoffklassen wie z.B. Tetrazykline, Chinolone, Sulfonamide und die Betalactam-Antibiotika, zu denen das 1929 entdeckte Penicillin gehört, zur Bekämpfung bakterieller Infektionen entwickelt. Aufgrund der in den letzten Jahren prinzipiell zunehmenden Resistenzentwicklung pathogener Bakterien haben viele herkömmliche Antibiotika ihre Wirksamkeit verloren oder können nur noch eingeschränkt eingesetzt werden. Diese Problematik erfordert auch die Suche nach neuen antimikrobiell aktiven Substanzen. Dabei kann es sich um modifizierte Abkömmlinge von herkömmlichen Antibiotika oder auch um Substanzen mit neuen Wirkprinzipien handeln. Als neue Substanzklasse finden seit einigen Jahren antimikrobiell aktive Peptide zunehmendes Interesse. Dabei handelt es sich um Peptide aus 12 bis 54 Aminosäuren, die sich in allen Gruppen des Pflanzen- und Tierreiches finden lassen und einen bedeutenden Teil der angeborenen Immunität darstellen. Eine besonders wichtige Gruppe der antimikrobiellen Peptide mit zunehmender Bedeutung beim Menschen bilden die α - und β -Defensine. Neuere Untersuchungen deuten an, dass diesen Peptiden neben der direkten Inaktivierung pathogener Erreger noch weitere Funktionen im menschlichen Immunsystem zukommen.

1.1 Aufbau des Immunsystems

Zur Bekämpfung von körperfremden Stoffen, die ihn schädigen oder zumindestens in seiner Funktion beeinträchtigen können, hat der menschliche Körper eine Vielzahl von Schutzmechanismen entwickelt, die sich einerseits in eine unspezifische, angeborene, und andererseits in eine spezifische, erworbene Immunabwehr gliedern lassen. Ein wichtiger Schutzmechanismus ist der kompakte Aufbau der Epithelien mit einem leicht saurem Milieu und das Vorhandensein einer lokalen Normalflora. Eine der ersten molekularen Barrieren des Körpers gegen eingedrungene Pathogene stellt die unspezifische zelluläre Immunantwort dar, die innerhalb von wenigen Sekunden nach einer Infektion aktiviert werden kann. Die unspezifische Immunabwehr beinhaltet sowohl zelluläre als auch humorale Faktoren. Einen wichtigen Bestandteil der unspezifischen Abwehr bildet die antikörperunabhängige Phagozytose, d.h. die Aufnahme von Fremdstoffen und Mikroorganismen ins Zellinnere mit anschließendem intrazellulären Verdau der aufgenommenen Partikel. Dazu werden die Erreger von den

Phagozyten umflossen und endozytotisch aufgenommen. Die in den Phagozyten lokalisierten Lysosomen enthalten neben Enzymen und hochreaktiven Sauerstoffradikalen auch antimikrobielle Peptide wie die α -Defensine (Risso, 2000), und führen nach der Phagozytose zur Inaktivierung der Erreger. Zur Phagozytose befähigt sind eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Monozyten. Letztere wandern nach zweitägiger Zirkulation in den Blutgefäßen in verschiedene Gewebe ein und differenzieren dort zu sessilen oder lokal wandernden Makrophagen, die nach Kontakt mit Bakterien durch Abgabe von Chemokinen oder Komplementfaktoren weitere Phagozyten anlocken können. Auf die unspezifische Abwehr von Viren sind die natürlichen Killerzellen spezialisiert, die etwa 5% der Blutleukozyten ausmachen. Diese großen Lymphozyten enthalten hydrolasehaltige Granula, mit denen sie nach Aktivierung durch Interferone virusinfizierte Zellen abtöten können. Ein weiterer Bestandteil der unspezifischen Abwehr sind humorale Faktoren, die die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Freisetzung von Interferonen, Akute-Phase-Proteinen und Lysozym beinhalten. Das Komplementsystem besteht aus etwa 20 Plasmaproteinen, die in einer Kaskade verschiedener spezifischer Proteasen aktiviert werden. Die Produkte dieser Proteolyse binden an Rezeptoren auf verschiedenen Leukozytenarten, und es kommt zu Reaktionen an deren Ende die Lyse von Bakterien steht. Das in Plasma, Lymphe und Sekreten vorhandene Lysozym baut die Zellwand der Bakterien enzymatisch ab und führt so ebenfalls zur Lyse der Bakterienzellen. Eine Markierung der Bakterienzellen mit dem Komplementfaktor C3b oder mit antigenspezifischen Immunglobulinen führt zu einer effizienteren Phagozytose der fremden Zellen und zur Initiierung einer Entzündungsreaktion. Dabei werden von aktivierten Makrophagen inflammatorische Faktoren wie Interleukin-1 und -6 sowie TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) freigesetzt, und es kommt zu einer akuten Entzündung (CASEY, 2000).

Desweiteren verfügt der Mensch auch noch über eine erworbene (adaptive) Immunabwehr. Das erworbene Immunsystem ist in der Lage, körperfremde Strukturen zu erkennen und diese mit einer spezifisch angepassten Reaktion zu neutralisieren. Die zelluläre Abwehr umfasst T- und B-Lymphozyten, die jeweils durch Kontakt mit Antigenen aktiviert werden. Aktivierte T-Lymphozyten dienen vor allem der Zerstörung von antikörpermarkierten Antigenen und der Stimulation von B-Lymphozyten, die daraufhin zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Dabei kann es bis zu 7 Tage dauern bis nach erstmaligem Kontakt mit einem Antigen die entsprechenden Antikörper zur Verfügung stehen (HANCOCK UND DIAMOND, 2000). Darüber hinaus werden Informationen über diese Strukturen in Gedächtniszellen abgespeichert, was dem Immunsystem bei wiederholten Antigenkontakt eine schnellere und stärkere Antikörperproduktion erlaubt. Dieser Effekt wird zum Beispiel bei der Impfung genutzt. Antimikrobielle Peptide wie z.B. die humanen Defensine sind aufgrund ihres breiten antimikrobiellen Wirkspektrums und ihrer immunmodulatorischen Aktivitäten wie beispielsweise die chemotaktische Anlockung von Monozyten ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität, aber es mehren sich in jüngster Zeit Hinweise, dass sie auch mit der erworbenen Immunität verbunden sind (YANG *et al.*, 2002).

1.2 Antimikrobielle Peptide

Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr bei der Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen sind antimikrobielle Peptide. Die Suche nach antimikrobiellen Peptiden hat ihre Wurzeln in den frühen 80iger Jahren des letzten Jahrhunderts, als ein antimikrobiell aktives Peptid aus der Raupe des Seidenspinners, *Hyalophora cecropia*, isoliert werden konnte. Dieses tötete spezifisch Bakterien, hatte aber keine schädigende Wirkung auf die Wirtszellen (STEINER *et al.*, 1981).

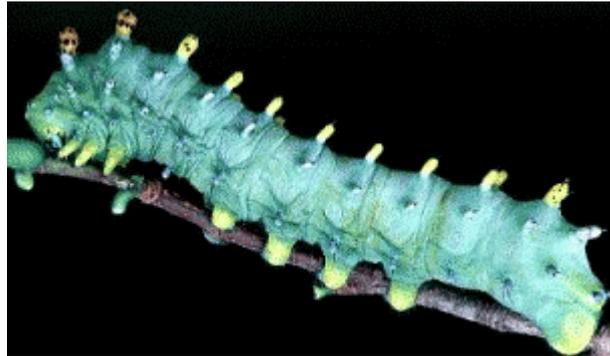


Abbildung 1: Die Raupe des Seidenspinners *Hyalophora cecropia*.

In den folgenden zwei Dekaden zeigte sich, dass antimikrobielle Peptide ein weitverbreitetes Wirkprinzip bei der Immunabwehr von Pflanzen und Tieren darstellen (GURA, 2002). Bis Juli 2002 konnten über 750 antimikrobielle Peptide eukaryotischen Ursprungs identifiziert werden, wobei alleine im Jahre 2001 etwa 100 neue Peptide entdeckt wurden (TOSSI, 2002).

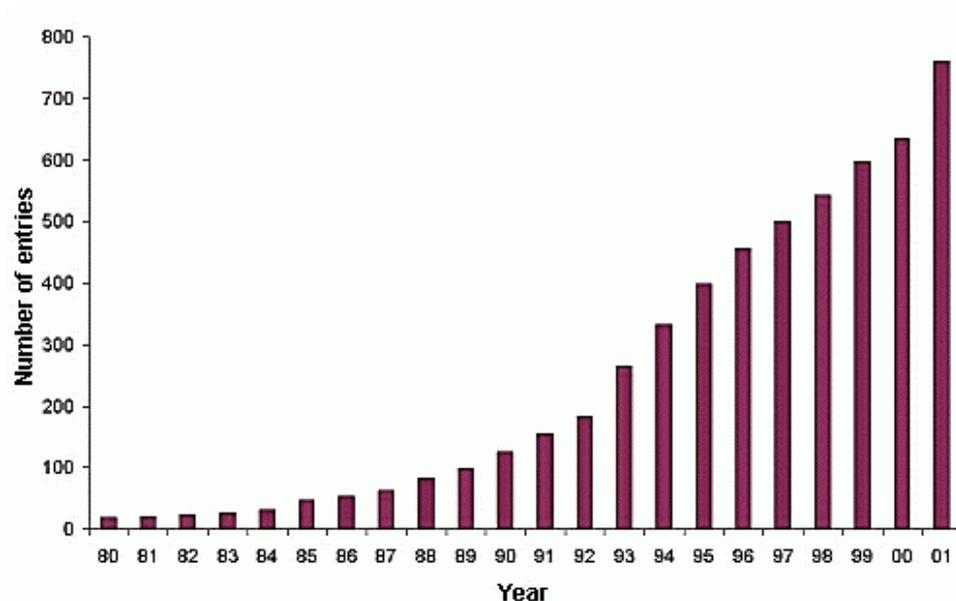


Abbildung 2: Graphische Darstellung der seit 1980 identifizierten antimikrobiellen Peptide eukaryotischen Ursprungs. Angegeben ist die Zahl der Datenbankeinträge pro Jahr (nach TOSSI, 2002).

Bei den antimikrobiellen Peptiden handelt es sich um kleine, aus 12-54 Aminosäuren aufgebaute Peptide, die meist eine positive Nettoladung von >2 aufweisen. Der Anteil kationischer

Aminosäuren wie Lysin und Arginin ist in diesen Peptiden größer als der Anteil saurer Aminosäuren wie Asparagin- und Glutaminsäure. Zahlreiche antimikrobielle Peptide haben einen Anteil an hydrophoben Aminosäuren von mehr als 50%. Die räumliche Trennung des kationischen und des hydrophoben Anteils erlaubt die Ausbildung einer amphipathischen Struktur, welche eine Interaktion mit der Bakterienoberfläche ermöglicht und eine wesentliche Voraussetzung für den Wirkmechanismus von kationischen Peptiden ist (HANCOCK UND DIAMOND, 2000). Aufgrund ihres Syntheseortes unterscheidet man nicht-ribosomal und ribosomal synthetisierte Peptide. Die ersteren findet man bei Bakterien, Pilzen und Streptomyzeten, bekannte Vertreter sind Polymyxin, Gramicidin und Bacitracin (HANCOCK UND CHAPPLE, 1999). Fast alle Vertreter der ribosomal synthetisierten Peptide werden als Präpropeptid generiert, wobei nach Entfernung des Signal- und Propeptids das reife, bioaktive Peptid freigesetzt wird. Die in vielen Fällen anionische Prosequenz wird dabei als Neutralisator für das reife kationische und oftmals zytotoxische Peptid diskutiert (MICHAELSON *et al.*, 1992; KAISER UND DIAMOND, 2000). Darüber hinaus ist die Generierung von antimikrobiell aktiven Peptiden durch Proteolyse großer Proteine möglich. Ein Beispiel ist das antimikrobiell aktive Lactoferricin B, das durch Proteolyse des bovinen Lactoferrins entsteht (BELLAMY *et al.*, 1992). Desweiteren lassen sich antimikrobielle Peptide basierend auf ihren Sekundärstrukturelementen in 4 Hauptklassen einteilen (BOMAN, 1994; ANDREU UND RIVAS, 1998). Die größte Klasse bilden die linearen α -helikalen Peptide ohne Cysteinbrücken (TOSSI, 2002), die überwiegend in Insekten und Amphibien vorkommen. Aber auch in Säugetieren sind Vertreter dieser Klasse, wie z.B. die Cathelicidine, zu finden. Für diese Peptide wird angenommen, dass sich die amphipathische α -Helix erst bei Kontakt mit Bakterienmembranen ausbildet (HWANG UND VOGEL, 1998). Eine weitere Gruppe bilden die in Säugern weitverbreiteten Peptide mit β -Faltblattstruktur. Ein charakteristisches Merkmal dieser Gruppe ist das Vorhandensein von zwei bis vier Cysteinbrücken, die die Tertiärstruktur stabilisieren. Beispiele dafür sind die in Pflanzen, Insekten und Vertebraten vorkommenden Defensine mit drei Cysteinbrücken sowie die porcinen Protegrine mit zwei Cysteinbrücken. Die dritte Gruppe umfasst lineare, langgestreckte (*extended*) Peptide, die sich durch einen hohen Gehalt an einzelnen Aminosäuren auszeichnen, wodurch sich eine flexible Peptidstruktur ergibt. Beispiele dafür sind das prolin- und argininreiche porcine PR-39 (AGERBERTH *et al.*, 1991) und das tryptophanreiche bovine Indolicidin (SELSTED *et al.*, 1992). Cyclische Peptide wie das bovine Dodecapeptid Bactenecin (ROMEO *et al.*, 1988) bilden eine vierte Strukturklasse. Dabei handelt es sich um kleine Peptide mit bis zu 15 Aminosäureresten, die durch eine Disulfidbrücke stabilisiert werden.

Trotz der unterschiedlichen Strukturen liegt vermutlich allen antimikrobiellen Peptiden ein gemeinsames Wirkprinzip zugrunde, das auf ihrer direkten Interaktion mit der Bakterienmembran beruht (VAN'T HOF *et al.*, 2001). Aufgrund von elektronenmikroskopischen, enzymatischen und Membranbindungsstudien konnte ein allgemein anerkanntes Modell zur Interaktion mit der äußeren Bakterienmembran erarbeitet und teilweise bestätigt werden (HANCOCK UND CHAPPLE, 1999; WU *et al.*, 1999; HANCOCK UND ROZEK, 2001; HAUKLAND *et al.*,

2001; HARDER *et al.*, 2001). Man geht davon aus, dass es bei Kontakt zwischen antimikrobiellen Peptiden und Bakterien zu einer Anlagerung der Peptide an die äußere Bakterienmembran kommt. Die positive Ladung der Peptide ermöglicht elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Lipopolysacchariden (LPS) bei Gram-negativen und den negativ geladenen Lipoteichonsäuren bei Gram-positiven Bakterien. Für Gram-negative Bakterien wurde postuliert, dass kationische Peptide durch ihre Bindung an das bakterielle LPS die für die Stabilität der Bakterienoberfläche essentiellen zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} von ihren Bindestellen verdrängen und so die Integrität der äußeren Membran zerstören (HANCOCK UND SCOTT, 2000). Dieses Modell würde auch die Salzeempfindlichkeit vieler antimikrobieller Peptide erklären, da die Peptide mit den Kationen um deren Bindungsstellen in der äußeren Membran konkurrieren (VAN'T HOF *et al.*, 2001). Mittlerweile sind aber auch Peptide bekannt, deren antimikrobielle Aktivität nur schwach von der Mediensalzkonzentration beeinflusst wird (HARDER *et al.*, 2001; STEINSTRÄESSER *et al.*, 2001).

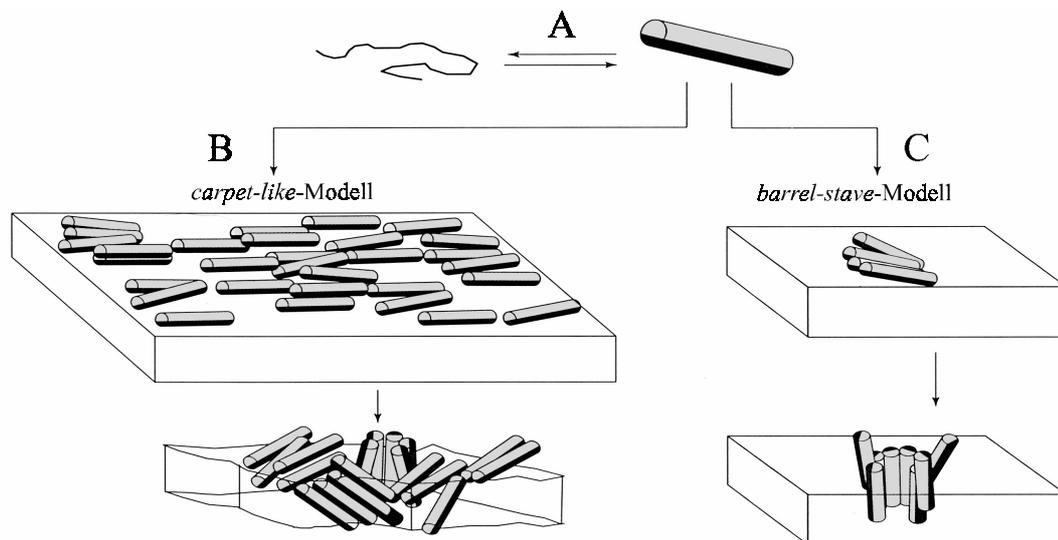


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Teppich- (*carpet-like*) und des Fassdauben- (*barrel-stave*) Modells zur Interaktion antimikrobieller Peptide mit der Bakterienmembran. (A) Die in Lösung unstrukturiert vorliegenden antimikrobiellen Peptide bilden bei Kontakt mit einer Bakterienmembran eine geordnete, amphiphile Struktur aus. (B) Im Teppich-Modell gehen die Moleküle mit ihrem hydrophoben Anteil (schwarz) Wechselwirkungen mit der bakteriellen Membran ein und bedecken diese wie einen Teppich. Nach Überschreiten einer Grenzkonzentration dringen die Monomere ungeordnet ins Membrannere ein und zerstören so die Membranintegrität. (C) Im Fassdauben-Modell hingegen lagern sich die Monomere ab einer bestimmten Konzentration wie die Dauben eines Fasses aneinander, so dass sie eine Transmembranpore bilden. Dabei zeigen die hydrophilen Anteile der Moleküle (grau) in das Innere der Transmembranpore, während die hydrophoben Anteile direkt mit der Membran interagieren (Nach SHAI, 1995).

Nach Durchdringen der äußeren Bakterienmembran kommt es anschließend zur Interaktion mit den Phospholipidschichten der Cytoplasmamembran, wofür mehrere theoretische Modelle existieren, die aber experimentell noch nicht belegt werden konnten (VAN'T HOF *et al.*, 2001). Beim Teppich-Modell (*carpet-like*) bedecken die Peptidmoleküle die bakterielle Membran wie einen Teppich, und es kommt zu Wechselwirkungen zwischen dem hydrophoben Anteil der

Peptide und der Membran. Nach Überschreiten einer Grenzkonzentration dringen die Moleküle ungeordnet in das Membraninnere ein und zerstören so die Integrität der Membran. Das Fassdauben-Modell (*barrel-stave*) beschreibt die Bildung einer Transmembranpore. Dabei sollen die hydrophoben Anteile der Peptide mit der Phospholipidschicht interagieren, während der positiv geladene Anteil der Peptide in das Innere der so entstandenen Pore zeigt. Aufgrund der Abstoßung zwischen positiv geladenen Peptiden, und der für dieses Modell erwarteten Porengröße, die nicht mit den Dimensionen der zellulären Komponenten korreliert, kann dieses Modell nur für wenige, schwach amphipathische Peptide angewandt werden (VAN'T HOF *et al.*, 2001). Ein weiteres Modell beruht darauf, dass antimikrobielle Peptide kurzzeitig Aggregate auf der Bakterienoberfläche bilden, die die Passage weiterer Moleküle in das Zellinnere erlauben. Im Gegensatz zu den ersten beiden Modellen, wo der Zusammenbruch des Membranpotentials der Bakterienzelle als tödlicher Schritt gesehen wird, postuliert dieses Modell andere Mechanismen wie z.B. die Bindung an essentielle Proteine und Nukleinsäuren als den Zelltod auslösenden Faktor (HANCOCK UND CHAPPLE, 1999; ZHANG *et al.*, 2000; HANCOCK UND ROZEK, 2001). Antimikrobielle kationische Peptide werden oftmals als membranaktive Substanzen beschrieben, die zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials und damit zum Absterben der Bakterienzelle führen. Dieses Modell mag für viele Peptide zutreffen, und so konnte z.B. für Defensine, Magainine Bactenecine und Cecropine eine direkte Korrelation zwischen der antimikrobiellen Aktivität und der Fähigkeit die bakterielle Zellmembran zu permeabilisieren dargestellt werden (WHITE *et al.*, 1995; GAZIT *et al.*, 1995; MATSUZAKI *et al.*, 1997; WU UND HANCOCK, 1999). Verschiedene Untersuchungen aber belegen, dass antimikrobiellen Peptiden auch andere Mechanismen zum Abtöten der Bakterienzellen zur Verfügung stehen. So wurde gezeigt, dass das porcine PR-39 und das bovine Indolicidin die bakterielle DNA-Synthese blockieren, und für das Peptid Nisin wurde eine Induktion der bakteriellen Autolyse beschrieben (BOMAN *et al.*, 1993; SUBBALAKSHMI UND SITARAM, 1998; BIERBAUM UND SAHL, 1985).

Die im allgemeinen geringe Zytotoxizität antimikrobieller Peptide gegenüber Säugerzellen scheint auf dem unterschiedlichen Aufbau der Zellmembranen zu beruhen. Die bakterielle Membran enthält anionische Phospholipide und trägt eine höhere Anzahl negativer Ladungen als die aus zwitterionischen Phospholipiden und Cholesterol aufgebaute Zellmembran der Säugerzellen. Die geringere negative Ladung soll dabei die Interaktion mit den positiv geladenen Peptiden erschweren und so eine Schädigung der körpereigenen Zellen verhindern (RISSO, 2000). Durch Untersuchungen zur Struktur-Aktivitätsrelation (SAR) an Derivaten antimikrobieller Peptide, wie z.B. bovinem Indolicidin (STAUBITZ *et al.*, 2001), bei denen Aminosäuren ausgetauscht worden waren, zeigte sich, dass eine Erhöhung der positiven Ladung zu einer höheren antimikrobiellen Wirkung führt. Desweiteren konnte eine Abnahme der hämolytischen Aktivität, d.h. die Fähigkeit Erythrozyten zu lysieren, gezeigt werden. Dabei dient die hämolytische Aktivität als Mass für die Aktivität eines antimikrobiellen Peptids Säugermembranen zu lysieren. Erhöht man dagegen den Anteil an hydrophoben Aminosäuren, kann man eine Zunahme der antimikrobiellen und der hämolytischen Aktivität beobachten, da

hydrophobe Aminosäuren wie etwa Tryptophan eine Interaktion der Peptide mit den Phospholipidschichten der Membranen begünstigen (HWANG UND VOGEL, 1998; HANCOCK UND ROZEK, 2001). Andererseits können Bakterien durch die Verringerung von negativen Ladungen auf ihren Zelloberflächen Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Peptiden aufweisen (PESCHEL, 2002). Beispiele sind die resistenten Stämme *Proteus* und *Burkholderia*, bei denen die Zelloberfläche durch die Veresterung von Phosphatgruppen weniger negative Ladungen trägt (HANCOCK, 1997; ANDREU UND RIVAS, 1998; GUNN, 2001).

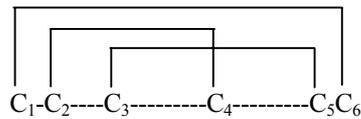
1.3 Die Gruppe der Defensine

Eine bei Pflanzen, Insekten und Vertebraten besonders weit verbreitete Gruppe antimikrobiell aktiver Peptide bilden die Defensine. Dabei handelt es sich um kationische Peptide mit einer β -Faltblattstruktur und einer Länge von 29-54 Aminosäuren. Das charakteristische Merkmal dieser Gruppe bilden die konservierten Cysteinreste und die entsprechende Ausbildung von Disulfidbrücken, die das Molekül stabilisieren. Die Defensine der Pflanzen besitzen 8 Cysteine, die durch vier Disulfidbrücken verbunden sind (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1998), während die Defensine der Insekten und Vertebraten 6 konservierte Cysteine und drei Disulfidbrücken aufweisen (OTVOS, 2000; RISSO, 2000). Die pflanzlichen Defensine werden aufgrund ihrer selektiven Aktivität gegen Gram-positive/Gram-negative Bakterien und Pilze in vier Gruppen unterteilt und zeigen keine zytotoxische Wirkung gegenüber pflanzlichen und tierischen Zellen. Desweiteren gibt es nur wenig Homologien zwischen den pflanzlichen und tierischen Defensinen. So besitzen Pflanzendefensine eine längere Aminosäuresequenz (45-54 Aminosäuren) und haben ein Signalpeptid, zeigen aber kein Propeptid wie es für die Defensine der Insekten und Vertebraten üblich ist (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1998; HUGHES, 1998; RAJ UND DENTINO, 2002).

Die Defensine der Insekten sind 29-34 Aminosäuren lang und besitzen 6 konservierte Cysteine, die jeweils über Disulfidbrücken verbunden sind. Im Gegensatz zu den Defensinen der Vertebraten, die ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien, Pilze und behüllte Viren besitzen (YASIN *et al.*, 2000; KAISER UND DIAMOND, 2000), zeigen die Defensine der Insekten eine selektive Aktivität gegen Gram-positive Bakterien (OTVOS, 2000). Bei Vertebraten unterscheidet man je nach relativer Position und Verknüpfung der Cysteine zwischen α - und β -Defensinen. Bei α -Defensinen sind die Cysteine C₁-C₆, C₂-C₄ und C₃-C₅ verbrückt, bei β -Defensinen dagegen die Cysteine C₁-C₅, C₂-C₄ und C₃-C₆ (DIAMOND UND BEVINS, 1998). Vertreter der α -Defensine wurden bisher nur bei Säugetieren beschrieben, während β -Defensine auch bei Vögeln gefunden wurden (HARWIG *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde kürzlich in Rhesusaffen eine dritte Defensinfamilie entdeckt. Die drei bisher identifizierten Vertreter der sogenannten θ -Defensine sind durch eine posttranslationale Verknüpfung von zwei α -Defensin-ähnlichen Peptiden entstanden und tragen drei intramolekulare Disulfidbrücken (TRAN *et al.*, 2002).

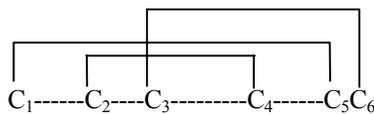
Interessanterweise sind die θ -Defensine in ihrer antimikrobiellen Aktivität nicht von der Mediensalzkonzentration abhängig (TRAN *et al.*, 2002).

α -Defensine



NP1	Kaninchen	VVCACRRALCLP RERRAGFCRI RGRIHPL CCRR
RNP1	Ratte	CYCRRT RCGF RE RLSGACGY RGR IY RLCC R
HNP1	Mensch	AC YCR IPACIAG ERR YGT C IYQ GR LWAF CC
HNP2	Mensch	CYCR IPACIAG ERR YGT C IYQ GR LWAF CC
HNP3	Mensch	D CYCR IPACIAG ERR YGT C IYQ GR LWAF CC
HNP4	Mensch	V CS CR LVFCRR TEL RVGN CLIGGV SFTYCC TRVD
HD-5	Mensch	ARAT CYCR T GR CAT RES LSGV CEISGR LY RLCC R
HD-6	Mensch	TRAF TCHCRR -SCYSTEYSYGT CTVM GIN HR FCCL

β -Defensine



TAP	Rind	NPV SCVR NKGIC VP IR CP GS MK QIG TCV GRA VKCC RRK
LAP	Rind	GFTQGV RNSQ SC RR NKGIC VP IR CP GS MR QIG TC LGAQ VKCC RRK
hBD1	Mensch	GNFLTGLG HR SDHYN CV SSGGQCLYSAC P IF TK IQGT CY R GKAK CC CK
hBD2	Mensch	IGDPVT CL KSGA I CHPV FC PR RY KQIG TC GLPG TKCC KKP
hBD4	Mensch	ELDR IC GYGT AR CR K-K CR SQ EY R IG RC PNTY-AC CL RRK
mBD1	Maus	CLQHGG FCL RSS CP SNT KL QGT CK PK PNCC KS
rBD1	Ratte	CLQNGG FCL RSS CP SHT KL QGT CK PK PNCC RS
GAL1	Huhn	CFR KS GFCA FL KC PS LT LIS GKC -SR FYLCC KRI W G

Abbildung 4: Aminosäuresequenzen genkodierter α - und β -Defensine. Konservierte Cysteinreste sind fett und basische Aminosäuren (Arginin und Lysin) rot gedruckt.

Das erste α -Defensin wurde in den alveolären Makrophagen von Kaninchen entdeckt (SELSTED *et al.*, 1983), weitere Vertreter fanden sich in den neutrophilen Granulozyten von Mensch, Rhesusaffe, Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen und Hamster, sowie in den enterischen Paneth-Körnerzellen von Mensch, Maus und Ratte (RISSO, 2000; KAISER UND DIAMOND, 2000). Beim Menschen sind bisher vier leukozytäre (HNP1-4) sowie zwei enterische (HD5 und 6) α -Defensine bekannt. Die Familie der β -Defensine dagegen wurde erst später beschrieben. Das erste identifizierte β -Defensin war bovinen Ursprunges, dieses zeigte zwar diverse Ähnlichkeiten mit den α -Defensinen aber ein abweichendes Cystein-Motiv (DIAMOND *et al.*, 1991; SELSTED *et al.*, 1993; TANG UND SELSTED, 1993). Mittlerweile wurden β -Defensine auch bei Mensch, Affen,

Maus, Ratte identifiziert, wobei die humanen β -Defensine mit nur zwei Vertretern (hBD1 und hBD2) zu Beginn dieser Arbeit deutlich unterrepräsentiert waren. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei neue humane β -Defensine als antimikrobiell aktive Peptide beschrieben (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a und b; HARDER *et al.*, 2001). Anders als die α -Defensine werden die vier bisher bekannten humanen β -Defensine hBD1 (BENSCH *et al.*, 1995), hBD2 (HARDER *et al.*, 1997), hBD3 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a; HARDER *et al.*, 2001; JIA *et al.*, 2001) und hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b) hauptsächlich in epithelialen Geweben der Haut, der Atemwege, des Urogenitaltrakts und des Gastrointestinaltrakts gebildet. Das nur schwach antimikrobiell aktive, primär in Niere und Uterus gebildete hBD1 (VALORE *et al.*, 1998; ZUCHT *et al.*, 1998) unterscheidet sich von den anderen humanen β -Defensinen vor allem durch seine konstitutive Expression. Die Transkriptionsrate von hBD2, hBD3 und hBD4 lässt sich durch *in vitro*-Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , Interleukin-1, Interferon- γ sowie durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) induzieren (HARDER *et al.*, 2000; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a und b; HARDER *et al.*, 2001; JIA *et al.*, 2001). Nach Kontakt mit pathogenen Keimen wie *Pseudomonas aeruginosa* kann für hBD2, hBD3 und hBD4 eine Erhöhung der Transkriptionsrate beobachtet werden, während für hBD1 kein Effekt feststellbar ist (HARDER *et al.*, 2000; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a und b; HARDER *et al.*, 2001). Außerdem zeigen hBD2, hBD3 und hBD4 antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive/Gram-negative Bakterien und Hefen, wobei hBD4 von diesen drei die schwächste antimikrobielle Potenz aufweist (HARDER *et al.*, 1997; 2001; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a und b). Mit Ausnahme von hBD3 zeigen die humanen β -Defensine in ihrer antimikrobiellen Aktivität eine starke Abhängigkeit von der Mediensalzkonzentration (GOLDMAN *et al.*, 1997; BALS *et al.*, 1998; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a und b; HARDER *et al.*, 2001). Die chemotaktische Wirkung von hBD2 (YANG *et al.*, 1999) und hBD3 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a) auf T-Zellen und Monozyten, sowie die Wirkung von hBD4 auf Monozyten (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b) deutet darauf hin, dass diesen Peptiden neben der direkten Inaktivierung pathogener Erreger noch weitere Funktionen im menschlichen Immunsystem zukommen könnten.

Die bisher bekannten humanen α - und β -Defensine sind auf Chromosom 8p21-23 lokalisiert (KAISER UND DIAMOND, 2000; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a), was für einen gemeinsamen evolutionären Ursprung spricht, allerdings konnten mittlerweile weitere Gensequenzen mit dem für β -Defensine-typischen Cystein-Motiv auch auf den humanen Chromosomen 6 und 20 identifiziert werden (SCHUTTE *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Trotz einiger Ähnlichkeiten zwischen den Defensinen der Insekten und den β -Defensinen der Vertebraten (RAJ UND DENTINO, 2002) gibt es viele strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen der Defensine bei Insekten und Vertebraten. So ist das Verbrückungsmuster der Cysteine in allen Gruppen unterschiedlich und man findet mit Ausnahme der Cysteine keine andere Aminosäure, die in allen Gruppen konserviert ist (HUGHES, 1999). Eine hohe Sequenzhomologie findet sich nur bei Defensinen aus einem spezifischen Gewebe einer Spezies, wie es z.B. bei den humanen neutrophilen α -Defensinen der Fall ist (RAJ UND DENTINO, 2002). Zwischen zwei Spezies können

die Aminosäuresequenzen beträchtliche Unterschiede aufweisen, was darauf hindeutet, dass sich die Defensine entsprechend des jeweiligen mikrobiellen Umfeldes entwickelt haben. Trotz der großen Unterschiede in der Aminosäuresequenz bei verschiedenen Defensinen der Säugetiere sind doch erhebliche Übereinstimmungen bezüglich der Sekundär- und Tertiärstruktur festzustellen (ZIMMERMANN *et al.*, 1995). So konnte anhand der humanen β -Defensine hBD1 und hBD2 sowie der murinen β -Defensine mBD7 und mBD8 gezeigt werden, dass auf der Ebene der Sekundär- und Tertiärstruktur große Ähnlichkeiten zwischen den Defensinen verschiedener Säugerspezies vorhanden sind (BAUER *et al.*, 2001). Alle vier β -Defensine enthalten keinen hydrophoben Kern, was vermuten lässt, dass die Tertiärstruktur hauptsächlich über die drei Disulfidbrücken stabilisiert wird. Desweiteren besitzen diese eine kurze N-terminale α -Helix sowie drei antiparallele Stränge, die ein β -Faltblatt bilden und in Länge und relativer Anordnung sehr ähnlich sind (BAUER *et al.*, 2001). Wie in Abbildung 5 dargestellt, besitzen auch α -Defensine diese Sekundärstrukturelemente, wobei allerdings dem humanen α -Defensin HNP-3 und dem bovinen β -Defensin BNBD12 die kurze α -Helix fehlt.

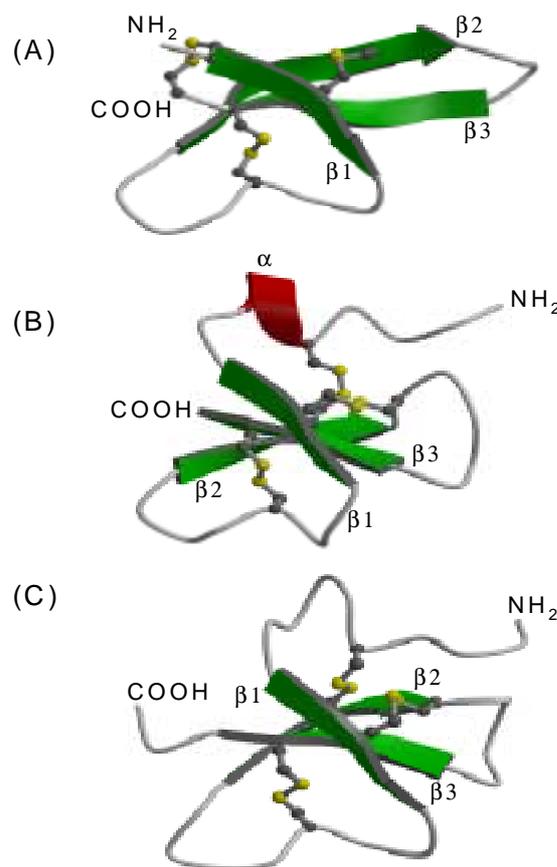


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente von (A) humanes α -Defensin HNP-3, (B) humanes β -Defensin hBD1 und (C) bovines β -Defensin BNBD12. Alle drei Defensine zeigen signifikante Ähnlichkeiten bezüglich der Struktur, so enthalten diese Defensine jeweils drei antiparallele β -Faltblattstrukturen (β 1- β 3), und für hBD1 konnte desweiteren gezeigt werden, dass es N-terminal eine kurze α -Helix aufweist (nach BAUER *et al.*, 2001).

Zwar konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden, ob die Defensine der Insekten und der Vertebraten einen gemeinsamen Ursprung haben oder ob sie sich unabhängig voneinander

entwickelt haben (HUGHES, 1999), aber das Vorkommen der Defensine in den entwicklungsgeschichtlich so unterschiedlichen Gruppen wie Pflanzen, Insekten und Vertebraten deutet darauf hin, dass sie einen alten, wichtigen Teil der angeborenen Immunabwehr im Kampf gegen pathogene Erreger darstellen.

1.4 Antimikrobielle Peptide als multifunktionelle Moleküle

Die Klassifizierung der antimikrobiellen Peptide erfolgte aufgrund ihrer Strukturbesonderheiten und ihres breiten Wirkspektrums gegen Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren. Nach der Entdeckung der ersten antimikrobiellen Peptide in unterschiedlichen Organismen des Pflanzen- und Tierreiches wurde angenommen, dass die alleinige Funktion dieser phylogenetisch sehr alten Peptide das unspezifische Abtöten eingedrungener Mikroorganismen sei (RISSO, 2000). In Organismen mit einem schwach entwickeltem Immunsystem, wie z.B. Pflanzen, Insekten oder Mollusken scheinen antimikrobielle Peptide mit ihrem breiten Wirkspektrum zur Abwehr von Krankheitserregern auszureichen (OTVOS, 2000). In höheren Wirbeltieren, die ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem besitzen, wurden antimikrobielle Peptide als eine erste Barriere gegen eingedrungene Mikroorganismen angesehen, um die Zeitspanne bis zur Aktivierung der spezifischen Immunantwort zu überbrücken. Die Synthese kleiner Peptide ist energetisch günstiger und weniger aufwändig als die Produktion von spezifischen Antikörpern (BOMAN, 1998). Allerdings weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass antimikrobielle Peptide weitergehende Funktionen haben, und sowohl einen wichtigen Teil der angeborenen Immunabwehr als auch ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen (GUDMUNDSSON UND AGERBERTH, 1999; HANCOCK UND SCOTT, 2000; YANG *et al.*, 2001b).

Bei einer Infektion mit Bakterien kommt es zu einer Kaskade von verschiedenen Ereignissen, an deren Ende die vollständige Eliminierung der eingedrungenen Erreger steht. Die unspezifische Immunabwehr bindet an die Oberflächenstrukturen von eingedrungenen Bakterien. Das Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) von Gram-negativen Bakterien ist der Prototyp einer solchen Struktur und aktiviert das angeborene Immunsystem schon in Konzentrationen unter 1 nM. LPS wird von einem im Blut zirkulierenden LPS-bindenden Protein (LBP) gebunden, und dieser Komplex wird an den CD14-Rezeptor transportiert. Der CD14-Rezeptor findet sich unter anderem auf der Oberfläche von Makrophagen/Monozyten oder als lösliche Form im Serum (TAPPING UND TOBIAS, 1997), und ist zusammen mit LBP die Voraussetzung für die LPS-induzierte Aktivierung der Zellen des Immunsystems (LE ROY *et al.*, 2001; LAZARON UND DUNN, 2002). Da CD14 keine zytoplasmatische Domäne besitzt, erfolgt die Signaltransduktion ins Zellinnere von Epithelzellen oder Makrophagen über den Korezeptor *toll-like receptor 4* (TLR4) (CHOW *et al.*, 1999). Dessen Aktivierung setzt eine Signalkaskade in Gang (CASEY, 2000), in deren Verlauf es sowohl zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (CHOW *et al.*, 1999;

ADEREM UND ULEVITCH, 2000) als auch zur Freisetzung inflammatorischer Faktoren wie z.B. TNF- α kommt. Im weiteren Verlauf erfolgt dann sowohl eine Stimulation der Zellen des Immunsystems als auch die Freisetzung antimikrobieller Peptide wie z.B. hBD2 (BECKER *et al.*, 2000). Die Ergebnisse neuerer Untersuchungen deuten darauf hin, dass antimikrobielle Peptide nicht nur eingedrungene Mikroorganismen inaktivieren sondern bei Säugern auch eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung der adaptiven Immunabwehr haben. Das Vorkommen von antimikrobiellen Peptiden in Organismen mit einem nur schwach entwickelten Immunsystem, wie es bei Pflanzen der Fall ist, zeigt ihre urtümliche Abstammung, aber die in Abbildung 3 aufgelisteten Befunde deuten an, dass diese Peptide in höheren Organismen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und der Anlockung von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems spielen (RAJ UND DENTINO, 2002).

Peptidfamilie	Funktion
Cathelicidine	<ol style="list-style-type: none"> 1) Antimikrobielle Aktivität 2) Direkte Bindung und Neutralisation von LPS 3) Chemotaktisch für T-Zellen und phagozytierende Zellen 4) Degranulation von Mastzellen
α-Defensine	<ol style="list-style-type: none"> 1) Antimikrobielle Aktivität 2) Chemotaktisch für unreife dendritische Zellen 3) Chemotaktisch für CD4, CD45RA und CD8 T-Zellen 4) Induktion der IL-8 Produktion 5) Verstärkung der Antigen-spezifischen Immunität 6) Hemmung der Glukokortikoid-Produktion 7) Aktivierung von Makrophagen
β-Defensine	<ol style="list-style-type: none"> 1) Antimikrobielle Aktivität 2) Chemotaktisch für unreife dendritische Zellen 3) Chemotaktisch für Gedächtniszellen 4) Aktivierung von Mastzellen 5) Direkte Bindung von LPS 6) Chemotaktisch für Makrophagen/Monozyten

Abbildung 6: Darstellung der für Cathelicidine und Defensine postulierten Funktionen bei der Immunantwort (CHERTOV *et al.*, 1996; LILLARD *et al.*, 1999; SCOTT *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2001a und b; NAGAOKA *et al.*, 2001; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a und b; YANG *et al.*, 2002).

Humane α -Defensine sind in Konzentrationen von $\sim 10^{-10}$ M chemotaktisch für Monozyten, T-Zellen und unreife dendritische Zellen (CHERTOV *et al.*, 1996; LILLARD *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2001b). Humane β -Defensine sind im nanomolaren Bereich chemotaktisch für Monozyten, unreife dendritische Zellen und für Gedächtniszellen. Das humane Cathelicidin LL-37 wiederum zeigt chemotaktische Aktivität für T-Zellen und phagozytierende Zellen (YANG *et al.*, 2001b;

CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a und b). Man vermutet, dass an Orten, wo Mikroorganismen eingedrungen sind, die Bildung von lokalen α - und β -Defensin-Gradienten erfolgt, und so unreife dendritische Zellen an den Ort der Antigenpräsentation gelockt werden (YANG *et al.*, 2001b). Ebenso sinnvoll erscheint die durch Cathelicidine und Defensine mediierte Anlockung von phagozytierenden Zellen wie z.B. neutrophile Granulozyten an Orte mit mikrobiellen Befall. So induzieren Cathelicidine und α -Defensine die Degranulation von Mastzellen. Dadurch kommt es zur Freisetzung weiterer Defensine und zur verstärkten Produktion von IL-8, welches wiederum chemotaktisch für neutrophile Granulozyten ist. Dabei entsteht eine positive Rückkopplung, wodurch immer mehr phagozytierende Zellen zum Infektionsort gelockt werden (YANG *et al.*, 2001b). Die daran beteiligten Rezeptoren sind bisher nur teilweise bekannt. So wird z.B. die chemotaktische Aktivität von LL-37 über den humanen *formyl peptide receptor-like 1* (FPRL1) vermittelt (YANG *et al.*, 2000). Die chemotaktische Aktivität vom humanen β -Defensin hBD2 wird über den humanen Chemokinrezeptor CCR6 mediiert (YANG *et al.*, 1999). Interessanterweise hat der CCR6 Rezeptor als weiteren Liganden das Chemokin *macrophage inflammatory protein 3 α* (MIP-3 α) (LIAO *et al.*, 1999). Aufgrund von NMR-Analysen wurde festgestellt, dass hBD2 bezüglich Struktur und Ladungsverteilung Ähnlichkeit mit MIP-3 α aufweist, und es wurde postuliert, dass dieses die Voraussetzung für Überschneidungen in antimikrobieller und chemotaktischer Aktivität sei (HOOVER *et al.*, 2002). Desweiteren konnte für MIP-3 α und ELR⁻ CXC-Chemokine gezeigt werden, dass sie eine defensin-ähnliche antimikrobielle Aktivität zeigen, die bei den ELR⁻ CXC-Chemokinen ebenfalls von der Mediensalzkonzentration abhängig ist (HOOVER *et al.*, 2002; COLE *et al.*, 2001). Die oben beschriebenen Befunde zeigen für Defensine und Chemokine einige strukturelle und funktionelle Übereinstimmungen, die eine Rolle der Defensine sowohl in angeborener als auch adaptiver Immunität nahelegen (DÜRR UND PESCHEL, 2002).

Der Begriff Sepsis bezeichnet eine generalisierte Entzündungsreaktion nach bakterieller Infektion. Wie oben beschrieben wird das LPS Gram-negativer Bakterien vom LBP gebunden und an den CD14-Rezeptor übertragen (CASEY, 2000). Durch Bindung an den TLR4 wird eine intrazelluläre Signalkaskade induziert, und es kommt zur Entstehung von Entzündungsprozessen. Untersuchungen an LPS-bindenden Proteinen wie *Limulus anti-LPS factor* (LALF), *Bacterial/permeability-increasing protein* (BPI) und *LPS-binding protein* (LBP) ergaben, dass eine β -Faltblattstruktur mit einem basischen und einem hydrophoben Anteil von Vorteil, wenn auch nicht zwingend notwendig bei der LPS-Bindung ist (LAZARON UND DUNN, 2002). Für einige antimikrobielle Peptide wurde gezeigt, dass sie aufgrund ihrer positiven Ladung bakterielles LPS binden können und somit einer bakteriellen Sepsis *in vivo* entgegenwirken (KIRIKAE *et al.*, 1998; GIACOMETTI *et al.*, 2002). Durch die Bindung von Peptid und LPS wird die Interaktion von LPS und LBP blockiert, wodurch die LPS-induzierte Produktion von TNF- α in murinen Makrophagen gehemmt wird (SCOTT *et al.*, 2000). Zu diesen Peptiden gehören Vertreter verschiedener Strukturklassen: die Defensine HNP1 und hBD2, die α -helikalen Cathelicidine CAP11 und CAP18 sowie MBI-28, das langgestreckte Indolicidin und

das zyklische Lipopeptid Polymyxin B (GOUGH *et al.*, 1996; SCOTT *et al.*, 2000; NAGAOKA *et al.*, 2001). Die hier dargestellten Befunde verschiedener Arbeitsgruppen lassen vermuten, dass antimikrobielle Peptide multifunktionelle Moleküle sind und eine regulatorische Funktion bei der Immunantwort haben. So wirken antimikrobielle Peptide einerseits chemotaktisch und somit proinflammatorisch auf Makrophagen, wodurch dann die Phagozytose von eingedrungenen Mikroorganismen gesteigert wird. Andererseits können antimikrobielle Peptide das bei der Lyse der Bakterienzellen freigewordene LPS binden und so in Makrophagen die durch das LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α hemmen. Wie weit sich die zum größten Teil *in vitro* erzielten Befunde auf eine *in vivo*-Situation beim Menschen übertragen lassen, ist ein wichtiger Aspekt, der in Zukunft geklärt werden muss.

1.5 Antimikrobielle Peptide als neues Wirkprinzip in der Therapie bakterieller Infektionen

Seit dem Beginn des Antibiotika-Zeitalters vor gut 90 Jahren wurden viele verschiedene Substanzklassen wie z.B. Betalactam-Antibiotika, Aminoglykoside, Tetracycline und Makrolide zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen entwickelt (KAYSER *et al.*, 1998). Nachdem diese Substanzen anfangs mit durchschlagendem Erfolg gegen bakterielle Infektionen eingesetzt wurden, hat in den letzten Jahren die Zahl der gegen verschiedene Antibiotika resistenten Stämme stark zugenommen, wobei die multiresistenten Bakterienstämme ein immer größeres Problem darstellen. Im Jahre 1998 wurden hochpathogene Stämme von *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Mycobacterium tuberculosis* identifiziert, die mit keinem der herkömmlichen Antibiotika mehr behandelt werden konnten (LEVY, 1998).

Die Ursachen für das Entstehen von Resistenzen sind vielfältig. Ein Grund liegt in dem oftmals fehlerhaftem Einsatz von Antibiotika. So ist die Gabe von Antibiotika bei viralen Infektionen schlichtweg sinnlos. Das gleiche gilt für eine zu kurze oder zu niedrig dosierte Einnahme von Antibiotika, da zuerst die sensitiveren Keime abgetötet werden, und somit das Wachstum resistenter Keime gefördert wird (LEVY, 1998). Die Ursache für die schnelle Zunahme der Resistenzen liegt in der ausgeprägten genetischen Variabilität der Bakterien in Verbindung mit sehr kurzen Generationszeiten. Bakterielle Resistenzen lassen sich in intrinsische und erworbene Resistenzen unterscheiden (TAN *et al.*, 2000). Intrinsische Resistenzen entstehen in einem langsamen Prozess durch Mutationen, die der Bakterienzelle einen Selektionsvorteil gegenüber antimikrobiellen Substanzen verschaffen. Bei der erworbenen Resistenz werden Resistenzgene zwischen Bakterien einer Art, aber auch zwischen verschiedenen Bakterienarten oder Bakteriengattungen weitergegeben (LEVY, 1998).

Die oben beschriebene Entwicklung stellt ein ernsthaftes medizinisches Problem dar, und erfordert die Suche nach neuen Therapieansätzen und neuen antimikrobiell aktiven Substanzklassen. Fast alle in den letzten 30 Jahren neu auf den Markt gekommenen Antibiotika

sind lediglich Derivate von schon auf dem Markt befindlichen Antibiotika und die bakteriellen Resistenzen gegen diese Antibiotika-Varianten nehmen immer mehr zu (HANCOCK, 1997; CHOPRA *et al.*, 1997). Antimikrobielle Peptide haben in den letzten Jahren im Zuge dieser Entwicklung ein wachsendes Interesse erlangt, da sie für ein völlig neues Wirkprinzip stehen. Es wird für antimikrobielle Peptide allgemein postuliert, dass sie im Gegensatz zu den herkömmlichen Antibiotika, deren Mechanismus oftmals die Hemmung von bakteriellen Enzymen beinhaltet, über einen physikalischen Mechanismus wirken (HANCOCK, 2000). Dieser Wirkmechanismus, der zu einer Aufhebung der Membranintegrität führt, in Verbindung mit einer schnell eintretenden, bakteriziden Wirkung, wie für Protegrin-1 beschrieben (STEINBERG *et al.*, 1997), erschwert die Entwicklung bakterieller Resistenzen. Bisher sind nur wenige gegen antimikrobielle Peptide resistente Bakterienstämme beschrieben. Die Entwicklung von Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide würde sehr aufwändige Umgestaltungsprozesse wie z.B. die Veränderung der Bakterienoberfläche erfordern (GUNN, 2001), so dass Resistenzen bisher nur selten auftraten. Dazu gehören die Stämme *Burkholderia cepacia* und *Serratia marcescens*, die durch eine veränderte äussere Membran und das Vorhandensein von spezifischen Proteasen unempfindlich gegenüber antimikrobiellen Peptiden sind (HANCOCK, 1997). Desweiteren sind Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Salmonella enterica* beschrieben, die durch eine Verringerung der negativen Ladungen auf ihren Oberflächen, eine Interaktion mit den positiv geladenen antimikrobiellen Peptiden verhindern (GUO *et al.*, 1998; PESCHEL *et al.*, 2001; PESCHEL, 2002). Bei dem Biofilm-bildenden *Staphylococcus aureus* hat die Veränderung der Oberflächenladung den unangenehmen Nebeneffekt, dass dadurch die Besiedlung von medizinischen Equipment wie z.B. Kathetern erleichtert wird (PESCHEL, 2002).

Das herausragende Merkmal der antimikrobiellen Peptide ist deren breites Wirkspektrum, das auch multiresistente Erreger miteinschließt. Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung können antimikrobielle Peptide durch die Anlockung immunkompetenter Zellen die Bekämpfung der bakteriellen Infektion verstärken und zu einer schnelleren Aktivierung der adaptiven Immunabwehr führen. Darüber hinaus können antimikrobielle Peptide synergistisch mit klassischen Antibiotika wirken und als Verstärker fungieren (HANCOCK, 1997). Beispiele wären Bakterienstämme, die durch veränderten Efflux oder Influx resistent gegen bestimmte herkömmliche Antibiotika sind. Mit antimikrobiellen Peptiden als verstärkenden „Porenbildnern“ könnte die Aktivität der herkömmlichen Antibiotika gegen resistente Stämme erhöht werden. Klinische Studien haben gezeigt, dass antimikrobielle Peptide bei topischer Anwendung nur ein geringes allergenes Potential besitzen (HANCOCK, 2000). Auch scheinen antimikrobielle Peptide bei topischer Anwendung kaum toxische Aktivität aufzuweisen, wie z.B. das Protegrin IB-367, das von der Firma IntraBiotics getestet wird. Allerdings gibt es bisher kaum veröffentlichte Daten zur Toxizität von antimikrobiellen Peptiden bei systemischer Anwendung (LATHAM, 1999; HANCOCK, 2000). Problematisch bei der Nutzung antimikrobieller Peptide in der Therapie ist deren vergleichsweise aufwändige und teure Produktion sowie die Empfindlichkeit gegenüber körpereigenen Proteasen und die damit verbundene kurze

biologische Halbwertszeit. Letzteres Problem könnte durch die Entwicklung geeigneter Applikationsformen oder durch den Einsatz von Peptiden mit D-Aminosäuren umgangen werden. Für Derivate des bovinen Indolicidins, bei denen L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren ersetzt worden waren, konnte gezeigt werden, dass sie die gleiche biologische Aktivität haben, während die Empfindlichkeit gegenüber proteolytischen Enzymen abnimmt (STAUBITZ *et al.*, 2001). Das antimikrobielle Peptid Nisin ist bakteriellen Ursprungs und kann durch Fermentation einfach in großen Mengen gewonnen werden (HANCOCK, 1997). Für andere Peptide aber haben sich natürliche Quellen für die Produktion im großen Maßstab als nicht ökonomisch erwiesen. Die chemische Synthese erlaubt zwar die Generierung von Peptiden mit ungewöhnlichen Aminosäuren wie z.B. Peptide mit D-Aminosäuren, ist aber sehr teuer. Die rekombinante DNA-Technologie ist entschieden günstiger aber auch aufwändiger (HANCOCK, 1997).

Bei den bisher zur Therapie zugelassenen Peptidantibiotika Polymyxin B, Colistin und Gramicidin S handelt es sich um nicht-ribosomal synthetisierte kationische Peptide bakteriellen Ursprungs, die für einen systemischen Einsatz als zu toxisch angesehen werden, und so nur für topische Anwendungen eingesetzt werden (HANCOCK, 2000). Einzige Ausnahme ist Colistin, das auch als Aerosol appliziert wird. Die Firma IntraBiotics Pharmaceuticals (<http://www.intrabiotics.com>) führte mehrere Studien für Isegran Hydrochlorid durch. Isegran ist auch bekannt als IB-367 und stellt ein Derivat des antimikrobiellen Peptids Protegrin-I dar (STEINBERG *et al.*, 1997). Die Anwendung von Isegran als Mundspüllösung zur Behandlung von Entzündungen der Mundschleimhaut bei Krebspatienten wird in einer Phase III-Studie untersucht, allerdings zeigen die ersten Ergebnisse dieser Studie nicht den gewünschten Erfolg. Die mit Isegran behandelten Patienten zeigen keine signifikante Verbesserung gegenüber der mit Placebos behandelten Gruppe (Stand: 27.09.2002). Mit dem gleichen Derivat wurde eine klinische Phase IIa-Studie zur Anwendung als Mundspüllösung zur Prävention von Lungenentzündungen bei künstlich beatmeten Patienten erfolgreich durchgeführt. Als dritte Indikation wurde die Nutzung von Isegran Hydrochlorid als Aerosol zur Behandlung von Atemwegsinfektionen bei Patienten mit Cystischer Fibrose in einer Phase I-Studie ebenfalls erfolgreich getestet.

Das aus dem bovinen Indolicidin abgeleitete MBI-226 wird von der Firma Micrologix Biotech Inc. (<http://www.mbiotech.com>) zur Zeit in einer klinischen Phase III-Studie untersucht und soll zur Prävention von Katheter-assoziierten Infektionen der Blutbahn eingesetzt werden. Ergebnisse dieser Studie werden für das dritte Quartal 2003 erwartet. Die Firma Demegen Pharmaceuticals (<http://www.demegen.com>) plant zwei klinische Phase II-Studien mit P-113L, einer Variante des Histatin (SAJJAN *et al.*, 2001). Dieses Peptid soll als Mundspülung zum einen zur Therapie von Entzündungen der Mundschleimhaut bei Krebspatienten, als auch zur Prävention von *Candida albicans*-Infektionen bei AIDS-Patienten eingesetzt werden. Für die Histatin-Variante P-113D ist eine klinische Phase I-Studie für die Behandlung von Lungenentzündungen bei Patienten mit Cystischer Fibrose geplant. Neuprex, oder auch rBPI₂₁ genannt, ist ein N-terminales Fragment

eines 55 kDa-Proteins aus humanen neutrophilen Granulozyten (LEVY, 2002). Die Firma Xoma (<http://www.xoma.com>) plant eine klinische Phase III-Studie mit Neuprex, in der die parenterale Anwendung zur Therapie von juveniler Meningokokken-Sepsis untersucht werden soll.

Die hier vorgestellten Studien zeigen, dass ein therapeutisches Potential bei antimikrobiellen Peptiden vorhanden ist, jedoch ihre Anwendung in der Therapie bisher meist auf die topische, d.h. lokale Applikation beschränkt ist (HANCOCK, 2000). Die Entwicklung von Neuprex deutet zudem an, dass auch eine parenterale Applikation möglich ist und dass antimikrobielle Peptide eine Ergänzung zu den klassischen Antibiotika darstellen können.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung eines neuen antimikrobiellen Peptids aus der Gruppe der humanen β -Defensine. Im Gegensatz zu den humanen β -Defensinen hBD1 und hBD2, die aus natürlichen Quellen wie Hämofiltrat oder Hautschuppen isoliert wurden, sollte die Identifizierung im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines bioinformatischen Ansatzes erfolgen. Unter Ausnutzung der Sequenzinformationen aus dem Humanen Genomprojekt sollte nach neuen Gensequenzen gesucht werden, die für das β -Defensin-typische Cystein-Motiv kodieren. Neben der Expressionsanalyse sollte im Rahmen der funktionellen Charakterisierung ein synthetisches Peptid hergestellt werden, um Daten zu antimikrobieller und immunmodulatorischer Aktivität zu gewinnen. In einem weiteren Schritt sollten nach Ableitung von verschiedenen Derivaten Daten zur Struktur-Aktivitätsrelation (SAR) des neuen β -Defensins erarbeitet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen

2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen

Die Sterilisation von thermostabilen Lösungen und Gebrauchsgegenständen (z.B. Polypropylen-Pipettenspitzen) erfolgte für 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3.021001, Schütt Labortechnik). Lösungen, die nicht mit feuchter Hitze behandelt werden konnten, wurden sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt, Ø 0,22 – 0,45 µm). Keramik- und Metallwaren wurden mit trockener Hitze (3 h bei 180 °C) entkeimt. Alle Pufferlösungen, Nährmedien und Nähragar wurden stets mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF} plus, Millipore) angesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden, wenn nicht explizit erwähnt, in sterilem, Endotoxin-freiem Wasser gelöst, während für molekularbiologische Zwecke steriles, schwermetallfreies Wasser (ACS-grade) verwendet wurde. Alle Chemikalien und Lösungsmittel hatten Analysequalität und wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Difco, Merck und Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Für alle experimentellen Arbeiten wurden sterile Einwegmaterialien (z.B. Reaktionsgefäße, Pipetten, Pipettenspitzen und Mikrotiterplatten) von den Firmen Sarstedt, Greiner, Nunc und Corning Costar verwendet. Diese wurden entweder steril verpackt von den Firmen bezogen oder vor Gebrauch autoklaviert. Neben den laborüblichen Standardgeräten wie Heizplatten, Thermomixern, Magnetrührern, Präzisionspipetten, Zentrifugen u. a. wurden folgende Geräte verwendet:

Sterilisation:	Bioclav 3.021001 (Schütt Labortechnik)
Zellkulturschrank:	IG150 CO ₂ -Inkubator (Jouan)
Kulturschüttler:	Innova 4230 (New Brunswick)
Sterilbank:	Sterilbank 8511 (Köttermann)
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems)
Bildbearbeitung:	Kodak EDAS 290-Dokumentationssystem mit Software Kodak 1D V. 3.5.0 (Kodak)
DNA-Sequenzierer:	Kapillarelektrophorese-Sequenzier PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
Echtzeit-PCR-Verfahren:	PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)
Mikrotiterplatten-Reader:	Microplate Autoreader EL 311 (Bio-Tek Instruments)
Spektralphotometer:	DU 640 (Beckman)
Heizblock für 96-Well:	Test Tube Heater SHT 1D (Stuart Scientific)
Ultraschallgerät:	Vibra cell (Sonics & Materials)
Ultraturrax:	Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel)

2.1.3 Molekularbiologische Testsysteme und Enzyme

Für molekularbiologische Routinearbeiten wurden die in Tabelle 1 und 2 angegebenen Kits und Enzyme verwendet:

Tabelle 1: Verwendete Kits für molekularbiologische Arbeiten

Anwendung	Kit
Isolierung von Total-RNA	RNeasy Mini Kit (Qiagen)
Plasmid-Isolierung	NucleoSpin Plus (Macherey-Nagel)
DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen	NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel)
Aufreinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel)
DNA-Sequenzierung	PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
Real-time PCR (<i>TaqMan</i>)-Experimente	<i>TaqMan</i> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) <i>TaqMan</i> PCR Core Reagent Kit (Applied Biosystems)

Tabelle 2: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
Reverse Transkriptase	SuperScript II RT (Life Technologies)
DNA-Polymerasen	<i>Taq</i> Platinum DNA-Polymerase (Life Technologies) Ampli <i>Taq</i> -Gold (Applied Biosystems)
DNA-Nuklease	DNase I Amp Grade (Life Technologies)
RNase-Inhibitor	RNasin (Promega)
DNA-Ligase	T4 DNA Ligase (Promega)

2.1.4 Verwendete Organismen und Plasmide

Im Rahmen der molekularbiologischen Experimente wurden für die Herstellung transformationskompetenter Zellen *Escherichia coli* XL2 Blue und Epicurian Coli XL10-Gold Ultracompetent Cells-Stämme von Stratagene verwendet. Für T/A-Standardklonierungen wurde das pGEM–T Plasmid von Promega genutzt. Die Selektion erfolgreich transformierter Vektoren erfolgte über deren Ampicillinresistenz auf antibiotikumhaltigen Agarplatten.

2.1.5 Verwendete Oligonukleotide

Die zur Aufklärung der vollständigen cDNA-Sequenz von hBD3 und zur quantitativen RT-PCR benötigten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Primer) und TIB MOLBIOL (*TaqMan*-Sonden) bezogen und sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung/ Richtung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Bemerkungen
β -Tub-1 ¹	TTCCCTGGCCAGCTSAANGCNGACCTNCGC AAG	degenerierter Primer (sense) für β -Tubulin-Haushaltsgen
β -Tub-2 ¹	CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAA GGC	degenerierter Primer (antisense) für β -Tubulin-Haushaltsgen
Intro- β -Tub for	TCAGATCTTTCGGCCGGACAACCTT	Primer (sense) für intronische β -Tubulin Sequenz zum Test auf genomische Verunreinigungen
Intro- β -Tub rev	TACCTGGATTCCAGCTTCTAGAAC	Primer (antisense) für intronische β -Tubulin Sequenz zum Test auf genomische Verunreinigungen
M13/pUC forward sequencing primer	AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzier-Primer für Klonierungsvektor pGEM-T
M13/pUC reverse sequencing primer	CAATTTACACAGGAAACAGCTAT- GACCATG	Sequenzier-Primer für Klonierungsvektor pGEM-T
hBD3 for	GAGGATCCATTATCTTCTGTTTG	Primer (sense) für hBD-3, Exon 1
hBD3 rev	TATTTCTTTCTTCGGCAGCATT	Primer (antisense) für hBD-3, Exon 1
hBD3 TM for	CCGCCTCTGACTCTGCAATAAT	<i>TaqMan</i> -Primer (sense) für hBD3
hBD3 TM rev	TGCTTGCTCTTCCTGTTTTG	<i>TaqMan</i> -Primer (antisense) für hBD3
hBD3 Sonde ²	FAM-GATTCCTCCATGACCTGGAACAGGCA- TAMRA	<i>TaqMan</i> -Sonde für hBD-3
18S TM for	GAAACTGCGAATGGCTCATTAAT	Primer (sense) für Haushaltsgen ribosomale 18S-rRNA
18S TM rev	CACAGTTATCCAAGTGGGAGAGG	Primer (antisense) für Haushaltsgen ribosomale 18S-rRNA
18S TM Sonde ²	FAM-TCAGTTATGGTTCCTTTGGTCGCTCGC- TAMRA	<i>TaqMan</i> -Sonde (sense) für Haushaltsgen ribosomale 18S-rRNA

¹= Redundanzen: S = (G + C) und N = (A + T + G + C).

²= FAM (6-Carboxy-fluorescein) bezeichnet den Reporterfarbstoff, TAMRA den Quencher (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin).

2.2 Isolierung von RNA und Erststrangsynthese

2.2.1 Isolierung von RNA

Bei allen Arbeitsvorgängen mit RNA wurden zur Vermeidung von Kontaminationen durch ubiquitär vorkommende RNasen Handschuhe getragen und sterile gestopfte Pipettenspitzen sowie RNase-freie Lösungen benutzt. Isolierte RNA wurde in sterilem ddH₂O in RNase-freien Eppendorfgläsern bei -80 °C gelagert. Für die Aufarbeitung von Total-RNA aus Gewebe oder Zelllinien kam der RNeasy Kit von Qiagen zum Einsatz. Bei der Isolierung von RNA aus humanem Gewebe wurden Organstücke von etwa 500 mg zunächst in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zerkleinert und nach Zugabe von 3 ml Lysispuffer (RLT-Puffer, Qiagen) und 1% β-Mercaptoethanol mit einem Ultra-Turrax T25 homogenisiert. Zur Isolierung von RNA aus Zelllinien wurden diese mit 500 µl Lysispuffer (inkl. 1% β-Mercaptoethanol) aufgeschlossen und bei Bedarf, d.h. bei Verwendung großer Zellzahlen, mit einem QIAshredder weiter zerkleinert. Das in RNA-Lysispuffer vorliegende Homogenisat wurde zur Abtrennung von Fettpartikeln und größerer Zelltrümmer 3 min bei 12.000 × g zentrifugiert und der resultierende Überstand sorgfältig mit 1 Volumenteil 70% Ethanol gemischt, wobei die Anwesenheit von 4 M Guanidiniumisothiocyanat und β-Mercaptoethanol im Lysispuffer die Denaturierung von Proteinen und RNasen bewirkte. Dann erfolgte die Bindung von RNA an die silikahaltige RNeasy-Säule durch Zentrifugation des ethanolischen Homogenisats bei 8000 × g für 15 s. Die für die Säulenbindung benötigte hohe Salzkonzentration und andere Verunreinigungen wurden durch Waschen mit 700 µl RW1-Puffer und 500 µl ethanolischem RPE-Puffer bei 8000 × g für 15 s entfernt. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurde die Säule für 2 min bis zur Trocknung zentrifugiert und in ein steriles Eppendorfglas überführt. Die Elution von RNA mit 50 µl RNase-freiem ddH₂O erfolgte durch Zentrifugation bei 8000 × g für 2 min bei 4 °C. Abschließend wurde ein Aliquot dieser RNA-Lösung zur photometrischen Analyse abgenommen, bevor die RNA in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C aufbewahrt wurde.

Gewebe zur Isolierung von RNA aus Ösophagus, Jejunum, Kolon, Rektum, Harnblase sowie aus verschiedenen Magensegmenten (Antrum, Fundus, Korpus) wurden nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki entnommen und von Prof. Dr. Markus Büchler und PD Dr. Helmut Friess vom Inselspital Bern zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Für einige Experimente wie reverse Transkriptionen und DNA-Sequenzierungen ist es notwendig, die Nukleinsäurekonzentration in den vorliegenden Lösungen zu bestimmen. Dazu wird die Absorption der wässrigen Lösung in einer Quarzküvette der Schichtdicke 1 cm bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration c ergibt sich aus der im Spektralphotometer bestimmten optischen Dichte (OD_{260}) durch folgende Beziehung:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times \epsilon \times V$$

c:	Konzentration
OD ₂₆₀ :	Optische Dichte bei 260nm
V:	Verdünnungsfaktor der Nukleinsäurelösung
ε:	Extinktionskoeffizient
	ε für ssRNA/ssDNA: 0,04
	ε für dsDNA: 0,05

Die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation läßt sich anhand des Quotienten aus den gemessenen optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) bestimmen. Reine DNA-Präparationen weisen einen Quotienten von 1,8 auf, bei entsprechenden RNA-Lösungen beträgt dieser 2,0.

2.2.3 Entfernung von DNA aus RNA-Präparationen

Vor der weiteren Verwendung der RNA-Präparationen wird diese mit Dnase-I behandelt, um eventuell vorhandene genomische DNA zu entfernen. Dazu wurden 2 µg lyophilisierte RNA in 7 µl RNase-freiem Wasser gelöst und nacheinander je 1 µl RNasin (Promega), 10 × DNase-Reaktionspuffer und DNase-I (Life Technologies) hinzugegeben. Der DNA-Verdau wurde nach 15 min bei RT durch Zugabe von 25 mM MgCl₂ gestoppt und die beteiligten Enzyme durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C vollständig inaktiviert.

2.2.4 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Zur Untersuchung der Transkriptionsrate von verschiedenen RNAs in unterschiedlichen Geweben wurde mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Durch diese indirekte Vervielfältigung der RNA können auch geringste Mengen RNA spezifisch nachgewiesen werden.

Für die Herstellung von cDNA wurden 5 µl DNase-behandelte (2.2.3), aus Zelllinien oder Gewebe gewonnene Total-RNA mit 13 µl ddH₂O verdünnt und mit 500 ng *random hexamer primer* versetzt. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 70 °C wurde der Ansatz schnell im Eisbad abgekühlt, um ein Anlagern der Hexamere zu ermöglichen. Anschließend wurden 6 µl 5 × Erststrangsynthesepuffer, 3 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) hinzugefügt und vorsichtig vermischt. Der Reaktionsansatz wurde 1 min bei 42 °C äquilibriert und die reverse Transkription durch Zugabe von 200 U SuperScript II (Life Technologies) gestartet. Nach weiteren 50 min bei 42 °C wurde das zwischenzeitlich am Deckel des Eppendorfgefäßes kondensierte Wasser herunterzentrifugiert und die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C über 15 min gestoppt. Die Konzentration der so gewonnenen komplementären DNA wurde aus der genutzten RNA-Äquivalentmenge berechnet.

Eine Abschätzung der cDNA-Qualität wurde in zwei sich anschließenden Kontrollexperimenten vorgenommen, wobei eine PCR mit einem β -Tubulin-Primerpaar die Effizienz parallel durchgeführter Erststrangsynthesen überprüfte, während eine zweite PCR mit intronischen β -Tubulin-Primern auf mögliche genomische Verunreinigungen testete.

2.3 Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

2.3.1 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion oder *polymerase chain reaction* (PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von zumindestens teilweise bekannten DNA-Abschnitten (SAIKI *et al.*, 1985). Die Vervielfältigung eines bestimmten Sequenzabschnitts ist Voraussetzung dafür, ihn für weitere Schritte wie Klonierung, Sequenzierung oder Transkriptanalyse zugänglich zu machen. Theoretisch würde ein DNA-Molekül für die Amplifikation ausreichen.

Reaktionsansatz für eine Standard-PCR:

10%	10 × PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl)
2 mM	MgCl ₂
200 nM	Oligonukleotidprimer (sense und antisense)
200 mM	dNTP-Mix (je 200 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
7,5 – 200 ng	DNA-Matrize (cDNA, Plasmid oder genomische DNA)
0,75 U	<i>Taq</i> Platinum DNA-Polymerase (Life Technologies)
ad 100%	ddH ₂ O

Angegeben sind die resultierenden Endkonzentrationen in einem 30 μ l bzw. 50 μ l Ansatz.

Eine Standard-PCR wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1.	<u>Initiale Denaturierung der Matrize</u>	96 °C	3 min	1 Zyklus
2.	Denaturierung	94 °C	10 s	
	Oligonukleotidanlagerung	52-60 °C ¹	30 s	
	<u>Elongation (Verlängerung)</u>	72 °C	30 s – 2 min	35-40 Zyklen
3.	End-Elongation	72 °C	7 min	1 Zyklus
4.	Reaktionsende	4 °C	∞	

¹ Die Standard-Annealingtemperatur für hBD-3 betrug 52 °C.

Zur Durchführung der PCR-Reaktion wurde ein GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler (Applied Biosystems) genutzt. Die Länge der Extensionsphase bei 72 °C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei für die *Taq* Platinum DNA-Polymerase eine Verlängerungsgeschwindigkeit von 1000 bp/min angenommen wurde.

2.3.2 Gelelektrophoretische Trennung von DNA

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten zu präparativen oder analytischen Zwecken erfolgte in nativen, horizontalen Agarosegelen nach ihrem Molekulargewicht. In Abhängigkeit vom Trennungsziel wurden 0,8 - 2,0%ige (w/v) Agarosegele in $1 \times$ TAE-Puffer mit einer Lauflänge von 8-13 cm hergestellt und die Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von 80-120 V in $1 \times$ TAE-Laufpuffer durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt, der Glycerin zum besseren Einsinken in die Geltaschen und Bromphenolblau zum Erkennen der Lauffront enthielt. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde der Agaroselösung vor dem Gelieren 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid hinzugefügt. Ein jeweils in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ aufgetragener DNA-Größenstandard (1 kbp- bzw. 100 bp-Leiter, Fa. Life Technologies) erlaubte die Abschätzung der relativen Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente. Die fertigen Gele wurden mit dem Kodak EDAS 290-Dokumentationssystem fotografiert und archiviert.

Ethidiumbromid-Stammlösung: 1 mg/ml Ethidiumbromid in ddH₂O

50 \times TAE-Puffer (Stammlösung):

2 M	Tris
100 mM	EDTA
1 M	Essigsäure

5 \times Auftragspuffer:

40%	Glycerin
20 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
2 mM	EDTA
0,1% (w/v)	Bromphenolblau

2.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Für die Aufarbeitung gelelektrophoretisch getrennter DNA wurde der NucleoSpin Extract-Kit der Fa. Macherey-Nagel (VOGELSTEIN UND GILLESPIE, 1979) entsprechend den Angaben des Herstellers genutzt. Das die gewünschte DNA-enhaltende Gelstück wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 μl Puffer NT1 wurde die Agarose bei 50 °C und 400 rpm für 10 min geschmolzen, und anschließend auf eine NucleoSpin Extract-Säule aufgebracht und 1 min bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, und es folgten zwei einminütige Waschschrte mit je 500 μl EtOH-haltigem Puffer NT3 bei $12.000 \times g$, bevor die Silikasäule durch zweiminütige Zentrifugation getrocknet wurde. Die Elution der DNA erfolgte nach Inkubation der Säule (1 min, RT) mit 50 μl ddH₂O bei ebenfalls $12.000 \times g$. Falls erforderlich, wurde die DNA-Konzentration des Eluats durch Einengen des Volumens auf ca. 30 μl im Vakuum erhöht.

2.3.7 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der Insertlänge rekombinanter Plasmid-DNA in transformierten Bakterien wurde die Methode der Kolonie-PCR genutzt, die eine Alternative zum Restriktionsverdau darstellt. Bei dieser modifizierten PCR wird Zellmaterial von weißen und somit erfolgreich transformierten Bakterienkolonien direkt mit pUC/M13 sense- und antisense-Oligonukleotiden amplifiziert. Diese Primer schließen die Polylinker-Region des verwendeten pGEM-T Vektors ein. Ein rekombinantes Plasmid lässt sich somit an der Länge seines PCR-Produktes erkennen, da sich dessen Größe nun aus der Länge der umspannten Polylinker-Region zuzüglich der Länge des inklonierten DNA-Fragments ergibt.

PCR-Mix I (Angaben pro Reaktion):

2 µl	10 × PCR-Puffer
0,8 µl	50 mM MgCl ₂
17,2 µl	ddH ₂ O

PCR-Mix II (Angaben pro Reaktion):

1 µl	10 × PCR-Puffer
0,6 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,25 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0,25 µl	Oligonukleotidprimer (je 10 µM)
7,75 µl	ddH ₂ O
0,15 µl	Taq Platinum DNA-Polymerase

Mittels steriler Pipettenspitzen wurde Zellmaterial aus entsprechenden Bakterienkolonien (Kapitel 2.3.6) in mit je 20 µl PCR-Mix I gefüllte PCR-Reaktionsgefäße überführt. Zum Anlegen einer Plattenkultur der zu untersuchenden Transformanten wird anschließend mit derselben Pipettenspitze ein Impfstrich auf eine Selektions-Agarplatte gebracht, welche später als Ausgangskultur für die Herstellung der Plasmid-Präparation (2.3.8) dient. Nach der Denaturierung der überspiralisierten Plasmid-DNA (*supercoiled DNA*) bei 99 °C über 10 min und darauf folgender Abkühlung auf 53 °C wurden jeder Reaktion 10 µl PCR-Mix II hinzugefügt und eine Standard-PCR nach den jeweiligen Gegebenheiten durchgeführt. Der Zwischenschritt bei dieser Reaktion ist notwendig, da die Halbwertszeit der Taq-Polymerase bei 99 °C nur wenige Minuten beträgt. Durch die abschließende gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte wurden die Kolonien mit korrekt rekombiniertem Plasmid identifiziert. Die entsprechenden Klone der Replikplatte wurden zur Vorbereitung der Mini-Präparation von Plasmid-DNA inokuliert.

2.3.8 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen kam das NucleoSpin Plus Kit der Firma Macherey-Nagel zum Einsatz. Grundlage dieses Kits ist die Methode der alkalischen Lyse (BIRNBOIM UND DOLY, 1979), wobei Reinheit und Ausbeute der Präparation über die zusätzliche Zentrifugation durch eine Silikamembran erhöht wird. Von den in der Kolonie-PCR (2.3.7) positiv getesteten Klonen wurde eine 5 ml Übernachtskultur mit ampicillinhaltigem LB-Selektivmedium angesetzt. 2 ml der so gewonnenen Bakteriensuspension wurden für 30 s bei $12.000 \times g$ abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Pellet mit 250 μ l RNase A-haltigem Puffer A1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 250 μ l alkalischem, SDS-haltigen Puffer A2 und anschließende 5-minütige Inkubation unter leichtem Schütteln bei RT. Im nächsten Schritt wurden störende Zelltrümmer sowie bakterielle Proteine und genomische DNA durch Zugabe von 300 μ l Puffer A3 gefällt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei $12.000 \times g$ und 4°C abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine silikahaltige NucleoSpin Plus-Säule überführt und in diese durch Zentrifugation ($12.000 \times g$, 1 min) eingebracht. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur Inaktivierung möglicherweise noch aktiver bakterieller Nukleasen wurde die an die Silikasäule gebundene Plasmid-DNA einmal mit 500 μ l Puffer AW (50°C) gewaschen, ehe sich ein weiterer Waschschrift mit 600 μ l EtOH-haltigem Puffer A4 anschloss. Auf der Säule verbliebene und im weiteren Verlauf störende ethanolische Rückstände wurden durch 3-minütige Zentrifugation entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch Inkubation der Säule mit 50 μ l ddH₂O für 2 min bei RT und abschließender Zentrifugation ($12.000 \times g$, 1 min).

2.3.9 Sequenzierung von DNA

Für die Identifizierung der Nukleotidsequenz von DNA-Fragmenten wurde eine modifizierte Form des Kettenabbruchverfahrens von SANGER *et al.* (1977) genutzt. Ein Vorteil dieses so genannten *cycle sequencing*-Verfahrens ist, dass nur geringe Mengen einzel- oder doppelsträngiger DNA eingesetzt werden müssen, da das DNA-Fragment durch Anlagerung eines einzelnen Primers linear amplifiziert wird. Die Amplifikation erfolgt dabei wie bei einer PCR durch die temperaturabhängige Anlagerung des Primers und dessen Verlängerung nach Denaturierung der Zielsequenz. Zusätzlich zu den für die Neusynthese verwendeten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden dem Reaktionsansatz in einem bestimmten Verhältnis Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt. Werden diese ddNTPs während der Extension in den neu entstehenden Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Kettenreaktion, und im weiteren Verlauf zur Akkumulation von spezifischen Abbruchprodukten. Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt, wobei sowohl aufgereinigte PCR-Produkte als auch präparierte Plasmid-DNA (Kapitel 2.3.8) sequenziert werden konnten.

Einfacher Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion:

4 µl	BigDye Terminator Ready Reaction Mix
1 µl	Oligonukleotidprimer (10 pmol/µl)
x µl	Matrizen-DNA (DNA in ng = Basenpaaranzahl/7,5)
ad 20 µl	ddH ₂ O

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1.	Denaturierung	96 °C	10 s	
2.	Oligonukleotidanlagerung	50-60 °C	5 s	
3.	Elongation (Verlängerung)	60 °C	4 min	25 Zyklen
4.	Reaktionsende	4 °C	∞	

Im Anschluß an die Sequenzierungsreaktion wurde zwecks Aufreinigung der Proben eine Ethanol-fällung durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden mit je 80 µl ddH₂O versetzt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 15 µl 2 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 250 µl 95%igem Ethanol. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde für 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette oder einem Tuch entfernt, das unsichtbare DNA-Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, und erneut zentrifugiert (5 min, 15.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einige Minuten im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Pellet kann bis zur Sequenzierung bei 4 °C gelagert werden. Zur Sequenzierung in einem Kapillarelektrophorese-Sequenzierer (PRISM 310 Genetic Analyzer, ABI) wurden die Proben mit Formamid-haltigem TSR-Reagenz (ABI) aufgenommen, bei 95 °C für 2 min denaturiert und zur Unterdrückung der Renaturierung schnell auf Eis abgekühlt. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz über 30 s auf das Kapillargel aufgetragen und bei einer Spannung von 15 kV und einer Temperatur von 50 °C elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzsignale erfolgte vollautomatisch durch die Sequence Analysis V3.4.1-Software (ABI).

2.4 Transkriptanalyse

2.4.1 Relative Quantifizierung von Transkripten durch Echtzeit-PCR

Die Quantifizierung der Transkriptionshöhen von hBD3 in humanen Zellen und Geweben erfolgte mit Hilfe der *TaqMan*-Technologie. Grundlage ist eine modifizierte PCR-Technik, die als *real-time reverse transcription PCR* oder auch als Echtzeit-PCR (SCHILD, 1996) bezeichnet wird. Die Echtzeit-PCR zeichnet sich sowohl durch die PCR-eigene Sensitivität, als auch durch ein hohes Maß an Selektivität und Reproduzierbarkeit aus. Die hohe Reproduzierbarkeit dieser Technik beruht unter anderem auf dem Wegfall von weiteren Arbeitsschritten zum Nachweis der Spezifität des PCR-Produktes (z.B. Gelelektrophorese). Desweiteren erfolgt die Quantifizierung der Echtzeit-PCR im logarithmischen Bereich der Amplifikation und nicht als Endpunktbestimmung wie bei der Standard-PCR.

Die *TaqMan*-Technologie basiert auf einem 5'-Nuklease-Assay (HOLLAND *et al.*, 1991), bei dem man unter Ausnutzung der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase relativ einfach sequenzspezifische Amplifikation nachweisen kann. Zusätzlich zu dem spezifischen Oligonukleotidpaar einer Standard-PCR wird eine fluorogene Sonde verwendet (LEE *et al.*, 1993), die aus einem modifizierten Oligonukleotid mit einer Länge von 24-30 bp besteht und spezifisch mit der DNA-Zielsequenz hybridisiert. Am 5'-Ende ist die Sonde mit einem Reporterfarbstoff (6-Carboxy-fluorescein) und am 3'-Ende mit einem sogenannten Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) verknüpft. Ist die Sonde intakt, findet zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Quencher ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt. Wird die Sonde mit der spezifischen Wellenlänge ($\lambda=488$ nm) angeregt, so wird die als Licht emittierte Fluoreszenz-Energie des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe des Quenchers auf diesen übertragen. Dadurch wird die Energie des emittierten Lichtsignals abgeschwächt und das detektierte Signal ist sehr schwach. Wird die Oligonukleotidsonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase während der Elongationsphase einer PCR-Reaktion hydrolysiert, so entfernen sich die beiden Farbstoffe voneinander und die emittierte Energie des Reporterfarbstoffs wird als Fluoreszenzsignal ($\lambda=518$ nm) messbar. Während des Hybridisierungsschritts der PCR lagern sich sowohl die Primer als auch die Sonde an die Matrizen-DNA an. Dabei sind durch die Länge und Basenzusammensetzung die Schmelztemperaturen so gewählt, dass die unmarkierten Oligonukleotide bei der gewählten Hybridisierungstemperatur ideal binden, d.h. die verwendete Hybridisierungstemperatur entspricht exakt der Schmelztemperatur der Primer. Die Sonde dagegen weist eine um mindestens 10 °C höhere Schmelztemperatur auf. Das führt dazu, dass die Sonde während der Neusynthese in der Elongationsphase (Extension) durch die *Taq* DNA-Polymerase verdrängt wird. Als Zwischenprodukt entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, bei der die Sonde am 5'-Ende durch die Polymerase verdrängt wird, während das 3'-Ende noch mit der Matrize hybridisiert bleibt. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase wird die Sonde

zwischen Fluoreszenz-Reporter und Quencher hydrolysiert. Da das 5'-markierte Derivat nun nicht mehr räumlich eng mit dem Quencher verbunden ist, wird die räumliche Nähe und somit auch der FRET aufgehoben, und es kann ein Lichtsignal detektiert werden.

Reaktionsansatz für eine *TaqMan*-PCR:

12,5 µl	2 × <i>TaqMan</i> Universal PCR Master Mix (ABI)
250 nM	Oligonukleotidprimer (250 nM je Primer)
250 nM	Sonde (5'-FAM / 3'-TAMRA markiertes Oligonukleotid)
2,0 µl	cDNA-Matrize (Template)

Das Endvolumen pro Reaktionsansatz betrug 25 µl. Für die Kontrolle auf Kontaminationen diene ein Ansatz mit Wasser anstelle von cDNA. Desweiteren wurde eine mögliche Amplifikation genomischer Sequenzen durch die Verwendung exonübergreifender Primer zusätzlich unterbunden.

Für alle *TaqMan*-PCR-Läufe wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1.	Uracil- <i>N</i> -Glykosylase-Reaktion	50 °C	2 min	1 Zyklus
2.	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1 Zyklus
3.	Denaturierung	95 °C	15 s	
	Oligonukleotidanlagerung und			
	Amplifikation der Zielsequenz	60 °C	1 min	45 Zyklen
4.	Reaktionsende	25 °C	∞	

Die für eine quantitative Auswertung notwendigen Absorptionsspektren der beteiligten Fluorogene wurden während der Amplifikation der Zielsequenz (Schritt 3) mit dem PRISM 7700 Sequence System (Applied Biosystems) aufgenommen. Die Anregung von Rezeptorfarbstoff und Quencher erfolgte bei $\lambda=488$ nm mit einem Argon-Laser, und die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe wurden im Bereich von 500-660 nm automatisch aufgenommen und durch eine CCD-Kamera (*charge-coupled device*) in elektronisch bearbeitbare Datenpunkte umgewandelt.

2.4.2 Quantifizierung der Transkriptionshöhe von hBD3

Die Quantifizierung der Transkriptionshöhe von hBD3 in humanen Geweben und Zellen erfolgte mit Hilfe der Standardkurvenmethode (SCHILD, 1996). Zur Berechnung der Ausgangsmenge cDNA in einer unbekannt Probe wird die Anzahl der PCR-Zyklen herangezogen, die nötig sind, um einen festgelegten Schwellenwert eines Fluoreszenzsignals zu überschreiten. Die benötigte Zyklenzahl wird als C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. Für hBD3 und die endogene Kontrolle (ribosomale 18S-rRNA) wurde das entsprechende Amplikon der Echtzeit-PCR in das pGEM-T Plasmid kloniert. Nach der spektralphotometrischen Bestimmung der Konzentration (2.2.2) der jeweiligen aufgereinigten Plasmid-DNA konnte die enthaltene Kopienzahl der hBD3-DNA bzw. Haushaltsgen pro µl Plasmidpräparation über folgende Beziehung bestimmt werden.

I. Umwandlung der Konzentrationsangabe [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] in [$\text{pmol}/\mu\text{l}$]:

$$\mu\text{g DNA} \times \frac{\text{pmol}}{660 \text{ pg}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1}{N} = \text{pmol DNA}$$

II. Umwandlung [$\text{pmol}/\mu\text{l}$] in [Anzahl Moleküle/ μl]:

$$[\text{pmol DNA} / \mu\text{l}] \times N_A = [\text{Moleküle Zielsequenz} / \mu\text{l}]$$

N = Anzahl Basenpaare im Plasmid, inklusive Insert; $N_A = 6,023 \times 10^{23}$ (Avogadro'sche Zahl)

Aus verschiedenen Verdünnungen der Plasmidpräparation und den entsprechenden C_T -Werten wurde eine Standardkurve konstruiert, so dass für unbekannte Proben jedem C_T -Wert eine Startkopienzahl zugeordnet werden konnte. Zur Berechnung der endogenen Expression in den verschiedenen Geweben wurde anschließend die experimentell festgestellte Startkopienzahl von hBD3 durch die der endogenen Kontrolle dividiert. Diese Ergebnisdarstellung hat den Vorteil, dass man die Transkriptionshöhen von verwandten Sequenzen (z.B. von β -Defensinen) in einem Gewebe gut miteinander vergleichen kann. Die Bestimmung der Transkriptionshöhe von hBD3 in stimulierten Zellen (Kapitel 2.7.3) erfolgt nach der gleichen Methode.

2.5 Kultivierung und Lagerung von prokaryotischen Zellen und Hefen

Für die Arbeiten mit Bakterien- und Hefezellen wurden die von SÜßMUTH *et al.* (1999) zusammengefassten allgemeinen Richtlinien eingehalten.

2.5.1 Verwendete Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet, die, wenn nicht anders vermerkt, von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen wurden.

Tabelle 4: Nicht-pathogene Keime.

Bakterienstamm	Nummer	Medium	Gram-Färbung	Wachstumsoptimum
<i>Staphylococcus carnosus</i>	TM300	LB	+	37 °C
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC9341	LB	+	37 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6051	LB	+	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	BL21	LB	-	37 °C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC9763	LB	Hefe	30 °C

Staphylococcus carnosus TM300 wurde freundlicherweise von J. Alves (Medizinische Hochschule Hannover) und *Escherichia coli* BL21 von F. Goetz (Universität München) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: Pathogene Keime der Sicherheitsstufe L2

Bakterienstamm	Nummer	Medium	Gram-Färbung	Wachstumsoptimum
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	TSB	+	37 °C
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM11865	TSB	+	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	DSM1103	LB	-	37 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM681	LB	-	37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM1128	LB	-	37 °C
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC17770	LB	-	37 °C
<i>Burkholderia cepacia</i>	CF-Isolat I	LB	-	37 °C
<i>Burkholderia cepacia</i>	CF-Isolat II	LB	-	37 °C

Burkholderia cepacia CF-Isolat I wurde freundlicherweise von I. Steinmetz (Medizinische Hochschule Hannover) und *Burkholderia cepacia* CF-Isolat II von R. Bals (Philipps-Universität, Marburg) zur Verfügung gestellt.

2.5.2 Nährmedien

LB (Luria-Bertani) - Flüssigmedium:

10 g	Caseinhydrolysat (Sigma C-0626)
5 g	Hefeextrakt (Sigma Y-4000)
5 g	NaCl

Lösen der Feststoffe in 1000 ml ddH₂O, Einstellen des pH 7,4 mit 1 N NaOH und autoklavieren. Zur Herstellung von Agarplatten wird vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar Select (Sigma A-5054) zugesetzt.

MHB (Mueller-Hinton-Both)-Medium: (für MIC-Bestimmung)

21 g	Mueller-Hinton-Broth (Merck)
------	------------------------------

Lösen der Feststoffe in 1000 ml ddH₂O. Das Medium hatte vor dem Autoklavieren einen pH-Wert von 7,2-7,4. Für die Herstellung von ¼ MHB verwendet man ein Viertel der Einwaage.

TSB-Medium:

30 g	Tryptic-Soy-Broth (Sigma T-8261)
3 g	Hefeextrakt (Sigma Y-4000)

Lösen der Feststoffe in 1000 ml ddH₂O, der Ansatz wird mit 5 N NaOH auf pH 7,2 gebracht und autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wird vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar Select (Sigma A-5054) zugesetzt.

1/10 TSB: (für MIC-Bestimmung und Hämolysetest)

3 g	Tryptic-Soy-Broth (Sigma T-8261)
-----	----------------------------------

Lösen der Feststoffe in 1000 ml ddH₂O, der Ansatz wird mit 5 N NaOH auf pH 7,2 gebracht und autoklaviert.

Medium für Radial-Diffusions-Hemmtest-Platten

30 mg	Tryptic-Soy-Broth (Sigma T-8261)
0,8 g	NuSieve GTG Agarose (Biozym)
200 µl	Tween-20 (10%)
10 mM	Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 (aus 0,5 M Stammlösung)

Die Mediumzusätze werden in 100 ml ddH₂O aufgekocht und anschließend im Wasserbad auf 40 °C abgekühlt.

2.5.3 Lagerung von Bakterien/Hefen

Die Lagerung von Bakterien/Hefen erfolgte in Form von Dauer- und Direktkulturen. Eine Direktkultur entsteht durch das Ausstreichen einer mit Anreicherungs- bzw. Übernachtskultur benetzten Impföse auf den entsprechenden Nähragarplatten. Dieser Ausstrich sollte als Einzelkoloniaustrich erfolgen, um so eventuell vorhandene Kontaminationen anhand des unterschiedlichen Koloniewachstums leichter erkennen zu können. Nach 12-24 Stunden Inkubation bei der für jeden Keim optimalen Wachstumstemperatur können die Direktkulturen bei 4 °C gelagert werden. Die Haltbarkeit der Direktkulturen liegt zwischen 2 Wochen (Isolate von *Burkholderia cepacia*) und 3 Monaten (*Staphylococcus carnosus* TM300). Zur Herstellung einer Dauerkultur wird 0,5 ml einer gut gewachsenen Anreicherungskultur mit 0,5 ml sterilem Glycerin versetzt und gut durchmischt. In dieser Form können Bakterien und Hefen für mehrere Jahre bei –80 °C gelagert werden.

2.6 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

2.6.1 Radial-Diffusions-Hemmtest

Der Radial-Diffusions-Hemmtest ist eine einfache und schnelle Testmethode zum Nachweis der antimikrobiellen Wirkung von wässrigen Lösungen (LEHRER *et al.*, 1991). Hierbei werden in Nähragar suspendierte Bakterien/Hefen mit den zu testenden Substanzen inkubiert, und dabei entstehende trübungsfreie Hemmhöfe dienen als Indikator für die antimikrobielle Wirkung der aufgetragenen Substanzen.

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in flüssigem Nährmedium entsprechend ihrer Wachstumsbedingungen bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Anschließend wurden 500 µl dieser Bakteriensuspension unter Rühren mit 100 ml der 40 °C warmen, flüssigen Nähragaroselösung vermischt (Kapitel 2.5.2). Je 25 ml dieses Ansatzes wurden in sterile Petrischalen ausgegossen und für mindestens 2 h bei 4 °C ausgehärtet. Die fertigen Platten sind 2-3 Tage bei 4 °C haltbar. Direkt vor Gebrauch der Platten wurden mit einem sterilen Stanzrohr Zylinder von 3 mm Durchmesser aus dem Gel gestanzt und mit einer an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossenen sterilen Pasteurpipette abgesaugt. In die so entstandenen Löcher wurden je 10 µl Lösung mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen eingebracht und für 15 ± 2h bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente das Peptidantibiotikum MBI-28 (GOUGH *et al.*, 1996), welches ursprünglich ein Entwicklungskandidat der Firma Micrologix Biotech war und an der IPF PharmaCeuticals GmbH in der Abteilung Peptidsynthese synthetisiert wurde. Nach beendeter Inkubation wurden die entstandenen Hemmhöfe manuell vermessen. Da eine lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der Antibiotikakonzentration und den Hemmhofradien besteht (LEHRER *et al.*, 1991), kann die antimikrobielle Aktivität in Einheiten (*units*) ausgedrückt werden.

Antimikrobielle Aktivität [U] = (d-K) x 10

U [units] Einheiten nach Lehrer, 1991

d Hemmhofdurchmesser [mm]

K Durchmesser des Stanzrohres [mm]

2.6.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) stellt ein Maß für die antimikrobielle Aktivität einer Substanz da und wird definiert als die niedrigste Konzentration eines Hemmstoffs, die benötigt wird, um das Anwachsen eines Inokulums innerhalb von 18 ± 2 h zu verhindern (SÜßMUTH *et al.*, 1999). Dabei kann allerdings nicht zwischen einer bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkung unterschieden werden.

Die Bestimmung der MIC-Werte erfolgte in 96-Well-Mikrotestplatten (MTP) mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode. Dazu wurden 100 µl einer definierten Peptidkonzentration in Testmedium in den obersten Kavitäten vorgelegt, während alle anderen Vertiefungen mit 50 µl reinem Testmedium befüllt wurden. Durch Mischen und Überführen von je 50 µl Lösung aus den Kavitäten der ersten in die zweite, der zweiten in die dritte Reihe usw. wurde eine Verdünnungsreihe der Potenz 2 hergestellt. Aus den Kavitäten der untersten Reihe wurden abschließend 50 µl entnommen und verworfen. Dann wurden 50 µl einer Keimsuspension mit $2 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ Zellen hinzugefügt und dieser Ansatz für 18 ± 2 h bei 30 oder 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine durch Bakterienwachstum entstehende Trübung in den Vertiefungen spektralphotometrisch ($\lambda=570$ nm) erfasst. Der MIC-Wert entspricht der kleinsten Peptidkonzentration in [µg/ml], bei der keine Trübung, also kein Bakterienwachstum, mehr feststellbar ist. Da die Anzahl der hinzugefügten Zellen direkten Einfluss auf den MIC-Wert hat, musste zuvor mit einer CFU-Bestimmung ermittelt werden, bei welcher Verdünnung der Übernachtskultur eines Bakteriums auch tatsächlich $2 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ Keime/Well vorlagen. Diese Verdünnungsstufen reichten von 1:2000 für *Micrococcus luteus* ATCC9341 bis 1:20.000 bei *Klebsiella pneumoniae* DSM681. Über die OD bei 570 nm wurde dann für jede neue Übernachtskultur der einzelnen Keime die ungefähre Verdünnung abgeschätzt. Zur Absicherung wurde von jeder verwendeten Bakteriensuspension eine 1:1000 Verdünnung in Testmedium hergestellt und davon 2×100 µl auf Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für 18 bis 24 h bei 30 bzw. 37 °C inkubiert, die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die Anfangskeimzahl berechnet. Entsprechend den NCCLS-Richtlinien (ISENBERG, 1993) kamen nur solche Experimente zur Auswertung, bei denen die nachträglich festgestellte Anfangskeimzahl unter 5×10^5 Keimen lag.

2.6.3 Bestimmung des FIC-Wertes (fractional inhibitory concentration)

Der FIC-Wert ist ein Maß für die Interaktion zweier antimikrobiell aktiver Substanzen. Die Bestimmung des FIC-Indexes erfolgte über eine aufwändige, aber gut quantifizierbare Schachbrett-Titration (SÜßMUTH *et al.*, 1999).

In einer 96-Well-Mikrotestplatte wurden mehrere identische Verdünnungsreihen von hBD3 und der auf Interaktion zu testenden Substanz (z.B. Lysozym) vorgelegt. Dabei wurde hBD3 in vertikaler und der Kombinationspartner in horizontaler Richtung pipettiert, so dass alle getesteten Konzentrationen beider Peptide sowohl einzeln als auch Kombination miteinander vorlagen. Die höchste getestete Konzentration von beiden Peptiden lag jeweils über dem zuvor experimentell ermitteltem MIC-Wert für den entsprechenden Versuchskeim, um versuchsbedingte Schwankungen des MIC-Wertes abzufangen. Nach Lyophilisation der Peptidlösungen wurden pro Well je 100 µl einer Suspension von *Staphylococcus carnosus* TM300 in 1/10 TSB-Medium hinzugefügt, wobei die Anfangskeimzahl zwischen 2×10^5 und 5×10^5 Keime/Well betragen sollte. Nach Inkubation für 18 ± 2 h bei 37 °C wurde die durch das

Bakterienwachstum verursachte Trübung im Plattenleser bei einer Wellenlänge $\lambda=570$ nm erfasst. Die in diesem Test ermittelte minimale Hemmkonzentration (MIC) jeder Einzelsubstanz in der Kombination dividiert durch die MIC jeder Einzelsubstanz ohne Kombinationspartner wird als fraktionierte inhibitorische Konzentration (FIC) bezeichnet. Durch Addition der einzelnen FIC-Werte ergab sich der FIC-Index, der zur Auswertung einer Interaktion herangezogen wurde:

$$\text{FIC}_{\text{Index}} = \frac{\text{MIC Substanz A}_{(\text{Kombination})}}{\text{MIC Substanz A}} + \frac{\text{MIC Substanz B}_{(\text{Kombination})}}{\text{MIC Substanz B}}$$

Abhängig vom FIC-Wert wurde eine Interaktion wie folgt bewertet (SÜßMUTH *et al.*, 1999):

FIC-Index	Interaktion
$\leq 0,5$	synergistisch
$> 0,5 - 1,0$	additiv
$> 1,0 - 2,0$	indifferent (keine Interaktion)
$> 2,0$	antagonistisch

2.6.4 Bestimmung der Salzabhängigkeit der MIC-Werte

Da die antimikrobielle Aktivität der bisher bekannten humanen β -Defensine mit zunehmender Salzkonzentration abnimmt (BALS *et al.*, 1998; VALORE *et al.*, 1998; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b), wurde für hBD3 die Abhängigkeit von der Salzkonzentration bestimmt.

Analog zur Bestimmung des MIC-Wertes (Kapitel 2.6.2) wurden in einer 96-Well-Mikrotestplatte mehrere identische Konzentrationsreihen von hBD3 in 50 μl Testmedium vorgelegt, wobei die niedrigste Konzentration knapp über dem zuvor experimentell bestimmten MIC-Wert für den Versuchskeim lag. Dann wurden 50 μl einer Keimsuspension mit $2 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ Zellen hinzugefügt und dieser Ansatz für 18 ± 2 h bei 37 °C inkubiert. Als Testmedium diente 1/10 TSB, dem vor dem Autoklavieren NaCl in Konzentrationen von 25 bis 150 mM zugesetzt worden war. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine durch Bakterienwachstum entstehende Trübung in den Vertiefungen spektralphotometrisch ($\lambda=570$ nm) erfasst und für jede getestete NaCl-Konzentration der entsprechende MIC-Wert ermittelt.

2.7 Kultivierung von Säuger-Zelllinien

2.7.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Arbeiten mit humanen und tierischen Zellkulturen wurden nach den von LINDL *et al.* (2000) zusammengefassten allgemeinen Empfehlungen durchgeführt. Im Verlauf dieser Arbeit genutzte Kulturen (Tabelle 6) wurden bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten. In flüssigem Stickstoff gelagerte Dauerkulturen wurden bei Bedarf vorsichtig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und einmal mit dem zehnfachen Volumen Kulturmedium, welches 20% FCS enthielt, gewaschen, um im Einfriermedium enthaltenes, zytotoxisches DMSO zu entfernen. Nach Sedimentation für 5 min bei 120× g wurde das Zellpellet in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und anschließend in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt.

Zum Passagieren adhärenter Kulturen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 2-4 min bei 37 °C mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Die Ablösungsreaktion wurde dann durch Zugabe von 10 ml FCS-haltigem Kulturmedium abgestoppt, die Zellen wurden abzentrifugiert und je nach Zellstamm und -dichte im Verhältnis 1:3 bis 1:8 in je 20 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Suspensionskulturen wurden in 50 ml Röhrchen überführt, abzentrifugiert und dann in 30 ml frischem Kulturmedium im Verhältnis 1:5 bis 1:10 aufgenommen. Überzählige Zellen bzw. nicht mehr benötigte Arbeitskulturen wurden wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren, indem das nach der Trypsinierung erhaltene Zellpellet unverdünnt in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in geeignete Einfriergefäße (Cryovial, Roth) überführt wurde. Nach 48 h Lagerung bei -80 °C wurden die Zellen dann zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium:

	Der Zelllinie entsprechendes Medium
20%	FCS
2 mM	L-Glutamin
100 µg/ml	Penicillin/Streptomycin
10%	DMSO*

*Der 10%ige Zusatz von DMSO verhindert die Eisbildung innerhalb und außerhalb der Zellen.

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien.

Zellstamm	Gewebe / Morphologie	Herkunft / Referenz
HaCaT	Humane Keratinozyten-Zelllinie, adhärenent als Monolayer wachsend	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten (BOUKAMP <i>et al.</i> , 1988)
THP-1	Humane Monozyten-Zelllinie, nicht-adhärenent Suspensions-Zelllinie	ATCC Nr.: TIB-202

Tabelle 7: Verwendete Agenzien zur Kultivierung von Zellen.

Medien, sonstiges Zellkulturmaterial	Lieferant, Bestellnummer
RPMI 1640	Life Technologies, 31870-025
Fetales Kälberserum (FCS)	BioWhittaker, 14-701F
PBS Dulbecco's	Life Technologies, 14190-094
Trypsin/EDTA-Lösung (1x)	Life Technologies, 25300-054
10.000 µg/ml Penicillin/Streptomycin (100x)	Life Technologies, 15140-130
200 mM (100x) L-Glutamin	Life Technologies, 25030-024
75 cm ² Zellkultur-Flaschen, Filterdeckel	Sarstedt, 83.1813.002
6-Well- Zellkultur-Schalen, Ø 35 mm	Corning Costar, 3516

Tabelle 8: Kulturbedingungen für verwendete Zelllinien.

Zellstamm	Kulturmedium
HaCaT	RPMI 1640, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS
THP-1	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS

2.7.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Trypan-Blau-Methode ist eine etablierte Methode zur Ermittlung der Zellvitalität und Zellzahl (LIN *et al.*, 1991). Dabei können durch Anfärben mit dem Ausschlußfarbstoff Trypan Blau (0,4% in wäßriger Kochsalzlösung, Sigma) tote bzw. Zellen mit einer defekten Zellmembran von lebenden Zellen unterschieden werden.

$$\text{Zellvitalität} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Lebendzellzahl} + \text{Totzellzahl}}$$

Je 50 µl der Zellsuspension und der Trypanblaulösung wurden mit einer Pipette homogen durchmischt und in eine Thoma-Zählkammer (Hemocytometer) pipettiert. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops mit Phasenkontrasteinrichtung (Zeiss, Jena) und 200-facher Vergrößerung wurden tote und lebende Zellen getrennt ausgezählt. Es wurden jeweils 4 Einzelbestimmungen vorgenommen und der Mittelwert der Tot-Lebend-Verteilung gebildet. Durch die zytotoxische Wirkung von Trypan Blau sollte die Inkubationszeit maximal 3 min betragen, da sonst das Ergebnis verfälscht würde. Das Volumen der Flüssigkeit über den beiden Zählfeldern der Thoma-Zählkammer beträgt 0,1 µl, so dass die Anzahl der Zellen pro Milliliter durch Multiplikation des Zählergebnisses mit dem Faktor 10⁴ erhalten wird.

2.7.3 Stimulation von Zellen

Für die Untersuchung einer Induzierbarkeit der Transkriptionsraten von hBD3 *in vitro* wurde eine humane Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) 24 h mit proinflammatorischen Zytokinen inkubiert. Dazu wurden für mindestens 10 Tage in Kultur befindliche Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Kavität auf einer 6-Well Kulturschale ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Kulturmedium der nun 60-70% konfluenten Zellen durch zytokinhaltiges, auf RT äquilibriertes Medium (Tabelle 8) ersetzt, wobei zur Vernachlässigbarkeit eines möglichen Lösemiteleinflusses die Stammlösung der Zytokine jeweils 1:1000 in Medium verdünnt worden waren. Im Anschluss an die entsprechenden Stimulationszeiten wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zur Vorbereitung der darauf folgenden RNA-Extraktion (2.2) durch Zugabe von 500 µl Lysispuffer aufgeschlossen. Jede Stimulation mit einer proinflammatorischen Substanz wurde in drei Wells parallel durchgeführt, wobei die Inkubation mit zusatzfreiem Kulturmedium als Kontrolle diente.

Die für die Stimulation von humanen Zellen genutzten Reagenzien wurden in den in Tabelle 9 aufgeführten Konzentrationen angewendet.

Tabelle 9: Verwendete Stimulanzen.

Stimulans	Eingesetzte Endkonzentration	Lieferant	Best.-Nr.
Interleukin-1 α	20 ng/ml Medium	TEBU	016200-01A
Interleukin-6	100 ng/ml Medium	TEBU	016200-06
Interferon γ	40 ng/ml Medium	TEBU	016300-02
Phorbol-12-myristat-13-acetat	10 ng/ml Medium	Sigma	P-8139
TNF- α	20 ng/ml Medium	TEBU	016300-01A
Lipopolysaccharid (E. coli)	100 ng/ml Medium	Sigma	L-2654

Mit Ausnahme von Interferon γ (PBS), Interleukin-1 α (100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0) und PMA (DMSO) wurden die Reagenzien in Wasser (ACS-grade, Sigma) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zur genauen Identifikation der in verschiedenen Aktivitätseinheiten angebotenen Substanzen wurden die jeweiligen Bestellnummern in Tabelle 9 mit aufgeführt.

2.8 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität

Da die Aktivität vieler antimikrobieller Peptide auf einer Interaktion mit bakteriellen Membranen beruht, ist es von Interesse, ob diese Substanzen auch mit humanen Strukturen wie z.B. Zellmembranen interagieren und so eine zytotoxische Wirkung entfalten.

2.8.1 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Eine Methode zur Darstellung der zytotoxischen Wirkung von Substanzen ist die Bestimmung der hämolytischen Aktivität. Bei diesem in Anlehnung an HELMERHORST *et al.* (1999)

durchgeführten Test gilt die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten als Nachweis für die membranlysierende Aktivität von Substanzen.

Einem gesunden Probanden wurde entsprechend der Richtlinien der Deklaration von Helsinki Blut entnommen. Die Erythrozyten aus dem citrathaltigen Vollblut (Monovetten, Sarstedt) wurden bei $1500 \times g$ und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette entfernt. Das erythrozytenreiche Pellet wurde zweimal gewaschen, indem es in 1 Volumenteil Testmedium resuspendiert und wie zuvor abzentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und die Erythrozyten 200-fach mit Testmedium verdünnt. In einer 96-Well-Mikrotestplatte mit V-förmig zulaufendem Boden wurden die zu testenden Peptide in Konzentrationen von 1-500 $\mu\text{g/ml}$ in Duplika vorgelegt und lyophilisiert. Dann wurden 200 μl der oben beschriebenen Lösung hinzugefügt und für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem Peptid inkubiert. Die Mikrotestplatte wurde anschließend bei $1000 \times g$ für 5 min zentrifugiert, um überschüssige Erythrozyten abzutrennen. Je 150 μl Überstand pro Kavität wurden in eine neue 96-Well-Mikrotestplatte mit flachem Boden überführt, und die Absorption der durch freigesetztes Hämoglobin gefärbten Überstände wurde bei einer Wellenlänge $\lambda=450\text{ nm}$ im Plattenleser bestimmt. Als Referenzwert für die Hämolyse diente die Inkubation mit einer 1 %igen Lösung Tween-20 bzw. die Verwendung verschiedener Konzentrationen des hämolytisch aktiven, antimikrobiellen Peptids MBI-28. Nur mit Testmedium inkubierte Erythrozyten dienten als Negativkontrolle. Die Angabe der hämolytischen Aktivität der getesteten Peptide erfolgte in Bezug auf die totale Hämolyse mit Tween-20 und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Hämolyse [\%]} = \frac{\text{Extinktionswert (Peptid)} - \text{Extinktionswert (Negativkontrolle)}}{\text{Extinktionswert (1\% Tween-20)} - \text{Extinktionswert (Negativkontrolle)}} \times 100$$

Als Testmedium diente 1/10 TSB-Medium mit 287 mM Glukose (2.5.2). Nach Zugabe von 56,9 g Glukosemonohydrat pro Liter 1/10 TSB-Medium erfolgte eine Sterilfiltration des Ansatzes in eine autoklavierte Duran-Flasche. Die isotonische Glukosekonzentration soll einer unspezifischen Hämolyse im hypotonen Milieu vorbeugen (Osmoprotektion).

2.8.2 WST-1-Test

Der WST-1-Test ermöglicht den Nachweis der metabolischen Aktivität von eukaryotischen Zellen. Das Prinzip dieser Testmethode beruht auf der Umsetzung des roten Tetrazoliumsalzes WST-1 ((4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat), Roche Diagnostics, Mannheim) zu einem gelben, löslichen Formazansalz. Sowohl Ausgangsstoff als auch Endprodukt sind wasserlöslich und zeigen keine toxische Wirkung. Die Umsetzung des WST-1 erfolgt, wenn NADH mit Hilfe der in den Mitochondrien lokalisierten NADH-Dehydrogenase zu NAD^+ oxidiert und das WST-1 dabei reduziert wird. Dabei korreliert die Menge an gebildeten Formazansalz mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

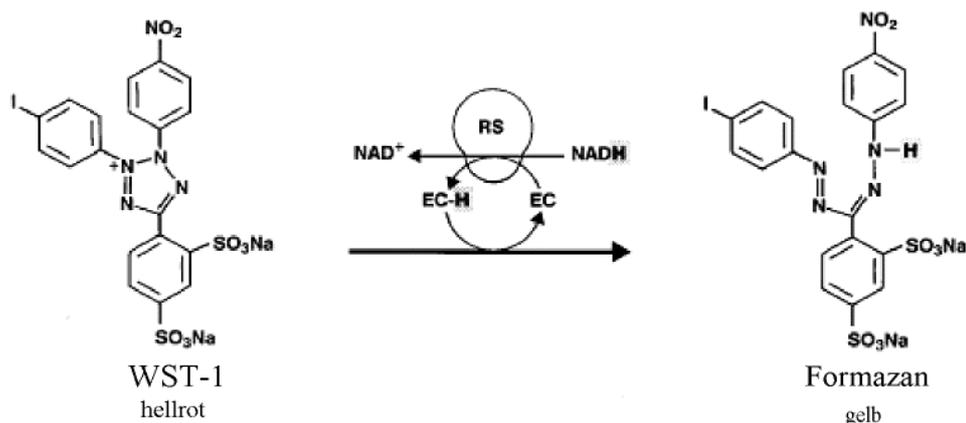


Abbildung 7: Umsetzung von WST-1. RS: Dehydrogenase; EC/EC-H: Elektronenkopplungsreagenz; NADH: Elektronendonator.

In einer 96-Well-Mikrotestplatte wurden die zu testenden Substanzen unter sterilen Bedingungen zehnfach konzentriert in Duplika vorgelegt, so dass sich Endkonzentrationen von 1-500 µg/ml ergaben. Als Positivkontrolle diente das Zytotoxin Cycloheximid (Calbiochem) in einer Konzentration von 50 µg/ml, als Negativkontrolle wurde die Absorption von Zellen in reinem Medium bestimmt. Da die verwendeten THP-1-Zellen besonders in den äußeren Wells der Mikrotestplatte ein sehr unterschiedliches Wachstum zeigten, wurden diese zwar mit Medium und Zellen belegt, flossen aber nicht in die Auswertung mit ein. Die für den Test vorgesehenen THP-1-Zellen wurden vorab für 5-7 Tage in RPMI 1640 Medium ohne Antibiotikazusatz bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten. Zur Durchführung des Tests wurden die Zellen für 5 min bei 400 × g abzentrifugiert, das Zellpellet in 4 ml Kulturmedium resuspendiert und anschließend die Lebendzellzahl mit der Trypan-Blau-Methode (Kapitel 2.7.2) bestimmt. Es kamen dabei nur Zellpopulationen zum Einsatz, bei denen die Zellvitalität über 90% lag. Die Zellsuspension wurde dann in Kulturmedium verdünnt, so dass 2,5 × 10⁵ Zellen / ml Medium vorlagen. Von dieser Suspension wurden 100 µl in jede Kavität pipettiert und für 19 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden 10 µl WST-1-Lösung pro Kavität zupipettiert und weitere 1,5 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Plattenleser bei einer Wellenlänge von 450 nm. Als Referenzwellenlänge wurde 630 nm verwendet, was dem Absorptionsmaximum des nicht umgesetzten Tetrazoliums entsprach. Mit der folgenden Formel wurde die Zellvitalität berechnet, wobei die Vitalität der Zellen umgekehrt proportional zur zytotoxischen Aktivität der Substanzen ist (BAKER *et al.*, 1993).

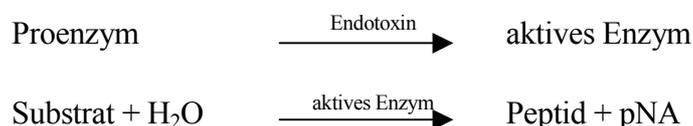
$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Extinktionswert (Peptid)} - \text{Extinktionswert (Positivkontrolle)}}{\text{Extinktionswert (Negativkontrolle)} - \text{Extinktionswert (Positivkontrolle)}} \times 100$$

2.9 Nachweis der LPS-Bindungsaktivität

Die Wirkung vieler antimikrobieller Peptide hat ihren Ursprung in dem kationischen Charakter dieser Substanzen, und ermöglicht eine Bindung an negativ geladene Strukturen wie z.B. Bakterienmembranen. Ein Bestandteil der Membran Gram-negativer Bakterien ist das Lipopolysaccharid (LPS), welches Krankheitsbilder mit oftmals tödlichen Ausgang verursachen kann. Für einige antimikrobielle Peptide wie Polymyxin B, MBI-28 und hBD2 (SCOTT *et al.*, 2000) wurde gezeigt, dass sie LPS binden und die daraus resultierende TNF- α -Produktion hemmen können. Mit dem folgenden Testverfahren sollte die LPS-Bindungsaktivität von hBD3 bestimmt werden.

Als Testsystem kam der Quantitative Chromogene LAL-Test von BioWhittaker Europe (Bestellnummer: 50-648U) zum Einsatz. Grundlage dieses Tests ist eine modifizierte Lysat-Präparation aus zirkulierenden Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*. Die Infektion von *Limulus polyphemus* mit Gram-negativen Bakterien führt zu tödlicher intravaskulärer Blutgerinnung, die durch die Interaktion von Endotoxin mit einem gerinnungsfähigem Protein der im Blut von *Limulus polyphemus* zirkulierenden Amöbozyten entsteht (YOUNG *et al.*, 1972). Der LAL-Test nutzt den anfänglichen Teil der LAL-Endotoxin Reaktion um ein Enzym zu aktivieren, das dann p-Nitroanilin (pNA) aus einem synthetischen Substrat freisetzt und das Reaktionsgemisch gelb färbt.

Testprinzip:



Das Endotoxin Gram-negativer Bakterien katalysiert die Aktivierung eines Proenzym im Limulus-Amöbozyten-Lysat, wobei die Stärke der Aktivierung von der Endotoxinkonzentration abhängig ist. Das aktivierte Enzym katalysiert die Abspaltung des p-Nitroanilin vom farblosen Substrat und das freigesetzte p-Nitroanilin kann dann spektralphotometrisch bei 405 nm gemessen werden. Die Korrelation zwischen der Absorption und der Endotoxinkonzentration ist im Bereich von 0,1 – 1,0 EU/ml linear (EU: *Endotoxin Units*). Bei der Durchführung des Tests kamen nur endotoxinfreie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Mikrottestplatten, sowie endotoxinfreies Wasser zum Lösen der Substanzen zum Einsatz. In einer 96-Well-Mikrottestplatte wurden die zu testenden Peptide in Konzentrationen von 1 – 50 $\mu\text{g/ml}$ in Duplika vorgelegt und anschließend lyophilisiert. Das LPS-bindende MBI-28 diente dabei als Positivkontrolle. Desweiteren wurden für die Standardreihe 5 Endotoxinkonzentrationen von 0,1 bis 1,0 EU/ml nach Angaben des Herstellers angesetzt. Für die Genauigkeit dieses Testsystems ist es wichtig, dass alle Reagenzien vorab auf 37 °C temperiert werden, und dass das Zusammenführen aller Reagenzien immer zeitgenau in der gleichen Reihenfolge durchgeführt

wird. Zu jeder Peptidkonzentration wurden 50 μ l einer Endotoxinlösung mit 0,75 EU/ml pipettiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt statt Peptid und Endotoxin lediglich 50 μ l endotoxinfreies Wasser. Nach Ablauf der 10 min wurden 50 μ l der LAL-Lösung zu allen Ansätzen dazugegeben und für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor 100 μ l des chromogenen Substrates dazupipettiert und für weitere 6 min bei 37 °C inkubiert wurde. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 25%iger Essigsäure wurde die Absorption bei 405 nm im Plattenleser bestimmt.

Die Berechnung der von den Peptiden gebundenen Endotoxinkonzentration erfolgte mit Hilfe von GraphPad PRISM V3.02. Zunächst wurde der Mittelwert von den Absorptionswerten der Negativkontrolle von den Mittelwerten der Absorptionswerte der Standards und Proben abgezogen, um so die mittleren Δ Absorptionswerte zu erhalten. Mit dem Programm GraphPad PRISM V3.02 wurden die mittleren Δ Absorptionswerte der Standards und Proben zusammen mit den dazugehörigen Konzentrationen der 5 Standards eingegeben und mit Hilfe der Funktion für lineare Regression die entsprechenden Endotoxinkonzentrationen berechnet. Die berechneten Endotoxinkonzentrationen entsprechen dem freien, also von den Peptiden nicht gebundenem Endotoxin. Diese Werte wurden von der zu Versuchsbeginn zugefügten Endotoxinkonzentration (0,75 EU/ml) subtrahiert und abschließend in % LPS-Bindung umgerechnet.

2.10 Bestimmung der TNF- α -Produktion

Für einige antimikrobielle Peptide wie z.B. MBI-28, Polymyxin B und hBD2 (SCOTT *et al.*, 2000) wurde gezeigt, dass sie mit LPS interagieren und die LPS-induzierte Produktion von TNF- α in murinen Makrophagen hemmen können. Dieser Versuchsansatz wurde für hBD3 an frisch isolierten humanen Blutzellen durchgeführt. Periphere mononukleäre Blutzellen (enthalten Monozyten, Lymphozyten und natürliche Killerzellen) wurden isoliert, anschließend mit LPS, Peptid oder einer Kombination aus LPS und Peptid stimuliert und der Zellüberstand auf enthaltenes TNF- α überprüft.

2.10.1 Isolation und Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen

Einem gesunden Probanden wurden entsprechend der Richtlinien der Deklaration von Helsinki 30 ml Blut entnommen, mit Dextran im Verhältnis 4:1 vorsichtig gemischt und für 45 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde entnommen, mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei RT für 7 min bei 300 \times g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 8 ml sterilem PBS aufgenommen und vorsichtig auf 4 ml Ficoll Paque PLUS (Amersham, 171440-02) geschichtet und bei RT und 500 \times g für 20 min eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Es wurde dann die schmale, weiße Interphase entnommen, mit sterilem PBS auf 15 ml aufgefüllt und bei RT für 7 min bei 500 \times g zentrifugiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 300 \times g bei 10 °C wurde die Zellpräparation in sterilem RPMI 1640 Medium

aufgenommen und ausgezählt. LPS (von *E. coli*) oder Peptid allein oder eine Kombination von beiden wurden in je 50 µl Medium für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Konzentrationen betragen dabei jeweils 100 ng/ml für LPS und 50 µg/ml für die zu testenden Peptide. In einer 96-Well-Mikrotestplatte wurden pro Kavität 2×10^5 Zellen in 150 µl RPMI 1640 Medium vorgelegt, die vorinkubierten Stimulanzen hinzugefügt und für 6 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellen für 7 min bei $500 \times g$ abzentrifugiert und der Zellüberstand bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren.

2.10.2 TNF- α -Bestimmung durch ELISA

Für die Untersuchung der TNF- α -Produktion kam der humane TNF- α ELISA Kit von PIERCE (EH3TNFA) zum Einsatz. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers. Mit dem im Kit enthaltenen rekombinanten humanem TNF- α wurden mehrere Standards in Konzentrationen von 0 bis 2000 pg/ml hergestellt. In die vorgecoateten Kavitäten der ELISA-Platte wurden jeweils 50 µl einer Lösung zum Verdünnen der Proben und Standards vorgelegt und jeweils 50 µl der Proben und Standards in Duplika hinzugefügt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und nach Zugabe von 100 µl biotinyliertem Antikörper erneut für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und nach Zugabe einer Streptavidin-HRP Lösung für 30 min bei RT inkubiert und wieder dreimal gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl TMB-Lösung und Entwicklung der Platte für 30 min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stop-Lösung beendet.

Die Auswertung erfolgte spektralphotometrisch bei 450 nm/550 nm in einem Plattenleser. Die mittleren Absorptionswerte der Standards und Proben wurden zusammen mit den dazugehörigen Konzentrationen der neun TNF- α Standards verwendet und mit Hilfe der linearen Regression wurden die entsprechenden TNF- α -Konzentrationen berechnet (GraphPad PRISM V3.02).

2.11 Nachweis der chemotaktischen Aktivität von hBD3

Die Versuche zum Nachweis der chemotaktischen Aktivität von hBD3 *in vitro* wurden von Dr. Ulf Forssmann (IPF PharmaCeuticals GmbH) durchgeführt. Aus dem Frischblut freiwilliger, gesunder humaner Spender wurden nach Routineprotokollen neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten gewonnen (PARDIGOL *et al.*, 1998). Der Chemotaxisassay wurde in einer 48-Well-Kammer (Neuro Probe) unter Verwendung einer polyvinylpyrrolidonfreien Membran (PVPF; Porengröße 5 µm, Whatman) durchgeführt. Zu testendes hBD3 (0,1-1000 nM) wurde in die untere Kammer gefüllt, während 5×10^4 Zellen der entsprechenden Leukozytenpopulation in die obere Kammer eingebracht wurden. Als Negativkontrolle dienten nur mit Testmedium gefüllte Kammern (RPMI 1640 inkl. 0,5% BSA,

25 mM Hepes), während als Positivkontrolle das chemotaktische N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) bzw. das Chemokin Eotaxin zum Einsatz kam. Nach 25- (Neutrophile) bzw. 60-minütiger (Eosinophile, Monozyten) Inkubation bei 37 °C wurde die PVPF-Membran aus der Kammer entnommen, zur Entfernung an der Oberseite aufliegender Zellen vorsichtig mit einer Gummilippe abgestreift und entsprechend der Herstellerangaben mit DIFF-Quick (Dade Diagnostika) angefärbt. Die Bestimmung der chemotaktischen Aktivität erfolgte anschließend durch Auszählung migrierter Zellen in fünf zufällig ausgewählten Augenfeldern bei einer 1000-fachen Vergrößerung. Alle Versuchsansätze wurden in Triplika durchgeführt (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a).

2.12 Synthese von hBD3 und seinen Derivaten

Die Herstellung von hBD3 und hBD4 sowie deren Derivaten erfolgte in der Abteilung Peptidsynthese bei IPF PharmaCeuticals GmbH durch Dr. Enno Klüver. Details zur Synthese von β -Defensinen wurden kürzlich veröffentlicht. (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a und b; KLÜVER *et al.*, 2002).

Lineares hBD3 wurde nach dem Prinzip der Festphasenpeptidsynthese (MERRIFIELD, 1986) unter Verwendung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppenchemie auf einem automatischen Peptidsynthesizer 433A (ABI) hergestellt. Die Synthese wurde auf einem vorbeladenen TentaGel-Harz (0,1 mmol/g, Rapp Polymere) durchgeführt. Die zu koppelnden, Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden der Reaktion im zehnfachen Überschuß hinzugefügt und durch HBTU ((2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)) aktiviert. Fmoc-Cystein war Trityl-geschützt. Lineares hBD3 wurde nach Beendigung der Synthese mit einer frisch angesetzten Mischung von Trifluoressigsäure, Ethandithiol und Wasser (94:3:3) 3 h vom Harz abgespalten und durch Zugabe von kaltem tert-Butylmethylether ausgefällt. Das Rohpeptid wurde lyophilisiert, in Wasser aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (Vydac C18, The Separations Group) vorgereinigt. Nach der Abtrennung von Nebenprodukten erfolgte die Einführung der Disulfidbrücken, indem 0,7 mg/ml reduziertes hBD3 in einer Mischung aus 5%iger Essigsäure und Ammoniumcarbonat ((NH₄)₂CO₃) bei pH 6 gelöst und unter Zugabe von 20% (v/v) DMSO für 6 Tage bei RT oxidiert wurde. Aus dem Isomerengemisch wurde das Hauptprodukt chromatographisch isoliert. Das durch ESIMS (API 100, ABI) ermittelte Molekulargewicht von hBD3 stimmte mit dem theoretisch berechneten Molekulargewicht von 4656,6 Da überein. Angaben zur Synthese von hBD4 wurden bereits publiziert (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Derivate von hBD3 und hBD4 mit den oben genannten Methoden synthetisiert. Dabei handelte es sich um Strukturisomere, um verkürzte Formen und um Derivate, in denen Cystein durch Arginin oder Tryptophan ersetzt wurden. Die Einführung der Disulfidbrücken bei den Strukturisomeren musste dabei für jedes Derivat

individuell untersucht werden. Im Falle von hBD3 (I₁), hBD3-I₃, hBD3-N und allen hBD4-Derivaten wurde von linearen Vorläufermolekülen mit freien Thiolgruppen an allen sechs Cysteinen ausgegangen. Die oxidative Faltung erfolgte unter Verwendung verschiedener Redox-Systeme: hBD3 (I₁), hBD3-I₃ und hBD3-N wurden bei pH 6 (5%ige Essigsäure + (NH₄)₂CO₃) und einer Peptidkonzentration von 0,6 mg/ml unter Zugabe von 20% Dimethylsulfoxid 6 Tage (hBD3 (I₁), hBD3-I₃) bzw. 24 h (hBD3-N) oxidiert. Die hBD4-Derivate wurden bei pH 8 (0,1 M NH₄HCO₃-Puffer mit 2 mM EDTA) und einer Peptidkonzentration von 0,13 mg/ml bei 4 °C in N₂-Atmosphäre unter Zugabe von 2,1 mM Cystein und 0,9 mM Cystin 3 – 6 Tage lang behandelt. Bei hBD4 (1-50) konnte die Ausbeute gesteigert werden, indem der Reaktionsmischung 5 M Guanidinium-Hydrochlorid zugegeben wurde und über drei Tage gegen Pufferlösung mit sinkenden Konzentrationen an Guanidinium-Hydrochlorid dialysiert wurde.

Die Disulfidbrücken der übrigen Derivate (hBD3-I₂ und hBD3-C) wurden selektiv in zwei Reaktionsschritten eingeführt. Dazu wurden bereits bei der Synthese der linearen Vorläufermoleküle Cysteinderivate mit verschiedenen Thiol-Schutzgruppen eingesetzt, was bei geeigneter Wahl der Reaktionsbedingungen eine selektive Verknüpfung zwischen den gewünschten Cysteinen erlaubt. Die Bedingungen waren im Einzelnen wie folgt. hBD3-I₂ (Trityl-Schutzgruppe für C₂, C₃, C₄, C₆; Acetamidomethyl-Schutzgruppe für C₁, C₅): Zwei Disulfidbrücken bildeten sich durch spontane Faltung des in Wasser gelösten linearen Peptids (Peptidkonzentration 0,11 mg/ml, Dauer 4 – 6 Tage), die Einführung der verbleibenden Brücke erfolgte durch Oxidation mit Iod (0,5 mg/ml Peptid in Essigsäure/0,1 M Salzsäure (4:1), 20 Äquivalente Iod, Dauer 2 h). hBD3-C (Trityl-Schutzgruppe für C₂, C₃; Acetamidomethyl-Schutzgruppe für C₁, C₄): die erste Disulfidbrücke wurde durch Oxidation bei pH 6 (5%ige Essigsäure + (NH₄)₂CO₃, Peptidkonzentration 0,6 mg/ml) mit Dimethylsulfoxid (20%) eingeführt, die zweite durch nachfolgende Oxidation mit Iod (0,5 mg/ml Peptid in Essigsäure/0,1 M Salzsäure (4:1), 20 Äquivalente Iod, Dauer 1 h). Die Zuordnung der Disulfidbindungen in den Derivaten erfolgte mittels massenspektrometrischer Untersuchung von Peptidfragmenten, die durch enzymatische Spaltung erhalten wurden. Da Disulfidbrücken unter den gewählten Versuchsbedingungen erhalten bleiben, kann jedem Fragment aufgrund seiner Masse eine Aminosäuresequenz zugeordnet werden, wobei die Sequenz der cysteinhaltigen Fragmente durch Edman-Abbau (Applied Biosystems Modell 473A, ABI) verifiziert wurde. Für hBD3 (I₁) ergab sich folgendes Verbrückungsmuster (C₁-C₂, C₃-C₆, C₄-C₅), das aber nicht dem für alle β-Defensine vorausgesagten Verbrückungsmuster (C₁-C₅, C₂-C₄, C₃-C₆) (TANG UND SELSTED, 1993) entspricht.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chargen synthetischer Peptide hatten eine durch HPLC ermittelte Reinheit von mindestens 95%.

2.13 Datenbankrecherche

2.13.1 Genutzte Datenbanken und Software

Der Vergleich verschiedener sequenzierter DNA-Fragmente untereinander sowie die Übersetzung dieser Nukleotidsequenzen in eine Aminosäureabfolge wurde mit der Sequencher V3.1 Software (ABI) durchgeführt. Die Suche und Analyse öffentlich zugänglicher Sequenzinformation (z.B. EST-Klone, genomische Contigs) in Internetdatenbanken erfolgte auf dem NCBI (National Center for Biotechnology Information)-Server mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, ALTSCHUL *et al.*, 1997). Zur Vorhersage putativer Signalpeptidsequenzen wurde das Programm Signal P V2.0 (NIELSEN *et al.*, 1997) genutzt. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Nukleotidsequenz (Kapitel 3.1) wurde mit Hilfe der WEBIN-Software des *European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk) an *GenBank* übermittelt. Darüber hinaus wurden für die Suche und Analyse neuer Sequenzen weitere in Abbildung 8 angegebene Internetadressen genutzt.

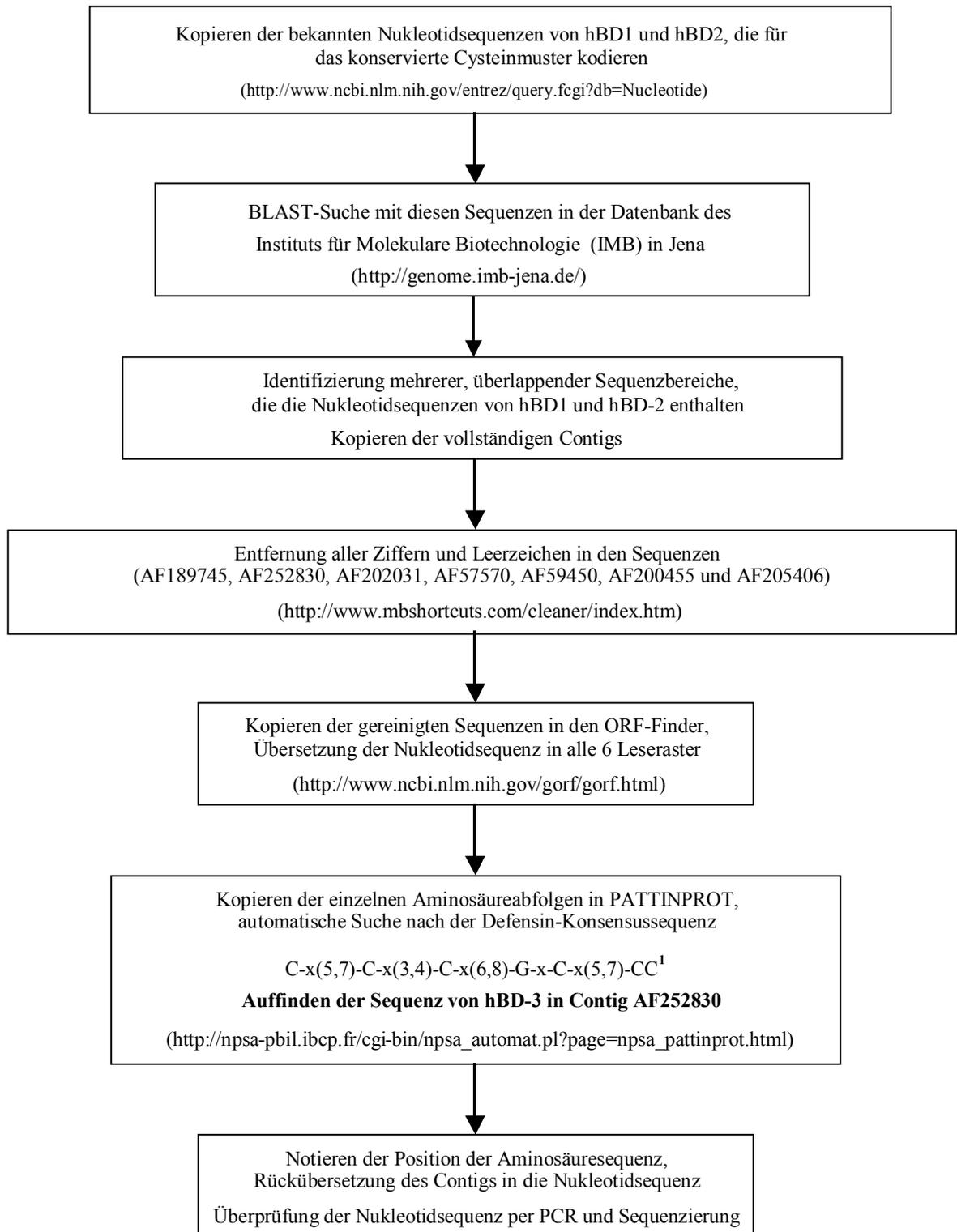
Diese Dissertation wurde mit Programmen des Microsoft Office-Paketes sowie mit Adobe Photoshop und GraphPad PRISM V3.02 erstellt. Die im Ergebnisteil dargestellten Standardabweichungen (SD) wurden mit Excel 97 nach folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{\text{Mittelwert}})^2}{n - 1}}$$

(y_i = Einzel-Messwerte; $y_{\text{Mittelwert}}$ = Mittelwert aller Einzel-Messwerte, n = Anzahl der Replika)

2.13.2 *In silico*-Identifizierung der Nukleotidsequenz von hBD3

Durch die Fortschritte bei der Sequenzierung des humanen Genoms wurden im Verlauf dieser Arbeit immer mehr genomische Nukleotidsequenzen in öffentlichen Datenbanken bereitgestellt. Neben dem Auffinden bisher unbekannter Gene erlaubte die Bereitstellung dieser großen Datenmengen insbesondere die Suche nach weiteren Mitgliedern bereits bekannter Genfamilien. Da die β -Defensine ein hochkonserviertes, von nur einem Exon kodiertes Cysteinmotiv besitzen, eigneten sie sich besonders für die computergestützte Suche nach Homologen. Ein weiterer Vorteil war ihre bekannte chromosomale Lokalisation; zu Beginn dieser Arbeit waren nur zwei auf Chromosom 8 lokalisierte humane β -Defensine bekannt, mittlerweile wurden allerdings weitere Mitglieder dieser Familie auf Chromosom 8, Chromosom 6 und Chromosom 20 identifiziert (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; SCHUTTE *et al.*, 2001; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2003).



¹ Die Eingabe von 4 variablen Aminosäurebereichen [x(Zahl, Zahl)] war nur bis Ende 2000 möglich. Danach konnten nur noch zwei variable Abstände eingegeben werden.

Abbildung 8: Darstellung zur computergestützten Identifizierung des neuen humanen β -Defensins hBD3.

3. Ergebnisse

3.1 *In silico*-Identifizierung des hBD3-Gens

Im Rahmen der computergestützten Suche nach neuen humanen β -Defensin-Genen (Kapitel 2.13.2) wurde mit Hilfe der Nukleotidsequenzen von hBD1 und hBD2 Datenbanken durchsucht, die Sequenzen des humanen Genoms enthalten. Da die zu Beginn dieser Arbeit bekannten humanen α - und β -Defensine geclustert auf Chromosom 8p22-23 vorlagen, konnte der zu durchsuchende Bereich somit eingeschränkt werden. Es wurden mehrere überlappende genomische Sequenzabschnitte identifiziert, die die Nukleotidsequenzen von hBD1 und hBD2 enthielten (*GenBank* Acc.-No.: AF252830, AF189745, AF202031, AF57570, AF59450, AF200455 und AF205406). Alle Datenbankeinträge waren kurz zuvor von am Humanen Genomprojekt (HUGO) beteiligten Instituten erstellt und publiziert worden. Nach Bearbeitung und Übersetzung der Nukleotidsequenzen in alle sechs Leseraster wurde mit Hilfe des Programms PATTINPROT (Abbildung 8) die Aminosäuresequenzen nach dem für β -Defensine-typischen Cystein-Motiv durchsucht. In der Sequenz des Datenbankeintrages AF252830 auf Chromosom 8p23 konnte dann das Gen für ein neues putatives β -Defensin identifiziert werden, das im folgenden als hBD3 bezeichnet wird.

```

1                               5'-catccagtctcagcgtgggggtgaagcctagcagct                               35

1          M R I H Y L L F A L L F L F L V P V P                               19
36          ATGAGGATCCATTATCTTCTGTTTGTCTTTGCTCTTCCCTGTTTTTGGTGCCTGTTCCAG|          93
              (hBD3 for)                               Intron 1 (943 bp)

20          G H G G I I N T L Q K Y Y C R V R G G R                               39
94          GTCATGGAGGAATCATAAACACATTACAGAAATATTATTGCAGAGTCAGAGGCGGCCG          151

40          C A V L S C L P Q E E Q I G K C S T R                               58
152         GTGTGCTGTGCTCAGCTGCCTTCCAAAGGAGGAACAGATCGGCAAGTGCTCGACGCGT          209

59          G R K C C R R K K *                               67
210         GGCCGAAATGCTGCCGAAGAAAGAAATAAaaaccctgaaacatgacgagagtgttg-3'          266
              (hBD3 rev)

```

Abbildung 9: cDNA-Sequenz und abgeleitete Primärstruktur von hBD3. Kodierende Sequenzabschnitte sind in Großbuchstaben dargestellt, das putative Signalpeptid ist rot markiert. Die Aminosäuresequenz des zuerst synthetisierten und in Bioassays getesteten hBD3 ist fett gedruckt. Lage und Orientierung der für die Überprüfung der cDNA eingesetzten Oligonukleotide sowie die Länge und Position des Introns (|) sind angegeben.

Mit Hilfe des Programms Signal P V2.0 (NIELSEN *et al.*, 1997) wurde anschließend in 5'-Richtung die Nukleotidsequenz für ein putatives Signalpeptid identifiziert. Von der erhaltenen Sequenz wurden Oligonukleotidprimer abgeleitet (Abbildung 9), mit deren Hilfe die vollständige

hBD3-cDNA aus Lungenepithel, welches ein häufiger Expressionsort von antimikrobiellen Peptiden ist, kloniert und sequenziert werden konnte. Die dabei erhaltene cDNA-Sequenz (einsehbar in *GenBank* Acc.-No.: AF295370) war identisch mit der vorhergesagten Sequenz und kodiert für ein Peptid von 67 Aminosäuren. Durch Vergleich von cDNA- und genomischer DNA-Sequenz konnte die Position und Länge des Introns bestimmt werden. Das hBD3-Gen besteht, wie bei β -Defensinen üblich, aus 2 Exonen, die von einem 943 bp langen Intron getrennt werden (Abbildung 9). Gemäß einer neuen Nomenklatur (HUGO GENE NOMENCLATURE COMMITTEE, 2002) werden Gene, die für humane β -Defensine kodieren, mit *DEFBx* benannt. So lautet die neue Bezeichnung für das hBD3-Gen *DEFB103*. Die Benennung der abgeleiteten Peptide wird noch unterschiedlich gehandhabt, so wird das von *DEFB103* abgeleitete Peptid als hBD3, hBP3 oder auch BD3 bezeichnet. In dieser Arbeit wird durchgehend die Bezeichnung hBD3 für Gen und abgeleitetes Peptid verwendet.

Die in Abbildung 9 dargestellte cDNA-Sequenz von hBD3 kann in *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) eingesehen werden. Die entsprechenden Zugangsnummern (Acc.-No.) sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Datenbankeinträge für hBD3

Titel des Eintrags	Acc.-No.
<i>Homo sapiens</i> mRNA for beta-defensin 3	AF301470
<i>Homo sapiens</i> mRNA for beta defensin-3	AF217245
<i>Homo sapiens</i> mRNA for beta-defensin-3	AJ237673
<i>Homo sapiens</i> mRNA for beta-defensin 3	AF295370
<i>Homo sapiens</i> mRNA for beta defensin 103 (<i>DEFB103</i>)	NM_018661
<i>Homo sapiens</i> mRNA for beta-defensin-3	AF516673

3.2 Expressionsanalyse von hBD3

3.2.1 Endogene Expression von hBD3 in humanen Geweben

Transkripte antimikrobieller Peptide werden bevorzugt an Orten mikrobieller Besiedlung wie z.B. Schleimhäuten, Hautepithel und Leukozyten erwartet (GANZ, 1999; RISSO, 2000). Im Rahmen einer Expressionsanalyse wurde die Genexpression von hBD3 in 25 humanen Geweben analog zu dem in 2.4.2 beschriebenen Echtzeit-PCR-Verfahren durchgeführt und quantitativ ausgewertet. Die Sequenzen der für die Echtzeit-PCR eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 dargestellt, als endogene Amplifikationskontrolle diente 18S-rRNA (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a).

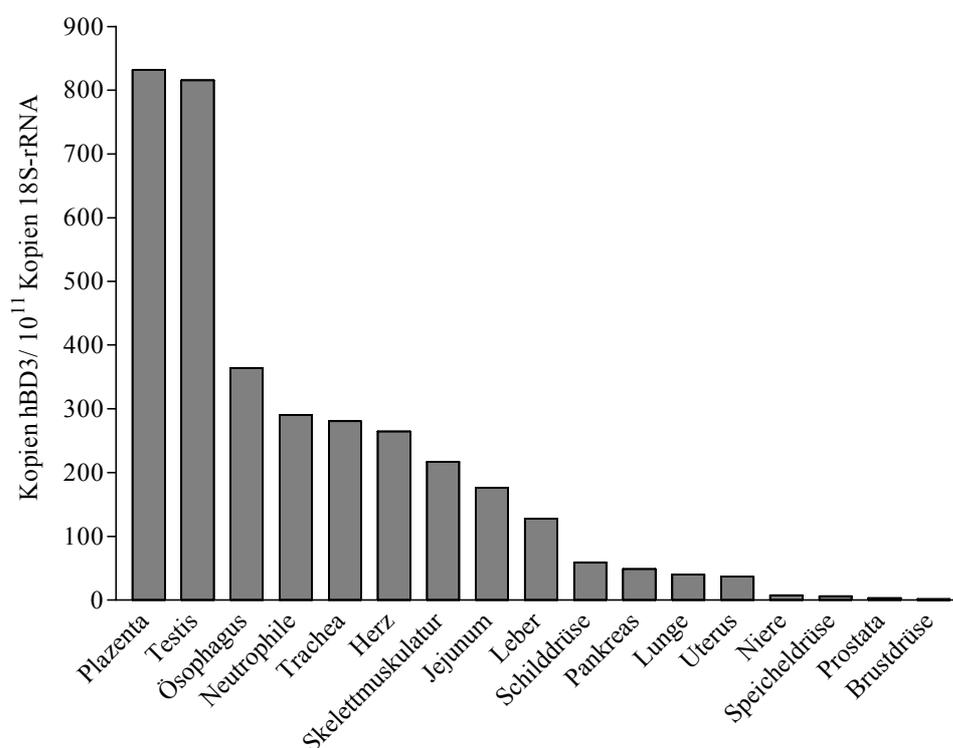


Abbildung 10: Endogene Expression von hBD3 in humanen Geweben. Die Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve, die aus Verdünnungsstufen eines hBD3-Referenzplasmids mit bekannter Kopienzahl erstellt wurde. Transkriptionsraten können deshalb als Kopienzahl der Zielsequenz pro 10¹¹ Kopien 18S-rRNA dargestellt werden. Diese Ergebnisdarstellung hat den Vorteil, dass man die Transkription von verwandten Sequenzen (z.B. von anderen β -Defensinen) in einem Gewebe quantitativ miteinander vergleichen kann.

Wie der Abbildung 10 zu entnehmen ist, konnten Transkripte von hBD3 in 17 von 25 getesteten Geweben detektiert werden, wobei die Transkriptzahlen in Brustdrüse, Prostata, Speicheldrüse und Niere am Detektionslimit liegen. In Magen (Antrum, Fundus und Corpus), Gehirn, Kleinhirn, Dickdarm, Enddarm und Harnblase wiederum konnten keine Transkripte nachgewiesen werden. Für humane β -Defensine (hBD1 und hBD2) wurden bisher als Ort der Expression überwiegend epitheliale Gewebe beschrieben (HARDER *et al.*, 1997; VALORE *et al.*, 1998; ZUCHT *et al.*, 1998), insofern ist die Expression in Skelettmuskulatur bemerkenswert, da

dieses Gewebe nicht-epithelialen Ursprungs ist. Die höchste Transkriptionsrate ergab sich allerdings für Plazenta und erstaunlicherweise für Hoden. HARDER *et al.* (2001) wiederum wiesen die höchste hBD3-Expression parallel zu dieser Arbeit in Tonsillen, Haut und Trachea nach. Tonsillen und Haut wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet, aber das Ergebnis für Trachea ist in relativer Übereinstimmung mit der in Abbildung 10 dargestellten Expressionsanalyse. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Gensequenzen mit dem für β -Defensine-typischen Cystein-Motiv im Nebenhoden unterschiedlicher Spezies exprimiert werden (PERRY *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2001; FRÖHLICH *et al.*, 2001; KRAUSE, 2001; YAMAGUCHI *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Deshalb sollte überprüft werden, wie sich die hBD3-Expression, die im untersuchten Gesamthoden (Total-RNA von Clontech, Heidelberg) detektiert wurde, auf Testis und Epididymis verteilt. Zu diesem Zweck wurden aus Orchiektomien stammenden Geweben 6 definierte Gewebeproben (Testis, Rete testis, Caput epididymis, Corpus epididymis, Cauda epididymis und Ductus deferens) entnommen und daraus Total-RNA hergestellt (KRAUSE, 2001). Die Expressionsanalyse wurde analog zu dem in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Verfahren durchgeführt und ergab für hBD3 lediglich eine minimale, am Detektionslimit liegende Expression in Testis, Rete testis und Caput epididymis.

3.2.2 Stimulation der hBD3-Expression in humanen Keratinozyten

Durch Stimulation mit proinflammatorischen Agenzien sollte überprüft werden, ob hBD3, wie für hBD1 beschrieben (ZHAO *et al.*, 1996), konstitutiv exprimiert wird, oder ob die Expression von hBD3 induzierbar ist, wie für hBD2 gezeigt werden konnte (HARDER *et al.*, 2000).

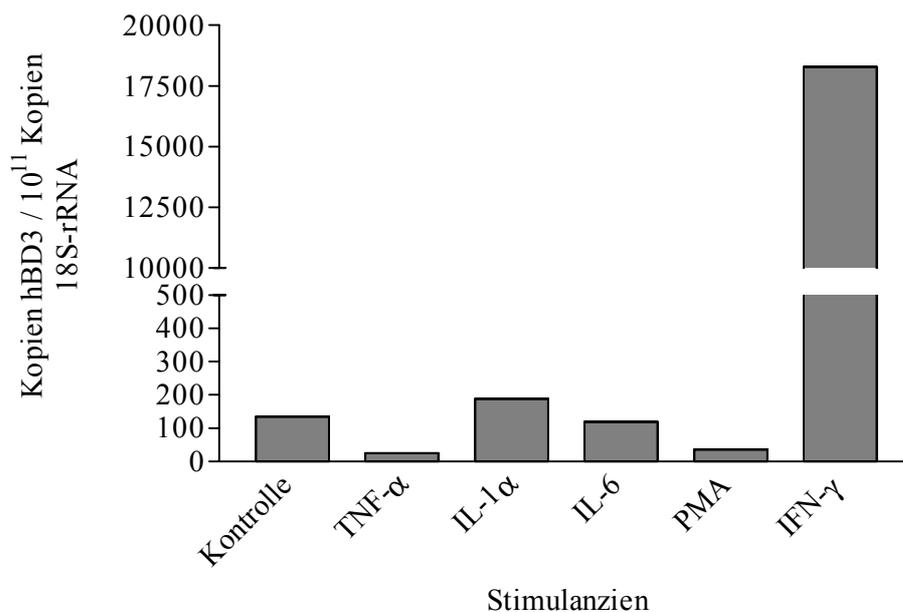


Abbildung 11: Induktion der endogenen Expression von hBD3 in humanen HaCaT-Zellen. Die Stimulation wurde in Triplika durchgeführt und ergab identische Ergebnisse. Verwendete Konzentrationen: siehe Kapitel 2.7.3.

Da antimikrobielle Peptide oftmals an Orten mikrobieller Besiedlung wie z.B. Hautepithel exprimiert werden, was unter anderem bei hBD2 der Fall ist (HARDER *et al.*, 1997), wurde für die Stimulation eine humane Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) verwendet, die eine basale hBD3-Expression aufweist. hBD3 zeigt in HaCaT-Zellen eine durch IFN- γ induzierbare Expression (Abbildung 11), während nach Stimulation mit TNF- α , IL-1 α , IL-6 und PMA keine Hochregulation der endogenen Expression zu beobachten war. HARDER *et al.* (2001) wiederum konnten zeigen, dass die Expression von hBD3 in humanen primären Keratinozyten durch Stimulation mit einem mukoiden *Pseudomonas aeruginosa* (klinisches Isolat) hochreguliert wird, während die Stimulation mit TNF- α in diesem Zelltyp ebenfalls keinen Effekt hat.

3.3 Peptidsynthese

Um biologische Wirkungen zu untersuchen, wurden nach den in Kapitel 2.12 beschriebenen Techniken verschiedene hBD3-Peptide chemisch-synthetisch hergestellt (Tabelle 11), gereinigt und charakterisiert. Sie dienten darüberhinaus zur Analyse der Struktur-Aktivitätsrelation (SAR), was für β -Defensine bislang nur in untergeordneten Maße durchgeführt wurde.

Tabelle 11: Synthetische hBD3-Peptide.

Derivat	Sequenz	Molekulargewicht (theoretisch/experimentell)	Ausbeute (mg)
<u>Zyklische Peptide</u>			
hBD3 (I ₁)	LQKYYCRVRGGRC AVLS SCLPKEEQIGK C STRGRK CC RRKK	4656,6 / 4656,1	7
hBD3-I ₂	LQKYYCRVRGGRC AVLS SCLPKEEQIGK C STRGRK CC RRKK	4656,6 / 4656,2	16,5
hBD3-I ₃	GIINTLQKYYCRVRGGRC AVLS SCLPKEEQIGK C STRGRK CC RRKK	5155,1 / 5154,3	11,1
<u>Lineare Peptide</u>			
hBD3-Cam	LQKYYC* R VRGGRC* AVLS C* L PKKEEQIGK C *STRGRK C * C *RRKK	5005,2 / 5005,0	25,8
[Ala]-hBD3	LQKYYA R VRGGRA AVLS ALPKEEQIGKA S TRGRKA AA RRKK	4470,2 / 4470,0	74
[Trp]-hBD3	LQKYYW R VRGGRW AVLS WLPKEEQIGKW S TRGRKW WW RRKK	5161,1 / 5161,9	156,3
hBD3-N	LQKYYCRVRGGRC AVLS	1970,3 / 1969,8	18,7
[Ala]-hBD3-N	LQKYYA R VRGGRA AVLS	1908,2 / 1908,0	78,6
[Trp]-hBD3-N	LQKYYW R VRGGRW AVLS	2138,5 / 2137,8	83,1
hBD3-C	AVLS SCLPKEEQIGK C STRGRK CC RRKK	3074,7 / 3074,7	54
[Ala]-hBD3-C	AVLS ALPKEEQIGKA S TRGRKA AA RRKK	2950,5 / 2949,9	58,4
[Trp]-hBD3-C	AVLS WLPKEEQIGKW S TRGRKW WW RRKK	3411,0 / 3410,5	172,1

I₁₋₃ bezeichnen Disulfidomere, zyklisch beschreibt Peptide mit Disulfidverbrückung, linear steht für Peptide ohne Disulfidverbrückung. Konservierte Cysteine sind fett markiert, im Austausch gegen Cystein eingeführtes Tryptophan oder Alanin ist rot dargestellt. Cam steht für Alkylierung mit Carboxamidomethyl, die Position der Alkylierung ist mit * markiert. hBD3-N bezeichnet ein N-terminales und hBD3-C ein C-terminales Fragment. Die Ausbeute ist jeweils bezogen auf einen Synthesemaßstab von 0,1 mmol angegeben. Desweiteren sind das theoretisch erwartete und anschließend experimentell bestimmte Molekulargewicht angegeben.

Im Verlauf der oxidativen Faltung des linearen Vorläuferpeptids von hBD3 entstanden mehrere Produkte mit unterschiedlichen Disulfidverbrückungen. Im Gegensatz dazu bildete sich bei der oxidativen Faltung von hBD4 jeweils nur ein Produkt mit der für β -Defensine erwarteten Disulfidverbrückung (TANG UND SELSTED, 1993). Bei der Auswahl der Derivate standen in Bezug auf die antimikrobielle Potenz folgende Fragen im Vordergrund: 1) Welchen Einfluss hat die Disulfidverbrückung? 2) Welchen Einfluss hat die Länge der Aminosäuresequenz?

Insgesamt wurden drei verschiedene Disulfidisomere von hBD3 synthetisiert, die als hBD3-I₁₋₃ bezeichnet werden. hBD3 (I₁) ist identisch mit der von CONEJO-GARCÍA *et al.* (2001a) identifizierten und in Bioassays verwendeten Form von hBD3. Es hat eine Länge von 40 Aminosäuren und weist eine für β -Defensine unerwartete Disulfidverbrückung auf (C₁-C₂, C₃-C₆ und C₄-C₅). hBD3-I₂ hat die identische Aminosäuresequenz, zeigt aber eine alternative, für β -Defensine ebenfalls untypische, Disulfidverbrückung (C₁-C₅, C₂-C₃ und C₄-C₆). hBD3-I₃ ist bezüglich der Länge identisch mit der von HARDER *et al.* (2001) isolierten Form von hBD3. Dieses Strukturisomer ist N-terminal um fünf Aminosäuren länger und weist die für β -Defensine vorhergesagte Verbrückung auf (C₁-C₅, C₂-C₄ und C₃-C₆) (TANG UND SELSTED, 1993). hBD3-Cam ist ein lineares Derivat mit 40 Aminosäureresten, dessen Cysteine mit Carboxamidomethyl alkyliert sind, wodurch eine Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert wird. Bei [Ala]-hBD3 und [Trp]-hBD3 handelt es sich um lineare Derivate mit 40 Aminosäureresten, bei denen die konservierten Cysteine gegen Tryptophan- bzw. Alaninreste ausgetauscht wurden; eine Ausbildung von Disulfidbrücken ist nicht mehr möglich. hBD3-N entspricht dem N-terminalen Teil von hBD3 (I₁). Es ist 17 Aminosäuren lang und enthält eine Disulfidbrücke (C₁-C₂). hBD3-C bezeichnet ein C-terminales Fragment von hBD3 (I₁) mit 27 Aminosäureresten und zwei Disulfidverbrückungen (C₃-C₆ und C₄-C₅). Bei den linearen Fragmenten [Ala]/[Trp]-hBD3-N und [Ala]/[Trp]-hBD3-C wurden alle Cysteine der genannten N- und C-terminalen Fragmente gegen Tryptophan oder Alanin ausgetauscht, so dass auch hier eine Ausbildung der Disulfidbrücken nicht möglich ist. Desweiteren wurden Peptide des kürzlich identifizierten hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001) synthetisiert und zum Vergleich bezüglich der Struktur-Aktivitätsrelation herangezogen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Synthetische hBD4-Peptide.

Derivat	Sequenz	Molekulargewicht (theoretisch/experimentell)	Ausbeute (mg)
<u>Zyklische Peptide</u>			
hBD4 (3-39)	ELDRICGYGTAR CR KKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRK	4366,1 / 4366,4	1,2
hBD4 (1-39)	EFELDRICGYGTAR CR KKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRK	4642,4 / 4641,9	12,9
hBD4 (1-50)	EFELDRICGYGTAR CR KKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRKWDESLNRTKP	5982,9 / 5982,3	1,0
<u>Lineare Peptide</u>			
[Ala]-hBD4	EFELDRIC AG YGTAR AR KK AR SQEYRIGR AP NTY AA LRK	4456,0 / 4456,0	38,6
[Trp]-hBD4	EFELDRIC WG YGTAR WR KK WR SQEYRIGR WP NTY AW LRK	5146,9 / 5147,0	144,5

hBD4 (3-39) entspricht der von CONEJO-GARCÍA *et al.* (2001b) beschriebenen und in Bioassays getesteten Form, zyklisch beschreibt Peptide mit Disulfidverbrückung, linear steht für Peptide ohne Disulfidverbrückung. Konservierte Cysteine sind fett markiert, im Austausch gegen Cystein eingeführtes Tryptophan oder Alanin ist rot dargestellt. Die Ausbeute ist bezogen auf einen Synthesemaßstab von 0,1 mmol angegeben. Desweiteren sind das theoretisch erwartete und anschließend experimentell bestimmte Molekulargewicht angegeben.

hBD4 (3-39) hat eine Länge von 37 Aminosäuren und entspricht der von CONEJO-GARCÍA *et al.* (2001b) publizierten Form. Die Disulfidverbrückung stimmt mit dem für β -Defensine vorrausgesagten Verbrückungsmuster (C₁-C₅, C₂-C₄ und C₃-C₆) überein. hBD4 (1-39) ist N-terminal um zwei Aminosäuren länger als hBD4 (3-39), die Variante hBD4 (1-50) ist zusätzlich C-terminal um 11 Aminosäuren verlängert. Beide Derivate weisen ebenfalls die für β -Defensine vorrausgesagte Disulfidverbrückung auf (C₁-C₅, C₂-C₄ und C₃-C₆). Bei [Ala]-hBD4 und [Trp]-hBD4 handelt es sich um lineare Derivate mit 39 Aminosäureresten, bei denen die konservierten Cysteine gegen Tryptophan bzw. Alanin ausgetauscht wurden. Eine Ausbildung von Disulfidbrücken ist nicht mehr möglich.

3.4 Antimikrobielle Aktivität von hBD3

3.4.1 Radial-Diffusions-Hemmtest

Da der Radial-Diffusions-Hemmtest (LEHRER *et al.*, 1991) eine sehr sensitive Methode zum Nachweis antimikrobieller Aktivität darstellt, wurde in einem ersten Versuchsansatz synthetisches hBD3 (hBD3 (I₁)) mit diesem Verfahren gegen verschiedene nicht-pathogene Keime getestet. Da antimikrobielle Peptide meist über ein breites Wirkungsspektrum verfügen (HANCOCK, 1997; RISSO, 2000), wurde gegen drei Gram-positive, einen Gram-negativen Keim sowie eine Hefe getestet. Durch den Einsatz von verschiedenen Konzentrationen von hBD3 sollte eine dosisabhängige Aktivität identifizierbar sein. Die Ergebnisse des Radial-Diffusions-Hemmtests sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Antimikrobielle Aktivität von hBD3 (I₁) im Radial-Diffusions-Hemmtest.

Bakterienstamm	Gram-Färbung	Aktivität von hBD3 (I ₁) [U]*		
		1 µg	10 µg	20 µg
<i>Staphylococcus carnosus</i> TM300	+	30	60	80
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6051	+	0	40	70
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	+	20	60	80
<i>Escherichia coli</i> BL21	-	45	70	90
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC9763	Hefe	0	30	60

1 Unit [U] = 0,1 mm Hemmhofdurchmesser (LEHRER *et al.*, 1991).

Die Auswertung des Hemmtests ergab eine dosisabhängige Aktivität von hBD3 gegen alle getesteten Bakterienstämme. Lediglich bei dem Gram-positiven *Bacillus subtilis* und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte mit der niedrigsten hBD3 Konzentration keine Hemmung des antimikrobiellen Wachstums detektiert werden.

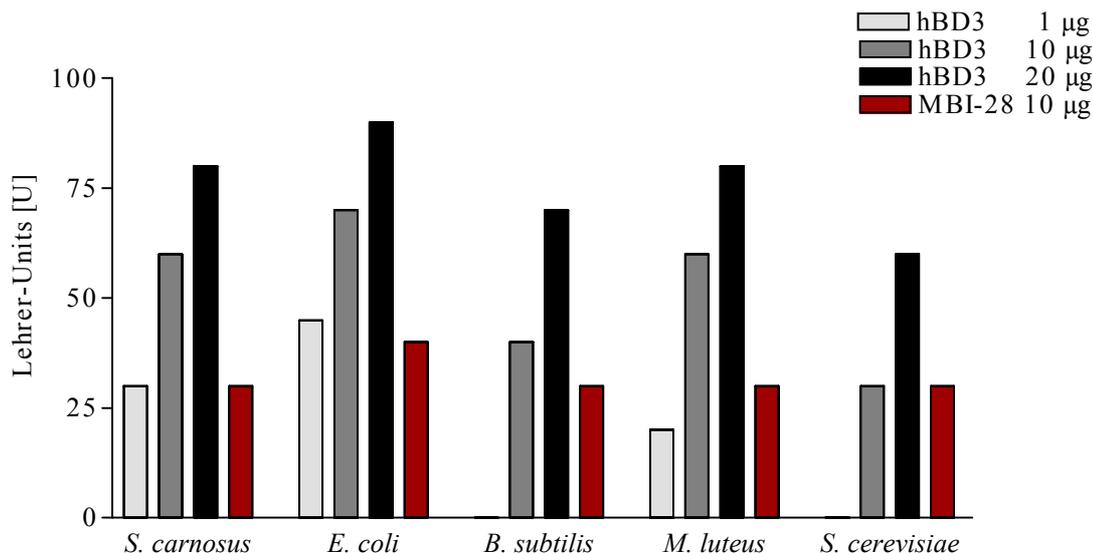


Abbildung 12: Antimikrobielle Aktivität von hBD3 (I₁) gegen *Staphylococcus carnosus* TM300, *Bacillus subtilis* ATCC6051, *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Escherichia coli* BL21 und *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763. Als Positivkontrolle dienten 10 µg MBI-28 (GOUGH *et al.*, 1996). Die Auswertung zeigt die dosisabhängige Wirkung von hBD3 gegen die untersuchten Keime. 1 Unit entspricht dabei 0,1 mm Hemmhofdurchmesser. Da der Radial-Diffusions-Hemmtest nur bedingt quantitative Aussagen über die Aktivität eines Peptids zulässt und zeitweise nur eine geringe Menge an synthetischem Peptid zur Verfügung stand, wurde dieses Experiment lediglich einmal durchgeführt.

Der Radial-Diffusions-Hemmtest ist zwar eine sehr sensitive Methode, ermöglicht aber nur bedingt eine vergleichende quantitative Auswertung, da die Diffusion des jeweiligen Peptids und somit auch die Größe eines möglichen Hemmhofs von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Unter Idealbedingungen ist der Durchmesser des Hemmhofs direkt proportional zum Logarithmus der aufgetragenen Peptidkonzentration, aber verschiedene Faktoren wie Molekülgröße und –ladung, Wasserlöslichkeit der zu testenden Substanz, Dicke und Konzentration der Agarschicht können die Diffusion und somit die Hemmhofgröße stark beeinflussen. Insofern müssen andere Testverfahren wie z.B. die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration angewendet werden, um verschiedene Peptide quantitativ miteinander vergleichen zu können.

3.4.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von hBD3

Die Bestimmung des MIC-Wertes (*minimal inhibitory concentration*) stellt eine weitere Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität eines Peptides dar. Im Gegensatz zum Radial-Diffusions-Hemmtest, der nur bedingt eine vergleichende quantitative Auswertung erlaubt, können MIC-Werte unter Beachtung der Versuchsbedingungen zu einem direkten Vergleich verschiedener Peptide herangezogen werden. Der MIC-Wert, der üblicherweise in der Literatur als Referenzwert für die antimikrobielle *in vitro*-Wirksamkeit angegeben wird, ist abhängig von Parametern wie Inkubationszeit, Größe des bakteriellen Inokulums oder der Ionenstärke des eingesetzten Mediums, so dass diese bei einem Vergleich

beachtet werden müssen (ISENBERG, 1993). Das synthetische hBD3 (hBD3 (I₁)) zeigt in den ionenschwächeren Medien (1/10 Tryptic-Soy-Broth oder ¼ Mueller-Hinton-Broth) eine bemerkenswerte antimikrobielle Aktivität gegen die im Test befindlichen pathogenen und nicht-pathogenen Erreger (Tabelle 14), wobei kein auffälliger Unterschied zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu erkennen ist. Allerdings konnte die von HANCOCK (1997) als MIC-Wert für klinisch relevante antimikrobielle Peptide geforderte Größenordnung von 1-8 µg/ml nur in zwei Fällen gegen nicht-pathogene Bakterien erreicht werden.

Tabelle 14: Minimale Hemmkonzentrationen von hBD3 gegen pathogene und nicht-pathogene Keime.

Bakterienstamm	Gram-Färbung	MIC [µg/ml]		
		1/10 TSB	¼ MHB	MHB
nicht-pathogen				
<i>Staphylococcus carnosus</i> TM300	+	2,6	n.b.	n.b.
<i>Escherichia coli</i> BL21	-	6,6	n.b.	n.b.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC9763	Hefe	13,2	n.b.	n.b.
pathogen				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+	18,75	9,4	>300
<i>Streptococcus pneumoniae</i> DSM11865	+	300	18,75	>300
<i>Escherichia coli</i> DSM 1103	-	18,75	12,5	300
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM681	-	100	12,5	300
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM1128	-	9,375	18,75	>300
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC17770	-	>200	>300	n.b.
<i>Burkholderia cepacia</i> CF-Isolat I	-	>200	>300	n.b.
<i>Burkholderia cepacia</i> CF-Isolat II	-	>200	>300	n.b.

Die MIC-Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen Experimenten, die höchste getestete Peptidkonzentration war je nach Experiment 200 oder 300 µg/ml. Die MIC-Werte für das Kontrollpeptid MBI-28 lagen in allen getesteten Medien mit Ausnahme von *Streptococcus pneumoniae* zwischen 1,56 und 18,75 µg/ml.

Bei den getesteten Stämmen und Isolaten von *Burkholderia cepacia*, der für seine Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden bekannt ist (ANDREU UND RIVAS, 1998), konnte keine antimikrobielle Aktivität von hBD3 beobachtet werden, obwohl dies in der Literatur abweichend beschrieben wurde (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a). In dem ionenstärkeren MHB-Medium kann für hBD3 nur noch eine sehr schwache oder gar keine antimikrobielle Aktivität gegen die getesteten pathogenen Bakterien detektiert werden. Dies steht im Gegensatz zu der in 3.4.3. dargestellten Bestimmung der Salzabhängigkeit von hBD3, wo sich hBD3 im Test gegen den nicht-pathogenen *Staphylococcus carnosus* als relativ unempfindlich gegenüber der Mediensalzkonzentration erwies. Die Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von der

Salzkonzentration scheint sich bei unterschiedlichen Keimen verschieden stark auszuprägen (TURNER *et al.*, 1998), desweiteren scheint die Aktivität auch von der Art der Ionen (ein- oder zweiwertig) abhängig zu sein. Für das Kontrollpeptid MBI-28, das in seiner Aktivität unempfindlich gegen die Mediensalzkonzentration ist (FRIEDRICH *et al.*, 1999), ergaben sich in allen getesteten Medien MIC-Werte von 1,56-18,75 µg/ml. Einzige Ausnahme war *Streptococcus pneumoniae* DSM11865, bei dem sich MBI-28 als sehr schwach aktiv erwies. Im Vergleich damit muss man die antimikrobielle Potenz von hBD3 als geringer einstufen. hBD3 zeigt zwar in dem ionenschwachen 1/10 TSB-Medium eine starke antimikrobielle Aktivität gegen die nicht-pathogenen Keime, aber im Test gegen die pathogenen Erreger ergibt sich nur eine moderate Aktivität. Im ionenstärkeren MHB-Medium schließlich wird nur noch eine minimale antimikrobielle Aktivität gegen zwei Pathogene beobachtet.

3.4.3 Einfluss der Salzkonzentration auf die antimikrobielle Aktivität von hBD3

Viele antimikrobielle Peptide, wie z.B. die humanen β -Defensine hBD1, hBD2 und hBD4 (BALS *et al.*, 1998; VALORE *et al.*, 1998; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b), zeigen in ihrer antimikrobiellen Aktivität eine starke Abhängigkeit von der Salzkonzentration des Testmediums. So ist die Wirksamkeit vieler Peptide in Medien und Puffern mit niedriger Ionenstärke gut messbar, während unter Verwendung physiologischer Salzkonzentrationen keine Aktivität mehr nachweisbar ist.

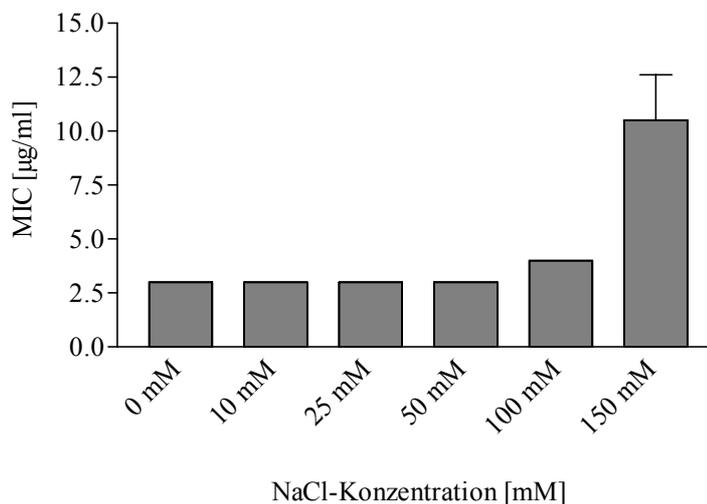


Abbildung 13: Antimikrobielle Aktivität von hBD3 (I₁) in 1/10 TSB-Medium, dem verschiedene Konzentrationen von NaCl zugesetzt worden war. 150 mM NaCl entspricht dabei einer physiologischen Salzkonzentration. Als Testkeim diente der nicht-pathogene *Staphylococcus carnosus* TM300 (Gram-positiv). Die MIC-Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen Experimenten und waren bis auf die höchste Konzentration identisch.

hBD3 zeigt gegen den nicht-pathogenen *Staphylococcus carnosus*, der als Modellsystem gewählt wurde, eine von der Mediensalzkonzentration weitestgehend unabhängige antimikrobielle Aktivität (Abbildung 13). Nur bei der physiologischen Konzentration von 150 mM NaCl steigt

der MIC-Wert von 3 auf knapp über 10 $\mu\text{g/ml}$ an. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem von HARDER *et al.* (2001) publizierten Befund, dass hBD3 im physiologischen Bereich gegen den pathogenen *Staphylococcus aureus* ATCC6538 eine von der NaCl-Konzentration unabhängige antimikrobielle Aktivität zeigt. In Kapitel 3.4.2 konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von hBD3 in MHB-Medium, das einen höheren Gehalt an zweiwertigen Ionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} besitzt, kaum noch nachweisbar ist, während in $\frac{1}{4}$ MHB noch gute Aktivität erzielt werden konnte. Erdalkaliionen wiederum werden als wichtiger Faktor bei der Interaktion von bakterieller Membran und Peptid angesehen (HANCOCK UND SCOTT, 2000), da sie mit den Peptiden um die Bindestellen konkurrieren. Den vorliegenden Ergebnissen nach scheint die antimikrobielle Aktivität von hBD3 sowohl von der Menge als auch von der Art der Ionen (ein- oder zweiwertig) abhängig zu sein.

3.4.4 Interaktion von hBD3 mit anderen antimikrobiell aktiven Substanzen

Ein einzelner Organismus kann bis zu drei Dutzend strukturell verschiedene antimikrobielle Peptide synthetisieren (TOSSI, 2002). Diese können sowohl einzeln als auch in Kombination mit anderen antimikrobiellen Substanzen wirken (YAN UND HANCOCK, 2001). Dabei kann es sich um körpereigene Substanzen wie z.B. Lysozym, als auch um von außen zugeführte Arzneimittel handeln. Die Art der Interaktion zweier Substanzen hängt jeweils von dem Wirkmechanismus der Einzelsubstanzen ab. Mit Hilfe der Schachbrett-Titration (Kapitel 2.6.3) wurden für hBD3 mögliche Interaktionen mit dem kürzlich identifizierten hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001), mit Lysozym, einem sehr wichtigen endogenen Antibiotikum, und mit dem klassischen Antibiotikum Ampicillin untersucht. Als Testkeim diente der nicht-pathogene *Staphylococcus carnosus* TM300 (Gram-positiv), die ermittelten Werte für den FIC-Index (*fractional inhibitory concentration*) sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

Tabelle 15: Interaktion zwischen hBD3 und verschiedenen antimikrobiell aktiven Substanzen gegen *Staphylococcus carnosus*.

Getestete Substanz	FIC-Index *	Interaktionstyp
hBD4	$> 0,5 < 1$	Additivität
Lysozym	$< 0,5$	Synergismus
Ampicillin	$> 1 < 2$	Indifferenz

Als Testmedium wurde 1/10 TSB verwendet. Der FIC-Index wurde jeweils aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. * Zur Berechnung des FIC-Indexes siehe Kapitel 2.6.3.

Für die Kombination hBD3/hBD4 ergibt sich ein additiver Effekt an der Grenze zum Synergismus. In Kombination mit Lysozym wurde eine synergistische Wirkung beobachtet, wie es für antimikrobielle Peptide bereits beschrieben wurde (TRAVIS *et al.*, 2001; YAN UND HANCOCK, 2001). Lysozym spaltet die Polysaccharid-Ketten des Mureins in der bakteriellen Zellwand und erleichtert den antimikrobiellen Peptiden das Eindringen in die Bakterienzelle. Die

Kombination hBD3/Ampicillin ergibt Indifferenz, d.h., dass sich beide Substanzen in ihrer Wirkung nicht beeinflussen. Für hBD3 wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt, dass die von HARDER *et al.* isolierte Form von hBD3 in einer sehr hohen Konzentration von 500 µg/ml innerhalb von 2 Stunden die bakterielle Zellmembran perforiert (HARDER *et al.*, 2001). Ampicillin wiederum stört die Mureinbiosynthese der Bakterien, d.h., es wirkt nur auf Bakterien, die sich in der Wachstumsphase befinden. Ampicillin zeigt zwar die deutlich stärkere antimikrobielle Aktivität, kann aber nur auf wachsende Bakterien wirken. Für hBD3 kann aufgrund des Wirkmechanismus vermutet werden, dass es auf alle Bakterienzellen wirkt, und damit das Ampicillin in seiner Wirkung dahingehend beeinträchtigt, dass es bei der Kombination beider Substanzen keinen additiven oder synergistischen Effekt gibt.

3.5 Antimikrobielle Aktivität von hBD3-Peptiden

Für die Erhebung von Daten zur Struktur-Aktivitätsrelation (SAR) bei β -Defensinen wurden verschiedene Derivate von hBD3 synthetisiert (siehe Kapitel 3.3) und auf ihre antimikrobielle Aktivität getestet. Zur Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität wurden die MIC-Werte gegen die Gram-negativen Stämme *Escherichia coli* DSM1103, *Klebsiella pneumoniae* DSM681, *Pseudomonas aeruginosa* DSM1128, und gegen die Gram-positiven Stämme *Staphylococcus aureus* ATCC25923 und *Streptococcus pneumoniae* DSM11865 bestimmt. Zum Vergleich wurde das kürzlich identifizierte hBD4 (3-39) (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001) und davon abgeleitete Derivate (siehe Kapitel 3.3) mitgetestet. Als Kontrollpeptid diente wiederum MBI-28. Um die Derivate auf ihre Abhängigkeit von der Ionenstärke des Mediums zu testen, wurde die MIC-Bestimmung sowohl in $\frac{1}{4}$ MHB als auch in dem ionenstärkeren, kompletten MHB-Medium durchgeführt. Die Ergebnisse für beide Medien sind in den Tabellen 16 und 17 dargestellt.

Beim Vergleich aller Derivate fällt zunächst einmal auf, dass die antimikrobielle Aktivität in dem ionenschwächeren $\frac{1}{4}$ MHB-Medium durchweg stärker ist. Einzige Ausnahme sind die beiden Derivate hBD3-N und hBD3-C, die schon in $\frac{1}{4}$ MHB-Medium nur eine minimale Aktivität zeigten, so dass sie in dem ionenstärkeren MHB-Medium nicht mehr mitgetestet wurden. hBD3-N und hBD3-C entsprechen dem N-terminalen bzw. C-terminalen Teil von hBD3 (I₁) und stellen stark verkürzte Fragmente mit einer bzw. zwei Disulfidbrücken dar. Für Protegrine wurde gezeigt, dass eine Mindestanzahl an Aminosäuren notwendig ist, um die volle antimikrobielle Aktivität der Ausgangsform zu erhalten (FIDDES, 2000). Dabei ist die Ausbildung einer amphipathischen Struktur und die Ladung des Moleküls von größerer Wichtigkeit als das Vorhandensein von spezifischen Aminosäuren. Damit erklärt sich die schwache antimikrobielle Aktivität von hBD3-N und hBD3-C, da aufgrund der kürzer werdenden Aminosäuresequenz die positive Nettoladung bei beiden Derivaten im Vergleich mit dem hBD3 voller Länge zu stark reduziert ist.

Tabelle 16: Minimale Hemmkonzentrationen (MIC) von hBD3- und hBD4-Peptiden in ¼ MHB-Medium (MIC in µg/ml).

Peptid	<i>Escherichia coli</i> DSM1103 (Gram-)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM681 (Gram-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM1128 (Gram-)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 (Gram+)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> DSM11865 (Gram+)
hBD3-Derivate					
hBD3 (I ₁)	12,5	12,5	18,75	9,4	18,75
hBD3-I ₂	6,25	9,4	12,5	6,25	18,75
hBD3-I ₃	12,5	12,5	9,4	12,5	9,4
hBD3-lin	100	75	25	18,75	37,5
hBD3-Cam	12,5	9,4	12,5	12,5	37,5
[Ala]-hBD3	18,75	9,4	12,5	12,5	25
[Trp]-hBD3	18,75	9,4	12,5	12,5	9,4
hBD3-N	>300	>300	>300	300	>300
[Ala]-hBD3-N	150	>300	300	150	>300
[Trp]-hBD3-N	12,5	12,5	18,75	12,5	18,75
hBD3-C	>300	>300	>300	150	>300
[Ala]-hBD3-C	75	300	>300	75	>300
[Trp]-hBD3-C	9,4	9,4	12,5	9,4	25
hBD4-Derivate					
hBD4 (3-39)	25	75	37,5	25	75
hBD4 (1-39)	37,5	200	75	50	150
hBD4 (1-50)	25	100	75	37,5	>300
[Ala]-hBD4	150	200	150	150	>300
[Trp]-hBD4	37,5	50	50	37,5	37,5

Die MIC-Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen Experimenten, die höchste getestete Peptidkonzentration war je einmal 200 µg/ml und einmal 300 µg/ml. Die MIC-Werte für das Kontrollpeptid MBI-28 betragen maximal 18,75 µg/ml.

Tabelle 17: Minimale Hemmkonzentrationen (MIC) von hBD3- und hBD4-Peptiden in MHB-Medium (MIC in µg/ml).

Peptid	<i>Escherichia coli</i> DSM1103 (Gram-)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM681 (Gram-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM1128 (Gram-)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 (Gram+)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> DSM11865 (Gram+)
hBD3-Derivate					
hBD3 (I ₁)	300	300	>300	>300	>300
hBD3-I ₂	>300	>300	>300	>300	>300
hBD3-I ₃	>300	>300	37,5	9,4	50
hBD3-lin	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
hBD3-Cam	>300	300	>300	>300	>300
[Ala]-hBD3	>300	>300	>300	>300	>300
[Trp]-hBD3	25	>300	25	18,75	25
hBD3-N	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
[Ala]-hBD3-N	>300	300	>300	>300	>300
[Trp]-hBD3-N	>300	>300	300	150	>300
hBD3-C	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
[Ala]-hBD3-C	>300	>300	>300	>300	>300
[Trp]-hBD3-C	100	>300	>300	>300	>300
hBD4-Derivate					
hBD4 (3-39)	200	300	300	300	>300
hBD4 (1-39)	>300	>300	>300	>300	>300
hBD4 (1-50)	>300	>300	>300	300	>300
[Ala]-hBD4	>300	>300	>300	>300	>300
[Trp]-hBD4	100	>300	>300	>300	>300

Die MIC-Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen Experimenten, die höchste getestete Peptidkonzentration war je einmal 200 µg/ml und einmal 300 µg/ml. Die MIC-Werte für das Kontrollpeptid MBI-28 lagen bei ≤ 18,75 µg/ml, ausser bei *Streptococcus pneumoniae* DSM11865, der sich in MHB-Medium als resistent gegen MBI-28 erwies.

Die im MHB-Medium bei allen Derivaten abnehmende antimikrobielle Aktivität hat ihre Ursache vermutlich im deutlich höheren Gehalt dieses Mediums an Ionen wie Mg²⁺ und Ca²⁺. Wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, scheint die antimikrobielle Aktivität von hBD3 (I₁) stärker von zweiwertigen Ionen wie Mg²⁺ und Ca²⁺ als von einwertigen Ionen wie Na⁺ beeinflusst zu werden. Zweiwertige Ionen wiederum werden als wichtiger Faktor bei der Interaktion von Peptid

und der Zellmembran Gram-negativer Bakterien angesehen (HANCOCK UND SCOTT, 2000), da sie mit den Peptiden um die Bindestellen konkurrieren. Der direkte Vergleich der antimikrobiellen Aktivität der drei Strukturisomere hBD3 (I₁), hBD3-I₂ und hBD3-I₃ ergibt in ¼ MHB-Medium keine auffälligen Unterschiede. Die ermittelten MIC-Werte gegen die fünf im Test verwendeten Keime liegen für alle drei Isomere jeweils zwischen 6,25 und 18,75 µg/ml. Allerdings wurde die von HANCOCK (1997) als MIC-Wert für klinisch relevante antimikrobielle Peptide postulierte Größenordnung von 1-8 µg/ml nur in zwei Fällen von dem Derivat hBD3-I₂ erreicht. hBD3 (I₁), das der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten und zuerst synthetisierten Form entspricht, sowie hBD3-I₂ haben eine Länge von je 40 Aminosäuren und unterscheiden sich nur durch die Art der Disulfidverbrückung, die in beiden Fällen nicht der für β-Defensine vorhergesagten Verbrückung entspricht. Das Strukturisomer hBD3-I₃ ist bezüglich der Aminosäuresequenz und Disulfidverbrückung identisch mit der von Harder *et al.* (2001) isolierten und in Bioassays eingesetzten Form von hBD3. Dieses Derivat ist N-terminal um fünf Aminosäuren länger und weist die für β-Defensine vorhergesagte Verbrückung auf. Das oben beschriebene Ergebnis deutet an, dass die Position der Disulfidbrücken zumindestens in einem ionenschwachen Medium nur wenig Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität hat. Vergleicht man die antimikrobielle Aktivität dieser drei Derivate in dem ionenstärkerem MHB-Medium, werden gewisse Unterschiede sichtbar. Für das Derivat hBD3-I₂ konnte keine antimikrobielle Aktivität mehr nachgewiesen werden, während hBD3 (I₁) noch minimale Aktivität gegen die beiden Gram-negativen Stämme *Escherichia coli* DSM1103 und *Klebsiella pneumoniae* DSM681 zeigt. Allerdings ergab sich gegen beide Keime ein hoher MIC-Wert von 300 µg/ml. Dagegen zeigt das Derivat hBD3-I₃ gegen den Gram-negativen *Pseudomonas aeruginosa* DSM1128 und die beiden Gram-positiven Stämme *Staphylococcus aureus* ATCC25923 und *Streptococcus pneumoniae* DSM11865 eine signifikante antimikrobielle Aktivität mit MIC-Werten zwischen 9,4 (*Staphylococcus aureus*) und 50 µg/ml (*Streptococcus pneumoniae*).

Ein direkter Vergleich mit den von HARDER *et al.* (2001) publizierten Daten ist allerdings nicht möglich, da dort sowohl andere Bakterienstämme als auch eine andere Testmethode verwendet wurde. Gegen die beiden Gram-negativen Keime *Escherichia coli* DSM1103 und *Klebsiella pneumoniae* DSM681 konnte für hBD3-I₃ in MHB-Medium keine Aktivität detektiert werden, was vermuten lässt, dass das Derivat bei einem erhöhten Gehalt von Mg²⁺ und Ca²⁺, wie es in dem MHB-Medium der Fall ist, bevorzugt gegen Gram-positive Keime wirkt. Inwieweit bei hBD3-I₃ die Disulfidverbrückung die antimikrobielle Aktivität beeinflusst, kann mit den vorhandenen Derivaten nicht geklärt werden. Für die Klärung dieser Frage würde ein Strukturisomer mit der kürzeren Aminosäuresequenz und der für β-Defensine-typischen Disulfidverbrückung benötigt werden. Dieses Derivat ließ sich aber bisher nicht synthetisieren, was nahe legt, dass für die Ausbildung der für β-Defensine erwarteten Disulfidverbrückung die längere Aminosäuresequenz von Vorteil ist. Bei hBD3-Cam handelt es sich ein lineares Derivat mit 40 Aminosäureresten, dessen Cysteine mit Carboxamidomethyl alkyliert sind, wodurch eine Ausbildung von Disulfidbrücken nicht möglich ist. In dem ionenschwächerem ¼ MHB-Medium

zeigt hBD3-Cam gegen die fünf im Test befindlichen Keime gute antimikrobielle Aktivität mit MIC-Werten zwischen 9,4 µg/ml und 37,5 µg/ml. In dem stärker konzentrierten MHB-Medium konnte dann nur noch gegen *Klebsiella pneumoniae* eine schwache Aktivität bei 300 µg/ml detektiert werden. Dieses Derivat zeigt, dass bei β-Defensinen die Disulfidverbrückung prinzipiell keine zwingende Voraussetzung für antimikrobielle Aktivität ist, nur nimmt die Aktivität mit zunehmender Ionenkonzentration stark ab. Auch für porcine Protegrine, die zwei Disulfidbrücken besitzen, wurde gezeigt, dass die linearen Formen eine stärkere Abhängigkeit von der Mediensalzkonzentration und somit eine schwächere antimikrobielle Aktivität aufweisen (FIDDES, 2000). Es wird dabei vermutet, dass die Disulfidbrücken notwendig sind für eine Stabilisierung der antimikrobiell aktiven Molekülstruktur.

Bei [Ala]-hBD3 und [Trp]-hBD3 handelt es sich ebenfalls um lineare Derivate aus 40 Aminosäuren, bei denen alle Cysteine gegen Alanin bzw. Tryptophan ausgetauscht wurden. Beide Derivate zeigen in ¼ MHB-Medium deutliche Aktivität gegen die fünf getesteten Keime, wobei die MIC-Werte jeweils im Bereich von 9,4 bis 25 µg/ml liegen. Im MHB-Medium dagegen ist für [Ala]-hBD3 keine antimikrobielle Aktivität mehr nachweisbar. Auch hier fehlen die stabilisierenden Disulfidbrücken und die hydrophobe Aminosäure Alanin hat keinen Anteil an der Stabilisierung der Tertiärstruktur. Das Derivat [Trp]-hBD3 dagegen zeigt auch im MHB-Medium noch gute Aktivität mit MIC-Werten von 18,75 bis 25 µg/ml. Einzige Ausnahme war der Gram-negative Keim *Klebsiella pneumoniae*, gegen den sich [Trp]-hBD3 als inaktiv erwies. Durch Einfügen der aromatischen Aminosäure Tryptophan wird eine Interaktion mit den Lipidschichten der Zellmembranen erleichtert (HWANG UND VOGEL, 1998). Durch Versuche mit Modell-Membranen konnte gezeigt werden, dass Tryptophan mit der Lipid-Doppelschicht interagiert und sich in die Membran einfügt (HANCOCK UND ROZEK, 2002). Dadurch wird trotz fehlender Disulfidbrücken eine Struktur gebildet, die eine Interaktion mit Membranen erlaubt. In Verbindung mit der hohen positiven Nettoladung dieses Derivats ergibt sich eine von der Ionenkonzentration relativ unabhängige antimikrobielle Aktivität. Der Nachteil dieses Derivats ist allerdings die hohe hämolytische und zytotoxische Aktivität (siehe Kapitel 3.6 und 3.7), denn der hohe Gehalt an Tryptophan erleichtert offensichtlich die Interaktion sowohl mit prokaryotischen als auch mit eukaryotischen Zellmembranen. Bei den Derivaten [Ala]-hBD3-N, [Trp]-hBD3-N, [Ala]-hBD3-C und [Trp]-hBD3-C handelt es sich um N-terminale bzw. C-terminale Fragmente mit einer Länge von 17 bzw. 27 Aminosäureresten, bei denen die enthaltenen Cysteine durch Alanin oder Tryptophan ausgetauscht wurden. Für diese vier Derivate wurde in MHB-Medium keine oder nur noch eine geringfügige Aktivität detektiert. In dem ionenschwächeren ¼ MHB-Medium zeigen die Derivate [Ala]-hBD3-N und [Ala]-hBD3-C nur schwache antimikrobielle Aktivität mit MIC-Werten zwischen 75 µg/ml und 300 µg/ml. Die Derivate [Trp]-hBD3-N und [Trp]-hBD3-C dagegen zeigten gute Aktivität gegen alle fünf getesteten Keime mit MIC-Werten zwischen 9,4 und 25 µg/ml. Wie oben beschrieben, nimmt bei den N- und C-terminalen Fragmenten durch die Verkürzung der Aminosäuresequenz die positive Nettoladung ab, wodurch die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende

Bindung an die bakterielle Zellmembran erschwert wird (HWANG UND VOGEL, 1998). Die kleine, hydrophobe Aminosäure Alanin wiederum hat wenig Einfluss auf die Ausbildung der Tertiärstruktur und interagiert auch nicht mit der bakteriellen Zellmembran, so dass diese Derivate nur eine schwache oder auch gar keine Aktivität zeigen. Durch Einfügen der aromatischen Aminosäure Tryptophan dagegen erhöht sich das hydrophobe Moment des Moleküls, wodurch eine Interaktion mit den Zellmembranen erleichtert wird (HWANG UND VOGEL, 1998).

hBD4 (3-39) und davon abgeleitete Derivate zeigen in $\frac{1}{4}$ MHB-Medium eine moderate antimikrobielle Aktivität gegen die fünf im Test befindlichen Keime mit MIC-Werten zwischen 25 und 200 $\mu\text{g/ml}$. Lediglich für hBD4 (1-50) und [Ala]-hBD4 kann keine Aktivität gegen *Streptococcus pneumoniae* detektiert werden. Im MHB-Medium dagegen kann nur noch eine geringfügige Aktivität beobachtet werden, hBD4 (1-39) und [Ala]-hBD4 zeigen überhaupt keine messbare Aktivität mehr. Im Vergleich mit hBD3 (I₁) und davon abgeleiteten Derivaten zeigen die von hBD4 (3-39) abgeleiteten Derivate eine schwächere antimikrobielle Potenz. Ein Grund dafür dürfte die bei den hBD4-Derivaten geringere positive Nettoladung sein, wodurch diese ein geringeres Potential bei der Interaktion mit der bakteriellen Zellmembran besitzen (HWANG UND VOGEL, 1998). hBD3 (I₁) hat eine positive Nettoladung von 11, bei hBD4 (3-39) beträgt sie lediglich 7. Interessanterweise kann für das Derivat [Trp]-hBD4 in dem ionenstärkeren MHB-Medium nur noch eine minimale Aktivität gegen den Gram-negativen Keim *Escherichia coli* beobachtet werden. Bei diesem Derivat wurden die Cysteine durch Tryptophan ersetzt, aber trotz des erhöhten hydrophoben Charakters kann gegenüber der Ausgangsform hBD4 (3-39) keine Steigerung der antimikrobiellen Potenz beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war bei [Trp]-hBD3 eine Erhöhung der Anzahl hydrophober Aminosäuren mit einer Steigerung der antimikrobiellen Aktivität verbunden, bzw. die Aktivität von [Trp]-hBD3 zeigte eine geringere Abhängigkeit von der Ionenkonzentration des Mediums. Allerdings zeigen, wie in Kapitel 3.6 und 3.7 dargestellt, sowohl [Trp]-hBD3 als auch [Trp]-hBD4 eine deutliche Steigerung der hämolytischen und der zytotoxischen Aktivität. Dieses Phänomen hat seine Ursache in dem erhöhten Gehalt an Tryptophan, das mit der Lipid-Doppelschicht interagiert und sich in die Membran einfügt (HANCOCK UND ROZEK, 2002), wodurch eine Interaktion mit prokaryotischen und eukaryotischen Zellmembranen erleichtert wird (HWANG UND VOGEL, 1998).

3.6 Hämolytische Aktivität von hBD3-Peptiden

Für viele antimikrobielle Peptide wird die Anlagerung an Plasmamembranen und die darauf folgende Permeabilisierung als Wirkmechanismus postuliert (ANDREU UND RIVAS, 1998). Dabei ist es für den Wirtsorganismus lebenswichtig, dass bakterielle Membranen selektiv geschädigt werden, während die Zellen des Wirtes möglichst unbeeinflusst bleiben. Ein einfaches Modell zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung eines Peptides auf eukaryotische Zellen stellt der

Hämolysetest dar. Bei diesem in Anlehnung an HELMERHORST *et al.* (1999) durchgeführten Test wird die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten mit der membranlyisierenden Wirkung der Testsubstanzen gleichgesetzt. Zur Untersuchung der Relation zwischen antimikrobieller und hämolytischer Aktivität wurden Derivate gewählt, die entweder eine starke oder sehr schwache bzw. gar keine antimikrobielle Aktivität zeigen. Zum Vergleich wurden nach den gleichen Prinzipien ausgesuchte Derivate von hBD4 (3-39) mitgetestet (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001). Die mit dem Detergenz Tween-20 (1%) erreichte 100%ige Hämolysediente als relativer Referenzwert für die Berechnung der hämolytischen Aktivität (siehe Kapitel 2.8.1). Als Positivkontrolle diente das für seine starke hämolytische Aktivität bekannte Peptid MBI-28.

Wie in Abbildung 14 gezeigt, besitzt MBI-28 eine sehr starke hämolytische Potenz. Ab einer Peptidkonzentration von 50 µg/ml werden $\geq 70\%$ der eingesetzten Erythrozyten lysiert. Erst bei einer Konzentration von 10 µg/ml, die dem Bereich MIC-Wertes von MBI-28 entspricht, sinkt die hämolytische Aktivität auf 4%. Das Derivat hBD3 (I₁), das der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten und zuerst synthetisierten Form entspricht, zeigt in allen getesteten Konzentrationen eine hämolytische Aktivität von weniger als 10%, und kann somit als schwach hämolytisch eingestuft werden. Das Derivat hBD3-I₂, das sich von hBD3 (I₁) nur durch die Art der Disulfidverbrückung unterscheidet, zeigt ebenfalls in allen getesteten Konzentrationen eine hämolytische Aktivität von weniger als 10%. Beide Derivate (siehe Abbildung 14) verhalten sich bezüglich ihrer hämolytischen Aktivität sehr ähnlich, was darauf hindeutet, dass die Position der Disulfidbrücken nur wenig oder gar keinen Einfluss auf die hämolytische Wirkung hat. Andererseits wird angenommen, dass die Sekundärstrukturelemente eine Voraussetzung für die hämolytische Aktivität sind, da die Sekundärstruktur notwendig für die Bildung von Multimeren bei dem Durchdringen von Zellmembranen ist (HWANG UND VOGEL, 1998). Das dritte Strukturisomer hBD3-I₃, das bezüglich der Länge der von HARDER *et al.* (2001) isolierten Form entspricht, N-terminal um fünf Aminosäuren länger ist und die für β -Defensine-typische Disulfidverbrückung aufweist, zeigt im Vergleich mit hBD3 (I₁) und hBD3-I₂ eine stärkere hämolytische Potenz. Bei einer Peptidkonzentration von 500 µg/ml liegt die hämolytische Aktivität bei 38,5%, und erst bei einer Konzentration von 10 µg/ml sinkt die hämolytische Aktivität von hBD3-I₃ unter 10%. Durch zwei zusätzliche Isoleucinreste erhöht sich der Anteil hydrophober Aminosäuren, wodurch eine Interaktion mit den Zellmembranen erleichtert und die hämolytische bzw. zytotoxische Aktivität erhöht wird (HWANG UND VOGEL, 1998).

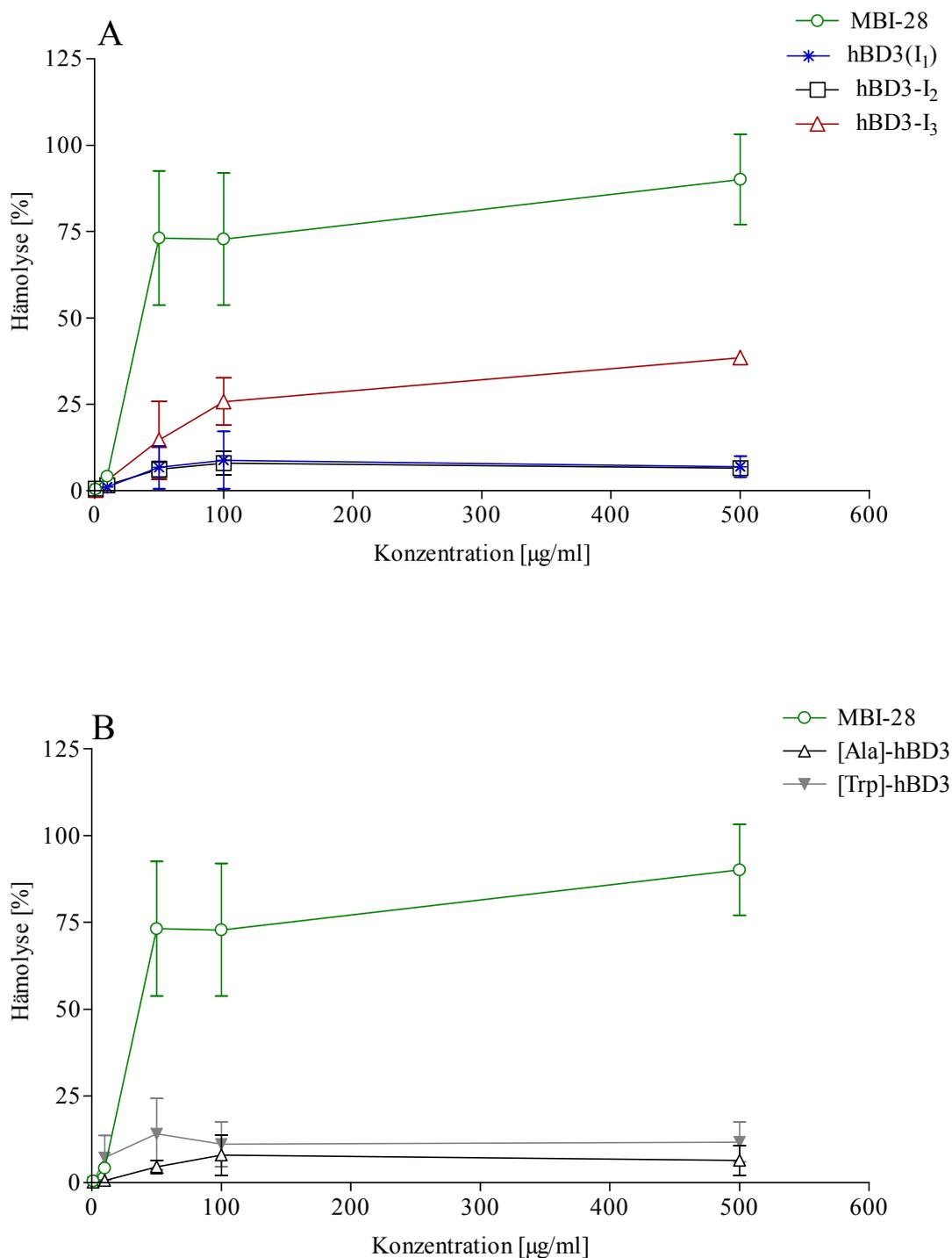


Abbildung 14: Hämolytische Aktivität von hBD3-Peptiden. Es wurden zwischen 1 und 500 µg/ml des jeweiligen Peptids eingesetzt. Die hämolytische Aktivität wurde über die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten bestimmt, die spektralphotometrisch quantifizierbar ist. Eine mit Tween-20 (1%) erreichte vollständige Hämolyse diente als Referenzwert für die Berechnung der Hämolyse (siehe Kapitel 2.8.1). Die dargestellten Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen in Duplika durchgeführten Experimenten. Das für seine hämolytische Aktivität bekannte MBI-28 diente als Positivkontrolle.

Das Peptid [Ala]-hBD3, bestehend aus 40 Aminosäureresten, bei dem alle Cysteine durch die hydrophobe Aminosäure Alanin ersetzt wurden, so dass die Ausbildung der für β -Defensintypischen Sekundärstrukturelemente nicht mehr möglich ist, zeigte analog zu den

Strukturisomeren hBD3 (I₁) und hBD3-I₂ ebenfalls nur eine schwache hämolytische Aktivität. Bei allen getesteten Konzentrationen liegt die hämolytische Aktivität von [Ala]-hBD3 jeweils unter 10%. Eine Besonderheit stellt das Derivat [Trp]-hBD3 dar. Es besteht ebenfalls aus 40 Aminosäureresten, und die Cysteine wurden durch die aromatische Aminosäure Tryptophan ersetzt. Die in Abbildung 14 dargestellten Werte für die hämolytische Aktivität, die in allen getesteten Konzentrationen unter 15% liegt, spiegeln nicht die wahren Verhältnisse wieder. Bei dem Hämolysetest (siehe Kapitel 2.8.1) erhält man am Versuchsende bei einem hämolytisch nicht-aktiven Peptid ein Pellet mit intakten Erythrozyten, während bei einem hämolytisch aktivem Peptid das Erythrozytenpellet abnimmt oder ganz verschwindet und im Mediumüberstand freigesetztes Hämoglobin spektralphotometrisch bei $\lambda=450$ nm nachgewiesen werden kann. Bei dem Derivat [Trp]-hBD3 war am Versuchsende zwar kein sichtbares Erythrozytenpellet mehr vorhanden, aber im Überstand konnte nur eine geringe Menge freigesetztes Hämoglobin nachgewiesen werden. Daher kann man annehmen, dass [Trp]-hBD3 nicht nur Erythrozyten lysiert, sondern auch direkt am Hämoglobin wirkt. Möglich wäre eine Oxidation oder eine Bindung des Fe^{2+} , so dass sich das Absorptionsmaximum verschiebt, und das freigesetzte Hämoglobin nicht mehr bei einer Wellenlänge $\lambda=450$ nm dargestellt werden kann.

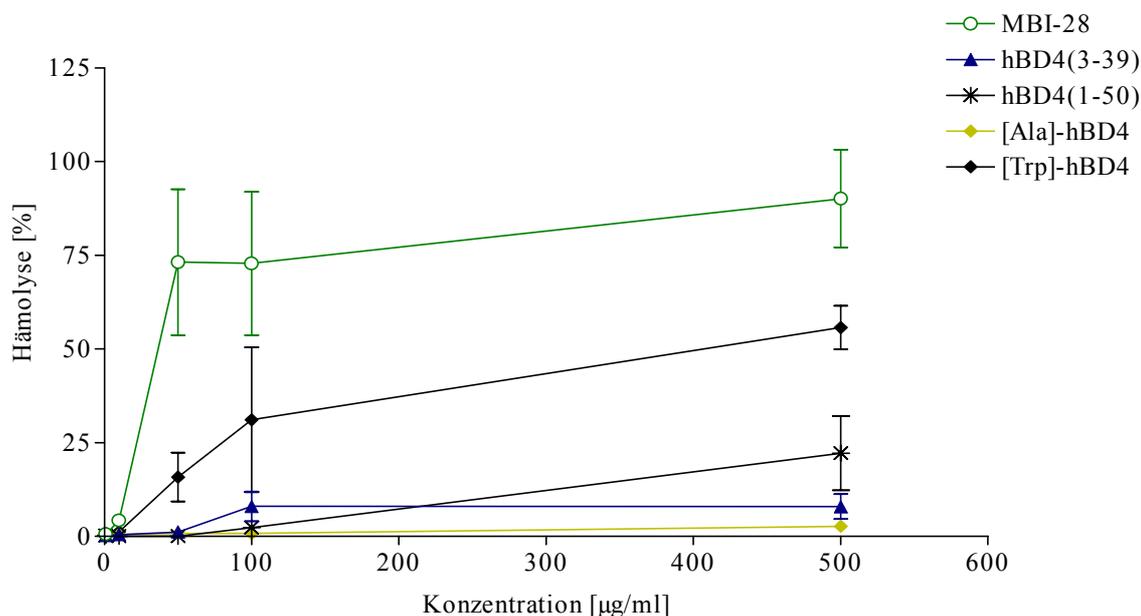


Abbildung 15: Hämolytische Aktivität von hBD4-Peptiden. Es wurden jeweils zwischen 1 und 500 µg/ml des jeweiligen Peptids eingesetzt. Die hämolytische Aktivität wurde spektralphotometrisch über die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten bestimmt. Eine mit Tween-20 (1%) erreichte vollständige Hämolyse diente als Referenzwert für die Berechnung der Hämolyse (Kapitel 2.8.1). Die dargestellten Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen in Duplika durchgeführten Experimenten. Das für seine hämolytische Aktivität bekannte MBI-28 diente als Positivkontrolle.

Bei hBD4 (3-39), das der von CONEJO-GARCÍA *et al.* (2001b) untersuchten Form entspricht, und davon abgeleiteten Derivaten ergab sich ein ähnliches Bild (Abbildung 15). hBD4 (3-39) zeigte nur eine schwache Hämolyse, bei Peptidkonzentrationen von 500 bzw. 100 µg/ml liegt die

hämolytische Aktivität bei lediglich 8% und bei 10 bzw. 1 µg/ml ist keine Hämolyse mehr nachweisbar. Das N- und C-terminal verlängerte Derivat hBD4 (1-50) ist ebenfalls nur schwach hämolytisch. Lediglich in der höchsten Konzentration von 500 µg/ml lag die hämolytische Aktivität bei 22%, in den anderen getesteten Konzentrationen ergaben sich Werte von $\leq 2\%$. Bei den beiden Derivaten [Ala]-hBD4 und [Trp]-hBD4, in denen die Cysteine mit Alanin bzw. Tryptophan substituiert worden waren, ergaben sich sehr unterschiedliche Werte. [Ala]-hBD4 erwies sich als sehr schwach hämolytisch, in allen getesteten Konzentrationen lag die Hämolyse bei $\leq 2,7\%$. Die Variante [Trp]-hBD4 dagegen zeigte die stärkste messbare hämolytische Aktivität von allen im Test befindlichen Derivaten. Bei einer Peptidkonzentration von 500 µg/ml lag die Hämolyse bei 55,7%, bei 100 µg/ml waren es immerhin noch 31,1%. Nur in der niedrigsten Konzentration war keine Hämolyse nachweisbar. Zusammenfassend ergibt sich im Vergleich aller getesteten Derivate der grösste Effekt durch Austausch der Cysteine gegen Tryptophan, während die Substitution mit Alanin nur wenig Einfluss auf die hämolytische Aktivität hat.

3.7 Zytotoxische Wirkung von hBD3-Peptiden

Eine weitere Methode die zytotoxische Aktivität einer Substanz darzustellen, ist die Bestimmung der metabolischen Aktivität von eukaryotischen Zellen. Das Prinzip dieser Testmethode beruht auf der metabolischen Umsetzung des roten Tetrazoliumsalses WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat) zu einem gelben, wasserlöslichen Formazansalz. Dabei korreliert laut Herstellerangaben bei eukaryotischen Zellen die Menge an gebildetem Formazansalz mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Bei Zugabe einer zytotoxischen Substanz kommt es zu einer Reduktion der metabolisch aktiven Zellen und die Menge des gebildeten Formazansalzes nimmt entsprechend ab. Für den WST-1-Test kam eine humane Monozyten-Zelllinie zum Einsatz (Kapitel 2.8.2), darüber hinaus sollten auch humane primäre Lymphozyten getestet werden, die sich aber in der noch zur Verfügung stehenden Zeit nicht mehr ausreichend kultivieren ließen. Als Positivkontrolle und Referenzwert für die Berechnung der Zellvitalität kam das Zytotoxin Cycloheximid in einer Konzentration von 50 µg/ml zum Einsatz, als Negativkontrolle wurde die Absorption von Zellen in reinem Medium bestimmt. Die angegebene Zellvitalität [%] bezieht sich somit auf die Anzahl metabolisch aktiver Zellen nach Einwirkung einer Substanz. Werte für die Zellvitalität von $> 100\%$ ergeben sich, wenn die Zellen der Negativkontrolle eine geringere metabolische Aktivität als die mit Peptid behandelten Zellen aufweisen. Zur Untersuchung der Relation zwischen antimikrobieller und zytotoxischer Aktivität wurden Derivate ausgesucht, die entweder eine starke oder sehr schwache bzw. gar keine antimikrobielle Aktivität zeigen. Zum Vergleich wurden nach den gleichen Prinzipien ausgesuchte Derivate von hBD4 (3-39) (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001) mitgetestet.

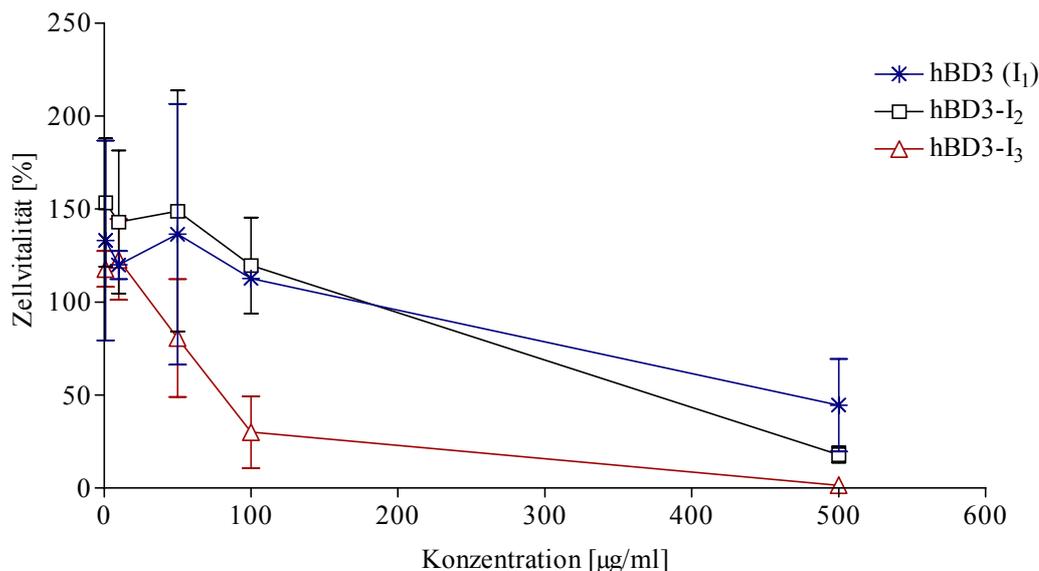


Abbildung 16: Zytotoxische Aktivität der drei Disulfidisomere von hBD3 auf humane THP-1-Zellen, die für die Dauer des Versuches in 10% FCS kultiviert wurden. Die Auswertung erfolgte spektralphotometrisch bei 450/630 nm. Als Positivkontrolle und Referenzwert für die Berechnung der Zellvitalität (Kapitel 2.8.2) wurde das Zytotoxin Cycloheximid verwendet, als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen in Duplika durchgeführten Experimenten, die teilweise hohen Standardabweichungen entstehen durch das sehr unterschiedliche Wachstum der THP-1-Zellen in den einzelnen Wells der verwendeten 96-Well-Mikrotestplatte. Bei einer Zellvitalität von $\geq 100\%$ wird die Wirkung der jeweiligen Peptidkonzentration als nicht zytotoxisch gewertet.

Der direkte Vergleich der zytotoxischen Aktivität der drei Disulfidisomere hBD3 (I₁), hBD3-I₂ und hBD3-I₃, (Abbildung 16) zeigt, dass hBD3 (I₁) und hBD3-I₂ sich bezüglich ihrer zytotoxischen Wirkung sehr ähnlich verhalten. Bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml liegt die Zellvitalität bei $\geq 100\%$. Erst bei einer Konzentration von 500 µg/ml sinkt bei beiden Isomeren die Zellvitalität auf $\leq 50\%$. Das Disulfidisomersomer hBD3-I₃ dagegen erwies sich schon bei einer Konzentration von 50 µg/ml als zytotoxisch, bei 500 µg/ml ist keine metabolische Aktivität der THP-1-Zellen mehr messbar. Diese Daten deuten erneut darauf hin, dass bei den Isomeren hBD3 (I₁) und hBD3-I₂, die eine identische Aminosäuresequenz besitzen, die Art der Disulfidverbrückung keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung hat. hBD3-I₃ wiederum besitzt die für β -Defensine-typische Disulfidverbrückung und ist N-terminal um fünf Aminosäuren länger. Durch zwei zusätzliche Isoleucinreste erhöht sich das hydrophobe Moment, wodurch eine Interaktion mit den Lipidschichten der Zellmembranen erleichtert und die zytotoxische Wirkung erhöht wird (HWANG UND VOGEL, 1998).

Das Derivat [Ala]-hBD3 mit 40 Aminosäureresten, das statt der Cysteine Alaninreste enthält, zeigt bis zu einer Peptidkonzentration von 100 µg/ml keine zytotoxische Aktivität. Wie in Abbildung 17 gezeigt, sinkt die Zellvitalität erst bei einer Konzentration von 500 µg/ml auf 86%. Somit kann dieses Derivat als schwach zytotoxisch eingestuft werden. Auffällig sind bei diesem Derivat allerdings die hohen Standardabweichungen, für die es außer dem sehr unterschiedlichen Wachstum der THP-1-Zellen keine eindeutige Erklärung gibt. Das Derivat [Trp]-hBD3 dagegen

erwies sich als die zytotoxischere Form. Es besteht ebenfalls aus 40 Aminosäureresten, und die Cysteine wurden durch die aromatische Aminosäure Tryptophan ersetzt, wodurch der hydrophobe Charakter dieses Moleküls erhöht wird. Bis zu einer Peptidkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ liegt die Zellvitalität bei $\geq 100\%$, bei 100 $\mu\text{g/ml}$ sinkt sie auf 33% und bei 500 $\mu\text{g/ml}$ sind dann noch 15% der eingesetzten Zellen metabolisch aktiv.

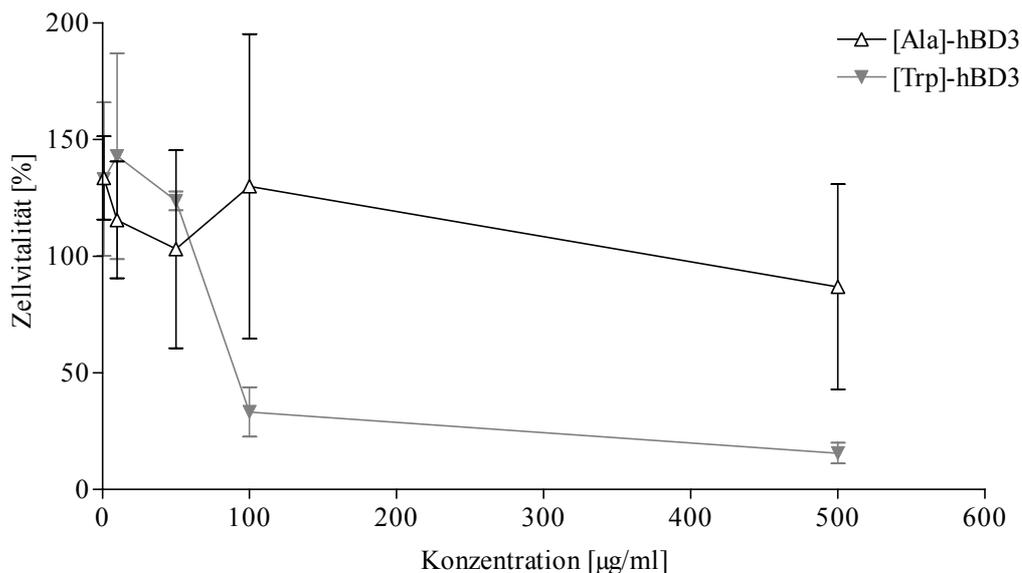


Abbildung 17: Zytotoxische Aktivität der hBD3-Derivate [Ala]-hBD3 und [Trp]-hBD3 gegen humane THP-1-Zellen, die für die Dauer des Versuches in 10% FCS kultiviert wurden. Als Positivkontrolle und Referenzwert für die Berechnung der Zellvitalität (Kapitel 2.8.2) wurde das Zytotoxin Cycloheximid verwendet, als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen in Duplika durchgeführten Experimenten, die teilweise hohen Standardabweichungen entstehen durch das sehr unterschiedliche Wachstum der THP-1 Zellen in den einzelnen Wells der verwendeten 96-Well-Mikrotestplatte. Bei einer Zellvitalität von $\geq 100\%$ wird die Wirkung der jeweiligen Peptidkonzentration als nicht zytotoxisch gewertet.

Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, sind hBD4 (3-39), welches der von CONEJO-GARCÍA *et al.* (2001b) publizierten Form entspricht, und die davon abgeleiteten Derivate nur schwach oder gar nicht zytotoxisch. Einzige Ausnahme ist das Derivat [Trp]-hBD4. Bis zu einer Peptidkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ ist zwar keine zytotoxische Aktivität messbar, aber bei 500 $\mu\text{g/ml}$ sinkt der Anteil metabolisch aktiver Zellen auf 14%. Das Derivat hBD4 (1-50) zeigt in allen getesteten Konzentrationen keine messbare Aktivität, und die Zellvitalität liegt jeweils $\geq 100\%$. Beim Derivat hBD4 (3-39) ist nur eine sehr schwache Aktivität nachweisbar, bei Peptidkonzentration von 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ liegt die Zellvitalität $\geq 100\%$, in den drei höheren Konzentrationen ergibt sich eine Zellvitalität von $\geq 87\%$. Das Derivat [Ala]-hBD4 wiederum zeigt nur in der höchsten getesteten Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ zytotoxische Aktivität, die Zellvitalität sinkt hier auf 64%.

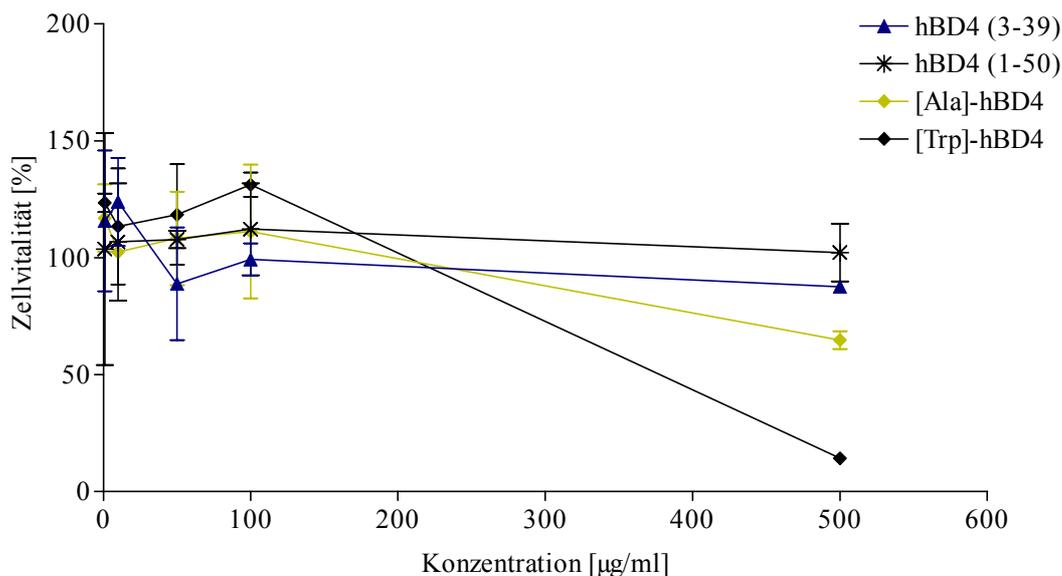


Abbildung 18: Zytotoxische Aktivität von hBD4 (3-39) und davon abgeleiteten Derivaten gegen humane THP-1-Zellen, die für die Dauer des Versuches in 10% FCS kultiviert wurden. Als Positivkontrolle und Referenzwert für die Berechnung der Zellvitalität (Kapitel 2.8.1) wurde das Zytotoxin Cycloheximid verwendet, als Negativkontrolle dienen unbehandelte Zellen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen in Duplika durchgeführten Experimenten, die teilweise recht hohen Standardabweichungen entstehen durch das sehr unterschiedliche Wachstum der THP-1-Zellen in den einzelnen Wells der verwendeten 96-Well-Mikrottestplatte. Bei einer Zellvitalität von $\geq 100\%$ wird die Wirkung der jeweiligen Peptidkonzentration als nicht zytotoxisch gewertet.

In einem weiteren Experiment wurden hBD3 (I_1) und abgeleitete Derivate gegen THP-1-Zellen getestet, die während der Dauer des Versuches ohne FCS (fetales Kälberserum) kultiviert wurden. LICHTENSTEIN *et al.* (1988) zeigte für α -Defensine, dass deren zytotoxische Aktivität auf Säugerzellen in Gegenwart von FCS abnimmt. Im FCS enthaltene Bestandteile wie z.B. Albumine sollen dabei die Bindung der α -Defensine an die Zellmembran verhindern. Insofern sollte die zytotoxische Wirkung von hBD3 (I_1) und davon abgeleiteten Derivaten in Gegenwart und Abwesenheit von FCS verglichen werden. Wie in Abbildung 19 gezeigt, steigt in Abwesenheit von FCS die zytotoxische Aktivität von allen getesteten hBD3-Derivaten. Der größte Effekt zeigt sich bei hBD3- I_3 , das vermutlich der von HARDER *et al.* (2001) isolierten Form entspricht. Bei einer Peptidkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ liegt die Zellvitalität bei 96%, bei 10 $\mu\text{g/ml}$ sinkt sie auf 53% und ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ sind fast keine metabolisch aktiven THP-1-Zellen mit dem WST-1-Assay mehr nachzuweisen. Die Zellvitalität sinkt hier auf unter 2%. Die beiden Isomere hBD3 (I_1) und hBD3- I_2 , die sich nur durch die Art der Disulfidverbrückung unterscheiden, zeigen auch hier eine sehr ähnliche Aktivität. Beim Versuch mit 10% FCS war für beide Derivate nur in der höchsten Peptidkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ eine zytotoxische Aktivität messbar, während beim Versuch ohne FCS die Zahl metabolisch aktiver Zellen schon ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ abnimmt. Ohne FCS verringert sich also die zytotoxisch aktive Konzentration beider Derivate um den Faktor 10.

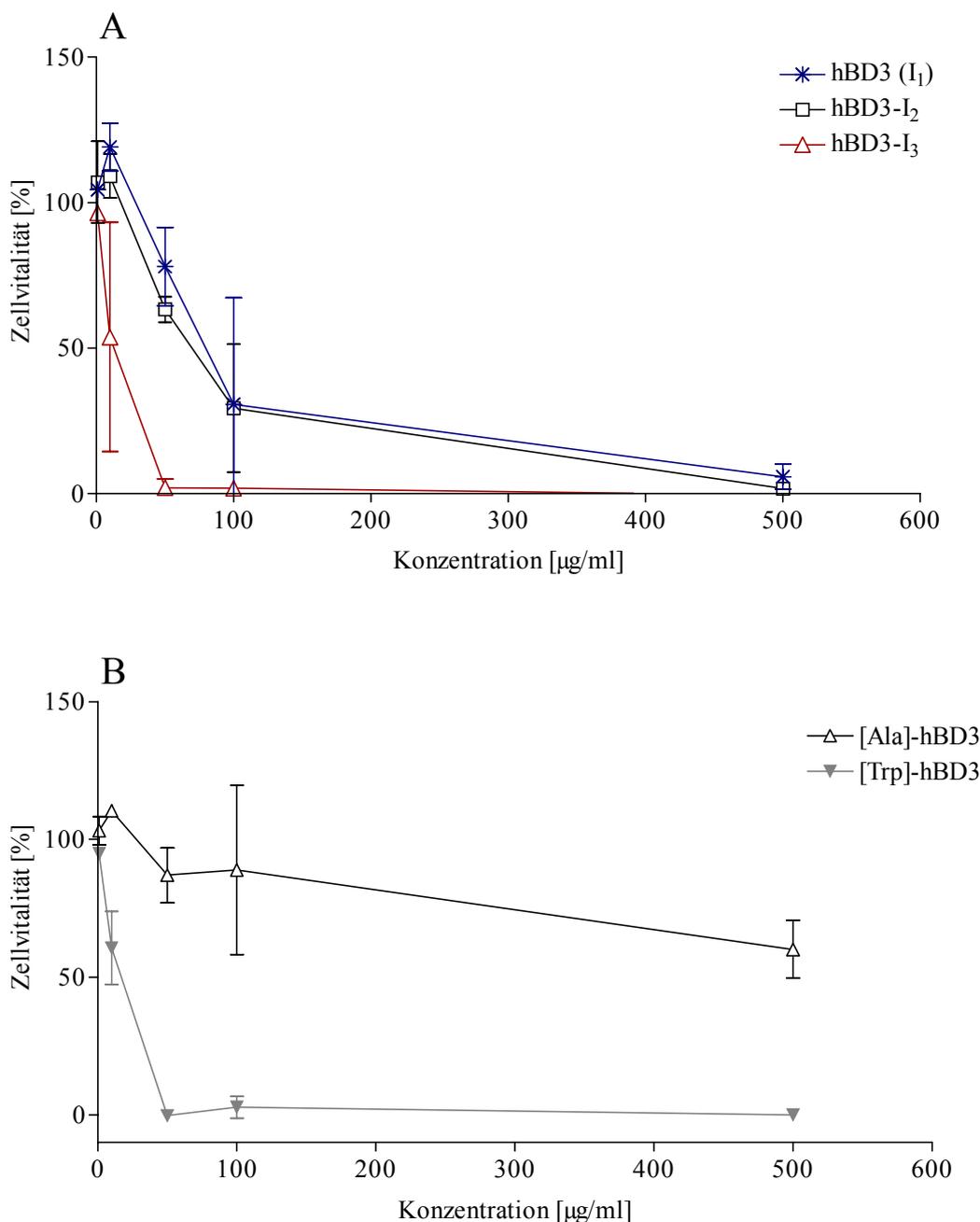


Abbildung 19: Zytotoxische Aktivität von hBD3 (I_1) und abgeleiteten Derivaten gegen humane THP-1-Zellen, die für die Dauer des Versuches ohne FCS kultiviert wurden. Als Positivkontrolle und Referenzwert für die Berechnung der Zellvitalität (Kapitel 2.8.1) wurde das Zytotoxin Cycloheximid verwendet, als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen in Duplika durchgeführten Experimenten, die teilweise hohen Standardabweichungen entstehen durch das sehr unterschiedliche Wachstum der THP-1-Zellen in den einzelnen Wells der verwendeten 96-Well-Mikrotestplatte. Bei einer Zellvitalität von $\geq 100\%$ wird die Wirkung der jeweiligen Peptidkonzentration als nicht zytotoxisch gewertet.

Ein ähnlicher Effekt ist bei [Ala]-hBD3 zu beobachten: mit 10% FCS wirkt dieses Derivat nur in der höchsten Peptidkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ zytotoxisch. Wird dagegen ohne FCS getestet, kann schon ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eine, wenn auch geringe, Abnahme der metabolisch aktiven Zellen beobachtet werden, so dass sich auch hier die zytotoxisch aktive Konzentration um den Faktor 10 verringert. Das Derivat [Trp]-hBD3 wiederum zeigt ohne FCS

einen ähnlichen Aktivitätsverlauf wie das Derivat hBD3-I₃. Bei einer Peptidkonzentration von 500 µg/ml liegt die Zellvitalität bei knapp 95%, ab einer Konzentration von 50 µg/ml sind keine metabolisch aktiven Zellen mehr nachweisbar. Mit 10% FCS war dieses Derivat erst ab einer Konzentration von 100 µg/ml zytotoxisch aktiv. Ohne FCS kann man schon ab einer Konzentration von 1 µg/ml eine leichte Abnahme der metabolisch aktiven Zellen beobachten, so dass sich hier die zytotoxisch aktive Konzentration fast um den Faktor 100 verringert hat. Zusammenfassend kann man feststellen, dass die zytotoxische Aktivität von hBD3 (I₁) und den davon abgeleiteten Derivaten in Abwesenheit von FCS stark zunimmt. Ein Grund dafür könnte die für α-Defensine bereits beschriebene Bindung an Bestandteile des FCS sein (LICHTENSTEIN *et al.* 1988). Desweiteren benötigen Säugerzellen für ihr Wachstum FCS. Vergleicht man in diesem Test die Absorptionswerte von unbehandelten Zellen mit und ohne FCS, dann ist erkennbar, dass bei den ohne FCS gehaltenen Zellen die metabolische Aktivität deutlich abnimmt (obwohl für beide Versuche die gleiche Anzahl Zellen eingesetzt wurden). Zwar fließt die durchschnittliche metabolische Aktivität der unbehandelten Zellen in die Berechnung der Zellvitalität mit ein, aber es ist möglich, dass die ohne FCS gehaltenen Zellen geschwächt sind und empfindlicher auf einwirkende Noxen reagieren. Dafür spricht auch, dass das nur wenig aktive [Ala]-hBD3 in Abwesenheit von FCS eine erhöhte zytotoxische Aktivität zeigt.

3.8 LPS-Bindungsaktivität von hBD3

Die Wirkung der meisten antimikrobiellen Peptide hat ihren Ursprung in dem kationischen Charakter dieser Substanzen und ermöglicht eine Bindung an negativ geladene Strukturen, wie z.B. Bakterienmembranen. Ein Bestandteil der Membran Gram-negativer Bakterien ist das negativ geladene Lipopolysaccharid (LPS), das bei Lyse der Bakterienzellen freigesetzt wird und schwere Krankheiten hervorrufen kann. LPS kann seine schädigende Wirkung aber erst entfalten, wenn es von dem LPS-bindenden Protein (LBP) gebunden wird und an den CD14-Rezeptor gelangt (LE ROY *et al.*, 2001). SCOTT *et al.* (2000) konnten zeigen, dass verschiedene antimikrobielle Peptide wie z.B. MBI-28, Indolicidin, Polymyxin, HNP1 und hBD2 LPS binden und so die Bindung von LPS an LBP hemmen.

Da das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte hBD3 eine hohe positive Nettoladung (+11) aufweist, was von Vorteil bei der Bindung von LPS sein sollte (LAZARON UND DUNN, 2002), wurde das synthetische Peptid mit Hilfe des quantitativen chromogenen LAL-Tests (siehe Kapitel 2.9) auf seine LPS-Bindungsaktivität getestet. Grundlage dieses Tests ist eine modifizierte Lysat-Präparation aus zirkulierenden Amoebozyten des Pfeilschwanzkrebes *Limulus polyphemus*. Die Infektion von *Limulus polyphemus* mit Gram-negativen Bakterien führt zu tödlicher intravaskulärer Blutgerinnung, die durch die Interaktion von Endotoxin mit einem gerinnungsfähigem Protein der im Blut von *Limulus polyphemus* zirkulierenden Amoebozyten entsteht (YOUNG *et al.*, 1972). Der LAL-Test nutzt den anfänglichen Teil der

LAL-Endotoxin Reaktion um ein Enzym zu aktivieren, das dann p-Nitroanilin (pNA) aus einem synthetischen Substrat freisetzt und das Reaktionsgemisch gelb färbt.

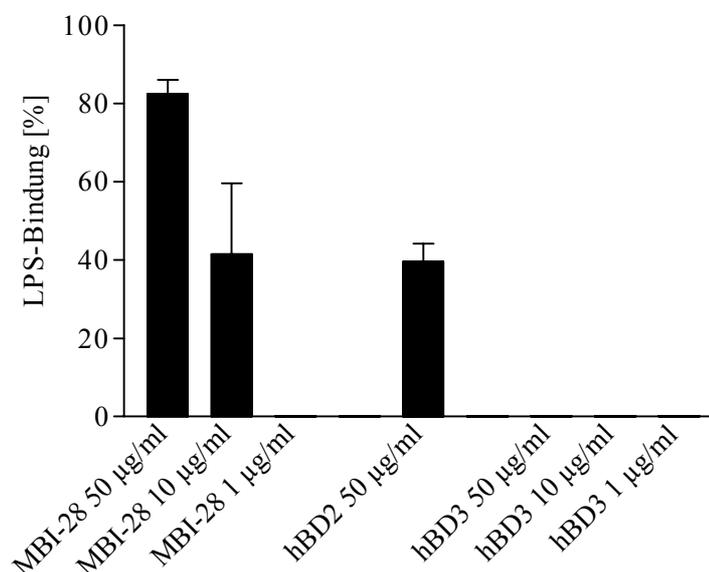


Abbildung 20: LPS-Bindungsaktivität von hBD3 (hBD3 (I₁)). Die LPS-Bindungsaktivität wurde mit Hilfe des quantitativen chromogenen LAL-Tests (BioWhittaker) ermittelt. Die Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen in Duplika durchgeführten Experimenten, MBI-28 und hBD2 dienen als Positivkontrollen. Für hBD2 wurde nur die höchste Konzentration mit 50 µg/ml getestet. Die LPS-Bindung [%] gibt an, wieviel von dem zu Versuchsbeginn vorgelegten LPS gebunden wurde. Das verwendete LPS stammte von *Escherichia coli*.

Das synthetische hBD3 (hBD3 (I₁)) zeigt in allen drei getesteten Konzentrationen von 1-50 µg/ml keine messbare LPS-Bindung. Erstaunlicherweise zeigt hBD2 (HARDER *et al.*, 1997), das lediglich eine positive Nettoladung von +6 hat, bei einer Peptidkonzentration von 50 µg/ml eine LPS-Bindung von 39,5%, d.h. 39,5% des zu Versuchsbeginn vorgelegten LPS wurden gebunden. Das Kontrollpeptid MBI-28 (GOUGH *et al.*, 1996) wiederum zeigt in der höchsten Peptidkonzentration eine LPS-Bindung von knapp über 80%, bei einer Konzentration von 10 µg/ml werden noch 40% des vorgelegten LPS gebunden und nur bei einem 1µg/ml war keine Aktivität mehr nachweisbar. Aufgrund der kationischen Struktur wurde für das synthetische hBD3 erwartet, dass es die Fähigkeit besitzt, bakterielles LPS zu binden. Diese Annahme ließ sich aber für das verwendete Peptid nicht bestätigen. Von LAZARON UND DUNN (2002) wurde postuliert, dass die Fähigkeit eines Peptids LPS zu binden sowohl von der positiven Nettoladung als auch von den Sekundärstrukturelementen abhängt. Da dieses synthetische Peptid eine von dem mitgetesteten hBD2 abweichende Disulfidverbrückung aufweist, wäre es interessant, das Derivat hBD3-I₃ auf LPS-Bindung zu testen. Dieses Derivat entspricht bezüglich der Länge der von HARDER *et al.* (2001) isolierten natürlichen Form und zeigt die für β-Defensine vorhergesagte Disulfidverbrückung (TANG UND SELSTED, 1993). Leider stand dieses Peptid zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht zur Verfügung. So läßt sich nur feststellen, dass das synthetische hBD3 (hBD3 (I₁)) mit seiner für β-Defensine-untypischen Disulfidverbrückung trotz seiner hohen positiven Nettoladung keine LPS-Bindungsaktivität zeigt.

3.9 Abhängigkeit der Freisetzung von TNF- α in Gegenwart von hBD3 und LPS

Wie neuere Untersuchungen inzwischen überzeugend gezeigt haben, besitzen antimikrobielle Peptide nicht nur die Fähigkeit eingedrungene Mikroorganismen zu inaktivieren, sondern sie üben auch weitergehende Funktionen bei der Regulation der Immunantwort aus (SCOTT UND HANCOCK, 2000; YANG *et al.*, 2002). TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) ist ein proinflammatorischer Faktor, der an der Entstehung von akuten Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Für einige antimikrobielle Peptide konnte gezeigt werden, dass sie aufgrund ihrer positiven Ladung bakterielles LPS binden und so die Interaktion von LPS und LBP blockieren können, wodurch die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α in murinen Makrophagen gehemmt wird (SCOTT *et al.*, 2000). Zu diesen Peptiden gehören Vertreter verschiedener Strukturklassen wie die Defensine HNP1 und hBD2, die α -helikalen Cathelicidine CAP11 und CAP18 sowie MBI-28, das langgestreckte Indolicidin und das zyklische Lipopeptid Polymyxin B (GOUGH *et al.*, 1996; SCOTT *et al.*, 2000; NAGAOKA *et al.*, 2001). Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung von hBD3 (hBD3 (I₁)) sollte überprüft werden, ob hBD3 die Fähigkeit besitzt, in humanen peripheren mononukleären Blutzellen die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α zu hemmen.

Humane periphere mononukleäre Blutzellen wurden entsprechend dem in Kapitel 2.10.1 beschriebenen Verfahren frisch isoliert und 6 h mit LPS, Peptid oder einer Kombination aus beiden stimuliert. Die Bestimmung der am Versuchsende im Zellüberstand vorliegenden Menge an TNF- α erfolgte anschließend mit einem humanen TNF- α ELISA. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen, desweiteren wurden als Positivkontrollen MBI-28 und hBD2 getestet, für die SCOTT *et al.* (2000) gezeigt haben, dass sie die LPS induzierte TNF- α Produktion hemmen können. Darüber hinaus wurde auch hBD1 (BENSCH *et al.*, 1995) untersucht, für das bisher keine entsprechenden Daten zur Verfügung stehen. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit Isolation/Stimulation der Zellen sowie einem TNF- α ELISA durchgeführt, aber beim zweiten Experiment war nach Stimulation mit dem verwendeten LPS kein Effekt messbar, so dass dieses Experiment nicht auswertbar war.

Da nur ein Experiment ausgewertet werden konnte, sind die in Abbildung 21 dargestellten Werte nur bedingt aussagekräftig. Für die unstimulierten Zellen der Kontrolle ergab sich am Versuchsende eine basale TNF- α -Produktion von 134 pg TNF- α pro ml Zellüberstand. Ursachen für die basale Produktion können der Stress während der Isolation der Zellen, Kontaminationen mit Bakterien als auch der allgemeine Gesundheitszustand des Blutspenders sein. Nach Stimulation mit bakteriellem LPS kommt es zu einer erwarteten Hochregulation der TNF- α -Freisetzung auf 1135 pg/ml. Die Stimulation mit MBI-28 alleine scheint keinen Einfluss auf die Produktion von TNF- α zu haben, während nach Stimulation mit MBI-28 und LPS die Konzentration von TNF- α im Medium auf 362 pg/ml ansteigt. Das bedeutet, dass MBI-28 die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α um 77% hemmt. Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit den von SCOTT *et al.* (2000) publizierten Daten, die in einer murinen Makrophagen-Zelllinie

für MBI-28 eine Hemmung der TNF- α -Produktion von fast 80% beschreiben. Diese Übereinstimmung deutet aber auch darauf hin, dass das oben beschriebene Experiment prinzipiell funktionierte. Betrachtet man dagegen hBD1, hBD2 und hBD3, dann ist für keines der drei Peptide eine Hemmung der LPS-induzierten TNF- α -Freisetzung zu beobachten.

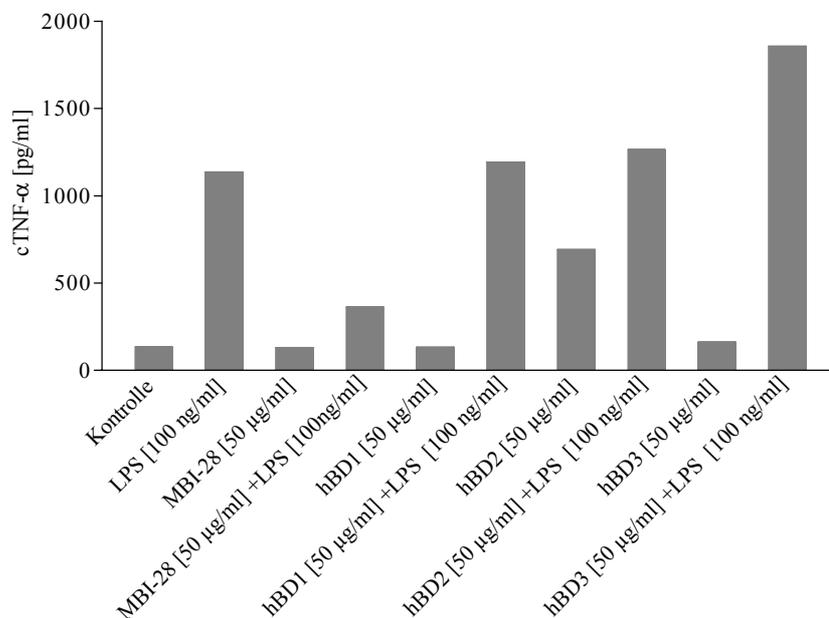


Abbildung 21: Darstellung der TNF- α -Produktion von humanen peripheren mononukleären Blutzellen, die mit LPS (aus *Escherichia coli*), Peptid oder einer Kombination aus beiden für 6 h stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte mit jeweils 100 ng/ml LPS und/oder 50 µg/ml Peptid. Für die Bestimmung der TNF- α -Produktion wurde der humane TNF- α ELISA Kit von PIERCE Endogen verwendet, die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Peptide MBI-28, hBD1 und hBD2 dienen dabei als Kontrollpeptide, unstimulierte Zellen in Medium kamen als Negativkontrolle (Kontrolle) zum Einsatz. Die dargestellten Werte ergeben sich aus einem Experiment, daher sind keine Standardabweichungen angegeben. Es wurde noch ein zweites unabhängiges Experiment mit Isolation und Stimulation der Zellen sowie einem TNF- α ELISA durchgeführt, aber dort war nach Stimulation mit dem verwendeten LPS kein Effekt messbar, so dass dieses Experiment nicht ausgewertet werden konnte.

Die Stimulation mit hBD3 alleine hat keinen Einfluss auf die TNF- α -Produktion, während die Stimulation mit LPS und hBD3 einen starken Anstieg von TNF- α zur Folge hat. Dieser Wert liegt mit 1856 pg/ml deutlich höher als die TNF- α Produktion nach Stimulation mit LPS. Ob es sich dabei lediglich um einen Messfehler handelt, oder ob hBD3 in Kombination mit LPS die Produktion von TNF- α steigert, kann auf der Basis von nur einem ausgewerteten Experiment nicht beurteilt werden. Da hBD3 aber, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, keine LPS-Bindungsaktivität besitzt, was eine Voraussetzung für die Hemmung der durch LPS induzierten TNF- α -Produktion ist, muss aufgrund dieses Experiments vermutet werden, dass hBD3 in dieser Hinsicht nicht aktiv ist. Für hBD1 ergibt sich ein ähnliches Bild wie für hBD3. Eine Stimulation mit hBD1 alleine ergibt keinen Effekt, die freigesetzte Menge an TNF- α liegt auf dem Level der Kontrolle. Stimuliert man mit einer Kombination aus hBD1 und LPS, dann steigt die TNF- α -Konzentration im Zellüberstand auf 1193 pg/ml, d.h., dass auch hBD1 nicht in der Lage ist, die

LPS-induzierte Produktion von TNF- α zu hemmen. Laut den von SCOTT *et al.* (2000) publizierten Daten hemmt hBD2 in einer murinen Makrophagen-Zelllinie die durch LPS induzierte Hochregulation von TNF- α . Mit den in dieser Arbeit verwendeten humanen Blutzellen konnte dieser Befund allerdings nicht bestätigt werden. Da die Stimulation mit hBD2 alleine schon zu einer erhöhten Bildung von TNF- α führt, was bei hBD1 und hBD3 nicht der Fall war, könnte es sich unter Umständen um ein experimentelles Problem handeln. Eine andere Möglichkeit ist, dass hBD2 in humanen Zellen bislang nicht bekannte Effekte zeigt, in deren Verlauf es zu einer Verstärkung der TNF- α -Produktion kommt. Zur genaueren Überprüfung dieses Sachverhalts sollten zukünftig weitere Experimente folgen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass hBD3 (I₁) trotz seiner hohen positiven Nettoladung keine LPS-Bindungsaktivität zeigt, und dass es vermutlich keinen hemmenden Effekt auf die LPS-induzierte TNF- α -Produktion ausübt.

3.10 Chemotaktische Aktivität von hBD3

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass es zwischen Defensinen und Chemokinen zu funktionellen Überschneidungen kommen kann (HOOVER *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2002). Sie deuten darauf hin, dass Defensine neben der direkten Inaktivierung von Bakterien weitere Funktionen während der Immunantwort haben. So wurde gezeigt, dass die humanen β -Defensine hBD1 und hBD2 chemotaktisch auf unreife dendritische Zellen (iDC) wirken. Desweiteren hat hBD2 eine chemotaktische Wirkung auf T-Gedächtniszellen (YANG *et al.*, 2002), und das kürzlich identifizierte hBD4 erwies sich als moderat chemotaktisch für Monozyten (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001).

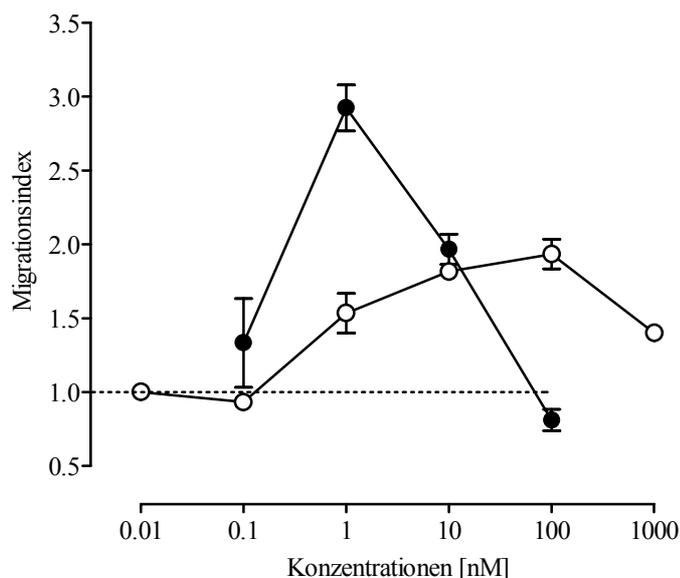


Abbildung 22: Chemotaktische Aktivität von hBD3 (I₁) (1 μ M hBD3 (I₁) = 4,66 μ g/ml) auf humane Monozyten Die chemotaktische Aktivität von hBD3 (○) und der Positivkontrolle fMLP (●) ist als Migrationsindex dargestellt. Der Migrationsindex ist definiert als Quotient aus Anzahl der gewanderten Zellen unter Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle (Medium). Die dargestellten Werte ergeben sich aus einem in Triplika durchgeführten Experiment.

Zur Überprüfung der chemotaktischen Aktivität von hBD3 (hBD3 (I₁)) wurde ein Migrationsassay mit frisch isolierten Monozyten, Eosinophilen und Neutrophilen durchgeführt (Kapitel 2.11). Das synthetische hBD3 wirkt *in vitro* chemotaktisch auf Monozyten (Abbildung 22), während gegen eosinophile und neutrophile Granulozyten kein Effekt zu beobachten war. hBD3 zeigt eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve, die ihr Maximum bei einer Konzentration von 100 nM hat, und dabei flacher verläuft als die des chemotaktischen Peptids N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP). Die chemotaktische Aktivität von hBD3 auf Monozyten muss als eher schwach eingeordnet werden, für eine maximale chemotaktische Wirkung muss eine hundertmal höhere Konzentration eingesetzt werden als beim moderat aktivem fMLP. Auch im Vergleich mit dem kürzlich publizierten hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001) erweist sich hBD3 als die schwächere chemotaktische Substanz. hBD4 zeigt in dem gleichen Migrationsassay eine maximale chemotaktische Aktivität bei einer Konzentration von 10 nM, von hBD3 dagegen muss eine zehnmal höhere Konzentration eingesetzt werden. YANG *et al.* (2002) beschreiben hBD3 ebenfalls als chemotaktisch für Monozyten. Allerdings werden keine näheren Angaben zu den getesteten Konzentrationen oder der verwendeten Peptidform (HARDER *et al.*, 2001 oder CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a) gemacht. Vermutlich wurde die zuerst von HARDER *et al.* (2001) publizierte Form verwendet, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

4. Diskussion

Hintergrund dieser Arbeit ist das immer größer werdende Interesse an antimikrobiell aktiven Peptiden, die sich in fast allen Gruppen des Pflanzen- und Tierreiches finden lassen. Das oftmals breite Aktivitätsspektrum gegen Bakterien, Pilze, Viren und Protozoen (VAN 'T HOF *et al.*, 2001) sowie die Erkenntnis, dass antimikrobielle Peptide auch eine Funktion bei der Modulation der Immunantwort haben (SCOTT UND HANCOCK, 2000; YANG *et al.*, 2001b), machen diese Peptide zu einem wichtigen Forschungsobjekt. Im Hinblick auf die starke Zunahme bakterieller Resistenzen gegen klassische Antibiotika erscheinen antimikrobielle Peptide mit ihrem neuen Wirkmechanismus, der auf einer Interaktion mit der bakteriellen Membran beruht (HANCOCK, 2000), als interessante Alternative bei der Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstoffe. Die Tatsache, dass manche Gruppen von antimikrobiellen Peptiden beim Menschen im Vergleich zu anderen Säugern, wie z.B. Rindern, zu Beginn dieser Arbeit deutlich unterrepräsentiert waren, gab den Anstoß zur Suche nach neuen humanen antimikrobiellen Peptiden. Aufgrund ihres konservierten Cystein-Motivs, das eine Identifizierung sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene erlaubt, wurde mit Hilfe eines neuen bioinformatischen Ansatzes ganz gezielt nach neuen humanen β -Defensinen gesucht.

***In silico*-Identifizierung von hBD3**

Im Gegensatz zu den humanen β -Defensinen hBD1 und hBD2 (BENSCH *et al.*, 1995; HARDER *et al.*, 1997), die aus natürlichen Quellen wie Hämofiltrat oder Haut isoliert und anschließend charakterisiert wurden, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Entdeckung von hBD3 mit einem völlig anderen Ansatz. Im Falle von hBD3 wurde gezielt im humanen Genom nach Gensequenzen gesucht, die für das konservierte Cystein-Motiv kodieren. Da die zu Beginn dieser Arbeit bekannten humanen α - und β -Defensine gehäuft auf Chromosom 8 vorliegen, war der zu durchsuchende Bereich des humanen Genoms somit zunächst eingeschränkt. Ein weiterer Vorteil ist die einfache genomische Struktur der β -Defensine mit nur zwei Exonen, wobei ein Exon für das vollständige Cystein-Motiv kodiert. Diverse Publikationen der jüngsten Zeit haben dann auch gezeigt, dass die *in silico*-Suche eine effiziente Methode zur Identifizierung neuer Vertreter der Familie der β -Defensine darstellt. So konnten weitere Gensequenzen, die für die konservierte Cystein-Domäne kodieren, sowohl auf Chromosom 8 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; SCHUTTE *et al.*, 2002) als auch auf Chromosom 6 und Chromosom 20 identifiziert werden (SCHUTTE *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Der Nachteil der *in silico*-Analyse ist, dass man zwar eine Aminosäuresequenz erhält, aber nur begrenzte Informationen über die natürlich vorkommende Peptidform hat. So konnten HARDER *et al.* (2001) zeitgleich mit dieser Arbeit aus Fußschwielen und der Haut von Psoriasis-Patienten eine native Form von hBD3 isolieren, die N-terminal um fünf Aminosäurereste länger ist als die von CONEJO-GARCÍA *et al.* (2001a) publizierte Form.

Bezüglich der Genstruktur zeigt hBD3 deutliche Übereinstimmungen mit den beiden bereits bekannten β -Defensinen hBD1 und hBD2, die ebenfalls epithelialen Ursprungs sind. Das hBD3-Gen besteht aus zwei Exonen, die durch ein Intron getrennt werden. Exon 1 kodiert für das Signalpeptid und Exon 2 für das reife Peptid. Ebenso wie das induzierbare hBD2 weist das ebenfalls induzierbare hBD3 nur ein kurzes Intron mit 943 bp auf, während das konstitutiv exprimierte hBD1 ein sehr langes Intron mit ca. 10 kbp besitzt (KAISER UND DIAMOND, 2000; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a).

Tabelle 18: Aminosäuresequenzen, Nettoladungen und chromosomale Lokalisation von humanen Peptiden mit dem für β -Defensine-typischen Cystein-Motiv.

	Aminosäuresequenz der Cystein-Domäne	Chr. Lokation	Nettoladung
hBD1	GNFLTGLGHRSDHYNCV--SSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK	8p23	+4
hBD2	IGDPVTCCLK--SGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	8p23	+6
hBD3	LQKYYCRV--RGGRCVAVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRKCCRKK	8p23	+11
hBD4	ELDRICGY--GTARCRKK-CRSQEYRIGRCPN-TYACCLRK +11	8p23	+7
EP2E	TICRM-QQGI CRLFFCHSGEKKRDI CSDPWNRC CVSNTDE +14	8p23	+1
hBD25	QKCWK-NNVGHCRRR-CLDTERYILLCRN-KLSCCISIIISR +94	20p13	+7
hBD27	KKCWNNYVQGHCRRI-CRVNEVPEALCEN-GRYCCLNIKEL +39	20p13	+3
hBD28	KKCFN-KVTGYCRKK-CKVGERYEIGCLS-GKLCCANDEEE +34	20p13	+3

hBD1-3 sind humane Vertreter der klassischen β -Defensine, hBD4, hBD25, -27 und -28 gehören zu den kürzlich identifizierten humanen β -Defensinen (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; SCHUTTE *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2003), EP2E ist ein Epididymis-spezifisches Peptid (FRÖHLICH *et al.*, 2001). Dargestellt sind jeweils die Aminosäuresequenzen der Cystein-Domäne, bei EP2E, hBD4, -25, -27 und -28 ist die Anzahl zusätzlicher Aminosäurereste am C-Terminus angegeben. Konservierte Cysteinreste sind fett und basische Aminosäuren (Arginin und Lysin) rot gedruckt.

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanen Peptiden, die das für β -Defensine-typische Cystein-Motiv zeigen, ergeben sich auffällige Unterschiede (Tabelle 18). Die klassischen β -Defensine hBD1-3 weisen nach dem letzten Cystein nur wenige Aminosäurereste am C-Terminus auf. Ein Vergleich von β -Defensinen verschiedener Spezies verdeutlicht, dass die klassischen Defensine epithelialen Ursprungs nach dem letzten Cystein grundsätzlich nicht mehr als sechs Aminosäurereste tragen (LI *et al.*, 2001). Die kürzlich identifizierten neuen β -Defensin-Gene kodieren zwar für ein identisches Cysteinmuster (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; SCHUTTE *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2003), zeigen aber überwiegend eine Epididymis-spezifische Expression und tragen am C-Terminus zwischen 11 und 123 zusätzliche Aminosäurereste. Auch konnte mit Ausnahme von hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001) diesen Peptiden noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Dieser

Befund verdeutlicht, dass ein gemeinsames Aminosäuresequenz-Motiv nur wenig Aussagen über Genstruktur, Expression und Funktion zulässt.

Expression von hBD3

Im Rahmen der Expressionsanalyse wurden hBD3-Transkripte in 17 von 25 getesteten Geweben detektiert (Kapitel 3.2.1), wobei sich die höchste Transkriptionsrate in Plazenta, Gesamthoden, Ösophagus, Neutrophilen und Trachea ergab. HARDER *et al.* (2001) dagegen wiesen parallel zu dieser Arbeit die höchste Expression in Tonsillen, Haut und Trachea nach. Die deutliche Expression in Plazenta lässt vermuten, dass hBD3 in der Schwangerschaft eine Rolle bei der Bekämpfung mikrobieller Infektionen des Embryos spielt (JIA *et al.*, 2001). Einerseits zeigt hBD3 die für klassische β -Defensine erwartete Expression (SCHRÖDER, 1999) in epithelialen Geweben wie z.B. Haut und Trachea, die häufig mikrobieller Besiedlung ausgesetzt sind. Andererseits wird hBD3 auch dort gebildet, wo es eher selten zu mikrobiellem Kontakt kommt, wie z.B. in Gesamthoden oder der Skelettmuskulatur, die nicht-epithelialen Ursprungs ist (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a; JIA *et al.*, 2001). Desweiteren ist hBD3 das erste humane β -Defensin, für das eine Expression in Ösophagus nachgewiesen werden konnte (JIA *et al.*, 2001). Es scheint somit, dass die klassische Definition von β -Defensinen als antimikrobielle Peptide epithelialen Ursprungs (SCHRÖDER, 1999) neu überdacht werden muss. Dafür sprechen auch die zahlreichen neu entdeckten β -Defensin-Gene, die bevorzugt in Epididymis (KRAUSE, 2001; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2003) oder gar Epididymis-spezifisch (FRÖHLICH *et al.*, 2001) exprimiert werden. Über die physiologische Funktion dieser Peptide in Epididymis kann zur Zeit nur spekuliert werden. Eine antimikrobielle Funktion wird ebenso diskutiert wie eine Funktion bei der Reifung der Spermatozoen (RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Beim Vergleich zweier Expressionsanalysen von hBD3, die parallel im Rahmen dieser Arbeit und von HARDER *et al.* (2001) durchgeführt wurden, zeigt sich, dass die Wahl der getesteten Gewebe großen Einfluss auf das Gesamtbild hat. Die von HARDER *et al.* (2001) durchgeführte Analyse beinhaltete bevorzugt Gewebe, die als Expressionsort epithelialer antimikrobieller Peptide bekannt waren, so dass sich dann das Bild eines typischen β -Defensins ergab. In der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Analyse wurden auch für β -Defensine untypische Gewebe getestet, und es ergab sich ein abweichendes Bild für hBD3. Das kürzlich publizierte hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b) wurde parallel zu hBD3 mit der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode getestet und zeigte ebenfalls ein für klassische β -Defensine untypisches Expressionsmuster. hBD4-Transkripte konnten nur in wenigen Geweben nachgewiesen werden, wobei die mit Abstand höchste Expression in Gesamthoden, d.h. in Hoden und Epididymis, zu verzeichnen war. Weitere Untersuchungen (KRAUSE, 2001) ergaben unerwarteterweise eine bevorzugte Expression von hBD4 in der Epididymis. Zwar war es nicht möglich, die für hBD3 in Gesamthoden gemessene Expression genauer zu lokalisieren (Kapitel 3.2.1), aber dieser Befund lässt vermuten, dass eventuell auch hBD1 und hBD2 an für antimikrobiellen Peptiden unerwarteten Orten exprimiert werden könnten.

Im Rahmen der Expressionsanalyse wurde desweiteren untersucht, ob hBD3 wie für hBD1 beschrieben (ZHAO *et al.*, 1996) konstitutiv exprimiert wird oder analog zu hBD2 (HARDER *et al.*, 2000) eine durch proinflammatorische Zytokine induzierbare Expression zeigt. Da die Expression von antimikrobiellen Peptiden bevorzugt in Geweben epithelialen Ursprungs erwartet wird (RISSO, 2000), wurde eine Keratinozyten-Zelllinie verwendet, die auch eine basale hBD3-Expression zeigte. In diesem Zelltyp lässt sich die Transkriptionsrate von hBD3 durch Stimulation mit Interferon- γ um das 136-fache steigern, während die Stimulation mit TNF- α , IL-1 α , IL-6 und PMA keinen Effekt zeigte. Interferon- γ besitzt die Fähigkeit, phagozytierende Zellen zu aktivieren (CASEY, 2000). Diese Aktivierung bewirkt sowohl eine Aufnahme von Mikroorganismen in die phagozytierenden Zellen als auch die Bildung von Substanzen wie Lysozym oder Sauerstoffradikalen, die die aufgenommenen Bakterien intrazellulär abtöten. Dabei wäre für hBD3, das sowohl antimikrobiell als auch schwach chemotaktisch aktiv ist (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a; YANG *et al.*, 2002), eine Funktion bei der direkten Eliminierung der Bakterien oder der Anlockung von weiteren Immunzellen denkbar. Im Gegensatz zu hBD2, dessen Expression sich in respiratorischem Epithel durch TNF- α und IL-1 β induzieren lässt (HARDER *et al.*, 2000), kann dieser Effekt für hBD3 in der verwendeten Keratinozyten-Zelllinie nicht beobachtet werden. Von HARDER *et al.* (2001) zu hBD3 publizierte Daten stützen dieses Ergebnis. Die Expression von hBD3 in primären Keratinozyten kann dort zwar durch hitzeinaktivierte Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* (klinisches Isolat) induziert werden, aber eine Stimulation mit TNF- α zeigt in primären Keratinozyten ebenfalls keinen Effekt. Lediglich in primärem Luftröhrenepithel konnte eine moderate Hochregulation der hBD3-Expression nach Stimulation mit TNF- α beobachtet werden (HARDER *et al.*, 2001). CONEJO-GARCÍA *et al.* (2001a) wiederum konnten in primären bronchialen Epithelzellen nach Stimulation mit TNF- α oder lebenden Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 keine Hochregulation der hBD3-Expression nachweisen. Die hier zusammengetragenen Befunde ergeben für hBD3 eine vom Zelltyp abhängige durch Interferon- γ , TNF- α und Bakterien induzierbare Expression, was klar darauf hinweist, dass hBD3 eine Funktion bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen hat.

Antimikrobielle Aktivität von hBD3 und Struktur-Wirkungsbeziehung

Im Rahmen der Funktionsanalyse von hBD3 wurde zunächst eine Peptidform mit einer Länge von 40 Aminosäureresten (Kapitel 3.1) synthetisiert und auf antimikrobielle Aktivität getestet. Im Verlauf der oxidativen Faltung des linearen Vorläuferpeptids entstanden mehrere Produkte mit unterschiedlichen Disulfidverbrückungen. Das Hauptprodukt wurde gereinigt und zeigte ein Disulfidmuster, das nicht identisch mit der für β -Defensine erwarteten Verbrückung war (Kapitel 2.12). Trotz der abweichenden Disulfidverbrückung zeigte diese Peptidform eine gute und konzentrationsabhängige antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene nicht-pathogene Keime (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2). Auch gegen die getesteten pathogenen Keime (Kapitel 3.4.2) ergab sich in den ionenschwächeren Medien (1/10 TSB- oder 1/4 MHB-Medium) eine gute antimikrobielle Aktivität, wobei allerdings die von HANCOCK (1997) als MIC-Wert für klinisch

relevante antimikrobielle Peptide geforderte Größenordnung von 1-8 µg/ml nur in zwei Fällen gegen nicht-pathogene Bakterien erreicht wurde. Im ionenstärkeren MHB-Medium wiederum konnte nur noch eine geringe Aktivität gegen zwei pathogene Erreger beobachtet werden. Insgesamt zeigte sich hBD3 als gleichermaßen aktiv gegen die getesteten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Einzige Ausnahme waren die Isolate bzw. Stämme von *Burkholderia cepacia*, der für seine Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden bekannt ist (ANDREU UND RIVAS, 1998). Selbst in dem ionenschwachen 1/10 TSB-Medium konnte für hBD3 gegen die getesteten Stämme bzw. Isolate keine messbare Aktivität beobachtet werden, obwohl dies in der Literatur abweichend beschrieben wurde (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a). Dieser Befund verdeutlicht die Problematik der quantitativen Vergleichbarkeit von MIC-Werten. Da Versuchsparameter, wie z.B. die Zusammensetzung des Mediums, Inkubationszeit oder Größe des bakteriellen Inokulums, großen Einfluss auf die MIC-Werte haben (ISENBERG, 1993), können sich durch unterschiedliche Versuchsbedingungen starke Abweichungen bei den MIC-Werten ergeben.

Untersuchungen zum Einfluss der Salzkonzentration auf die antimikrobielle Aktivität ergaben für hBD3 nur eine minimale Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration (Kapitel 3.4.3). Als Modellsystem diente der Gram-positive Keim *Staphylococcus carnosus* TM300. Erst bei einer physiologischen NaCl-Konzentration von 150 mM stieg der MIC-Wert von 3 auf 10 µg/ml. Im Gegensatz dazu zeigt das unter gleichen Bedingungen getestete hBD4 eine deutlichere Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001). Da auch hBD1 und hBD2 in ihrer Aktivität stark abhängig von der Salz- bzw. NaCl-Konzentration sind (BALS *et al.*, 1998; VALORE *et al.*, 1998), stellt hBD3 einen Sonderfall bei den humanen β -Defensinen dar. Von HARDER *et al.* (2001) publizierte Daten stützen diesen Befund, gegen den dort getesteten Gram-positiven *Staphylococcus aureus* ATCC6538 wurde erst bei einer NaCl-Konzentration von 250 mM eine deutliche Abnahme der antimikrobiellen Aktivität von hBD3 beobachtet. Da aber hBD3 in MHB-Medium, das unter anderem einen erhöhten Gehalt an zweiwertigen Ionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} aufweist, eine stark verminderte Aktivität im Vergleich mit den ionenschwächeren Medien zeigt (Kapitel 3.4.2), liegt die Vermutung nahe, dass die Potenz von hBD3 von der Art der Ionen abhängig ist. Einwertige Kationen wie Na^+ haben offensichtlich nur minimalen Einfluss, während eine Zunahme an zweiwertigen Kationen eine starke Abnahme der antimikrobiellen Aktivität gegen alle getesteten Keime bewirkt. Dieser Befund lässt sich mit einem Modell erklären, das für Gram-negative Bakterien postuliert wurde. Dieses Modell besagt, dass kationische Peptide durch ihre Bindung an das negativ geladene bakterielle LPS die für die Stabilität der Bakterienoberfläche essentiellen zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} von ihren Bindestellen verdrängen und so die Integrität der äußeren Membran zerstören (HANCOCK UND SCOTT, 2000). Da die Peptide mit den Kationen um deren Bindungsstellen in der äußeren Membran konkurrieren (VAN'T HOF *et al.*, 2001), würde sich die mit zunehmender Konzentration an Kationen abnehmende Aktivität der Peptide erklären, da diese nur noch begrenzt mit der Bakterienmembran interagieren können. Im MHB-Medium war

aber auch gegen die beiden Gram-positiven Keime (*Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*) keine Aktivität für hBD3 mehr messbar, so dass dort ein ähnlicher Mechanismus vorliegen könnte, da auch Gram-Positive Bakterien negativ geladene Strukturen auf ihrer Zelloberfläche tragen. Inwieweit sich die Unempfindlichkeit von hBD3 gegenüber NaCl auch auf andere Bakteriengattungen als die getesteten Staphylococcen übertragen lässt, ist ein Punkt der in Zukunft noch geklärt werden muss. Publierte Daten zeigen, dass die Salzabhängigkeit einer antimikrobiellen Aktivität bei unterschiedlichen Keimen verschieden stark ausgeprägt ist (TURNER *et al.*, 1998), so dass die für hBD3 erarbeiteten Daten auch für andere Bakteriengattungen überprüft werden sollten.

Da ein einzelner Organismus bis zu drei Dutzend verschiedene antimikrobielle Peptide synthetisieren kann (TOSSI, 2002), die sowohl einzeln als auch in Kombination mit anderen antimikrobiellen Substanzen wirken können (YAN UND HANCOCK, 2001), stellt sich die Frage, ob sich die antimikrobielle Potenz von hBD3 durch Interaktion mit anderen Substanzen steigern lässt. Mit Hilfe des FIC-Tests (Kapitel 2.6.3) wurde anhand des Modellsystems *Staphylococcus carnosus* TM300 untersucht, inwieweit hBD3 mit anderen antimikrobiellen Substanzen interagiert. In Kombination mit dem kürzlich publizierten hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b) ergibt sich ein additiver Effekt an der Grenze zum Synergismus, d.h., durch Kombination von zwei humanen β -Defensinen kann die minimale Hemmkonzentration der Einzelsubstanzen deutlich herabgesetzt werden. Da beide Defensine vermutlich über einen ähnlichen Mechanismus wirken, der das Durchdringen der bakteriellen Zellmembran beinhaltet (HARDER *et al.*, 2001), können sie sich in ihrer Wirkung addieren. Für die Kombination von hBD3 und Lysozym, einer endogenen antimikrobiellen Substanz, wurde eine synergistische Wirkung beobachtet, wie es für andere antimikrobielle Peptide bereits beschrieben wurde (TRAVIS *et al.*, 2001). Dieser Effekt erklärt sich vermutlich dadurch, dass Lysozym die Polysaccharid-Ketten des Mureins in der bakteriellen Zellwand spaltet und so hBD3 das Eindringen in die Bakterienzelle erleichtert. Betrachtet man dagegen die Kombination aus hBD3 und Ampicillin, einem klassischen Antibiotikum, dann ergibt sich ein indifferenter Effekt. In diesem Fall beeinflussen sich beide Kombinationspartner in ihrer Wirkung nicht wesentlich. Ampicillin stört die Mureinbiosynthese der Bakterien, d.h. es wirkt im Gegensatz zu Lysozym nur auf Bakterien, die sich in der Wachstumsphase befinden. hBD3 dagegen führt in hohen Konzentrationen zu einer elektronenmikroskopisch sichtbaren Perforation der bakteriellen Zellmembran (HARDER *et al.*, 2001), und es kann aufgrund dieses Wirkmechanismus vermutet werden, dass es auf ruhende und wachsende Bakterienzellen wirkt. Ampicillin ist zwar die antimikrobiell stärkere Substanz, kann aber nur auf einen Teil der Bakterienpopulation wirken, so dass es zu keinem additiven oder synergistischen Effekt kommt.

Zusammengefasst ergibt sich für die hier getestete Peptidform von hBD3 (hBD3 (I₁)) eine moderate antimikrobielle Potenz. Unter günstigen Bedingungen wie z.B. in einem ionenschwachem Medium ergeben sich MIC-Werte, die eine klinische Einsetzbarkeit

suggestieren. Testet man aber unter stringenteren Bedingungen, z.B. in MHB-Medium, wie es in den NCCLS-Richtlinien empfohlen wird (ISENBERG, 1993), dann nimmt die antimikrobielle Potenz von hBD3 mit zunehmender Ionenstärke des Mediums stark ab oder verschwindet ganz. Dabei ergibt sich ein wichtiges Problem der *in silico*-Identifizierung: Man erhält eine cDNA-Sequenz, aus der man die Aminosäuresequenz ableiten kann, aber es lassen sich nur wenige Informationen über die natürlich vorkommende Peptidform erhalten. Während im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein hBD3-Peptid mit einer Länge von 40 Aminosäureresten chemisch synthetisiert wurde, gelang es HARDER *et al.* (2001) eine native Form von hBD3 aus der Haut von Psoriasis-Patienten zu isolieren, die N-terminal um fünf Aminosäurereste länger war. Außerdem isolierten ZUCHT *et al.* (1998) verschiedene N-terminal trunkierte Formen von hBD1 aus Hämofiltrat, was zeigt, dass *in vivo* verschiedene Peptidformen vorliegen können. Auch wenn MIC-Werte in Bezug auf die *in vivo*-Aktivität nur eine begrenzte Aussagekraft haben, da die *in vivo*-Situation in einem MIC-Test nicht simuliert werden kann, so stellt sich doch die Frage, welche strukturellen Voraussetzungen erfüllt sein müssen, um ein möglichst potentes β -Defensin zu erhalten. Da entsprechende Daten für β -Defensine bisher in der Literatur kaum zu finden sind, wurde anhand von hBD3 und dem kürzlich publizierten hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001) der Einfluss der Molekülstruktur auf die antimikrobielle Potenz untersucht. Zu diesem Zweck wurden von hBD3 (und hBD4) verschiedene Derivate synthetisiert. Um den Einfluss der Disulfidverbrückung auf die antimikrobielle Potenz zu untersuchen, wurden hBD3-Peptide mit unterschiedlichem Disulfidmuster oder ohne Disulfidverbrückung getestet. Dazu gehörten unter anderem Peptide, deren Cysteine alkyliert oder durch Alanin bzw. Tryptophan ersetzt waren. Für Protegrine, die zwei Disulfidbrücken besitzen, wurde gezeigt, dass die linearen Formen eine geringere antimikrobielle Potenz aufweisen (FIDDES, 2000). Die Disulfidverbrückung ist insofern wichtig, als dass sie die Tertiärstruktur, welche die antimikrobiell aktive Molekülstruktur darstellt, stabilisiert (BAUER *et al.*, 2001). Interessanterweise bildete sich bei der oxidativen Faltung des linearen hBD4-Vorläuferpeptids nur ein Produkt mit der für β -Defensine erwarteten Disulfidverbrückung (Kapitel 3.3), während bei hBD3 (I_1) verschiedene Peptidformen mit unterschiedlichem Disulfidmuster entstanden, so dass nur von hBD3 entsprechende Disulfidisomere untersucht wurden. Desweiteren sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Länge der Aminosäuresequenz hat. Eine Voraussetzung für die antimikrobielle Aktivität ist eine positive Nettoladung. Bei einer Verkürzung der Aminosäuresequenz nimmt diese unter Umständen ab, wodurch die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende Bindung an die bakterielle Zellmembran erschwert wird (HWANG UND VOGEL, 1998) und die antimikrobielle Potenz geringer wird.

Da die Wirksamkeit vieler antimikrobieller Peptide mit steigender Ionenkonzentration des Mediums stark abnimmt, wurden die MIC-Werte der hBD3- und hBD4-Derivate sowohl in verdünntem $\frac{1}{4}$ MHB-Medium als auch teilweise in MHB-Medium bestimmt (Kapitel 3.5). Fast alle Derivate zeigten in dem ionenstärkerem MHB-Medium eine deutlich verminderte oder gar

keine Aktivität mehr. Wie oben beschrieben, zeigt die Urform hBD3 (I_1) nur eine minimale Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration, so dass hier eher zweiwertige Ionen als Grund für die starke Abnahme der Aktivität vermutet werden. Die Urform hBD4 (3-39) dagegen erwies sich schon gegenüber der NaCl-Konzentration als sehr empfindlich (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001), so dass die deutliche Reduktion der Aktivität in dem ionenstärkeren MHB-Medium nicht überrascht. Im verdünnten $\frac{1}{4}$ MHB-Medium zeigen die hBD3-Derivate mit 40 oder 45 Aminosäureresten gute MIC-Werte, die allerdings in den meisten Fällen über der von HANCOCK (1997) für klinisch einsetzbare antimikrobielle Peptide postulierten Größenordnung von 1-8 $\mu\text{g/ml}$ liegen, während für die stark verkürzten Derivate hBD3-N und hBD3-C (Kapitel 3.3) nur geringe Aktivität beobachtet werden konnte. Beide Derivate entsprechen jeweils dem N- bzw. C-terminalen Anteil der Aminosäuresequenz von hBD3 (I_1), und durch die radikale und einseitige Verkürzung kann offensichtlich nur noch eine begrenzt aktive Molekülstruktur ausgebildet werden. Dabei sind sowohl eine positive Nettoladung als auch die durch Disulfidbrücken stabilisierte Tertiärstruktur wichtige Parameter bei der Interaktion mit der bakteriellen Zellmembran (BAUER *et al.*, 2001). An den hBD4-Derivaten wiederum war zu beobachten, dass eine Verlängerung der Aminosäuresequenz nicht zwingend zu einer gesteigerten antimikrobiellen Aktivität führt. Die publizierte Variante hBD4 (3-39) (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001) erzielte niedrigere MIC-Werte als die beiden N- und/oder C-terminal verlängerten Formen. Dabei könnte es sich bemerkbar machen, dass die zusätzlichen Aminosäurereste nicht zu einer Erhöhung der positiven Nettoladung beitragen. Ein gutes Beispiel sind auch die beiden Derivate [Ala]-hBD3 und [Ala]-hBD4, bei denen alle Cysteine durch Alanin substituiert wurden. Während [Ala]-hBD3 in $\frac{1}{4}$ MHB-Medium eine ähnlich gute Aktivität wie die Urform hBD3 (I_1) zeigt (Kapitel 3.5), wird für [Ala]-hBD4 eine deutlich reduzierte Aktivität im Vergleich mit der Urform hBD4 (3-39) sichtbar. [Ala]-hBD4 trägt im Vergleich mit [Ala]-hBD3 eine geringere positive Nettoladung, so dass sich bei diesem Derivat die fehlenden Disulfidbrücken wahrscheinlich stärker bemerkbar machen als bei [Ala]-hBD3. Die kleine, hydrophobe Aminosäure Alanin hat wenig Einfluss auf die Ausbildung der Tertiärstruktur (HRUBY, 2002) und interagiert auch nicht mit der bakteriellen Zellmembran, desweiteren fehlen die stabilisierenden Disulfidbrücken. Insofern wird die antimikrobielle Aktivität dieser Derivate in erster Linie über die positive Nettoladung bestimmt. Ein Austausch einzelner Aminosäurereste gegen Alaninreste wird im allgemeinen durchgeführt, um den Einfluss bestimmter Aminosäurereste auf die biologische Aktivität des Moleküls zu überprüfen (HRUBY, 2002).

Im ionenstärkeren MHB-Medium war nur noch für zwei hBD3-Derivate eine signifikante Aktivität zu beobachten. Dabei handelte es sich um hBD3- I_3 und [Trp]-hBD3. Beide Derivate haben im Vergleich mit der Urform hBD3 (I_1) einen erhöhten hydrophoben Charakter, bei hBD3- I_3 sind es zwei zusätzliche Isoleucinreste im N-Terminus, während bei [Trp]-hBD3 alle Cysteine gegen Tryptophan ausgetauscht wurden (Kapitel 3.3). Für α -Defensine z.B. wurde gezeigt, dass durch Einfügen von zwei hydrophoben Aminosäureresten im N-Terminus und zwei

basischen Argininresten im C-Terminus von HNP2 ein sehr aktives Molekül entsteht (RAJ *et al.*, 2000). Ein ähnliches Szenario ist auch beim Derivat hBD3-I₃ gegeben: Dieses Derivat besitzt am N-Terminus jene zwei hydrophoben Isoleucinreste sowie am C-Terminus zwei Arginin- und zwei Lysinreste, desweiteren bildet dieses Derivat auch die für β -Defensine erwartete Disulfidverbrückung aus (Kapitel 3.3). hBD3-I₃ zeigt im MHB-Medium eine stärkere Aktivität gegen Gram-positive Keime, was im $\frac{1}{4}$ MHB-Medium so deutlich nicht zu beobachten war (Kapitel 3.5). Ein ähnlicher Effekt wurde von SCHIBLI *et al.* (2001) für ein hBD3-Peptid beobachtet, das eine zu hBD3-I₃ identische Aminosäuresequenz aufweist. Die stärkere Aktivität gegen den Gram-positiven *Staphylococcus aureus* wird damit begründet, dass hBD3 in wässrigen Lösungen im Gegensatz zu hBD1 und hBD2 als Dimer vorliegt und auch eine deutlich höhere positive Oberflächenladung aufweist (SCHIBLI *et al.*, 2001). Welchen Einfluss die Disulfidverbrückung auf die Aktivität hat, kann aber anhand der vorhandenen Disulfidisomere nicht geklärt werden, da den beiden anderen Disulfidisomeren die fünf zusätzlichen Aminosäurereste am N-Terminus fehlen. Man würde ein Derivat mit der kürzeren Aminosäuresequenz und dem für β -Defensine-typischen Disulfidmuster benötigen, welches aber zur Zeit der Experimente noch nicht zur Verfügung stand, da sich die Synthese als unerwartet schwierig gestaltete.

Noch extremer ist die Situation beim Derivat [Trp]-hBD3, das durch das Einfügen der aromatischen Aminosäure Tryptophan hydrophober wird, wodurch eine Interaktion mit den hydrophoben Anteilen der Zellmembran erleichtert wird (HWANG UND VOGEL, 1998). Durch Versuche mit Modell-Membranen konnte gezeigt werden, dass Tryptophan mit der Lipid-Doppelschicht interagiert und sich in die Membran einfügt (HANCOCK UND ROZEK, 2002). Tryptophan ist eine recht große Aminosäure, die die native Faltung stört. Aufgrund seiner Molekülgröße ist zu vermuten, dass es aus dem Peptid herausragt, wodurch ein Kontakt mit der Zellmembran erleichtert wird. Dadurch wird trotz dem Fehlen der stabilisierenden Disulfidbrücken eine Struktur gebildet, die eine Interaktion mit Membranen erlaubt. Denkbar wäre, wie von RAJ *et al.* (2000) für α -Defensine beschrieben, dass der N- und C-Terminus den polaren Anteil und der Bereich mit den Tryptophanresten den apolaren Anteil des Moleküls bildet, so dass eine überaus aktive amphipathische Molekülstruktur entsteht. In Verbindung mit der hohen positiven Nettoladung dieses Derivats ergibt sich eine von der Ionenkonzentration relativ unabhängige antimikrobielle Aktivität. STRAUBITZ *et al.* (2001) haben gezeigt, dass in dem von Natur aus Tryptophan-reichen Indolicidin der Austausch von Tryptophan gegen Valin, Serin, Lysin, Tyrosin, Leucin u.a. eine deutliche oder sogar vollständige Reduzierung der antimikrobiellen Aktivität zur Folge hat. Für [Trp]-hBD4, dem entsprechendem hBD4-Derivat, konnte dagegen in MHB-Medium nur noch eine schwache Aktivität gegen einen Keim beobachtet werden. Auch hier scheint sich die geringere positive Nettoladung der hBD4-Derivate bemerkbar zu machen. So besitzt [Trp]-hBD4 am N- und C-Terminus insgesamt drei basische sowie drei saure Aminosäurereste während es bei [Trp]-hBD3 fünf basische sind (Kapitel 3.3).

Die Fähigkeit antimikrobieller Peptide, sich an Zellmembranen anzulagern und diese zu permeabilisieren, wird in vielen Fällen als Wirkmechanismus dieser Substanzen angesehen (ANDREU UND RIVAS, 1998). Dabei ist es in Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Arzneimittel aber wichtig, dass bakterielle Membranen selektiv geschädigt werden, während eukaryotische Zellen möglichst unbeeinflusst bleiben sollten. Eine gängige Methode zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung eines Peptids auf eukaryotische Zellen ist der Hämolysetest (HELMERHORST *et al.*, 1999). Die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten dient dabei als Nachweis für die membranlyisierende Aktivität einer Substanz (Kapitel 2.8.1). Eine weitere Möglichkeit, die zytotoxische Wirkung einer Substanz zu untersuchen, ist der WST-1-Assay (Kapitel 2.8.2). Mit diesem Testverfahren wird die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt, wobei die Vitalität der Zellen umgekehrt proportional zur zytotoxischen Aktivität der getesteten Substanzen ist (BAKER *et al.*, 1993). Im Gegensatz zum einfach durchzuführenden Hämolysetest ist der WST-1-Assay deutlich aufwändiger, hat aber den Vorteil, dass verschiedene Zelltypen getestet werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die zytotoxische Wirkung sowohl anhand einer etablierten Zelllinie als auch an primären humanen Lymphozyten bestimmt werden, da primäre Zellen oftmals empfindlicher reagieren. Da die primären Lymphozyten aber in der noch zur Verfügung stehenden Zeit nicht ausreichend kultiviert werden konnten, kam nur die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 zum Einsatz (Kapitel 2.7.1).

Ein Vergleich der drei Disulfidisomere von hBD3 ergibt für die beiden Isomere hBD3 (I₁) und hBD3-I₂ selbst in der höchsten Konzentration nur eine minimale hämolytische Wirkung von jeweils unter 10% (Kapitel 3.6). Gegen THP-1-Zellen wiederum konnte nur in der höchsten Konzentration ein deutlicher zytotoxischer Effekt beobachtet werden (Kapitel 3.7). Beide Isomere zeigen eine vergleichbare hämolytische bzw. zytotoxische Aktivität, so dass hier die Art der Disulfidverbrückung nur wenig Einfluss zu haben scheint. Das Isomer hBD3-I₃ dagegen zeigt sowohl eine erhöhte hämolytische als auch eine erhöhte zytotoxische Wirkung. Durch zwei zusätzliche Isoleucinreste im verlängerten N-Terminus erhöht sich bei diesem Isomer der Anteil hydrophober Aminosäuren, wodurch eine Interaktion mit eukaryotischen Zellmembranen erleichtert und die hämolytische bzw. zytotoxische Aktivität erhöht wird (HWANG UND VOGEL, 1998). Ein ähnlicher Effekt war auch bei den Derivaten [Trp]-hBD3 und [Trp]-hBD4 zu beobachten. Im Vergleich mit der jeweiligen Urform hBD3 (I₁) bzw. hBD4 (3-39) besitzen beide Derivate eine deutlich höhere hämolytische bzw. zytotoxische Wirkung. Wie schon beschrieben, lässt sich dieser Effekt mit dem höheren Anteil an hydrophoben Tryptophanresten erklären. Das Derivat [Trp]-hBD3 scheint aber nicht nur Erythrozyten zu lysieren, sondern auch am Hämoglobin direkt zu wirken. So konnten am Versuchsende weder intakte Erythrozyten noch freigesetztes Hämoglobin bei der vorgeschriebenen Wellenlänge detektiert werden (Kapitel 3.6). Der Wirkmechanismus ist allerdings unklar und könnte in Zukunft Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Ersetzt man dagegen die konservierten Cysteine gegen die kleine, hydrophobe Aminosäure Alanin, so hat das nur wenig Einfluss auf die hämolytische bzw.

zytotoxische Aktivität. Die entsprechenden Derivate erwiesen sich alle als schwach zytotoxisch wirksam.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Derivate stellen nur eine Auswahl aller möglichen hBD3-Varianten dar. So könnte z.B. die Aminosäuresequenz C- oder N-terminal jeweils um einen Aminosäurerest verkürzt werden, um die für eine optimale Aktivität benötigten Aminosäurereste zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Synthese von Derivaten mit D-Aminosäuren, um so einen möglichen Einfluss der Stereochemie auf die antimikrobielle Wirksamkeit zu erfassen. Für Protegrine und Indolicidin wurde z.B. gezeigt, dass L- und D-Analoga eine vergleichbare biologische Aktivität besitzen (CHEN *et al.*, 2000; STRAUBITZ *et al.*, 2001). Trotz der beschränkten Zahl an Derivaten lassen sich aus den Daten einige Prinzipien der Struktur-Aktivitätsrelation (SAR) bei hBD3 und hBD4 ableiten:

- 1) Das Vorhandensein von Disulfidbrücken ist prinzipiell keine notwendige Voraussetzung für die antimikrobielle Aktivität von hBD3. So zeigt z.B. das Derivat hBD3-Cam, bei dem die Ausbildung der Disulfidverbrückung durch Alkylierung der Cysteine verhindert wird, eine gut detektierbare Aktivität. Allerdings wird die Wirksamkeit dieses Derivats mit zunehmender Ionenkonzentration des Testmediums stark reduziert, da die stabilisierenden Disulfidbrücken fehlen. Da hBD3 im Vergleich mit hBD1, hBD2 und hBD4 (Tabelle 18) über die höchste positive Nettoladung verfügt, muss in Zukunft noch geklärt werden, ob sich dieser Befund auf die anderen drei humanen β -Defensine übertragen lässt.
- 2) Eine deutliche Verkürzung der Aminosäuresequenz, wie bei den C- bzw. N-terminalen Fragmenten von hBD3 der Fall, führt unter Umständen zu einer stark reduzierten antimikrobiellen Aktivität. Durch diese einseitige Verkürzung kann vermutlich die für optimale Aktivität notwendige Molekülstruktur nicht mehr ausgebildet werden.
- 3) Eine Verlängerung der Aminosäuresequenz, wie bei den hBD4-Derivaten hBD4 (1-39) und hBD4 (1-50) der Fall, führt nicht automatisch zu einer gesteigerten antimikrobiellen Potenz. Die publizierte, kürzere Variante hBD4 (3-39) (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b; KRAUSE, 2001) war in diesem Fall auch die aktivste Form, da die längeren Varianten durch die zusätzlichen sauren Aminosäurereste eine niedrigere positive Nettoladung aufwiesen.
- 4) Der Austausch von Cysteinen gegen die aromatische Aminosäure Tryptophan führt im Fall von hBD3 zu einer gesteigerten antimikrobiellen Potenz, die allerdings auch mit einer deutlich höheren hämolytischen bzw. zytotoxischen Aktivität verbunden ist.
- 5) Der direkte Vergleich der entsprechenden Derivate von hBD3 und hBD4 zeigt, dass sich Veränderungen in der Molekülstruktur bei verschiedenen Peptiden unterschiedlich stark auswirken können. Deshalb müssen die für hBD3 erarbeiteten Befunde für andere β -Defensine separat überprüft werden.

Weitere Funktionen von hBD3

Die Klassifizierung der antimikrobiellen Peptide erfolgte aufgrund ihrer Strukturbesonderheiten und ihrer breiten antimikrobiellen Wirkung. Allerdings weisen die Ergebnisse neuerer Arbeiten darauf hin, dass antimikrobielle Peptide weitergehende Funktionen bei der Regulation der Immunantwort haben können und damit sowohl einen wichtigen Teil der angeborenen Immunabwehr als auch ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen (HANCOCK UND SCOTT, 2000; YANG *et al.*, 2001). SCOTT *et al.* (2000) konnten z.B. zeigen, dass verschiedene antimikrobielle Peptide wie MBI-28, Indolicidin, Polymyxin, HNP1 und hBD2 aufgrund ihrer positiven Ladung in der Lage sind, bakterielles LPS zu binden und so in murinen Makrophagen die Interaktion von LPS und LBP (*LPS-binding protein*) zu blockieren, wodurch die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α gehemmt wird. Zur weiteren Charakterisierung von hBD3 wurde sowohl die LPS-Bindungsaktivität als auch der Einfluss auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α in humanen Blutzellen überprüft (Kapitel 3.8 und 3.9).

Während mit dem verwendeten Assay für MBI-28 und hBD2, wie in der Literatur bereits beschrieben (SCOTT *et al.*, 2000), eine hohe bzw. moderate LPS-Bindungsaktivität beobachtet wurde, war für hBD3 keine LPS-Bindung messbar. Für dieses Experiment wurde eine Peptidform mit 40 Aminosäureresten eingesetzt, da die anderen Derivate zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung standen. Die verwendete Peptidform ist allerdings N-terminal fünf Aminosäuren kürzer als die von HARDER *et al.* (2001) aus Haut isolierte Form und zeigt ein für β -Defensine-untypisches Disulfidmuster. Beide Formen besitzen zwar eine identische hohe positive Nettoladung, was für die LPS-Bindung von Vorteil sein sollte (LAZARON UND DUNN, 2002). Aber andererseits wäre es möglich, dass durch die N-terminale Verkürzung und die abweichende Disulfidverbrückung die Ausbildung der für die LPS-Bindung notwendigen Molekülstruktur verhindert wird. hBD2, das zwar das für β -Defensine erwartete Disulfidmuster, aber auch eine deutliche niedrigere positive Nettoladung besitzt, kann dagegen LPS binden. Insofern könnte auch die Art der Disulfidverbrückung Einfluss auf die LPS-Bindungsaktivität haben. Das N-terminal längere Derivat hBD3-I₃, welches bezüglich der Aminosäuresequenz der von HARDER *et al.* (2001) isolierten Form entspricht, zeigt im Vergleich mit hBD3 (I₁) eine deutlich stärkere antimikrobielle und zytotoxische Aktivität, so dass es möglich erscheint, dass diese Peptidform eventuell auch bakterielles LPS binden könnte.

Die Bindung von freiem LPS ist wiederum eine Voraussetzung für die Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung von TNF- α (GOUGH *et al.*, 1996; SCOTT *et al.*, 2000). Entsprechende Experimente (Kapitel 3.9) ergaben, dass hBD3 (I₁) in humanen Blutzellen keinen hemmenden Einfluss auf die TNF- α -Freisetzung nach Stimulation mit LPS hat. Auch hier wurde lediglich die kürzere Variante hBD3 (I₁) verwendet. Zwar konnte nur ein Experiment ausgewertet werden, so dass das Ergebnis unter Vorbehalt bewertet werden sollte, aber andererseits war aufgrund der

fehlenden LPS-Bindungsaktivität kein hemmender Einfluss auf die TNF- α -Freisetzung zu erwarten. Auch hier stellt sich die Frage, ob mit hBD3 (I₁) nicht eine ungeeignete Peptidform eingesetzt wurde. Insofern wäre es sinnvoll, bei einer zukünftigen funktionellen Charakterisierung das Derivat hBD3-I₃ zu verwenden, da es eher der natürlich vorkommenden Form entspricht (HARDER *et al.*, 2001). Noch besser wäre es allerdings, die native Form zu verwenden und genauer zu charakterisieren. Abschließend ist noch festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit die in murinen Makrophagen beschriebene Hemmung der LPS-induzierten TNF- α -Freisetzung (SCOTT *et al.*, 2000) für MBI-28 auch in humanen Blutzellen beobachtet werden konnte. Für hBD2 dagegen konnte die Hemmung von TNF- α in humanen Blutzellen nicht reproduziert werden. Ob es sich hierbei um ein experimentelles Problem oder um spezifische Effekte von hBD2 in humanen Zellen handelt, muss in Zukunft in weiteren Experimenten verifiziert werden.

Verschiedene Publikationen der letzten Jahre (YANG *et al.*, 1999; COLE *et al.*, 2001; HOOVER *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2002; DÜRR UND PESCHEL, 2002) haben überzeugend dargestellt, dass es zwischen Defensinen und Chemokinen zu Überschneidungen bezüglich Struktur und Aktivität kommen kann. So konnte sowohl für einige Chemokine eine antimikrobielle Wirkung (COLE *et al.*, 2001), als auch für verschiedene Defensine eine chemotaktische Aktivität nachgewiesen werden (CHERTOV *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2002). Um hBD3 auf eine mögliche chemotaktische Wirkung hin zu überprüfen, wurde die N-terminal verkürzte Peptidform hBD3 (I₁) in einem Chemotaxisassay (Kapitel 2.11) getestet. Während hBD3 schon im nanomolaren Bereich schwach chemotaktisch auf Monozyten wirkt, konnte bei Eosinophilen und Neutrophilen kein Effekt festgestellt werden. YANG *et al.* (2002) beschreiben hBD3 ebenfalls als chemotaktisch für Monozyten, machen allerdings keine näheren Angaben zu Testmethode, eingesetzten Konzentrationen oder der verwendeten Peptidform, so dass ein Vergleich nicht möglich ist. Es ist aber zu vermuten, dass die von HARDER *et al.* (2001) isolierte, natürliche Form verwendet wurde. Dabei wäre es interessant, ob die längere Peptidform im Vergleich mit der kürzeren Variante hBD3 (I₁) eventuell eine stärkere chemotaktische Wirkung zeigt. Auch für das kürzlich publizierte hBD4 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b) wurde ein vergleichbarer Effekt auf Monozyten beobachtet. Da antimikrobiell aktive Peptide bevorzugt an Orten mikrobieller Besiedlung erwartet werden, erscheint die Anlockung phagozytierender Zellen als sinnvoll. Darüberhinaus ist hBD3 auch chemotaktisch für unreife dendritische Zellen (YANG *et al.*, 2002), was darauf hindeutet, dass hBD3 neben der antimikrobiellen Wirkung auch eine regulierende Funktion bei der Immunantwort hat.

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte *in silico*-Analyse führte zur erfolgreichen Identifizierung eines neuen humanen β -Defensins. Die Charakterisierung ergab einerseits ein typisches epitheliales β -Defensin mit antimikrobieller Wirkung, andererseits ergaben sich auch untypische Befunde, wie z.B. die Expression in Gesamthoden und Skelettmuskulatur. Neuere Publikationen zeigen deutlich, dass es sich bei β -Defensinen um eine entschieden

vielschichtigere Gruppe handelt als bislang angenommen. Das bisher geltende Bild vom klassischen antimikrobiell aktiven β -Defensin epithelialen Ursprungs muss überdacht werden. Die *in silico*-Analyse ist bei geeigneten Peptidfamilien wie den Defensinen eine effektive Methode, um neue Mitglieder zu identifizieren. Der Nachteil ist aber, dass man nur begrenzte Informationen zu den natürlich vorkommenden Peptidformen erhält. Andererseits ist die native Peptidform wichtig für eine funktionelle Charakterisierung, da, wie diese Arbeit gezeigt hat, Veränderungen in der Aminosäuresequenz großen Einfluss auf die biologische Aktivität haben können. Ganz speziell bei den β -Defensinen muss, auch in Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung, zukünftig noch viel Forschungsarbeit geleistet werden, um die biologischen Funktionen dieser Peptide vollständig aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung eines neuen antimikrobiellen Peptids aus der Gruppe der humanen β -Defensine. Da β -Defensine über ein konserviertes Cystein-Motiv verfügen, und die zu Beginn dieser Arbeit bekannten humanen Defensine gehäuft auf Chromosom 8 vorlagen, eignete sich diese Peptidfamilie besonders gut für eine *in silico*-Analyse. Mit Hilfe verschiedener Computerprogramme wurden Datenbanken, die Sequenzen des humanen Genoms enthielten, nach dem für β -Defensine-typischen Cystein-Motiv durchsucht. Auf Chromosom 8p23 konnte dann erfolgreich das Gen für ein neues humanes β -Defensin identifiziert werden, welches hBD3 genannt wurde.

Eine in 25 humanen Geweben durchgeführte Expressionsanalyse ergab, dass hBD3 sowohl in epithelialen als auch nicht-epithelialen Geweben transkribiert wird, was bislang für β -Defensine so noch nicht beschrieben worden war. Die höchste Expression wurde dabei in Plazenta, Gesamthoden und Ösophagus nachgewiesen. In einer humanen Keratinozyten-Zelllinie konnte nach Stimulation mit IFN- γ eine deutliche Induktion der hBD3-Expression beobachtet werden, während mit TNF- α oder pathogenen Bakterien in diesem Zelltyp kein Effekt erzielt wurde. Synthetisches hBD3 (I_1) zeigt in ionenschwachen Medien eine gute antimikrobielle Aktivität gegen pathogene und nicht-pathogene Bakterien. Die antimikrobielle Aktivität von hBD3 (I_1) ist relativ unempfindlich gegenüber der NaCl-Konzentration des Testmediums, wird aber in komplexen Medien, wie z.B. Mueller-Hinton-Broth, deutlich reduziert. In Kombination mit Lysozym wurde ein synergistischer Effekt beobachtet, während die Kombination von hBD3 und hBD4 einen additiven Effekt ergab. Darüber hinaus wirkt die Peptidform hBD3 (I_1) in nanomolaren Konzentrationen chemotaktisch auf humane Monozyten. Weitere Versuche ergaben, dass hBD3 (I_1) keine LPS-Bindungsaktivität besitzt und auch keinen hemmenden Einfluss auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α hat.

Untersuchungen zur Struktur-Aktivitätsrelation an verschiedenen Struktur- und Disulfidisomeren zeigten, dass bei hBD3 die Disulfidverbrückung keine prinzipielle Voraussetzung für antimikrobielle Aktivität darstellt. Durch Austausch der Cysteine gegen hydrophobe Tryptophanreste wird sowohl die antimikrobielle als auch die zytotoxische Aktivität erhöht, während die Ausgangsform hBD3 (I_1) nur schwach hämolytisch bzw. zytotoxisch aktiv ist. Durch zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus in Kombination mit der für β -Defensine erwarteten Disulfidverbrückung konnte bei dem Derivat hBD3- I_3 , das in Bezug auf die Aminosäuresequenz identisch mit der natürlich vorkommenden Peptidform ist, die biologische Aktivität gesteigert werden. Das zeigt, dass die Kenntnis der nativen Peptidform wichtig für eine funktionelle Charakterisierung ist, da die biologische Aktivität stark von der Molekülstruktur abhängt.

6. Literaturverzeichnis

- Aderem, A. und Ulevitch, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- Agerberth, B., Lee, J.Y., Bergman, T., Carlquist, M., Boman, H.G., Mutt, V. und Jornvall, H. (1991) Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur. J. Biochem.* **202**, 849-854.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Andreu, D. und Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides. An overview. *Biopolymers (Peptide Science)* **47**, 415-433.
- Baker, M.A., Maloy, W.L., Zasloff, M. und Jacob, L.S. (1993) Anticancer efficacy of Magainin 2 and analogue peptides. *Cancer Res.* **53**, 3052-3057.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M. und Wilson, J.M. (1998) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.* **102**, 874-880.
- Bauer, F., Schweimer, K., Klüver, E., Conejo-García, J.R., Forssmann, W.-G., Rösch, P., Adermann, K. und Sticht, H. (2001) Structure determination of human and murine β -defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci.* **10**, 2470-2479.
- Becker, M.N., Diamond, G., Verghese, M.W. und Randell, S.H. (2000) CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J. Biol. Chem.* **275**, 29731-29736.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K. und Tomita, M. (1992) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 472-479.
- Bensch, K.W., Raida, M., Mägert, H.J, Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W.-G. (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**, 331-335.
- Bierbaum, G. und Sahl, H.G. (1985) Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* **141**, 249-254.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1522.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. und Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* **106**, 761-771.

- Boman, H.G., Agerberth, B. und Boman, A. (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.* **61**, 2978-2984.
- Boman, H.G. (1994) Antibacterial Peptides: Key components needed in immunity. *Cell* **65**, 205-207.
- Boman, H.G. (1998) Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: An update review. *Scand. J. Immunol.* **48**, 15-25.
- Casey, L.C. (2000) Immunologic response to infection and its role in septic shock. *Crit. Care. Clin.* **16**, 193-213.
- Chen J., Falla, T.J., Liu, H., Hurst, M.A., Fujii, C.A., Mosca, D.A., Embree, J.R., Loury, D.J., Radel, P.A., Cheng Chang, C., Gu, L. und Fiddes J.C. (2000) Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolymers* **55**, 88-98.
- Chertov, O., Michiel, D.F., Xu, L., Wang, J.M., Tani, K., Murphy, W.J., Longo, D.L., Taub, D.D. und Oppenheim, J.J. (1996) Identification of Defensin-1, Defensin-2, and CAP37/Azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from Interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* **6**, 2935-2940.
- Chopra, I., Hodgson, J., Metcalf, B. und Poste, G. (1997) The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 497-503.
- Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J. und Gusovsky, F. (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 10689-10692.
- Cole, A.M., Ganz, T., Liese, A.M., Burdick, M.D., Liu, L. und Strieter, R.M. (2001) IFN-inducible ELR⁻ CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J. Immunol.* **167**, 623-627.
- Conejo-García, J.R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodríguez-Jiménez, F.J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W.-G. und Bals, R. (2001a) Identification of a novel, multifunctional β -defensin (hBD-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.
- Conejo-García, J.R., Krause, A., Schulz, S., Rodríguez-Jiménez, F.J., Klüver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R. und Forssmann, W.-G. (2001b) Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**, 1819-1821.

- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W.L. und Bevins, C.L. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3952-3956.
- Diamond, G. und Bevins, C.L. (1998) beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **88**, 221-225.
- Dürr, M. und Peschel, A. (2002) Chemokines meet defensins: the merging concept of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect. Immun.* **70**, 6515-6517.
- Fiddes, J.C. (2000) Protegrin antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Drug Discov. & Devel.* **3**, 655-662.
- Fröhlich, O., Po, C. und Young, L.G. (2001) Organization of the human gene encoding the epididymis-specific EP2 protein variants and its relationship to defensin genes. *Biol. Reprod.* **64**, 1072-1079.
- Friedrich, C., Scott, M.G., Karunaratne, N., Yan, H. und Hancock, R.E. (1999) Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**, 1542-1548.
- Ganz, T. (1999) Defensins and host defense. *Science* **286**, 420-421.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M. und Rodriguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* **47**, 479-491.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G. und Shai, Y. (1995) Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**, 11479-11488.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Ghiselli, R., Mocchegiani, F., Del Prete, M.S., Viticchi, C., Kamysz, W., Lempicka, E., Saba, V. und Scalise, G. (2002) Potential therapeutic role of cationic peptides in three experimental models of septic shock. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**, 2132-2136.
- Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M. und Wilson, J.M. (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**, 553-560.
- Gough, M., Hancock, R.E. und Kelly, N.M. (1996) Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect. Immun.* **64**, 4922-4927.
- Gudmundsson, G.H. und Agerberth, B. (1999) Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J. Immunol. Methods* **232**, 45-54.
- Gunn, J.S. (2001) Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J. Endotoxin Res.* **7**, 57-62.

- Guo, L., Lim, K.B., Poduje, C.M., Daniel, M., Gunn, J.S., Hackett, M. und Miller, S.I. (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**, 189-198.
- Gura, T. (2001) Innate immunity. Ancient system gets new respect. *Science* **291**, 2068-2071.
- Hancock, R.E.W. (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* **349**, 418-22.
- Hancock, R.E.W. und Chapple, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317-1323.
- Hancock, R.E.W. (2000) Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **9**, 1723-1728.
- Hancock, R.E.W. und Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**, 402-410.
- Hancock, R.E.W. und Scott, M.G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8856-8861.
- Hancock, R.E.W. und Rozek, A. (2001) Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 143-149.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J.M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L.M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S. und Schröder, J.M. (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **22**, 714-721.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J.M. (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* **276**, 5707-5713.
- Harwig, S.S., Swiderek, K.M., Kokryakov, V.N., Tan, L., Lee, T.D., Panyutich, E.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V. und Lehrer, R.I. (1994) Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes. *FEBS Lett.* **342**, 281-285.
- Haukland, H.H., Ulvatne, H., Sandvik, K. und Vorland, L.H. (2001) The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Lett.* **508**, 389-393.
- Helmerhorst, E.J., Reijnders, I.M., van 't Hof, W., Veerman, E.C. und Nieuw Amerongen, A.V. (1999) A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett.* **449**, 105-110.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. und Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7276-7280.

- Hoover, D.M., Boulègue, C., Yang, D., Oppenheim, J.J., Tucker, K., Lu, W. und Lubkowski, J. (2002) The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J. Biol. Chem.* **40**, 37647-37654.
- Hruby, V.J. (2002) Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **1**, 847-858.
- Hughes, A.L. (1999) Evolutionary diversification of the mammalian defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 94-103.
- HUGO Gene Nomenclature Committee (2002); <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>
- Hwang, P.M. und Vogel, H.J. (1998) Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell. Biol.* **76**, 235-246.
- Isenberg, H.D. (1993) Clinical microbiology procedures handbook, Supplement 1. American Society for Microbiology, New York.
- Jia, H.P., Schutte, B.C., Schudy, A., Linzmeier, R., Guthmiller, J.M., Johnson, G.K., Tack, B.F., Mitros, J.P., Rosenthal, A., Ganz, T. und McCray, P.B. Jr. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* **263**, 211-218.
- Kaiser, V. und Diamond, G. (2000) Expression of mammalian defensin genes. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 779-784.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. und Zinkernagel, R.M. (1998) Medizinische Mikrobiologie. 9. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Kirikae, T., Hirata, M., Yamasu, H., Kirikae, F., Tamura, H., Kayama, F., Nakatsuka, K., Yokochi, T. und Nakano, M. (1998) Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infect. Immun.* **66**, 1861-1868.
- Klinke, R. und Silbernagl, S. (1994) Lehrbuch der Physiologie. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Klüver, E., Schulz, A., Forssmann, W.G. und Adermann, K. (2002) Chemical synthesis of beta-defensins and LEAP-1/hepcidin. *J. Pept. Res.* **59**, 241-248.
- Krause, A. (2001) Charakterisierung neuer humaner antimikrobieller Peptide: LEAP-1, LEAP-2 und humanes β -Defensin 4. Dissertation im Fachbereich Chemie der Universität Hannover.
- Latham, P.W. (1999) Therapeutic peptides revisited. *Nat. Biotechnol.* **17**, 755-757.

- Lazaron, V. und Dunn, D.L. (2002) Molecular biology of endotoxin antagonism. *World J. Surg.* **26**, 790-798.
- Lee, L.G., Connell, C.R. und Bloch, W. (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3761-3766.
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S.L., Jackson, R. und Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immun. Methods* **137**, 167-173.
- Le Roy, D., Di Padova, F., Adachi, Y., Glauser, M.P., Calandra, T. und Heumann, D. (2001) Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against Gram-negative bacteria. *J. Immunol.* **167**, 2759-2765.
- Levy, O. (2002) Therapeutic potential of the bactericidal/permeability-increasing protein. *Expert Opin. Investig. Drugs* **11**, 159-167.
- Levy, S.B. (1998) The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Am.* **278**, 46-53.
- Li, P., Chan, H.C., He, B., So, S.C., Chung, Y.W., Shang, Q., Zhang, Y.D. und Zhang, Y.L. (2001) An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* **291**, 1783-1785.
- Liao, F., Rabin, R.L., Smith, C.S., Sharma, G., Nutman, T.B. und Farber, J.M. (1999) CC-Chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 α . *J. Immunol.* **162**, 186-194.
- Lichtenstein, A.K., Ganz, T., Nguyen, T.M., Selsted, M.E. und Lehrer, R.I. (1988) Mechanism of target cytolysis by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity. *J. Immunol.* **140**, 2686-2694.
- Lillard, J.W. JR, Boyaka, P.N., Chertov, O., Oppenheim, J.J. und McGhee, J.R. (1999) Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 651-656.
- Lin A., Nguyen T. und Miller W.M. (1991) A rapid method for counting cell nuclei using a particle sizer/counter. *Biotech. Techniques* **12**, 153-156.
- Lindl, T. (2000) Zell und Gewebekultur. 4. Überarbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Harada, M., Fujii, N. und Miyajima, K. (1997) Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1327**, 119-130.
- Merrifield, B. (1986) Solid phase synthesis. *Science* **232**, 341-347.
- Michaelson, D., Rayner, J., Couto, M. und Ganz, T. (1992) Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leukoc. Biol.* **51**, 634-639.

- Nagaoka, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H. und Heumann D. (2001) Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14⁺ cells. *J. Immunol.* **167**, 3329-3338.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6169.
- Otvos, L. Jr. (2000) Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.* **6**, 497-511.
- Pardigol, A., Forssmann, U., Zucht, H.D., Loetscher, P., Schulz-Knappe, P., Baggiolini, M., Forssmann, W.-G. und Mägert, H.J. (1998) HCC-2, a human chemokine: gene structure, expression pattern, and biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6308-6313.
- Perry, A.C., Jones, R., Moisyadi, S., Coadwell, J. und Hall, L. (1999) The novel epididymal secretory protein ESP13.2 in Macaca fascicularis. *Biol. Reprod.* **61**, 965-972.
- Peschel, A., Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K.P. und van Strijp, J.A. (2001) Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* **193**, 1067-1076.
- Peschel, A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* **10**, 179-186.
- Raj, P.A., und Dentino, A.R. (2002) Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 9-18.
- Raj, P.A., Antonyraj, K.J. und Karunakaran, T. (2000) Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins. *Biochem. J.* **347**, 633-641.
- Risso, A. (2000) Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol.* **68**, 785-792.
- Rodríguez-Jiménez, F.J., Krause, A., Schulz, S., Forssmann, W.-G., Conejo-García, J.R., Schreeb, R. und Motzkus, D. (2003) Distribution of new human β -defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics* **81**, 175-183.
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M. und Gennaro, R. (1988) Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* **263**, 9573-9575.

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sajjan, U.S., Tran, L.T., Sole, N., Rovaldi, C., Akiyama, A., Friden, P.M., Forstner, J.F. und Rothstein, D.M. (2001) P-113D, an antimicrobial peptide active against *Pseudomonas aeruginosa*, retains activity in the presence of sputum from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3437-3444.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schibli, D.J., Hunter, H.N., Aseyev, V., Starner, T.D., Wiencek, J.M., McCray, P.B. Jr, Tack, B.F. und Vogel, H.J. (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.
- Schild, T.A.(1996) Einführung in die Real-Time *TaqMan* PCR-Technologie. Handbuch Applied Biosystems, Version 2.1, 4-21.
- Schröder, J.M. (1999) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 121-134.
- Schutte, B.C., Mitros, J.P., Bartlett, J.A., Walters, J.D., Jia, H.P., Welsh, M.J., Casavant, T.L. und McCray, P.B. Jr. (2002) Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2129-2133. Erratum in: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002 **99**, 14611.
- Scott, M.G., Vreugdenhil, A.C., Buurman, W.A., Hancock, R.E. und Gold, M.R. (2000) Cutting edge: Cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J. Immunol.* **164**, 549-553.
- Scott, M.G. und Hancock, R.E. (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **20**, 407-431.
- Selsted, M.E., Brown, D.M., DeLange, R.J. und Lehrer, R.I. (1983) Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J. Biol. Chem.* **258**, 14485-14489.
- Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W. und Cullor, J.S. (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* **267**, 4292-4295.
- Selsted, M.E., Tang, Y.Q., Morris, W.L., McGuire, P.A., Novotny, M.J., Smith, W., Henschen, A.H. und Cullor, J.S. (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.
- Shai, Y. (1995) Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 460-464.
- Steinberg, D.A., Hurst, M.A., Fujii, C.A., Kung, A.H., Ho, J.F., Cheng, F.C., Lounsbury, D.J. und Fiddes, J.C. (1997) Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1738-1742.

- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. und Boman, H.G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-248.
- Steinstraesser, L., Klein, R.D., Aminlari, A., Fan, M.H., Khilanani, V., Remick, D.G., Su, G.L. und Wang, S.C. (2001) Protegrin-1 enhances bacterial killing in thermally injured skin. *Crit. Care Med.* **29**, 1431-1437.
- Staubitz, P., Peschel, A., Nieuwenhuizen, W.F., Otto, M., Götz, F., Jung, G. und Jack, R.W. (2001) Structure-function relationships in the tryptophan-rich, antimicrobial peptide indolicidin. *J. Pept. Sci.* **7**, 552-564.
- Stryer, L. (1994) Biochemie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Subbalakshmi, C. und Sitaram, N. (1998) Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 91-96.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R. und Springer, W. (1999) Mikrobiologisch-biochemisches Praktikum. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Tan, Y.-T., Tillett, D.J. und McKay, I.A. (2000) Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol. Medicine Today* **6**, 309-314.
- Tang, Y.Q. und Selsted, M.E. (1993) Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 6649-6653.
- Tapping, R.I. und Tobias, P.S. (1997) Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 23157-23164.
- Tossi, A. (2002) Antimicrobial Sequences Database (AMSDb), <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic/html>
- Tran, D., Tran, P.A., Tang, Y.-Q., Yuan, J., Cole, T. und Selsted, M.E. (2002) Homodimeric θ -Defensins from *Rhesus macaque* Leukocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 3079-3084.
- Travis, S.M., Singh, P.K. und Welsh, M.J. (2001) Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 89-95.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J. und Lehrer, R.I. (1998) Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2206-2214.
- van 't Hof, W., Veerman, E.C., Helmerhorst, E.J. und Amerongen, A.V. (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.* **382**, 597-619.
- Valore, E.V., Park, C.H., Quayle, A.J., Wiles, K.R., McCray, P.B. Jr. und Ganz, T. (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* **101**, 1633-1642.

- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615-619.
- White, S.H., Wimley, W.C. und Selsted, M.E. (1995) Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 521-527.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R. und Hancock, R.E.W. (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 7235-7242.
- Wu, M. und Hancock, R.E. (1999) Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 29-35.
- Yamaguchi, Y., Nagase, T., Makita, R., Fukuhara, S., Tomita, T., Tominaga, T., Kurihara, H. und Ouchi, Y. (2002) Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J. Immunol.* **169**, 2516-2523.
- Yan, H. und Hancock, R.E.W. (2001) Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1558-1560.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M. und Oppenheim, J.J. (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-528.
- Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J. und Oppenheim, J.J. (2000) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived Cathelicidin, utilizes *formyl peptide receptor-like 1* (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1069-1074.
- Yang, D., Chertov, O. und Oppenheim, J.J. (2001a) Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.* **69**, 691-697.
- Yang, D., Chertov, O., und Oppenheim, J.J. (2001b) The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 978-989.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W. und Oppenheim, J.J. (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**, 291-296.
- Yasin, B., Pang, M., Turner, J.S., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J., Lehrer, R.I. und Wagar, E.A. (2000) Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 187-194.
- Young, M.S., Levin, J. und Prendergast, R.A. (1972) An invertebrate coagulation system activated by Endotoxin: Evidence for enzymatic mediation. *J. Clin. Invest.* **51**, 1790-1796.

- Zhang, L., Dhillon, P., Yan, H., Farmer, S. und Hancock, R.E.W. (2000) Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317-1323.
- Zhao, C., Wang, I. und Lehrer, R.I. (1996) Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* **396**, 319-322.
- Zimmermann, G.R., Legault, P., Selsted, M.E. und Pardi, A. (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* **44**, 3317-3321.
- Zucht, H.D., Grabowsky, J., Schrader, M., Liepke, C., Jürgens, M., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W-G. (1998) Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur. J. Med. Res.* **3**, 315-323.

Danksagung

Ich danke dem wissenschaftlichen Leiter von IPF PharmaCeuticals GmbH (bis 31.03.2000: Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH), Herrn Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann, ganz herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit in den IPF-Forschungslaboratorien in Hannover anfertigen zu können.

Mein ganz spezieller Dank geht an Herrn PD Dr. Knut Adermann für die stets engagierte und freundschaftliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die Übernahme des Referates danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Susann Baxmann, Herrn Dr. Enno Klüver, Herrn Dr. Alexander Krause, Frau Dr. Conny Liepke, Herrn Abbes Mahouachi, Herrn PD Dr. Erik Maronde, Herrn Dr. Dirk Motzkus, Rainer Schreeb und Herrn Dr. Axel Schulz für ihre unermüdliche Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen des Laboralltags. Herrn Dr. José-Ramón Conejo-García danke ich für die tiefen Einblicke in die Wissenschaft und die spanische Männerseele.

Desweiteren danke ich Dr. Ulf Forssmann und Birgit Eilers für die Durchführung des Chemotaxis-Assays. Auch möchte ich mich bei Dr. Enno Klüver, Dr. Axel Schulz und Andreas Zgraja für die Synthese diverser Peptide herzlich bedanken. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Markus Büchler und Herrn PD Dr. Helmut Friess vom Inselspital Bern sowie Herrn Prof. Dr. Christian Stief von der urologischen Abteilung der MHH für die Bereitstellung verschiedener Gewebeproben. Ein herzlicher Dank geht auch an Frau Dr. Aleksa Heitland und Herrn Dr. Dirk Motzkus für ihre Bereitschaft, Blut für meine Experimente zu spenden.

Darüberhinaus möchte ich Pico, Franzi und Kira dafür danken, dass sie in den letzten Monaten dieser Arbeit so oft zu meiner persönlichen Entspannung beigetragen haben.

Der allergrößte Dank gilt aber meinen Eltern, die mir mit ihrer unermüdlichen Unterstützung Ausbildung und Studium ermöglicht haben und immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte.

Auch möchte ich meinem Opa danken, der mir gezeigt hat, dass nach einer dunklen Nacht auch wieder ein heller Tag kommt.....

Und zum Schluss möchte ich noch ganz besonders Erik danken, der immer für mich da war, wenn mich alles zu erdrücken drohte.

Publikationsliste

Originalarbeiten

Conejo-García, J.R., Jaumann, F., **Schulz, S.**, Krause, A., Rodríguez-Jiménez, F.J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W.-G. und Bals, R. (2001) Identification of a novel, multifunctional β -defensin (hBD-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.

Conejo-García, J.R., Krause, A., **Schulz, S.**, Rodríguez-Jiménez, F.J., Klüver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R. und Forssmann, W.-G. (2001) Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**, 1819-1821.

Rodríguez-Jiménez, F.J., Krause, A., **Schulz, S.**, Forssmann, W.-G., Conejo-García, J.R., Schreeb, R. und Motzkus, D. (2003) Distribution of new human β -defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics* **81**, 175-183.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sandra Schulz-Maronde

Geburtsdatum / -ort: 30.06.1970 in Langenhagen (Niedersachsen)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

1976 - 1977 Grundschole Bordenau

1977 - 1980 Grundschole Vinnhorst

1980 Grundschole Elze-Bennemühlen

1980 - 1982 Orientierungsstufe Mellendorf

1982- 1988 Gymnasium Mellendorf

1988 - 1990 Gymnasium Langenhagen

Schulabschluss Abitur

Berufliche Ausbildung

1990 – 1992 S.-Blindow-Schulen Hannover (Berufsfachschule): Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin

1992 – 1999 Studiengang Biologie-Diplom in Hannover

April 1998 - Jan. 1999 Diplomarbeit in der HNO-Abteilung der Medizinischen Hochschule Hannover

Seit Nov. 1999 Durchführung der Doktorarbeit als wissenschaftliche Angestellte bei IPF PharmaCeuticals GmbH

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen und Personen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im April 2003

Sandra Schulz-Maronde