

Aus der Klinik für Innere Medizin I
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Rolle von IL-1 β und ADAM17
in der Regulation der β -Defensin-Antwort im Rahmen
der Candida-Ösophagitis**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
RENÉ PAHL
aus Schleswig

Kiel 2012

- 1. Berichtstatter:** Prof. Dr. Alexander Arlt
- 2. Berichtstatter:** Prof. Dr. Helmut Fickenscher
- Tag der mündlichen Prüfung:** 22.08.2013
- Zum Druck genehmigt, Kiel, den** 14.05.2013

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Ausschussvorsitzender)

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832), Italienische Reise II, 16. März 1787

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Gastrointestinaltrakt	1
1.2	Candida albicans Infektion des Gastrointestinaltrakts.....	1
1.3	Angeborene und erworbene Immunität	3
1.3.1	<i>Antimikrobielle Peptide</i>	5
1.4	Regulation der Immunantwort.....	7
1.4.1	<i>Toll-like Rezeptoren</i>	7
1.4.2	<i>IL-1β und der IL-1 Rezeptor</i>	8
1.4.3	<i>Epidermal growth factor Familie</i>	8
1.4.4	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase Familie</i>	9
1.4.5	<i>Transkriptionsfaktoren</i>	11
1.5	Fragestellung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Biochemikalien.....	14
2.2	Biologisches Material.....	15
2.3	Kits.....	16
2.4	Chemikalien und Reagenzien	16
2.4.1	<i>Medien und Puffer</i>	17
2.5	Gele.....	19
2.6	Verbrauchsmaterialien	19
2.7	Geräte.....	20
2.8	Gewebeproben	21
2.8.1	<i>Patientenkollektiv der Gewebeproben</i>	21
2.9	Immunhistochemie	21
2.9.1	<i>Protokoll der immunhistochemischen Färbung</i>	22
2.10	Zellkultur.....	22
2.10.1	<i>Ösophageale Plattenepithel Zelllinie</i>	22
2.10.2	<i>Lymphozyten/periphere mononukleäre Zellen</i>	23
2.10.3	<i>Candida albicans</i>	24
2.11	Stimulationsversuche	24
2.11.1	<i>Co-Stimulation mit PBMC's und C. albicans</i>	24
2.11.2	<i>Hemmung von extra- und intrazellulären Botenstoffen</i>	25
2.12	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.12.1	<i>RNA-Isolierung</i>	26

2.12.2	<i>Spektralphotometrische Quantifizierung</i>	27
2.12.3	<i>Reverse Transkription der Zellkulturproben</i>	28
2.13	Quantifizierung der Gen-Expression	28
2.13.1	<i>Auswertung mit quantitativer-real-time-Polymerasekettenreaktion</i>	28
2.13.2	<i>Absolute Quantifizierung anhand von Standardkurven</i>	30
2.14	Electrophoresis Mobility Shift Assay.....	36
2.14.1	<i>Isolierung der Kernproteine</i>	36
2.15	Statistische Analysen	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Regulation der β -Defensine im Rahmen der Candida-Ösophagitis	38
3.1.1	<i>Interleukin-1β Expression im Costimulationsversuch</i>	39
3.1.2	<i>Inhibition von IL-1β</i>	40
3.1.3	<i>Rolle des EGFR</i>	41
3.2	Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17.....	42
3.2.1	<i>Verteilung im Gastrointestinaltrakt</i>	42
3.2.2	<i>Immunhistochemischer Nachweis</i>	43
3.2.3	<i>Auswirkung von Candida-Ösophagitis</i>	44
3.2.4	<i>siRNA vermittelte Hemmung der ADAM-Expression</i>	44
3.3	ADAM17 reguliert die hBD-3 Expression.....	46
3.3.1	<i>Einfluss der ADAM-Inhibition auf die hBD-2 Expression</i>	46
3.3.2	<i>Einfluss der ADAM-Inhibition auf die hBD-3 Expression</i>	47
3.4	Einfluss der ADAM-Inhibition auf NF κ B und AP-1	49
4	Diskussion	51
4.1	Regulation der hBD-2 Expression.....	52
4.2	Regulation der hBD-3 Expression.....	53
4.3	Ausblick	54
5	Zusammenfassung	55
6	Literaturverzeichnis	57
7	Danksagung	66
8	Curriculum Vitae	67
9	Anhang	69
9.1	Erklärung Ethik	69
9.2	Erklärung Doktorarbeit.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gastrointestinaltrakts.....	1
Abbildung 2: Speiseröhre eines Patienten mit ausgedehntem <i>C. albicans</i> Befall.....	3
Abbildung 3: Mukosale Abwehrmechanismen gegen <i>C. albicans</i>	4
Abbildung 4: Struktur antimikrobieller Peptide des Menschen	6
Abbildung 5: Metzkinine Untergruppen der Zink-Proteinasen.....	9
Abbildung 6: Aufbau der Struktur einer katalytisch aktiven ADAM Domäne.....	10
Abbildung 7: Schema eines Co-Stimulationswells	24
Abbildung 8: Standardmesskurve für ADAM17.....	34
Abbildung 9: Messkurven und Schmelzkurven für ADAM10.....	35
Abbildung 10: Induktion der hBD-2 und hBD-3 Expression durch <i>C. albicans</i> Überstände	38
Abbildung 11: Induktion der hBD-2 und hBD-3 Expression im Cokulturmodell	39
Abbildung 12: IL-1 β Expression im Cokulturmodell	40
Abbildung 13: hBD-2 und -3 Expression unter Inhibition von IL-1 β , TGF- α oder EGFR	41
Abbildung 14: Expression von ADAM10 und ADAM17 im Gastrointestinaltrakt.....	43
Abbildung 15: ADAM10 und ADAM17 Expression im Ösophagus.....	43
Abbildung 16: Expression von ADAM10 und ADAM17 während der Candida-Ösophagitis	44
Abbildung 17: Wirkung der siRNA auf die ADAM-Expression	45
Abbildung 18: Ausschluss einer unspezifischen Typ I Interferonantwort der Zellen.....	45
Abbildung 19: Einfluss der ADAM10- oder ADAM17-siRNA auf die hBD-2 Expression.....	46
Abbildung 20: hBD-2 Expression unter pharmakologischer ADAM-Inhibition	47
Abbildung 21: Einfluss der ADAM10- oder ADAM17-siRNA auf die hBD-3 Expression.....	48
Abbildung 22: hBD-3 Expression unter pharmakologischer ADAM Inhibition	48
Abbildung 23: NF- κ B und AP-1 Aktivität in PBMC/ <i>C. albicans</i> coinkubierten OE21 Zellen.....	49
Abbildung 24: Auswirkung der ADAM-Inhibition auf NF- κ B und AP-1	50
Abbildung 25: Schema der hBD-Expressionsregulation.....	51

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Als3	<i>agglutinin-like sequence 3</i>
AMP	antimikrobielle Peptide
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-1	Aktivator Protein 1 (Transkriptionsfaktor)
aqua dest.	Destilliertes Wasser
AREG	Amphiregulin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BTC	Betacellulin
C. albicans	Candida albicans
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT-Wert	Schwellenwert-Zyklus
Cys	Cystein
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonuklease 2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	Epidermale Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermal Wachstumsfaktor Rezeptor
EMSA	<i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i>
EPGN	Epigen
EREG	Epiregulin
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum
fo	<i>forward</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
HB	Humanes Defensin
hBD	humanes beta Defensin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HER2/Erb	Epidermal Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HNP	Humanes neutrophiles Peptid
Hwp1	<i>Hyphal wall protein 1</i>
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
INF γ	Interferon gamma

I κ B	Inhibitor von NF- κ B
JNK	c-jun N-terminal Kinase
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich-region</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MMP	Metalloproteinase Matrilysin
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor-kappaB</i> (Transkriptionsfaktor)
NLRP3	<i>nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing receptor</i>
NLRs	<i>NOD-like</i> Rezeptoren
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidinsäure
PAA	Polyacrylamid
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penizillin
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Poly-(A)	Polyadenylsäure
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
q-rt-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
rev	<i>reverse</i>
RLRs	<i>RIG-I-like</i> Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
spp.	species pluralis
Strep	Streptavidin
SVMPs	snake venom metalloproteinases
TAE	Tris-Acetat Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TGF- α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TSB	<i>tryptic soy broth</i>

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Pahl R, Brunke G, Steubesand N, Schubert S, Bottner M, Wedel T, Jurgensen C, Hampe J, Schafer H, Zeissig S, Schreiber S, Rosenstiel P, Reiss K, Arlt A (2011). IL-1beta and ADAM17 are central regulators of beta-defensin expression in Candida esophagitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **300**: G547-553.

Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, **Pahl R**, Reiss K, Herzig KH, Schubert S, Schreiber S, Folsch UR, Rosenstiel P, Arlt A (2009). The expression of the beta-defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF-kappaB and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of Candida esophagitis. *BMC immunology* **10**: 36.

1 Einleitung

1.1 Der Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) (Abb. 1) gliedert sich in mehrere Abschnitte, beginnend in der Mundhöhle und bis zum Anus reichend. Als eigenständige Organe nehmen sie verschiedene Funktionen wahr. Die den GIT bekleidende Schleimhaut dient zum einen als eine physische Barriere, zum anderen der Resorption von Nahrung und Flüssigkeiten in den unterschiedlichen Darmabschnitten. Barrierefunktionen schützen unseren Körper vor Infektionen und haben in den Abschnitten, die sich nicht im bakteriziden Milieu des Magens befinden, einen besonderen Stellenwert. Die Mundhöhle und die Speiseröhre (Ösophagus) sind folglich die ersten Kontaktpunkte für infektiöse Erreger. Ihr Epithel besteht, im Gegensatz zu den folgenden Darmabschnitten, aus einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel, welches lediglich eine zu vernachlässigende Diffusion und Resorption zulässt (Anthony S. Fauci et al. 2009).

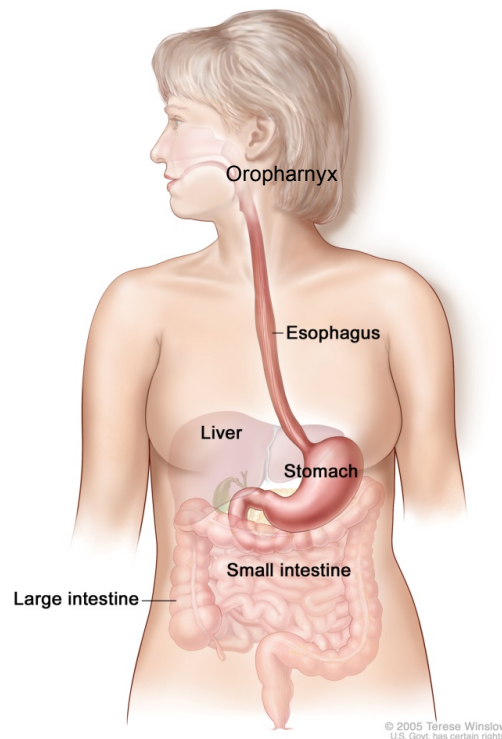


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gastrointestinaltrakts

Mit freundlicher Genehmigung von Frau Terese Winslow. Quelle: <http://teresewinslow.com/index.asp>

1.2 *Candida albicans* Infektion des Gastrointestinaltrakts

Ursachen für einen Befall des GIT mit *Candida albicans* (*C. albicans*) können eine längere antibiotische Behandlung, Glucocorticoid-, Hormontherapien und Diabetes mellitus sein. Zudem stellt

die steigende Zahl an Transplantationspatienten, Leukämie- und Intensivpatienten sowie weitere immundefiziente Patienten (z.B. AIDS) eine besondere Herausforderung an die Diagnostik und Therapie von *C. albicans* Infektionen dar (Clark et al. 2002). Es kann zu schweren Verläufen bis hin zu Todesfällen durch Sepsis kommen. Eine prospektive Multicenterstudie des *National Epidemiology of Mycosis Survey* in den USA zeigte, dass eine Candidämie (Infektion der Blutbahn mit *C. albicans*) bei chirurgischen Intensivstationspatienten eine Gesamtinzidenz von 0,98 pro 1000 Tagen auf Intensivstation hatte (Blumberg et al. 2001) und durch die daraus resultierende intensivierete Therapie auf Intensivstationen zusätzliche Kosten von \$21,590 erzeugten (Pelz et al. 2000). Die erregerspezifische Letalität wird dabei studienabhängig zwischen 5 % und 71 % angegeben (Falagas et al. 2006). Das Verstehen dieser Infektionskrankheiten und der Reaktionen der Zellen unseres Körpers auf Bedrohungen durch pathogene Erreger ist Bestandteil heutiger Forschungsprojekte und soll in dieser Arbeit weiter beschrieben werden.

Die Candida Gattung zählt über 200 Arten und kommt ubiquitär vor. Nur ein kleiner Anteil von 10 % kommt jedoch im menschlichen Organismus vor (Eggimann et al. 2003). *C. albicans* zählt zusammen mit *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata* zu den Hefepilzen, die in der natürlichen Flora des Menschen vorkommen. Je nach Studie sind bis zu 71% der gesunden Individuen besiedelt, wobei der Hauptanteil von 53 % bis 70 % *C. albicans* ausmacht (Thewes 2008, Wisplinghoff et al. 2004). Betroffen können Haut und Schleimhäute sein, ohne dass die Besiedlung einen Krankheitswert hätte (kommensaler Erreger). Für gewöhnlich ist eine Erkrankung selbstlimitierend. Besonders häufig betroffen sind die Schleimhäute von Oropharynx, Ösophagus (Abb. 2) und Urogenitaltrakt. Man differenziert weiterhin nach der Eindringtiefe des Erregers zwischen oberflächlichen Candidosen und invasivem Befall (tiefere Gewebeschichten → Blutkreislauf → systemischer Befall), die lebensbedrohlich sind und zum Multiorganversagen führen können. Eine prospektive Multicenterstudie der *Virginia Commonwealth University* aus 2004 mit 24.179 Fällen zeigte, dass *C. albicans* mit 9 % der vierthäufigste Erreger einer nosokomialen Sepsis ist und die Mortalität zwischen 29 % bis 47 % liegt (Wisplinghoff et al. 2004). Die Candida-Ösophagitis (Abb. 2) entwickelt sich meist als Komplikation eines oropharyngealen Befalls und stellt bereits eine invasive Form dar. Sie betrifft hauptsächlich immungeschwächte Patienten und ist eine AIDS definierende Erkrankung laut *Centers of Disease Control and Prevention* (Kratzer et al. 2010). Die Virulenzfaktoren sind bei Candida spp. von entscheidender Bedeutung. So besitzen manche Hefepilze die Möglichkeit, entweder als einzellige Blastosporen oder als invasive filamentöse Hyphen zu wachsen, welches als Dimorphismus bezeichnet wird. Wirtserkennungsmoleküle (Adhäsion), Sekretion von Aspartatproteasen, Phospholipasen und Variation von Oberflächenantigenen (*Phenotypic Switching*) schützen den Pilz vor der Immunabwehr (Calderone et al. 2001).

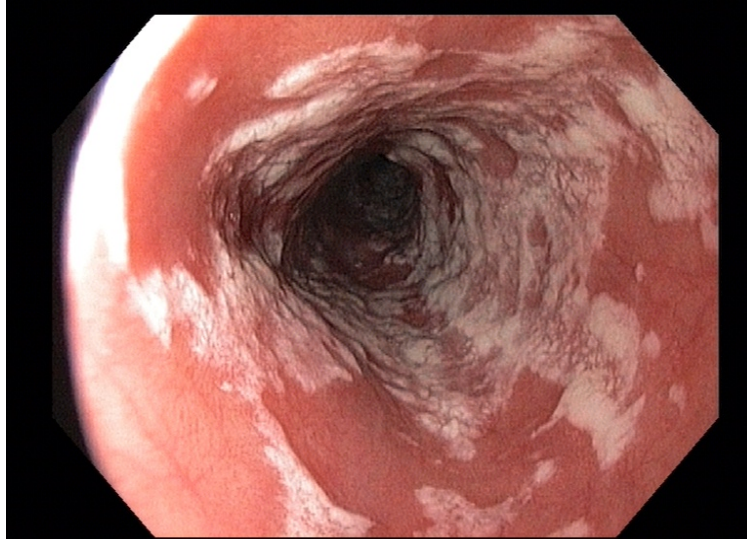


Abbildung 2: Speiseröhre eines Patienten mit ausgedehntem *C. albicans* Befall

Endoskopisches Bild einer Candida-Ösophagitis (Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Alexander Arlt). Weiße Flecken sind die Bereiche, die von *C. albicans* befallen sind. Die roten Areale sind die umliegende, teils entzündete Schleimhaut der Speiseröhre.

Das Epithel der Schleimhaut bildet die erste Barriere zum Schutz vor Erregern. Dabei stellt der Kontakt mit Epithelzellen einen starken Stimulus für *C. albicans* dar und bewirkt im Rahmen von in vitro Versuchen unverzüglich das filamentöse Hyphenwachstum. Hyphenassoziierte Genaktivierung spielt eine entscheidende Rolle für die Adhäsion und Invasion. Die Adhäsion wird induziert durch die Faktoren *Hyphal wall protein 1* (Hwp1) und *agglutinin-like sequence 3* (Als3). Eine Invasion geschieht zum einen durch induzierte Endozytose oder durch aktive Penetration (Zakikhany et al. 2008). Es hat sich außerdem gezeigt, dass Als3 eine entscheidende Rolle für die Endozytose einnimmt (Liu et al. 2011).

1.3 Angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem schützt das Individuum vor Erregern (Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten). Es ist ein komplexes System, das sich in einem Wettstreit der Evolution stetig weiterentwickelt hat. Freund und Feind müssen von den Immunzellen unterschieden werden. Vom Immunsystem wird eine passive Koexistenz von nicht schädlichen Keimen (Kommensalen) geduldet. Durch die Interaktion der Kommensalen mit dem Wirt erfolgt u.a. eine Eindämmung der Vermehrung pathogener Keime (Weindl et al. 2010). Traditionell differenziert man in höheren eukaryontischen Lebewesen zwischen einem unspezifischen (angeborenen) und spezifischen (adaptiven) Immunsystem (Medzhitov et al. 2000).

Das adaptive Immunsystem besteht aus T- und B-Lymphozyten. Jeder Lymphozyt besitzt einen individuellen Rezeptor für ein spezifisches Antigen, das bei der Antigen-Bindung zu einer klonalen Vervielfältigung dieser Zelle führt. Hierauf folgen Kaskaden, die in einer hochdifferenzierten Immunantwort mit Antikörperbildung münden und einen effektiven Abwehrmechanismus

repräsentieren. Das Immunsystem braucht in der Regel drei bis fünf Tage, bis eine ausreichend hohe Zahl an Effektorzellen ausdifferenziert ist. Damit haben Erreger genügend Zeit den Körper zu schädigen (Medzhitov et al. 2000).

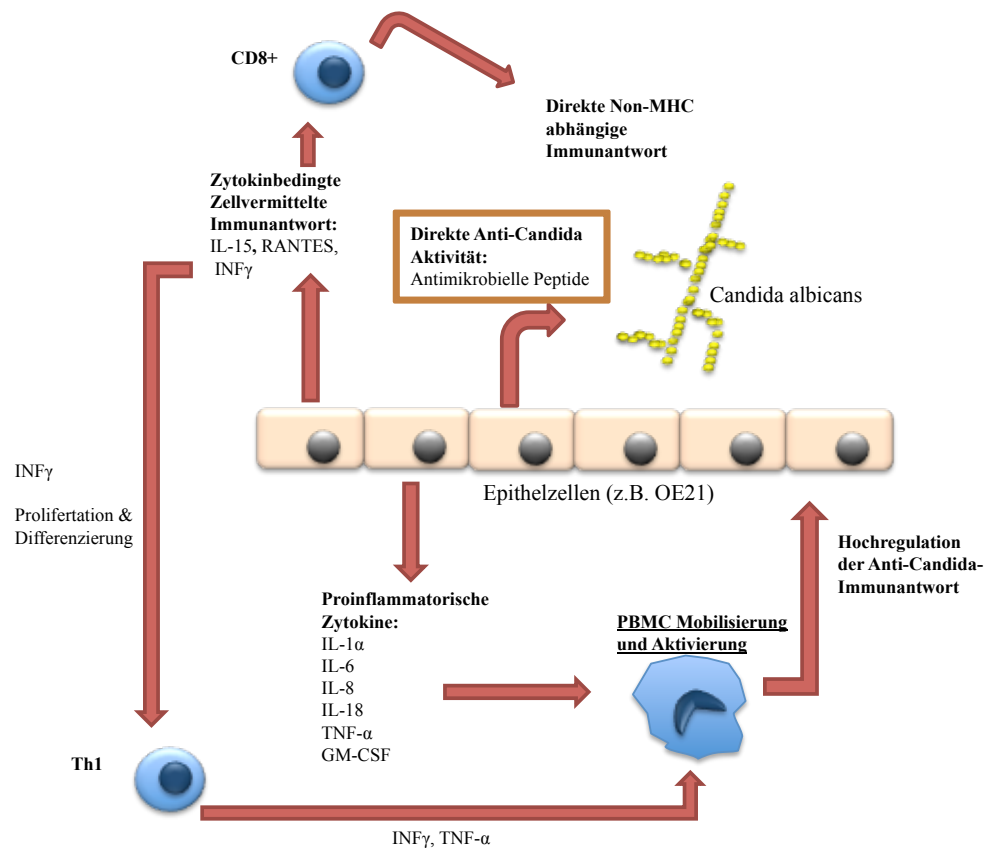


Abbildung 3: Mukosale Abwehrmechanismen gegen *C. albicans*

Rolle der oralen Schleimhaut bei der Induktion von Zytokinen und der Einleitung von Abwehrmechanismen gegen *C. albicans*. Abbildung vereinfacht nach Dongari-Bagtzoglou et al. 2005.

Im Gegensatz dazu ist das angeborene Immunsystem mit Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten, Komplementsystem und den antimikrobiellen Peptiden (AMP) sofort einsatzbereit. Schleimhäute sind permanent mikrobiellen Erregern ausgesetzt und spielen infolgedessen eine Schlüsselrolle als erste Abwehrstation (Abb. 3). Immunzellen, als auch in eingeschränktem Umfang ebenfalls Epithelien, besitzen die Fähigkeit bakterizide Substanzen wie Proteasen, Lipasen, Sauerstoff- und Stickstoffradikale sowie antimikrobielle Peptide zu synthetisieren und zu sezernieren. Außerdem können sie durch Phagozytose Keime abtöten. Sie erkennen unspezifische Antigene, wobei sie sich auf kleine, hoch konservierte Gruppen von Bakterienantigenen konzentrieren. Diese speziellen Antigene werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) beschrieben.

Bei *C. albicans* handelt es sich hierbei um β -Glucan, O- oder N-verknüpftes Mannan, Phospholipomannan, und β -Mannoside (Weindl et al. 2011). Die entsprechenden Rezeptoren des

angeborenen Immunsystems werden analog als *pattern-recognition receptors* (PRRs) (Dempsey et al. 2003, Janeway 1989) bezeichnet. Es gibt drei Arten von pattern-recognition receptors: Toll-like Rezeptoren (TLRs), NOD-like Rezeptoren (NLRs) und RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) (Damgaard et al. 2011). Verschiedene PRRs auf Zelloberflächen, in intrazellulären Kompartimenten sowie auch durch Sekretion in die Blutbahn ausgeschüttet erfüllen verschiedene Aufgaben. Dazu gehören die Opsonierung von Keimen, Aktivierung des Komplementsystems, Phagozytose und Aktivierung von pro-inflammatorischen Signalwegen (Damgaard et al. 2011, Medzhitov 2001).

1.3.1 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) spielen bei nahezu jedem Organismus eine Rolle in der Abwehr gegen Bakterien und Pilze (Cederlund et al. 2011, Hancock 1997). Der Ursprung dieser Peptide gründet auf einem Eiweiß, das 1962 in Deutschland isoliert wurde. Es handelte sich dabei um das Krötengift der Gelbbauchunke und besaß sowohl eine hämolytische als auch eine antimikrobielle Eigenschaft (Cederlund et al. 2011, Kiss et al. 1962). Heute reichen die Entdeckungen der AMPs von Pflanzen (Thomma et al. 2002) über invertebrate Organismen (Rodriguez de la Vega et al. 2005) bis hin zu den Vertebraten (Lehrer et al. 2002). Datenbanken zählten 2011 weit über 1700 unterschiedliche AMPs (<http://aps.unmc.edu/AP/>). Allen gemeinsam ist eine Länge von ungefähr 30 Aminosäuren, eine kationischen Ladung (+2 bis +9) und meist amphiphile Eigenschaften. Diese Eigenschaften machen AMPs zu perfekten Gegenstücken der negativ geladenen hydrophoben Phospholipidmembranen von Mikroorganismen (Cederlund et al. 2011, Ganz 2003). Eukaryontische AMPs werden in vier Gruppen eingeteilt, wobei die ersten beiden helikal, linear (ohne Cysteinreste/-brücken) aufgebaut sind. Innerhalb der dritten Gruppe kommen *loop*-Strukturen mit einer Disulfidbrücke vor, mit welcher schließlich innerhalb der vierten Gruppe β -Faltblätter ausgebildet werden (Hancock 1997). Im Jahr 1985 gelang es schließlich, antimikrobielle Peptide aus menschlichen neutrophilen Granulozyten zu isolieren (Ganz et al. 1985). Für diese neue Gruppe wurde erstmalig der Terminus Defensine geprägt.

1.3.1.1 Defensine

Defensine zählen zu der vierten Gruppe von antimikrobiellen Peptiden. Mit einer Länge von 30-42 Aminosäuren bilden sie charakteristisch aus drei Disulfidbrücken eine β -Faltblattstruktur aus (Bevins et al. 1999, Ganz et al. 1994):

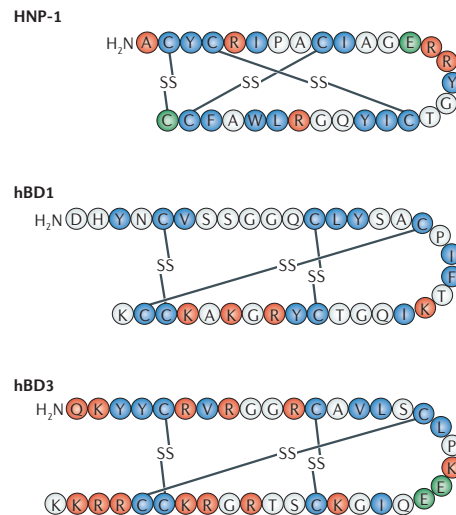


Abbildung 4: Struktur antimikrobieller Peptide des Menschen

Links: Aminosäuren in rot sind negativ geladen, in grün positiv und diejenigen in blau sind hydrophob. SS = Disulfidbrücken, H₂N = N-Terminales Ende. HNP-1, human neutrophil peptide 1; hBD, human β -defensin (Peschel et al. 2006).

Defensine haben durch ihren speziellen Aufbau die Eigenschaft Multimere zu bilden, welche Poren in Lipopolysaccharid-, Teichonsäure- und Phospholipidmembranen formieren (Ganz et al. 1994, Schneider et al. 2005), jedoch nicht in Phosphatidylcholin von eukaryontischen Zellen. Sie tragen zur Abtötung von gram-positiven und gram-negativen Bakterien als auch von Pilzen, Protozoen und Viren bei.

Basierend auf den Abständen der Cysteinreste und ihrer topographischen Bindungsstellen erfolgt eine Einteilung in: α -, β - und θ -Defensine. Die Cystein-Verknüpfung Cys¹-Cys⁶, Cys²-Cys⁴ und Cys³-Cys⁵ wurden für die α -Defensine (Selsted et al. 1989) und die Cys¹-Cys⁵, Cys²-Cys⁴ und Cys³-Cys⁶ Konformation (Tang et al. 1993) für die β -Defensine beschrieben.

1.3.1.2 α -Defensine

Es gibt insgesamt sechs humane α -Defensine mit einer Länge von 29-35 Aminosäuren. Vier von diesen kommen konzentriert in den Granula von neutrophilen Granulozyten vor und werden deshalb als *human neutrophil peptide* (HNP) 1 bis HNP 4 bezeichnet. HNP 1-3 machen circa 30 % der Proteine in den Granula aus (Daher et al. 1988). Dagegen werden die α -Defensine HD-5 und HD-6 hauptsächlich in Paneth-Zellen des Dünndarms gebildet (Jones et al. 1992, Jones et al. 1993) und im weiblichen Reproduktionstrakt. Ursprünglich werden sie als Präpropeptide (bestehend aus Signalpeptid/ Präpeptid, anionischem Propeptid und C-terminalen kationischem Defensin) gebildet und durch Enzyme weiter prozessiert. Trypsin prozessiert so z.B. beim Menschen das Propeptid nach der Sekretion ins Darmlumen zu HD5 (Ghosh et al. 2002). Im Mausmodell von Paneth-Zellen wurde die Metalloproteinase Matrilysin (MMP7) für das Prozessieren des Signalpeptids beschrieben (Weeks et al. 2006).

HNP-1 und HNP-2 haben gute Wirksamkeit gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien und manchen Viren z.B. Herpesviren, Cytomegalievirus und Influenza Virus (Daher et al. 1986). Gegenüber *C. albicans* spielen die HNP's eine untergeordnete Rolle und wirken primär im Zusammenspiel mit dem spezifischen Vakuolenmilieu der Granulozyten (Lehrer et al. 1988).

1.3.1.3 β -Defensine

Derzeit sind sechs *humane β -Defensine* (hBD) beschrieben, wobei die Defensine hBD-4, hBD-5 und hBD-6 bislang nur auf Genom-Ebene gefunden wurden (Pazgier et al. 2006, Yamaguchi et al. 2002). Im Gegensatz zu den α -Defensinen werden β -Defensine nicht von Zellen des Immunsystems gebildet, sondern überwiegend von Epithelzellen. Dadurch spielen β -Defensine bei der ersten Abwehr von pathogenen Mikroorganismen eine Rolle und tragen auf der anderen Seite zu einer Balance der natürlichen Flora mit Mikroorganismen bei (Weinberg et al. 1998).

Im Jahr 1995 gelang die Isolation von den hBD-1 aus dem Hämofiltrat von Patienten mit Niereninsuffizienz (Bensch et al. 1995). Zwei Jahre später gelang einer Kieler Arbeitsgruppe um Prof. Schröder und Prof. Harder die Entdeckung von hBD-2 und hBD-3 aus Hautläsionen von Psoriasispatienten (Harder et al. 1997, Harder et al. 2001). Die Expression von hBD-1 findet sich in einer Vielzahl von Epithelien (Pankreas, Nieren, Urogenitaltrakt, Atemwege, Haut, Speicheldrüsen, Prostata, Hoden und Dünndarm) und wird überwiegend als konstitutive (nicht durch Stimuli zu beeinflussende) Bildung beschrieben (Zhao et al. 1996).

In nahezu jedem Epithel kommen hBD-2 und hBD-3 vor (Abiko et al. 2007, Peters et al. 2010, Semple et al. 2006, Wehkamp et al. 2007, Wong et al. 2007). Ein weiterer Unterschied zu hBD-1 ist, dass hBD-2 durch unterschiedliche inflammatorische Agenzien wie TNF- α , bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), manche Bakterien und Hefepilze induziert werden können (Schroder et al. 1999, Steubesand et al. 2009, Wehkamp et al. 2006). Die Expression von hBD-3 lässt sich ebenfalls durch die oben erwähnten Stimuli mit der Erweiterung im gram-positiven Bereich der Bakterien steigern, wie z.B. *Staphylococcus aureus* (Menzies et al. 2006). Die β -Defensine hBD-2 und hBD-3 haben eine abtötende Wirkung auf gram-negative Bakterien (*E.coli*, *P. aeruginosa*) sowie Hefepilze wie *C. albicans*. HBD-3 hat, wie oben angedeutet, ebenfalls ein erweitertes bakterizides Spektrum im gram-positiven Bereich und schließt *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* mit dessen multi-resistenter Variante (MRSA) ein (Schneider et al. 2005).

1.4 Regulation der Immunantwort

1.4.1 Toll-like Rezeptoren

Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) spielt eine der Hauptfunktionen bei der Einleitung der Immun- und Entzündungsreaktion (Medzhitov et al. 2000). TLR zählen zu den PRR und sind Typ I Transmembranrezeptoren, für welche eine extrazelluläre *leucine-rich repeat* (LRR) Domäne

charakteristisch ist sowie eine intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne (Medzhitov 2001). Im Menschen sind bisher zehn Mitglieder der TLR-Familie charakterisiert, die für die Erkennung von Bakterien, Viren und Pilzen eine Rolle spielen. Dabei sprechen diese auf Moleküle wie LPS, Peptidoglykane, spezifische Lipoprotein- und Proteinreste sowie Nukleotidsequenzen an (Weindl et al. 2007).

TLR interagieren über nicht im Detail geklärte Wechselwirkungen mit spezifischen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Hierbei werden die TLR über pathogene Keime differenziert angesprochen und bewirken über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Produktion von Zytokinen, AMP, Chemokinen und Co-Stimulatoren (Brown 2001, Weindl et al. 2011). Durch diese Botenstoffe können andere Zellen zur Produktion von AMP angeregt werden und so einen vorzeitigen Schutz für umliegende Zellen aufbauen. Eine Überlappung von unterschiedlichen Signalwegen und Zytokinen macht den mechanistischen Nachweis jedoch schwierig (Brown 2001). Studien konnten zeigen, dass die Rezeptoren TLR2 und TLR4 für die Immunabwehr gegen *C. albicans* eine entscheidende Rolle spielen (Roeder et al. 2004, Weindl et al. 2007). Neueste Studien belegen jedoch auch eine wichtige Rolle für EGFR- und IL-1 Rezeptoren in der Regulation der AMP-Produktion (Johnston et al. 2011, Kawsar et al. 2010, Pahl et al. 2011, Steubesand et al. 2009).

1.4.2 IL-1 β und der IL-1 Rezeptor

Neben den TLR kommt dem IL-1 Rezeptor eine zentrale Rolle in der Regulation sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität zu (Casanova et al. 2011). Durch die Liganden IL-1 α und IL-1 β werden über diesen Rezeptor intrazelluläre Signalwege angesprochen, die häufig durch den Transkriptionsfaktor NF κ B (s.u.) die Expression von AMP und anderen proinflammatorischen Molekülen regulieren (Casanova et al. 2011).

Vor allem für IL-1 β gibt es zahlreiche Berichte, die eine kritische Funktion dieses Zytokins in der Zellantwort auf eine *Candida*-Infektion nahelegen (Gross et al. 2009, Hise et al. 2009, Joly et al. 2009, Muller et al. 2007). Hierbei wird eine auto- und parakrine IL-1 β Wirkung auf die Epithelzelle für die initiale transkriptionelle Induktion und anschließendes Prozessieren durch das *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing receptor* NLRP3 Inflammasom (Joly et al. 2010) im Rahmen der *Candida*-Infektion propagiert. Durch den TLR2 und Dectin-1 bewirkt *C. albicans* eine Induktion der IL-1 β Transkription. Das neu gebildete pro-IL-1 β wird anschließend über Caspase-1-vermittelte Spaltung zum reifen IL-1 β (Joly et al. 2010). Die intrazellulären Signalwege und Effektor-Funktionen von IL-1 β in Rahmen der *Candida*-Infektion waren weitestgehend unbekannt und sollten daher in Teilen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.4.3 Epidermal growth factor Familie

Zur Gruppe der Epidermal growth factor-Rezeptoren (EGFR) zählen EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 und HER4/ErbB4 (Prenzel et al. 2001). Liganden binden an einer core Domäne (EGF-

like Domäne) und induzieren Signalwege über G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen und weiter über mitogen activated Proteine (MAP) in den Zellkern mit gesteigerter Gentranskription (Prenzel et al. 2001). Dieses bewirkt u.a. Proliferation, Migration, Differenzierung sowie Zellüberleben. Zur Familie der EGFR-Liganden gehören 13 Mitglieder, welche aus rund 50 Aminosäuren mit drei Disulfidbrücken und einer Transmembrandomäne aus hydrophoben Aminosäuren bestehen (Higashiyama et al. 2011). Dazu zählen EGF, transforming growth factor (TGF)- α , heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), Amphiregulin (AREG), Epiregulin (EREG), Betacellulin (BTC), Epigen (EPGN) und Neuroregulin-1 bis -6 (Johnston et al. 2011). An den EGFR/ErbB1 binden aufgrund von Affinität und Spezifität die folgenden Liganden bevorzugt: EGF, EREG und TGF α .

1.4.4 A Disintegrin And Metalloproteinase Familie

Die Disintegrin-ähnliche Metalloproteinase (ADAM - A Disintegrin And Metalloproteinase) Familie der Metalloproteinasen sind essentiell für das *Ectodomain-Shedding* (proteolytische Abtrennung der extrazellulären Domänen) von Liganden des EGFR (Arribas et al. 1996, Dempsey et al. 1997). Diese Metalloproteinasen stellen als Teil der Metzinkine eine Untergruppe der Zink-Proteinasen dar (Abb. 5) (Bode et al. 1993, Huxley-Jones et al. 2007). Es wird weiter differenziert in die fünf Unterklassen der Serralysine (bakterielle Proteinasen), Astacine, den Matrix Metalloproteinasen (MMP) und den Adamalysine (Retrolysine) (Hooper 1994, Stocker et al. 1995). Die ADAMs zählen zusammen mit den Schlangengiften snake venom metalloproteinasen (SVMPs) und den löslichen ADAMs containing thrombospondin motifs (ADAMTS) zur Gruppe der Adamalysine.

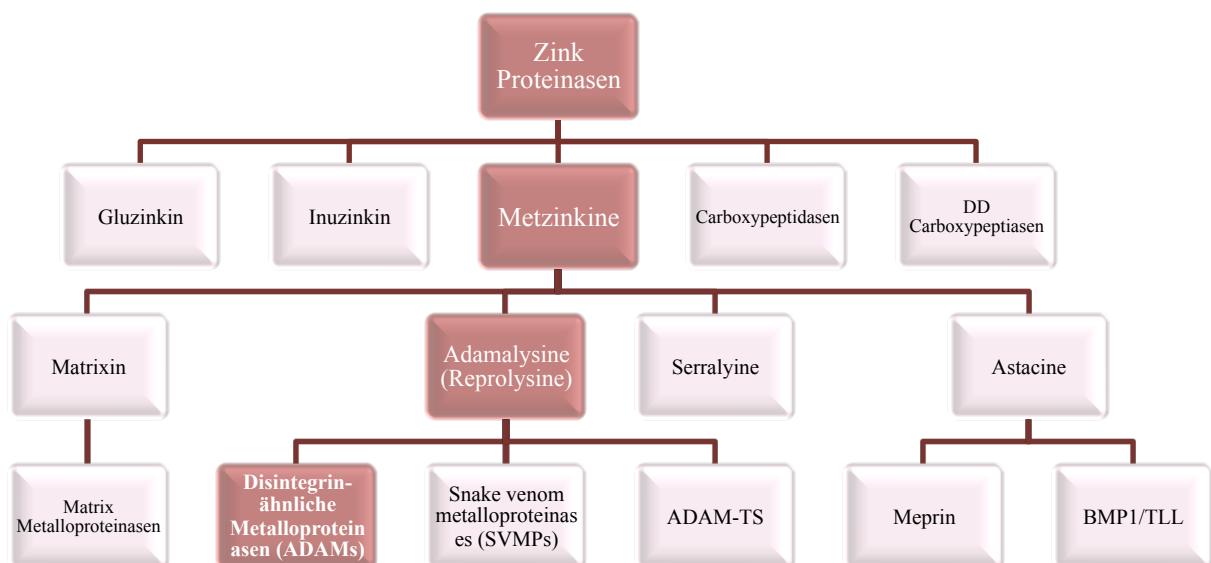


Abbildung 5: Metzinkine Untergruppen der Zink-Proteinasen

Quelle: (Huxley-Jones et al. 2007)

Erste Vertreter der ADAM Familie wurden 1987 als PH-30 beschrieben (Primakoff et al. 1987) und konnten 1992 Ihrer Funktion zugeordnet werden (Blobel et al. 1992). Heute sind sie bekannt als Fertilin α (ADAM 1) und Fertilin β (ADAM 2).

Danach wurden sie in vielen Organismen z.B. vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bis hin zu den Wirbeltieren nachgewiesen (Huxley-Jones et al. 2007). Zur Zeit zählt die ADAM Familie 40 Mitglieder in verschiedenen Spezies (Reiss et al. 2009). Ihr Name beruht auf den Gemeinsamkeiten in den Strukturen dieser Gruppe. Alle Vertreter besitzen einen Methionin-Rest, *Met-turn* genannt, sowie eine konservierte charakteristische Konsensussequenz mit drei Histidinen in aufgeführter Reihenfolge: HEXGHXXGXXHD (X steht für eine beliebige Aminosäure, H für Histidin, E für Glutaminsäure und G für Glycin) (Reiss et al. 2009). Durch diese Aminosäure-Sequenz und den *Met-turn* wird eine hydrophobe Tasche für ein Zink-(Zn^{2+})-Ion geschaffen und bildet damit das aktive Zentrum, wobei noch eine vierte Bindungsstelle durch einen Cysteinrest der Prodomäne abgeschildert wird (Bode et al. 1993).

Die ADAMs sind beteiligt an zellulären Prozessen wie Zellwanderung, Wundheilung, bei der Führung von Neuriten und Axonen, Penetration von Spermien in Eizellen, dem Schicksal von Zellen (Apoptose), Entwicklung des Herzens, bei der Zellproliferation und Angiogenese (Reiss et al. 2009).

Der charakteristische Aufbau einer typischen Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinase besteht aus unterschiedlichen Domänenstrukturen: An die N-terminale Prodomäne des Moleküls schließt sich die oben erwähnte katalytische Metalloproteindomäne an. Es folgt eine Disintegrin-ähnliche Domäne, eine Cystein-reiche Domäne und eine EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domäne. Nach einer transmembranen Domäne folgt eine C-terminale zytoplasmatische Domäne (Abb. 6).

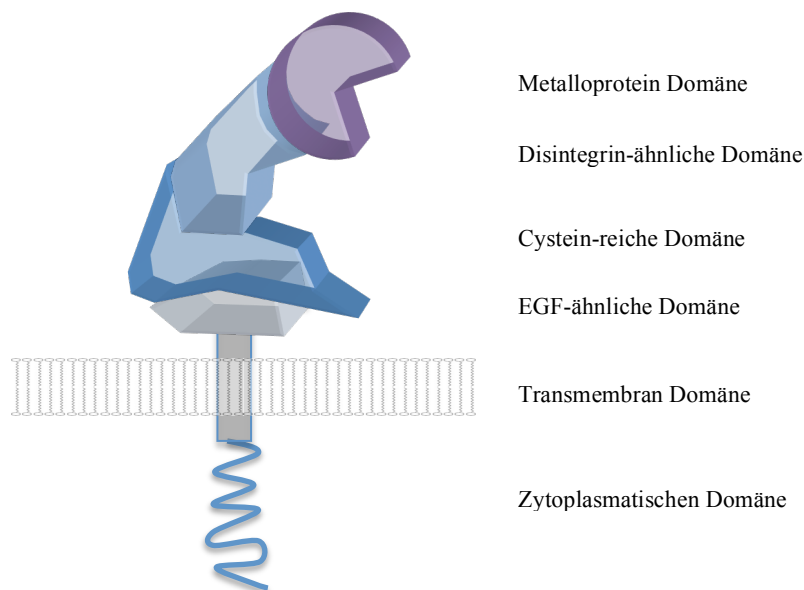


Abbildung 6: Aufbau der Struktur einer katalytisch aktiven ADAM Domäne

Die extrazelluläre Domäne besteht aus der Metalloproteinase mit einer Disintegrin-ähnlichen Domäne, Cystein-reichen Domäne und der EGF-ähnlichen Domäne. Nach einer transmembranären Domäne schließt sich eine zytoplasmatische Domäne an, die Signalfunktionen ausüben kann. ADAM10 und ADAM17 besitzen keine EGF-ähnliche Domäne (Janes et al. 2005). Abbildung nach Blobel et al. 2005.

1.4.4.1 Rolle von ADAM10 und ADAM17 in Immunantworten

Durch die Verwendung von Fibroblasten, die aus Embryonen von knock-out Mäusen gewonnen wurden, konnte gezeigt werden, dass ADAM10 und ADAM17 die zentralen Sheddases für die meisten EGFR Liganden darstellen (Deuss et al. 2008). Sheddases sind membrangebundene Proteasen und können so unterschiedliche an die Plasmamembran gebundene Transmembranproteine freisetzen. Es ist allerdings nicht geklärt, welche der ADAMs für die jeweiligen Liganden und den speziellen zellulären Kontext entscheidend sind. Weiterhin ist die Interaktion der ADAMs mit anderen Signalwegen nur unzulänglich untersucht. So konnte eine Relevanz für ADAM17 im *Shedding* von TGF- α und dem damit verbundenen EGFR Signalwegen in Brustkrebs-Tumorzellen nachgewiesen werden (Borrell-Pages et al. 2003), während andere Berichte zeigten, dass TGF- α und Amphiregulin nach Calcium Einfluss in die Zelle auch ADAM17 unabhängig gespalten werden können (Horiuchi et al. 2007). In ähnlicher Weise gibt es Nachweise für kritische Funktionen von ADAM10 für die Freisetzung von EGF (Sahin et al. 2004).

Dass eine Aktivierung der ADAMs auch im Zusammenhang mit epithelialer Abwehr stehen könnte, rückt zunehmend in den Fokus aktueller Forschungsprojekte (Chalaris et al. 2010, Koenen et al. 2009, Raucci et al. 2008, Reiss et al. 2006). Dementsprechend gibt es Hinweise darauf, dass PAMPs, wie Lipoteichonsäure des *Staphylococcus aureus*, in der Lage sind, über die Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren Metalloproteasen zu aktivieren und damit eine EGFR Transaktivierung zu bewirken. Die molekularen Mechanismen dieser Aktivierung und die funktionelle Bedeutung für die epitheliale Abwehr sind bislang jedoch kaum charakterisiert.

1.4.5 Transkriptionsfaktoren

Die Transkription ist einer der bedeutendsten Angriffspunkte für die Regulation der meisten zellulären Adaptationsprozesse. Die Steuerung der Transkription eines Gens wird durch Promotoren (Regulatorregionen der DNA) und Transkriptionsfaktoren (Gen-Regulatorproteine) bewerkstelligt. Neben allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die über die Bindung an die TATA-Box die Grundlage für den Beginn der Transkription eines Gens schaffen, gibt es weitere spezifische regulierende Transkriptionsfaktoren. Diese sind DNA-Interaktionsproteine, die spezifische Sequenzen im Promotor ihres Zielgens erkennen und an diese binden. Dadurch wird eine Aktivierung oder Repression des entsprechenden Genes bewirkt (Staber 2007).

1.4.5.1 NF- κ B

Wie bereits dargestellt, aktivieren die TLR, IL-1R und EGFR verschiedene intrazelluläre Signalwege. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B steuert die Expression einer großen Anzahl von Genen, die für Entzündungsreaktionen essentiell sind (Ben-Neriah et al. 2011, Vallabhapurapu et al. 2009). NF- κ B existiert als ein Hetero- oder Homodimer, das sich aus Mitgliedern der sogenannten Rel-Familie von

Transkriptionsfaktoren zusammensetzt. Die Mitglieder dieser Familie weisen eine *Rel homology domain* (RHD) auf, welche die Dimerisierung der Faktoren und ihre Interaktion mit den inhibitorischen Komponenten des Signalwegs vermittelt. Bisher sind fünf Mitglieder dieser Familie bekannt: RelA/p65, RelB, c-Rel, p50/p105 und p52/p100. Im Gegensatz zu den p50 und p52 Untereinheiten, weisen die RelA, die RelB und die c-Rel Untereinheiten eine *transactivation domain* auf, welche die Regulation der Transkription von NF- κ B-Zielgenen vermittelt (Ben-Neriah et al. 2011, Vallabhapurapu et al. 2009). In unstimulierten Zellen liegt NF- κ B im Zytoplasma an inhibitorische Proteine gebunden vor. Unter diesen inhibitorischen Proteinen ist I κ B α das am ausführlichsten untersuchte Protein und scheint für den klassischen NF- κ B-Aktivierungsweg das wichtigste inhibitorische Regulativ zu sein. Durch verschiedenste Stimuli kommt es zu einer Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der I κ B-Kinasen (IKK) α , β und γ , die den sogenannten I κ B-Kinase-Komplex bilden. Dieser IKK-Komplex kann nun I κ B phosphorylieren und dieses so modifizierte I κ B wird anschließend durch die Ubiquitin-E3-Ligase β -TRCP polyubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert. Durch diese Modifikationen spaltet sich das I κ B vom NF- κ B-Dimer ab, das in den Zellkern übergehen kann. Im Zellkern kann NF- κ B seine transkriptionsregulierende Funktion durch Interaktion mit den Promotoren seiner Zielgene ausüben (Ben-Neriah et al. 2011, Vallabhapurapu et al. 2009).

1.4.5.2 AP-1

AP-1 zählt wie NF- κ B zur Familie der Transkriptionsfaktoren. Es setzt sich ebenfalls aus Homo- oder Heterodimeren unterschiedlicher Proteinfamilien zusammen. Diese Dimere setzen sich aus den Bausteinen der Jun-Proteinfamilie (c-Jun, JunB, JunD), Fos-Proteinfamilie (c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2) sowie zusätzlich aus den Mitgliedern der ATF (ATFa, ATF-2 und ATF-3) und JDP (JDP-1 und JDP-2) Subfamilie zusammen (Angel et al. 1991). Alle Proteine dieser Familie verbindet, dass sie eine sogenannte *bZIP* Domäne besitzen, welche aus einer basischen Domäne und einer Leucine-Zipper-Region besteht. Eine Konsensussequenz (5'-TGAG/CTCA-3'), welche auch als *TPA-responsive elements* (TREs) bezeichnet wird, dient zur Bindung und Genaktivierung der entsprechenden DNA-Abschnitte (Angel et al. 1991, Hess et al. 2004). Jede dieser genannten Untereinheiten kommt je nach Zelle in einer unterschiedlichen Zusammensetzung vor, welche die große Vielfalt und Feinabstimmung dieser Proteindimere aufzeigt (Hess et al. 2004). Eine mannigfaltige Anzahl an physiologischen Reizen, dazu zählen Zytokine, Wachstumsfaktoren, Polypeptid-Hormone, Zell-Matrix-Interaktionen, onkogenetische Stimuli, chemische/physikalische Stressreize sowie bakterielle und virale Infektionen sind an der Induktion von AP-1 beteiligt. Im Detail sind intrazelluläre Signalkaskaden beteiligt, welche über sogenannte *mitogen activated protein kinases* (MAPK) weitergeleitet werden (Chang et al. 2001). Subgruppen stellen die *extracellular-signal-regulated kinases* (ERK), p38 MAPK als auch die meist untersuchte Kinase *Jun NH2-terminal kinases* (JNK)

dar (Karamouzis et al. 2007). Zu den von AP-1 vermittelten zellulären Prozessen zählen die Zellproliferation, Differenzierung und Transformation innerhalb der Zellentwicklung. Diskutiert wird seine Funktion in der Tumorgenese, bei welchen es anti-apoptotische (über negative Modulation von p53 und Induktion des Bcl Gens) Funktionen hat und in die Zellzyklus-Regulation über die Cycline eingreift (Shaulian et al. 2001).

AP-1 zeigt auch eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Entzündungen, speziell von Zellen von Oberflächen, z.B. der Haut (Schonthaler et al. 2011). In Mouse knock-out Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Subgruppe um c-Jun entscheidend an der Expression des EGF-Rezeptors als auch des HB-EGF Liganden beteiligt ist (Zenz et al. 2003).

1.5 Fragestellung

Wie bereits geschildert, sind die pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen der *Candida*-Ösophagitis weitestgehend ungeklärt.

Es sollten daher in dieser Arbeit die Regulation der Expression antimikrobieller Peptide im Rahmen der epithelialen Abwehrmechanismen des Ösophagus gegen eine *Candida*-Infektion untersucht werden, um eine mögliche pathophysiologische Funktion zu verifizieren.

Hierzu sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Sind IL-1 β oder EGFR Liganden an der Regulation der β -Defensin-Antwort im Rahmen der *Candida*-Ösophagitis beteiligt?
2. Welche intrazellulären Signalwege werden durch IL-1 β - oder EGFR-Liganden in diesem Kontext aktiviert?
3. Sind ADAM10 und/oder ADAM17 an der EGFR vermittelten Induktion der β -Defensin Expression beteiligt?

2 Material und Methoden

2.1 Biochemikalien

2.1.1.1 Primersequenzen

Primer Genbank-Nr.:	Primersequenzen:	5`-Primer (5`-3`) „fo“	3`-Primer (5`-3`) „rev“	Bp	T _a [°C]
hBD-2 <i>AF 448141</i>	fo	ATC AGC CAT GAG GGT CTT GT		173	58
	rev	GAG ACC ACA GGT GCC AAT TT			
hBD-3 <i>NM 018661</i>	fo	AGC CTA GCA GCT ATG AGG ATC		206	60
	rev	CTT CGG CAG CAT TTT CGG CCA			
IL-1β <i>NM 000576</i>	fo	CCA GCT ACG AAT CTC CGA CCA CCA CTA		600	60
	rev	TGC TTG AGA GGT GCT GAT GTA CCA GTT			
ADAM 10 <i>NM 001110.2</i>	fo	TGG CTC ATT GGT GGG CAG TA		221	60
	rev	GCG TCT CAT GTG TCC CAT TTG			
ADAM 17 <i>NM003183.4</i>	fo	AGA AGT GCC AGG AGG CGA TT		230	60
	rev	AGA AAG GTC CCT GCA GCA CA			
Hergestellt von Sigma ARK-Gensys, Taufkirchen, Ger					

2.1.1.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
EGFR-Neutralisierender Antikörper	Upstate Biomol, Hamburg, Ger
TGF-α-Neutralisierender Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden, Ger
IL-1 Rezeptorantagonisten	R&D Systems, Wiesbaden, Ger
ADAM10 Antikörper <i>Rabbit-anti-human</i>	Millipore, Schwalbach, Ger
ADAM17 Antikörper <i>Mouse-anti-human</i>	R&D Systems, Wiesbaden, Ger
E 0353 <i>Pig-anti-rabbit</i> , Biotin-gekoppelt	Dako, Hamburg, Ger
E 0354 <i>Rabbit-anti-mouse</i> , Biotin-gekoppelt	Dako, Hamburg, Ger

2.1.1.3 Inhibitoren und siRNA

Inhibitoren	Ziel	Hersteller
GI254023X	ADAM10	Prof. A. Ludwig, RWTH, Aachen, Ger
GW280264X	ADAM10 & ADAM17	
GM 6001	MMP's	Calbiochem, Merk, Ger

Stealth siRNA	Negative control ADAM10 ADAM17 RelA/p65	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
---------------	--	----------------------------

2.1.1.4 Enzyme

Produkt	Hersteller
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Restriktionsenzym (Hind3)	Boehringer, Mannheim, Ger
RNase-Free- DNase Set	Qiagen, Hilden, Ger
SuperScript TM II RNase H	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
T4-DNA Ligase	Promega, Heidelberg, Ger
T4-Polynukleotid Kinase (10 U/μl)	Promega, Heidelberg, Ger
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Ger

2.1.1.5 Vektoren

Produkt	Basenpaare	Hersteller
pCR-Blunt II-Topo Vector	3519	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
pGEM-T Vector	3000	Promega, Heidelberg, Ger

2.1.1.6 Oligonukleotide

Produkt	Hersteller
DNA-Ladder 100bp	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
Oligo(dT) ¹⁵ Primer	Promega, Madison, WI, USA
Gene Amp dNTPs	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
AP-1-Konsensussequenz	Stratagene, Heidelberg, Ger
NFκB-Konsensussequenz	Stratagene, Heidelberg, Ger
pUC/ M13 Primer fo und rev	Promega, Madison, WI, USA

2.2 Biologisches Material

2.2.1.1 Zelllinien, Pilze und Bakterien

Mikroorganismus	Hersteller
<i>C. albicans</i> (klinische Isolation)	Institut für Infektionsmedizin, UK-SH Kiel
Top 10 E.coli	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
OE 21	Oesophageal squamous carcinoma cell line, ATCC

2.3 Kits

Produkt	Hersteller
Light Cycler –SYBR Green mix	Roche, Mannheim, Ger
NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kit	Macherey-Nagel, Düren, Ger
pGem-T® Vector System II	Promega, Madison, WI, USA
QIAEXII Kit	Qiagen, Hilden, Ger
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Ger
StreptABComplex/HRP	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Ger
SuperScript™ RNase H	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
Zero Blunt Topo Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Ger

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
[γ ³² P]dATP	Amersham Biosciences, Braunschweig, Ger
β -Mercatoetahmol	Sigma, Taufkirchen, Ger
Agar Agar (reinst)	Merk, Darmstadt, Ger
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Braunschweig, Ger
Ammoniumperoxodisulfat (AMPS) 10 %	Merk, Darmstadt, Ger
Ampicillin sodium salt	Sigma, Taufkirchen, Ger
Aqua dest.	DeltaSelect, Dreieich
Aquatex	Merk, Darmstadt, Ger
Borsäure	Merk, Darmstadt, Ger
Bromphenolblau	Merk, Darmstadt, Ger
Carbenicillin (Sodium Salt)	Roth, Karlsruhe, Ger
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP's)	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen, Ger
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, Ger
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA)	Merk, Darmstadt, Ger
EMSA-Material	Promega, Heidelberg, Ger
Essigsäure	Merk, Darmstadt, Ger
Ethanol	Merk, Darmstadt, Ger
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen, Ger
Ficoll-Paque™ Plus	Amersham Biosciences, Braunschweig, Ger

Fötale Rinder Serum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, Ger
Glycerol	Merk, Darmstadt, Ger
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure	Merk, Darmstadt, Ger
LB Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
LB-Flüssigmedium	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
L-Glutamin (L-Glu)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Aut
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
Lymphozytenseparationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Linz, Aut
Natriumchlorid (NaCl)	JT Baker, Deventer, NL
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen, Ger
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen, Ger
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Aut
Penicillin / Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Aut
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH, Linz, Aut
S.O.C. Medium Ultra	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen, Ger
Tissue Tek Einfriermedium	Jung, Nussloch
Trihydroxymethyldiamin (Tris-Base)	Merk, Darmstadt, Ger
Tris-HCl	Merk, Darmstadt, Ger
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Linz, Aut
Xylencyanol	Merk, Darmstadt, Ger

2.4.1 Medien und Puffer

2.4.1.1 Medien

Medium	Bestandteile
RPMI-1640 Medium der Zellkultur	Flasche RPMI (Sigma Aldrich) plus 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung, 1 % L-Glutamin
-80 °C Konservierungsmedium	9 ml FCS + 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)
LB-Medium	10 g LB Broth Base, autoklaviert
LB-Agar	10 g LB Broth Base, 7,5g Agar Agar

2.4.1.2 Puffer

Puffer	Bestandteile	Menge
cDNA-Auftragspuffer	Glycerol (50-%iges) Bromphenolblau (100 mg/ 10 ml) Xylencyanol (100 mg/ 10 ml) Aqua dest	50 ml 2,5 ml 2,5 ml ad 100 ml
Elektrophorese-Laufpuffer	Tris Glycin Natriumdodecylsulfat (SDS) pH	25 mM 192 mM 0,1 % 8,3
EMSA-Puffer-I (Lagerung RT) Vor Verwendung Zugabe →	HEPES (pH 7,9) KCl EDTA DTT PMSF Aprotinin	10 mM 10 mM 0,2 mM 1 mM 0,5 mM 10 µg/ml
EMSA-Puffer-II (Lagerung RT) Vor Verwendung Zugabe →	HEPES (pH 7,9) NaCl EDTA DTT PMSF Aprotinin	20 mM 0,4 mM 0,2 mM 1 mM 0,5 mM 10 µg/ml
Lämmli-Probenpuffer 2x	Tris-HCl SDS Glycerin Bromphenolblau pH	128 mM 4,6 % 10 % 0,005 % 6,8
TAE Laufpuffer 5x (autoklaviert, Lagerung RT)	Tris-Base (2 M) Natriumacetat (1 M) EDTA (0,5 M) (pH 8) Aqua dest.	24,2 g 5,71 g 10 ml ad 1000 ml
TBE Laufpuffer 5x	Tris-Base Borsäure EDTA (0,5 M) (pH 8) Aqua dest.	54 g 27,5 g 20 ml ad 1000 ml

TE-Puffer	Tris-HCl (pH7,4) EDTA (pH 8,0)	10 mM 1 mM
Trenngel-Puffer (denat. Polyacrylamid-Gel)	Tris-HCl SDS pH	1,5 M 0,4 % 8,8
Sammelgel-Puffer (denat. Polyacrylamid-Gel)	Tris-HCl SDS pH	0,5 M 0,4 % 6,8

2.5 Gele

Gel	Zusammensetzung	Menge
8 % Polyacrylamid (PAA) Gel	Polyacrylamid (40 %) TBE-Puffer 5x Aqua dest. → 8% PAA-Lösung AMPS (10 %) TEMED	10 ml 5 ml ad 50 ml 500 µl 50 µl
8 % Low melting Agarosegel Ultrapur	Fertiggel	
12,5-%iges denat. PAA-Gel Trenngel	Acrylamidlösung (30 %) Trenngelpuffer AMPS TEMED Aqua dest.	12,5 ml 7,5 ml 100 µl 15 µl ad 30 ml
12,5-%iges denat. PAA-Gel Sammelgel	Acrylamidlösung (30 %) Sammelgelpuffer AMPS TEMED Aqua dest.	1,5 ml 2,5 ml 30 µl 10 µl ad 10 ml

2.6 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, Ger
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, Ger
6-Loch-Platten	Falcon, Heidelberg, Ger
Einmalpipette	Sarstedt, Nürnberg, Ger

Glaskapillaren	Roche, Mannheim, Ger
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim, Ger
Heparinisierte Röhrchen	Qiagen, Hilden, Ger
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, Ger
Leukosep-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Ger
<i>LightCycler</i> ® Kapillaren	Roche, Mannheim, Ger
PCR-Tubes	Sarstedt, Nürnberg, Ger
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Ger
Polaroid Filme	Kodak, Köln, Ger
QIAshredder 250	Qiagen, Hilden, Ger
Objekträger SuperFrost plus	Menzel GmbH, Braunschweig, Ger
Transwell Einsätze (0,4 µm)	Falcon, Heidelberg, Ger
Whatmann 3MM, Filterpapier	Walter, Dassel, Ger
Zellkulturflaschen T75	Sarstedt, Nürnberg, Ger
Zellkulturflaschen 10cm	Sarstedt, Nürnberg, Ger
Zellspatel	Nunc, Langenselbold, Ger

2.7 Geräte

Produkt	Hersteller
37° Wärmebad	GFL, Burgwedel, Ger
Autoradiographiegerät	Biorad, Hercules, CA, USA
Biofuge fresco	Heraeus, Newport Pagnell, UK
Brutschrank, Sterikult 200	Labotec, Göttingen, Ger
<i>LightCycler</i>	Roche, Mannheim, Ger
Gelkammer horizontal, Horizon	Invitrogen, Karlsruhe, Ger
Gelkammer vertikal	Biometra, Göttingen, Ger
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Ger
Kühlzentrifuge, Heraeus	Kendro, Osterode, Ger
Laminar Flow Bench, Steri Gard Hood	Baker Comp Inc, Sanford, Maine, USA
Mikroskop Axiovert	Zeiss, Jena, Ger
Microm HM 560	Microm International GmbH, Volketswil, CH
Mikrowelle	Miele, Gütersloh, Ger
Netzgerät für Elektrophoresen, 300 Xi	Biorad, Hercules, CA, USA
pH-Meter	Eydem, Kronshagen, Ger
Photometer, BioPhotomert	Eppendorf, Hamburg, Ger

Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Ger
Sofortbildkamera, Camag Reprostar II	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Stickstofftonne	AirLiquide, Hamburg, Ger
Thermocycler, GeneAmp PCR, System 2400	Perkin Elmer, Überlingen, Ger
Thermomixer, 5436	Eppendorf, Hamburg, Ger
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Ger
Tiefkühlschrank -80 °C	Hans S Schröder GmbH, Ger
Tischzentrifuge, 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Ger
Ultraturrax, T25	Janke und Kuhl, Ger
UV-Lampe, high performance transluminator	Ultraviolet products, CA, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Karlsruhe, Ger
Waage	Mettler, Giessen, Ger
Waage	Sartorius, Göttingen, Ger
Wärmebad, Typ 1002	GFL, Burgwedel, Ger
Zentrifuge, GPR Centrifuge	Beckmann, Krefeld, Ger
Zentrifuge, Varifuge 3.0	Heraeus, Newport Pagnell, UK

2.8 Gewebeproben

2.8.1 Patientenkollektiv der Gewebeproben

Das Gewebeprobenkollektiv bestand aus Patienten, bei denen unter verschiedenen Indikationen eine Routine-Ösophagogastroskopie durchgeführt wurde. Vorgenommen wurde die Probengewinnung durch die endoskopische Abteilung der Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Entnahme der Ösophagusbiopsien. Die Studie wurde der Ethikkommission der Universität Kiel gemeldet und von dieser bewilligt (Code AZ.: A 158/01).

In dieser Arbeit wurden Biopsien von acht an Soorösophagitis erkrankten Patienten (je befallenem und unbefallenem Bereich) sowie zehn Patienten mit unauffälligem Befund in der Ösophagoskopie als Kontrollgruppe verwendet.

Die Proben wurden nach der Biopsie sofort in flüssigem Stickstoff (bei -196 °C) schockgefroren und bei -80 °C für die weitere Verwendung gelagert. Für histologische Untersuchungen standen jeweils weitere Biopsien zur Verfügung, welche in Tissue Tek® eingebettet waren.

2.9 Immunhistochemie

Um auf Proteinebene Nachweise für das Vorhandensein der Metalloproteinasen im menschlichen Ösophagus zu führen, wurden immunhistochemische Färbungen mit der Labelled-Streptavidin-Biotin-

Methode für ADAM10 und ADAM17 angefertigt. Die im Tissue Tek® gelagerten Proben waren hierfür auf -20 °C temperiert und mit Hilfe eines Microtoms (Microm) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden diese vorsichtig auf Objektträger (superFrost Plus, Menzel) aufgetragen und bei -20 °C für weitere Arbeitsschritte gelagert.

2.9.1 Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Zur weiteren Fixierung wurden die konservierten Gefrierschnitte 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und mit Formalin fixiert. Dreimaliges Waschen mit TBS-Puffer und eine anschließende 10-minütige Inkubation mit 3 %-igen methanolischen Wasserstoffperoxid (9 ml Methanol + 1 ml 30 %-iges H₂O₂) schafften die Voraussetzung für eine Blockierung intrazellulär vorhandener Peroxidasen. Das überschüssige Wasserstoffperoxid wurde durch drei erneute Waschschrte mit TBS-Puffer entfernt und mit verdünntem Serum (Normalserum Dako, Verdünnungen 1:5 bis 1:20) von der Tierspezies des zweiten Antikörpers für 20 min inkubiert. Dieses hatte den Sinn einer Minderung von unspezifischen Bindungsreaktionen des zweiten Antikörpers, welcher später die entscheidende Färbungsreaktion katalysierte. Nach erneuten Waschen mit TBS-Puffer wurden die Gewebeschnitte bei +4 °C in einer feuchten Kammer für 16 h mit den jeweiligen primären Antikörpern (Verdünnung 1:50) ADAM10 Antikörper *Rabbit-anti-human* (Millipore, Schwalbach, Ger) und ADAM17 Antikörper *Mouse-anti-human* (R&D Systems, Wiesbaden, Ger) inkubiert. Die Negativkontrolle war ein Ansatz ohne Primäantikörper. Wieder wurde mit TBS-Puffer gewaschen, bevor nun mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (siehe 2.1.1.2), verdünnt mit TBS-Puffer (1:500), für 60 min inkubiert und danach mit TBS-Puffer mehrmals gewaschen wurde. Anschließend wurde der StreptABComplex/HRP (2,5ml TBS + 22,5µl Avidin + 22,5µl Biotin) für 30 min auf die Präparate gegeben und mit TBS-Puffer gewaschen. Das Aufbringen der chromogenen Substratlösung DAB (Verdünnung: 10 µl/ml TBS Puffer) für 2 bis 5 min unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde bis zu einer erkennbaren Braunfärbung durchgeführt. Durch Waschen mit TBS-Puffer wurde die Farbreaktion gestoppt. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Aqua Dest. und Leitungswasser gespült und das umliegende Gewebe durch eine Gegenfärbung für 10 min mit 10 %-igem Hämatoxylin (Merk) sichtbar gemacht. Konserviert wurde die fertigen Präparate durch Eindeckung in dem wässrigen Medium Aquatex (Merk). Am Lichtmikroskop (Axioplan, Zeiss) erfolgte die Fotodokumentation.

2.10 Zellkultur

2.10.1 Ösophageale Plattenepithel Zelllinie

Die Zelllinie OE21 wurde für das Modellsystem der menschlichen Speiseröhre in Vorversuchen etabliert (Steubesand et al. 2009).

Kultiviert wurden die OE21 Zellen in einem angemixten Zellkulturmedium aus RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 2 mM L-Glut (auf Penicillin/Streptomycin wurde im Medium verzichtet, da es sich

auf die Transfektion auswirkt). Zum Anzüchten wurden Zellkulturflaschen T75 Sarstedt benutzt und die Zellen im Brutschrank (Sterikult 200) bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Alle 3 Tage, bei circa 90 % Konfluenz, wurden die Zellen subkultiviert.

Im ersten Schritt wurden die Zellen mit 15 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA für 10 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Bei Passagen mit stark adhärenen Zellen wurde durch leichtes Schwenken oder Klopfen der Flasche nahezu die gesamte Zellpopulation vom Flaschengrund gelöst. Um zu verhindern, dass Trypsin übermäßig lange auf die Zellen einwirkt, wurde das doppelte Volumen an RPMI 1640 Medium zugefügt und der gesamte Flascheninhalt gleichmäßig in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und dann mit 1000 U/min für 10 min zentrifugiert. Über dem so erzeugten Zellpellet kann der Überstand vorsichtig abgesaugt werden und die Zellen anschließend im frischen Zellkulturmedium resuspendiert werden.

Mithilfe einer Neubauer Zählkammer wurde eine konstante Zellzahl von 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden dann für Stimulationsexperimente jeweils 2 ml in einer 6-Loch-Platte benutzt.

2.10.2 Lymphozyten/periphere mononukleäre Zellen

2.10.2.1 Aufbereitung und Isolierung aus peripherem Blut

Das venöse Blut für die experimentellen Stimulationsversuche wurde freundlicher Weise aus Spenden von zwei Personen unserer Arbeitsgruppe regelmäßig zur Verfügung gestellt. Es wurden 20 ml Blut in heparinisierten Röhrchen abgenommen.

Zur Vorbereitung für die Separation der *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) wurden zuvor 15 ml des Separationsmediums Ficoll-PaqueTM Plus (Dichte: 1,077 g/ml) in ein Leucosep®-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, Ger) gefüllt und 30 s mit 700 U/min ($\approx 1000 \times g$) zentrifugiert (Varifuge 3.0 Heraeus). Nun wurde vorsichtig über dem Filter 10 ml PBS (Raumtemperatur) zur Verdünnung des Probenmaterials hinzugefügt und dieses mit 20 ml heparinisiertem Vollblut langsam überschichtet und 20 min bei 650 U/min ($\approx 900 \times g$) ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Beim behutsamen Herausholen stellte sich nun eine Schichtung wie folgt dar (oben nach unten): Plasma (gelb), angereicherte Zellfraktionen aus Lymphozyten und PBMC's (cave: dünne Schicht, weiß), Separationsmedium (klar), Trennscheibe, Separationsmedium, Blut/Granulozytenpellet (rot). Die Plasmaschicht, in der sich auch die Thrombozyten befanden, wurde sehr vorsichtig bis auf dünne Millimeter Restschicht abgesaugt und verworfen. Mit einer Pasteurpipette konnten jetzt die Lymphozyten/PBMC vorsichtig geerntet und anschließend in einem frischen 15 ml Zentrifugenröhrchen 2x für 10 min bei 550 U/min mit 15 ml PBS zum Aufreinigen zentrifugiert werden (Steubesand et al. 2009). Zum Abschluss wurden die Zellen mit 10 ml RPMI resuspendiert und unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer für die Stimationsversuche auf 10⁵ Zellen/ml eingestellt.

2.10.3 *Candida albicans*

In Kooperation mit dem Institut für Infektionsmedizin der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel fand das Anzichten und Kultivieren von *C. albicans* statt. Die Herstellung der Kulturen unterlag dabei der Arbeitsgruppe unter Dr. med. Sabine Schubert vom Institut für Infektionsmedizin und wurde im Einverständnis für die Zellkulturexperimente benutzt.

2.10.3.1 Herstellung der *C. albicans* Suspensionkulturen

Die *C. albicans* Stämme wurden in einer Glycerin/BHI (Brain-Heart-Infusion) Kultur bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für den weiteren Gebrauch gelagert. Daraus wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ für die Beimpfung einer 10 ml tryptic soy broth (TSB) genommen und über Nacht für 16 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen bei $2800 \times g$ für 15 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zum Aufreinigen wurde die Prozedur zweimal mit PBS wiederholt und danach in RPMI resuspendiert und 3 h kultiviert. Diese Suspensionen wurden für die weiteren Experimente auf eine *C. albicans* Konzentration von 10^4 Zellen/ml jeweils konstant eingestellt.

2.10.3.2 Herstellung von *C. albicans* Überständen

Analog zu der Suspensionskultur (2.10.3.1) wurde eine Suspension von 10^4 Zellen/ml *C. albicans* eingestellt und für 48 h kultiviert. Dadurch stellte sich ein konstantes Konzentrationsniveau von 10^6 bis 10^7 Zellen/ml ein. Die Kultur wurde nachfolgend 5 min zentrifugiert und der Überstand über einen Filter sterilisiert. Bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Überstände bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.11 Stimulationsversuche

2.11.1 Co-Stimulation mit PBMC's und *C. albicans*

In Co-Kulturexperimenten (Abb. 8) sollte die Frage geklärt werden, ob Lymphozyten/PBMC's Einfluss auf das *Shedding* von ADAM-Substrat haben und sich dieser Effekt auf die Defensinexpression auswirkt. Für die Aussaat auf 6-Loch-Platten wurden 2 ml der eingestellten OE21 Zellsuspension benutzt, welches 2×10^5 OE21-Zellen entspricht. Die Zellen wurden 24 h im Inkubator bebrütet.

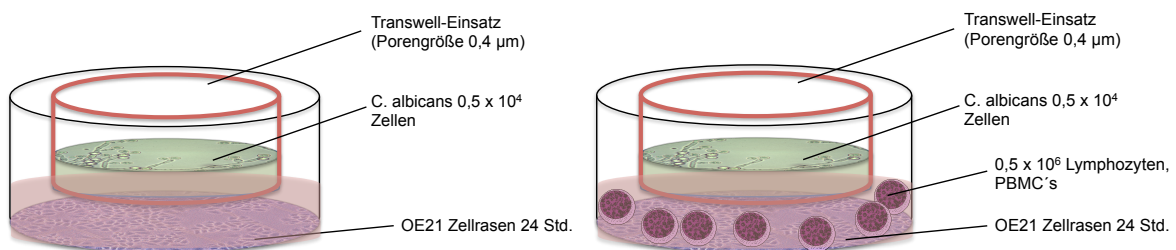


Abbildung 7: Schema eines Co-Stimulationswells

Dargestellt sind exemplarisch die Schemata für die Versuchsreihen (III) und (IV) siehe unten.

Bei den Versuchsreihen nahmen wir (Pahl et al. 2011, Steubesand et al. 2009) vier Ansatzreihen mit folgenden Schema:

- (I) Kontrollen,
- (II) PBMC's,
- (III) *C. albicans*,
- (IV) PBMC's und *C. albicans*

Die Platten (II – IV) wurden nach 24 h beim Mediumwechsel (statt den 1 ml RPMI für die Kontrollgruppe) mit 0,5 ml der 1×10^6 PBMC's / ml in Platte (II und IV) hinzugefügt, sodass direkter Zellkontakt zwischen Immunzellen und OE21 bestehen konnte. In Platte (III und IV) wurden Transwell-Einsätze (Porengröße 0,4 μm) in jedes Transwell eingehängt. Jeder Transwell-Einsatz wurde mit 0,5 ml der 1×10^4 *C. albicans*/ ml befüllt. Auf diese Weise wird der direkte Zellkontakt und ein Absterben der OE21 verhindert, jedoch fand ein Stoffwchelaustausch bis $< 0,4 \mu\text{M}$ löslicher Stoffe statt. Regelmäßige Stichproben unter einem Invert-Mikroskop (Axiovert) zeigten keinen direkten Befall der Zellen mit Hefepilzen. Analog zu (II) und (III) wurden beide zusammen in (IV) kombiniert, womit eine Co-Stimulation unter direkten PBMC's und indirekt *C. albicans* stattfand. Die fertig gestellten Ansätze wurden dann weitere 24 h im Inkubator gelagert.

Dieses Modell der Co-Stimulation stellte das Grundmodell für die folgenden Stimulationsversuche dar.

2.11.2 Hemmung von extra- und intrazellulären Botenstoffen

2.11.2.1 Antikörper gegen EGFR und TGF- α sowie IL-1 Rezeptorantagonisten

Für diesen Versuchsansatz wurden die OE21-Zellen zweimal mit spezifisch inhibitorischen oder neutralisierenden Antikörpern für jeweils EGFR (Upstate), TGF- α (R&D Systems) oder IL-1 Rezeptorantagonisten (R&D Systems) behandelt. Dies geschah jeweils 60 min vor sowie parallel zu dem Hinzugeben der PBMC's / *C. albicans*. Eingesetzte Dosierungen waren bei den EGFR Antikörper 10 $\mu\text{g/ml}$, bei den neutralisierenden TGF- α Antikörper 1 $\mu\text{g/ml}$ und bei den IL-1 Rezeptorantagonisten 250 ng/ml. Danach wurden die Zellen 24 h inkubiert und anschließend ihre RNA präpariert.

2.11.2.2 Metalloproteinase-Inhibitoren

Bei den Substanzen GW280264X, GI254023X und GM 6001 (Calbiochem) handelt es sich um auf Hydroxamat basierende Metalloproteinase-Inhibitoren. Sie wurden von Frau Prof. Reiss (Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt. GW280264X ist in der Lage, die proteolytische Aktivität von ADAM17 und ADAM10 zu inhibieren. GI254023X hingegen hemmt ausschließlich ADAM10 (Abel et al. 2004, Hundhausen et al. 2003, Ludwig et al. 2005).

Die Zellen wurden wie oben beschrieben (2×10^5 OE21-Zellen) in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 h im Inkubator wurde das Medium gewechselt, wobei kein FCS mehr hinzugegeben wurde. Weitere 24 h später erfolgten die Inhibitionsversuche mit den Metalloproteinase-Inhibitoren in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ (2 ml in einer Konzentration von 2:1000 [bei 10 mMol]). Nach 1 h wurden die Zellen mit *C. albicans* und *C. albicans*/PBMC's stimuliert und nach einer weiteren h abgestoppt, die RNA aufbereitet und per q-rt-PCR untersucht.

2.11.2.3 Small interfering RNA-Transfektion gegen ADAM10 und ADAM17

Bei der small interfering RNA (siRNA)-Transfektion wurden OE21 Zellen mit der jeweiligen spezifischen siRNA und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellvorbereitung entsprach den bisherigen Schilderungen, wobei nach 48 h hier die Transfektion erfolgte. Die Konfluenz der Zellen sollte dabei nicht 80 % überschreiten. Jedes Loch der bewachsenen 6-Loch-Platte erhielt als Vorlage $500 \mu\text{l}$ Magermedium (Mediumkontrollen $1000 \mu\text{l}$).

Das Transfektionsgemisch bestand aus zwei Komponenten. Zuerst wurde ein Transfektionsreagenz aus $5 \mu\text{l}$ Lipofectamin und $250 \mu\text{l}$ Magermedium je Loch als Mastermix angesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass das Lipofectamin ohne eine Wandberührung ins Medium gegeben wurde. Nach vorsichtigem Mischen wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Zweites folgte nun die Verdünnung der siRNA. Diese befand sich in einer Stocklösung [$20 \mu\text{mol} = 20 \text{ pmol/}\mu\text{l}$], wovon $1 \mu\text{l}$ je Loch in $250 \mu\text{l}$ Magermedium verdünnt wurde [Endkonzentration von 20 nM auf 1 ml Gesamtvolumen]. Zur Herstellung des Transfektionsgemisches wurden nun beide Ansätze vorsichtig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise zu der $500 \mu\text{l}$ Magermediumvorlage der Zellen pipettiert. Nach 3 h Inkubation wurde je Loch $100 \mu\text{l}$ FCS hinzugefügt und für weitere 45 h inkubiert.

Hieran schloss sich der Co-Stimulationsversuch für siehe 3.3.1.1 an. 24 h nach der Stimulation erfolgten die Zellernte, RNA-Isolierung und mRNA-Expressionsanalysen sowie Gel-shift-Experimente.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 RNA-Isolierung

2.12.1.1 Präparation der Gewebeproben

Die klinisch gewonnenen und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Proben mussten in einem ersten Arbeitsschritt mechanisch zerkleinert werden, was bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe geschehen war (Steubesand et al. 2009).

2.12.1.2 Isolierung und Aufbereitung der RNA per RNeasy mini Kit

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Jeweils am Ende der Versuchsreihen wurden die Zellen mit 500 µl SDS-haltigem Lysispuffer (Qiagen) unter Zusatz von 5 µl β-Mercaptoethanol je Loch lysiert und bei 2.000 U/min für eine Minute homogenisiert und lysiert. Guanidinisothiocyanat im Puffer sorgt für eine Denaturierung der Proteine (RNase frei). Die Lysate wurden einzeln jeweils über eine QIA-Schredder-Säule (Qiagen) gegeben und 3 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Dabei hielt der Filter verbliebene Verunreinigungen zurück.

Zum Durchfluss wurden 500 µl Ethanol (70 % DEPC-H₂O) gegeben, welches die Nukleinsäuren ausfällen ließ. Alle Proben wurden eine Minute durchmischt und in zwei Durchgängen je maximal 500 µl auf RNeasy-Mini-Säule (Qiagen) pipettiert. Die Nukleinsäuren verblieben unter Zentrifugation bei 10 000 U/min für 15 Sekunden auf der Silikat-Gel-Membran und der Durchfluss wurde verworfen. Ein folgender Waschschrift mit 350 µl RW-1-Puffer (Qiagen) bewirkte ein weiteres Aufreinigen der Proteinrückstände. Die DNA wurde durch Desoxyribonuklease I (Qiagen) mit 80 µl DNase-Mix (70µl RDD-Puffer + 10 µl DNase) abgebaut, welches für 15 min bei Raumtemperatur auf die Membran einwirkte. Zur Enzymfernung folgten zwei Waschriffe mit wiederum 350 µl RW-1-Puffer. Die Säulen wurden in ein neues Tube gesteckt und mit 500 µl RPE-Puffer (Qiagen) nach 15 Sekunden bei 13 000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen.

Zum Eluieren der aufgereinigten RNA vom Filter musste die Membran erneut trocken zentrifugiert werden und im Anschluss mit 50 µl RNase freiem Wasser zehn Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen werden, bevor diese bei 10 000 U/min eine Minute lang zentrifugiert wurde. Die nun gelöste RNA wurde bei 68°C für 5-10 Minuten denaturiert und im Anschluss sofort in Eis heruntergekühlt.

2.12.2 Spektralphotometrische Quantifizierung

2.12.2.1 Gesamt-mRNA-Quantifizierung

Ein Bio-Photometer (Eppendorf) wurde zur indirekten Bestimmung der mRNA-Menge hinzugezogen. Aufgrund des UV-Absorptionsmaximums der RNA bei 260 nm (Wilfinger et al. 1997) kann man bei einer Extinktion von 1 auf eine RNA-Konzentration von 41,2 µg/ml schließen (Sambrook J 1989). Nach Eichung des Photometers durch 100 µl DEPC Wasser, wurden 5 µl der Proben mit 95 µl RNase freiem DEPC-Wasser verdünnt und gemessen. Mit folgender Formel kann die Konzentration der Gesamt-RNA berechnet werden:

$$\text{Konzentration RNA } \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = E_{260\text{nm}} \times 41,2 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] \times 20$$

$E_{260\text{nm}}$ = Extinktion bei 260 nm; Faktor 20 durch die Verdünnung von 1:20

Um die Qualität der RNA-Isolation zu prüfen, wird ebenfalls der Proteingehalt der Proben bestimmt. Proteine haben im Gegensatz zu den Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient aus den Extinktionswerten 260 nm / 280 nm erlaubt dadurch eine Aussage über die Reinheit der RNA (Wilfinger et al. 1997). Zur Verhinderung einer Verunreinigung der Proben wurden Werte zwischen 1,6 und 2,0 angestrebt. Ein höherer Proteinanteil hätte das Transkriptionsergebnis der mRNA zu *copied* DNA (cDNA) negativ beeinflusst.

2.12.3 Reverse Transkription der Zellkulturproben

Nach der Bestimmung der RNA Konzentration wurde das Volumen von 2 µg in Tubes pipettiert und auf ein Totalvolumen von 10 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt, für zehn Minuten bei 68 °C erhitzt und sofort in ein Eisbad gestellt.

Für die Generierung einer stabilen, komplementären cDNA diente das Enzym Reverse Transkriptase (*moloney murine leukemia virus*). Nachfolgend wurde nach Angaben des Herstellers das Kit SuperScript™ II (Invitrogen) benutzt. Damit nur die mRNA umgeschrieben wurde, benutzten wir ausschließlich Oligo-dT-Primer, welche komplementär zum spezifischen poly-A-Schwanz der mRNA waren. Die Zusammensetzung sah wie folgt aus:

SuperScript™ II je Ansatz					
RNA	5x Puffer	DTT	Oligo-dT-Primer	dNTPs	SuperScript
(0,2 µg/µl)		(0,1M)	(20 µM)	(10mM)	(200 U)
10 µl	4 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl

Das Gemisch (20 µl) wurde kurz zentrifugiert und bei 42 °C für 1 h in cDNA in einem *Thermocycler* (Gene Amp 2400, Perkin) umgeschrieben. Im Anschluss wurden 80 µl RNase freies Wasser hinzugefügt, so dass eine cDNA Endkonzentration von 20 ng/µl eingestellt wurde. Für den Fall, dass mit den Proben nicht direkt weitergearbeitet wurde, waren diese bei minus 20 °C zwischengelagert worden.

2.13 Quantifizierung der Gen-Expression

2.13.1 Auswertung mit quantitativer-real-time-Polymerasekettenreaktion

2.13.1.1 Grundlagen der quantitativen-real-time-Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen-real-time-Polymerasekettenreaktion (q-rt-PCR) fügt man zwei Arbeitsschritte zusammen. Zum einen die Vervielfältigung der cDNA, zum anderen die direkte Quantifizierung der enthaltenen cDNA. Das Grundprinzip beruht auf einer Polymerase-Kettenreaktion

(Mullis et al. 1986), indem u.a. durch das Enzym Taq-DNA-Polymerase in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen die cDNA vervielfältigt werden kann.

Für die real-time-PCR wurde ein Fluoreszenz-Thermo-Cycler (*LightCycler*®, Roche Molecular Biochemicals) mit speziellem Farbstoff *SYBR Green I* (Roche) eingesetzt. Dieser Farbstoff besitzt die Eigenschaft, in doppelsträngiger DNA zu interkalieren und zeigt in diesem Bindungszustand eine Fluoreszenz in ultraviolettem Licht. Während jeder 72 °C Amplifikationsphase kann durch ein optisches Detektionsmodul die Fluoreszenz gemessen werden. Innerhalb der in jedem Zyklus neu synthetisierten primer-spezifischen Gen-Produkte kann proportional der Anstieg der cDNA-Zielsequenz abgeleitet werden und in Echtzeit über die entsprechende PC-Software dokumentiert werden. Benutzt wird der Wert, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, der sogenannte CT-Wert (*threshold Cycle*). Dadurch entfällt eine sonst nach PCR übliche gelelektrophoretische Auftrennung und Quantifizierung.

2.13.1.2 Herstellung der Primer

Die in dieser Arbeit gebrauchten Primer für die Defensine (Kiehne et al. 2007, Steubesand et al. 2009) wurden mit Hilfe der Primer 3 Software von S.Rozen und H.J. Skaletzky (2000) (http://www.broadinstitute.org/genome_software/other/primer3.html) ausgewählt. Die Primer für ADAM10 und ADAM17 wurden von Frau Prof. Reiss (Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt.

2.13.1.3 Ansatz und Amplifikationsprotokoll der q-rt-PCR

Die q-rt-PCR wurde nach Herstellerinformation (*LightCycler*®, Roche) durchgeführt mit der Modifikation, dass der Ansatz von 20 µl auf 10µl verringert wurde. Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration pro 10 µl
DNA Master <i>SYBR Green I</i> , 10x Konz.	1 µl	1x
MgCL ₂ (25 mM)	1,2 µ	4 mM
5' - Primer (10 µM)	0,5 µl	0,5 µM
3' - Primer (10 µM)	0,5 µl	0,5 µM
Aqua dest.	5,8 µl	-
cDNA (20 ng/µl)	1 µl	20 ng

Bevor die Zyklen starten, gibt es eine initiale Denaturierungsphase bei 95 °C für 10 min mit anschließenden 45 Zyklen. Zur Qualitätskontrolle wurde am Ende der 45 Zyklen eine Schmelzkurve (siehe Abb.9 unten) der synthetisierten DNA-Produkte erstellt. Dazu wurde auf eine Temperatur von 65 °C für 15 Sekunden herabgekühlt. In kleinen Schritten (0,2 °C/s) wurde die Temperatur angehoben, sodass sich je nach DNA-Stranglänge/Konfiguration die Doppelstränge lösten und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wurde. So konnte eine grobe Differenzierung zwischen Zielsequenz und eventuellen Nebensequenzen graphisch ausgewertet werden. Anhand der Schmelzkurve, die für das Endprodukt spezifisch ist, konnte nun eine Temperatur für die Fluoreszenzmessung bestimmt werden. Dadurch wurde bei den Messreihen gewährleistet, dass keine unspezifischen Nebenprodukte gemessen wurden.

2.13.2 Absolute Quantifizierung anhand von Standardkurven

2.13.2.1 Prinzip der Standardmesskurven

Um nun von den ermittelten CT-Werten des *LightCyclers*® eine absolute Quantifizierung der DNA-Konzentration zu erreichen, bedienten wir uns, wie in den Vorarbeiten (Kiehne et al. 2007, Steubesand et al. 2009), der Generierung von Standardmesskurven für unsere entsprechenden Proteine (Defensine, ADAM-Familie). Das Prinzip beruht darauf, dass eine Standardkurve mit bekannter DNA-Konzentration der gesuchten Proteinsequenz geschaffen wurde. Dazu wurde die benötigte DNA-Zielsequenz durch einen pGEM-T Vektor in *Escherichia coli* Stämme eingebracht, vervielfältigt, isoliert und die Konzentration ermittelt. Aus dieser bekannten Konzentration konnten nun Verdünnungsreihen von $10^1 - 10^8$ Kopien pro μl erstellt werden und die CT-Werte in eine annähernd lineare Funktion überführt werden. Neu ermittelte relative Werte aus den Versuchsreihen konnten mit Hilfe dieser erstellten Standardkurve nun in absolute Konzentrationswerte transformiert werden.

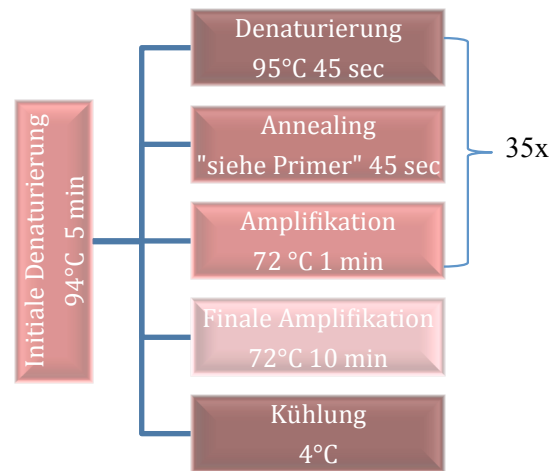
Die folgenden Arbeitsschritte zur Herstellung der Plasmide wurde mit Hilfe von Frau Dipl. Biologin G. Brunke, Klinik für Innere Medizin III, Molekulare Kardiologie, Universitätsklinikum-Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchgeführt und wurden zum besseren Verständnis zusammengefasst.

2.13.2.2 Amplifikation und Aufreinigen der cDNA

Um den Standard zu generieren, wurden die gleichen Primer und cDNA wie in den Versuchsreihen benutzt. Für die rt-PCR wurde ein *Thermocycler* eingesetzt. Der PCR Ansatz von 60 μl und das PCR-Protokoll sind nachfolgend dargestellt.

Komponenten	Volumen
10x PCR Puffer	6 µl
MgCL ₂ (1,5 mM)	1,8 µ
dNTPs (10 mM)	4,8 µl
5 U/µl Taq-Polymerase	0,6 ul
5' - Primer (10 µM)	1,5 µl
3' - Primer (10 µM)	1,5 µl
Aqua dest.	39,8 µl
cDNA (20 ng/µl)	4 µl

Protokoll für RT.PCR Mastermix



Amplifikationsprotokoll für die Generierung der Standard cDNA. 35x Zyklen siehe Klammer.

2.13.2.3 Gelelektrophorese

Um mit entstandenen spezifischen PCR-Produkten weiter arbeiten zu können, mussten diese konzentriert und identifiziert werden. Es wurden zu 55 µl der PCR-Produkte 6 µl TBE-Auftragspuffer hinzugefügt und in die Taschen eines 1,75-%igen low melting Agarosegel (Ultrapur, Invitrogen) pipettiert. Dem Gel wurde vor dem Gießen bei 60 °C 5 µl Ethidiumbromid zugefügt. Die Laufzeit betrug 1 h bei einer Spannung von 100 V und es wurde ein Größenstandard mitlaufen gelassen. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden unter UV-Licht mit Hilfe des Größenstandards die entsprechenden cDNA-Banden identifiziert und ausgeschnitten. Für die folgenden Aufreinigungsschritte wurden QIAEX II Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers benutzt, um die DNA aus dem Gel zu isolieren.

2.13.2.4 Vektor-Klonierung und Transfektion

Unter Einsatz des *Zero Blunt Topo Cloning Kit* (Invitrogen) fand die Insertion der spezifischen PCR-Produkte der antimikrobiellen Peptide unter Angaben des Herstellers in den pCR-Blunt II-Topo Vector (Plasmid, 3519 bp, Invitrogen) statt. Für ADAM10 und ADAM 17 wurden bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C für 16 h durch T4-DNA Ligase in den pGEM-T Vector (Plasid, 3000bp, Promega) integriert. Zum Einbringen des Vektors wurden als Zielzellen kompetente *Escherichia coli* Zellen (Top10 *E.coli*, Invitrogen) gewählt. 2 µl des Ligationsansatzes wurden mit 50 µl *E.coli*-Zellsuspension zusammen pipettiert und 30 min auf Eis herabgekühlt. Die Transfektion erfolgte unter einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden mit anschließender Kühlung auf Eis für zwei Minuten. Hiernach wurden die Zellen in 125 µl warmes Medium (S.O.C.-Medium ultrapur, Invitrogen) umpipettiert und bei 37 °C und 200 U/min im Thermomixer (5436 Eppendorf) für 1 h inkubiert. Der komplette Ansatz wurde auf mit 100 µg/ml Carbenicillin beinhaltenen LB-Agarplatten

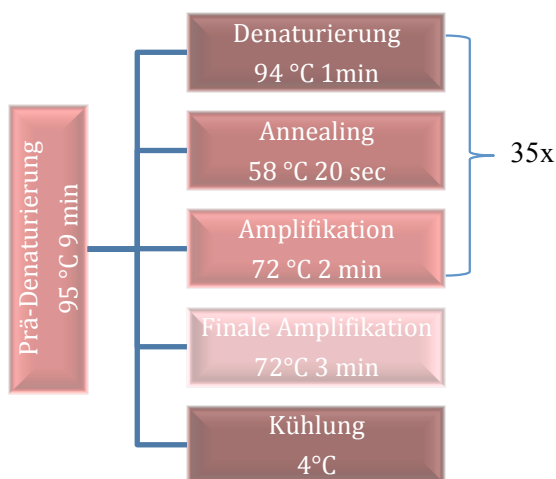
ausgesäht und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Durch die Integration der neuen cDNA in den Vektor wurde eine Antibiotikaresistenz im Vektor aktiviert, was eine Selektion der positiven Klone möglich machte.

2.13.2.5 Masterplatte und Kolonie-PCR

Um nun die richtige Insertion in den antibiotikaresistenten Kolonien verifizieren zu können, wurden die Kolonien vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze aufgepickt. Diese wurden zum einen auf einer mit Nummernraster versehenen frischen Carbenicillin-Agarplatte beimpft, als auch entsprechend ihrer Nummer in einen 30 µl PCR-Ansatz getaucht. Die an der Pipettenspitze verbliebenen *Escherichia coli* dienten einer Kontroll-PCR, welche die gesuchten Ziel-Sequenzen (Defensine, ADAM-Familie) nachweisen sollte. Die Masterplatte wurde währenddessen bei 37 °C über Nacht weiter inkubiert. Das PCR-Protokoll sah wie folgt aus:

Komponenten	Volumen
10x PCR Puffer	3 µl
MgCL ₂ (25 mM)	2,4 µ
dNTPs (10 mM)	0,6 µl
Ampli-Taq-Gold DNA Polymerase	0,15 µl
5'-Primer (10 mM)	0,6 µl
3'-Primer (10 mM)	0,6 µl
Milli-Q (aqua dest.)	21,65 µl
cDNA (20 ng/µl)	4 µl

Protokoll für Kolonie-PCR



**Amplifikationsprotokoll für Kolonie-PCR.
35x Zyklen siehe Klammer.**

Die Prä-Denaturierung für neun Minuten bei 95 °C diente u.a. dazu, die *E.coli* zu lysieren sowie die DNA zu denaturieren. Um die richtigen plasmidtragenden Kolonien auf der Masterplatte identifizieren zu können, erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung (100 V, 1 h) in einem 8-%igen Polyacrylamid-Gel mit 6 µl PCR-Ansatz und 1 µl Auftragspuffer pro Gel-Tasche. Das gesuchte Zielprodukt konnte nun in 5 ml LB-Medium (S.O.C. Medium ultrapur, Invitrogen) und 5 µl Ampicillin für die weitere Plasmidisolierung inkubiert werden.

2.13.2.6 Plasmidisolierung und Sequenzierung

Von der über Nacht kultivierten Insert-positiven LB-Medium Kultur konnten 3 ml zur Plasmidisolierung per *NucleoSpinPlasmid Quick Pure Kit* (Macherey und Nagel) genommen und die Plasmide nach Angaben des Herstellers isoliert werden. Eine Sequenzkontrolle wurde über die

Sequence Laboratories Göttingen (www.seqlab.de) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte analog zu 2.12.2.1 unter der folgenden Formel für DNA:

$$\text{Konzentration dsDNA} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = E_{260\text{nm}} \times 50 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] \times (\text{Verdünnungsfaktor})$$

$E_{260\text{nm}}$ = Extinktion bei 260 nm

2.13.2.7 Linearisierung der Plasmide

Um die Plasmide für die Quantifizierung der Standardkurven nutzen zu können, wurden diese durch das Restriktionsenzym Hind3 (Boehringer) linearisiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte per Gelelektrophorese und QIAEX II (Qiagen) siehe 3.5.2.3.

2.13.2.8 Kalkulation der Plasmidkonzentration

Zur Bestimmung der Plasmid-DNA Kopienzahl wurde eine photometrische Messung (Eppendorf-Photometer) bei 260 nm vorgenommen. Diese ergab einen DNA-Konzentrationswert X in g/μl, der neben der Anzahl an Basenpaaren des Plasmides Y (plus der Länge des eingebauten DNA-Fragmentes in Basenpaaren) für die folgende Formel benötigt wurde:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{X \left[\frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right] \text{ Plasmid DNA}}{Y \times 660 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]} \times 6,023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

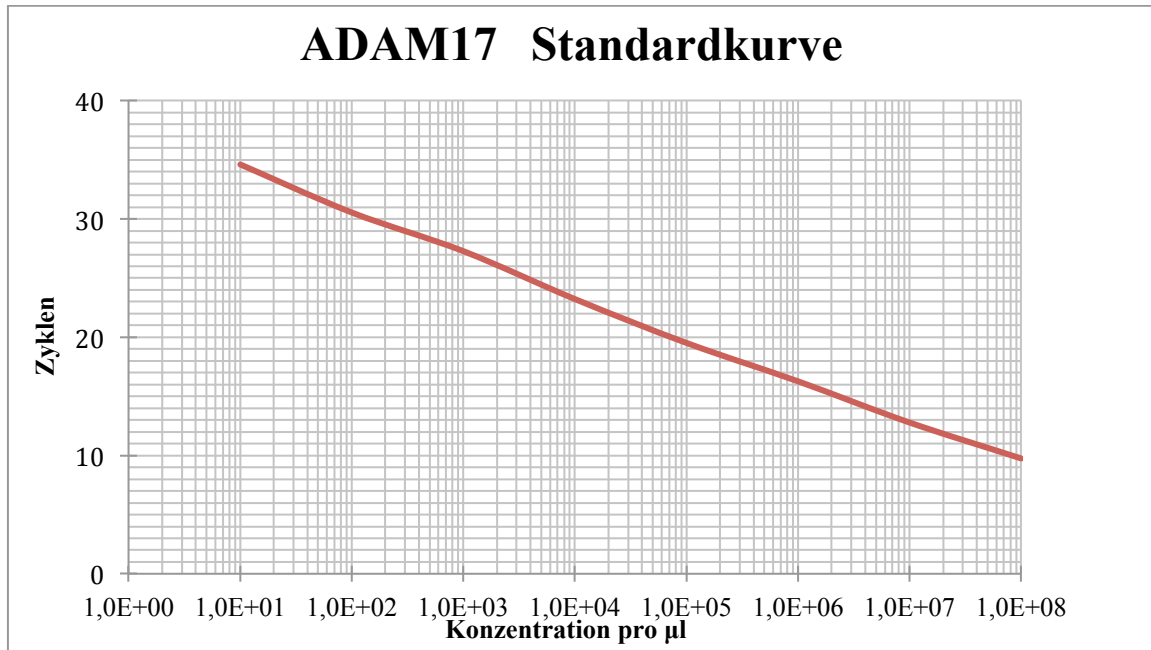
X = photometrisch bestimmte Plasmid-DNA-Konzentration $\left[\frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right]$

Y = Anzahl der Basenpaare (siehe Text)

$660 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$ = durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids

$6,023 \times 10^{23}$ = Zahl von Avogadro (Anzahl der Kopien pro Mol)

Mit dieser bestimmten Kopienzahl konnten wie in 3.5.2.1 die Verdünnungsreihen und die Standardkurve erstellt werden.



Anzahl der Läufe	Standardkonzentration [Template-copies/µl]	CT-WERT	Mittelwert	SD	Anzahl der Läufe	Standardkonzentration [Template-copies/µl]	CT-WERT	Mittelwert	SD
1	10E+0 1 Kopie	35,19	36,38	2,14	1	10E+5 100 000 Kopien	19,09	19,52	0,56
2		39,47			2		19,21		
3		34,74			3		19,60		
4		36,11			4		20,69		
5					5		19,71		
1	10E+1 10 Kopien	33,52	34,63	1,49	6		20,07		
2		36,78			7		19,19		
3		34,33			8		19,10		
4		32,88			9		19,00		
5		36,04			10				
6		34,23							
7									
1	10E+2 100 Kopien	30,61	30,55	0,88	1	10E+6 1 000 000 Kopien	16,28	16,27	0,32
2		30,27			2		15,91		
3		29,98			3		15,91		
4		30,07			4		16,55		
5		32,07			5		16,64		
6		31,72			6		16,49		
7		29,67			7		15,87		
8		29,99			8		16,18		
9					9		16,60		
10					10				
1	10E+3 1 000 Kopien	26,79	27,28	0,90	1	10E+7 10 000 000 Kopien	12,78	12,78	0,40
2		27,81			2		12,64		
3		27,06			3		12,75		
4		28,22			4		13,15		
5		28,44			5		13,28		
6		28,23			6		12,86		
7		26,26			7		12,76		
8		26,22			8		12,96		
9		26,47			9		11,88		
10					10				
1	10E+4 10 000 Kopien	22,74	23,23	0,67	1	10E+8 100 000 000 Kopien	9,74	9,75	0,11
2		23,03			2		9,72		
3		22,88			3		9,80		
4		24,33			4		9,72		
5		23,67			5		9,78		
6		24,21			6		9,62		
7		22,91			7		9,63		
8		22,69			8		9,75		
9		22,58			9		10,00		
10					10				

Abbildung 8: Standardmesskurve für ADAM17

Messergebnisse einer Verdünnungsreihe ($10^1 - 10^8$ Kopien pro μl) von ADAM17. Oben: graphische Darstellung der Standardmesskurven von ADAM17. Unten: Ergebnisse aus neun unabhängigen Messwerten. Konzentrationen $< 10^2$ Kopien pro μl wurden aufgrund von Messschwierigkeiten nur in einer kleineren Anzahl erreicht. Der CT-Wert stellt den Schwellenwert-Zyklus dar, bei welchem die Fluoreszenz erstmalig den Hintergrundfluoreszenz überschreitet.

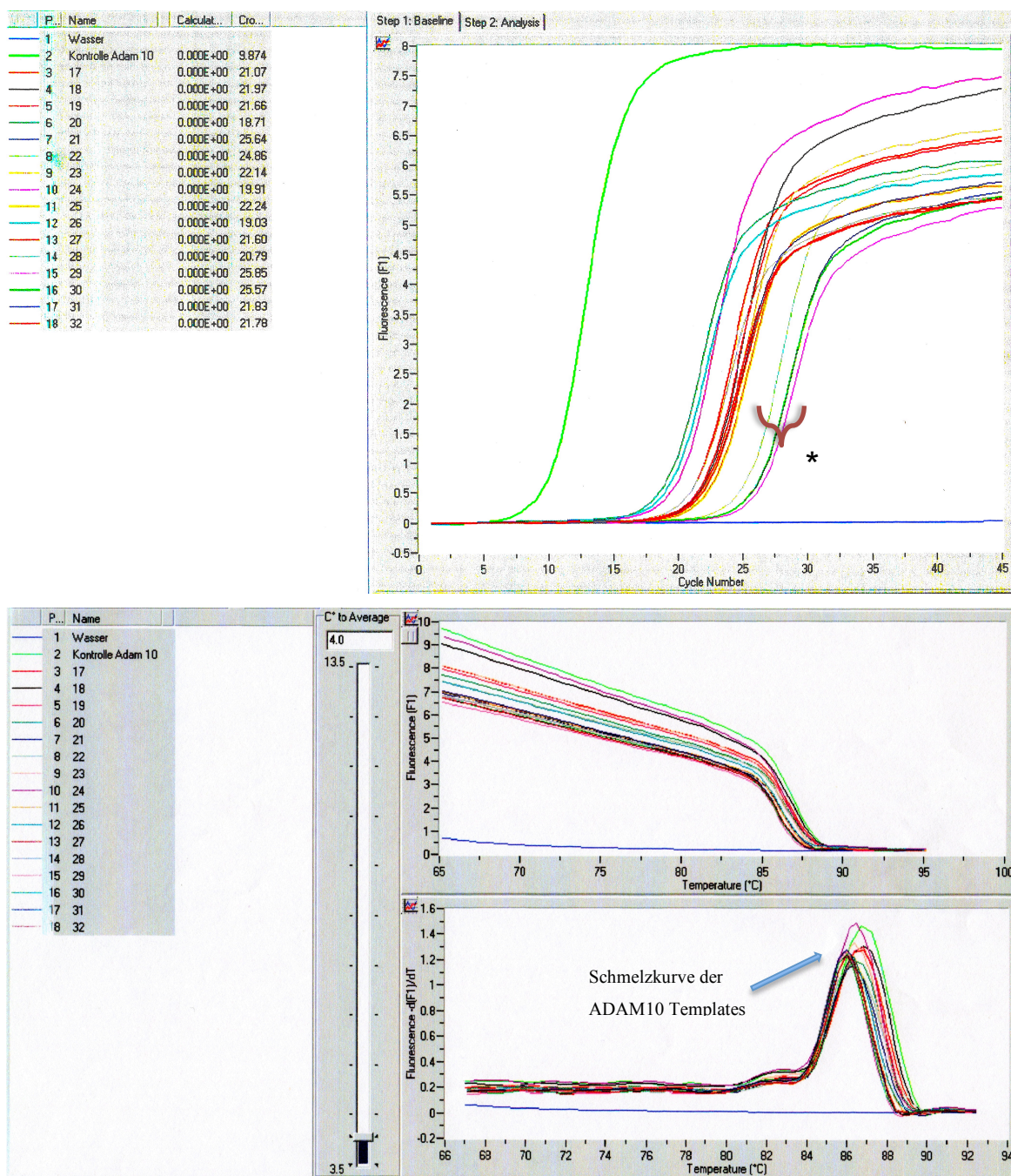


Abbildung 9: Messkurven und Schmelzkurven für ADAM10

Exemplarische Darstellung der CT-Wert-Messung eines ADAM10 *knock-down*. Position 3-10 entsprechen dem Aufbauchema OE21+Candida (III) und die Positionen 11-18 Aufbauchema *C. albicans* + PBMC (IV) → siehe in Abb.7. Die Zellen (außer der Kontrolle) wurden 48 h nach der Aussaat mit der jeweiligen siRNA oder scrambled RNA transfiziert und für weitere 48 h inkubiert. Danach erfolgte für 24 h die Stimulation mit den *C. albicans*/PBMC und anschließender Isolierung der RNA und cDNA-Transkription für die oberen Messzyklen. Position 2 entspricht einer Kontrolle ADAM10 in 10^8 Kopien pro μ l; Position 3+4 sowie 11+12 Mediumkontrolle; 5+6 sowie 13+14 plus scrambled RNA; 7+8 sowie 15+16 ADAM10 siRNA; 9+10 sowie 17-18 ADAM17 siRNA. **Oben:** Fluoreszenz in Abhängigkeit der vollendeten Zyklen. Die Werte außen zeigen den ermittelten CT-Wert für die ADAM10 Templates. **Unten:** Schmelzkurve für ADAM10 Templates. Hiermit können SYBR Green I (Roche) markierte unspezifische PCR-Nebenprodukte von Primerdimeren dargestellt werden, welche eine geringere Schmelztemperatur als die ADAM10 Templates hätten. * zeigt die ADAM10 siRNA *knock-downs*.

2.14 Electrophoresis Mobility Shift Assay

2.14.1 Isolierung der Kernproteine

Bei der Durchführung der *Electrophoresis Mobility Shift Assay* (EMSA) Versuchsreihe wurde stets auf eine ausreichende Kühlung der Proben von Beginn an geachtet, um proteolytische Prozesse der Zelle zu minimieren. Daher wurden die Stimulationsversuche siehe 3.3.1.1 mit zwei Waschschrritten unter eiskaltem PBS gestoppt und auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde das PBS abgesaugt und die Zellen in jeder Kammer der 6-Loch-Platten unter Zugabe von 500 µl EMSA-Puffer-I vorsichtig mit einem Zellspatel vom Untergrund gelöst. Danach wurden für die weiteren Schritte jeweils zwei Kammern (identische Doppelansätze) in 1,5 ml Röhrchen zusammen pipettiert. Bei einer Konfiguration von 4 °C und 13 000 U/min wurde 20 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt lysierte die Zellen, ließ aber die Integrität der Kerne unberührt. Durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes wurden die zytoplasmatischen Bestandteile der Zellen entfernt und für die Proteinuntersuchungen bei -20 °C bzw -80 °C gelagert. Es blieb ein Pellet der Kerne am Boden der Röhrchen zurück. Zu diesen Kernpellets wurden 100 µl EMSA-Puffer-II hinzugefügt, um diese vom Boden zu lösen und bei 4 °C für 20 min geschüttelt. Anschließend wurden diese wieder bei 4 °C und 13 000 U/min für 5 min zentrifugiert. Nun befanden sich die Kernproteine in dem Überstand, der in ein neues 1,5 ml Röhrchen pipettiert wurde.

2.14.1.1 Sonden

Die Sonden AP-1- und NFκB-Konsensus-Sequenzen (Stratagene) bestanden aus doppelsträngigen Oligonukleotiden von etwa 22-30 Basenpaaren, die am 5'Ende durch [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP radioaktiv markiert wurden.

2.14.1.2 Gelshift

Die auf Eis gelagerten Proben konnten nun für Gelshift- und Supershift-Versuche benutzt werden. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu den Ansätzen 1 µl Auftragspuffer hinzugegeben und in die Taschen eines 8-%igen nativen Polyacrylamid-Gels pipettiert, das Gel bei 100 V und maximaler Stromstärke [mA] vorlaufen gelassen und anschließend das Gel mit den Proben beladen. Bei maximaler Spannung [V] und 25 mA (für 2 Gele) wurden die Proben für 1 ½ bis 2 h laufen gelassen. Am Ende der Elektrophorese wurden die Proben auf Whatmann-3mm-Filterpapier übertragen und nach einer Vakuumtrocknung durch die radioaktiv markierten Sonden autoradiographisch ausgewertet.

2.15 Statistische Analysen

Alle Versuche innerhalb der Zellkultur repräsentieren Beispiele für mehrfach durchgeführte unabhängige Versuchsdurchführungen mit vergleichbaren Ergebnissen. Versuche ohne eindeutige Ergebnisse oder mit zu gravierenden Abweichungen wurden nicht weiter ausgeführt und wurden nicht im Ergebnisteil dargestellt.

Für die Präsentation der ermittelten Resultate wurden sämtliche Messwerte zur Mittelwertbildung herangezogen und mit einer positiven Standardabweichung (SD) graphisch dargestellt. Für die Beurteilung der wissenschaftlichen Signifikanz wurde der Student-Test (t-test) durchgeführt und bei einem p-Wert < 0.05 als signifikant bewertet. Sowohl für die Berechnungen, als auch für die Diagramme wurde die Software Excel für mac²⁰¹¹ (Microsoft) angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der β -Defensine im Rahmen der Candida-Ösophagitis

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnten wir nachweisen, dass die Expression von hBD-2 und hBD-3 durch eine Inkubation von OE21 Zellen mit Überständen einer *C. albicans* Kultur dosisabhängig erfolgt (Abb. 10; (Steubesand et al. 2009)).

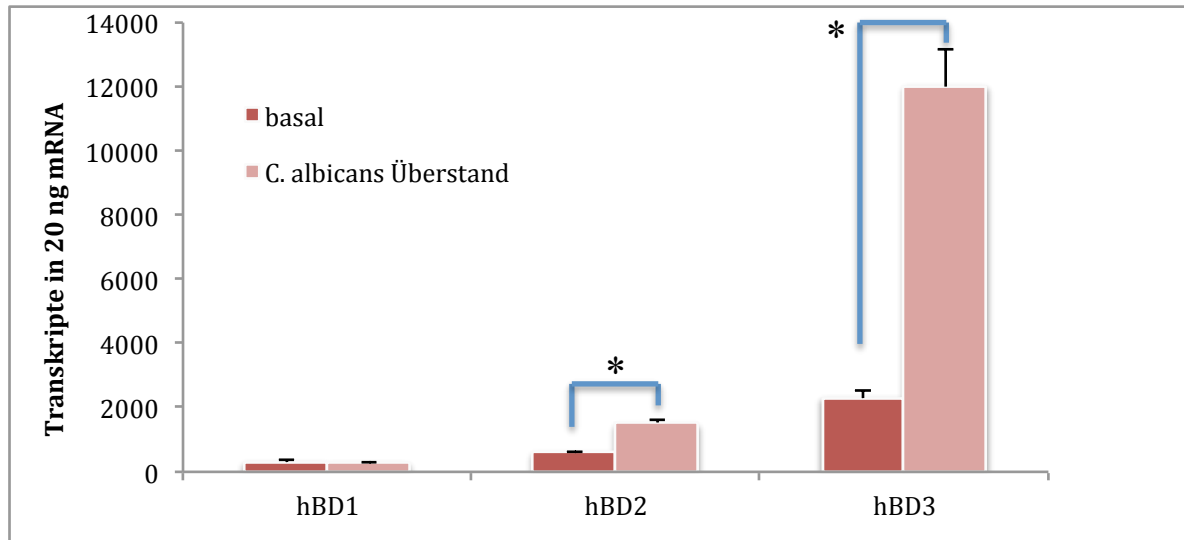


Abbildung 10: Induktion der hBD-2 und hBD-3 Expression durch *C. albicans* Überstände

OE21 Zellen wurden für 24 h mit Überständen von *C. albicans* Kulturen (10^6 - 10^7 Zellen/ml; 48 h inkubiert; siehe 2.10.3.2) stimuliert und anschließend die Expression von hBD-2 und hBD-3 mittels q-rt-PCR bestimmt. Ergebnis von 5 unabhängigen Experimenten. * p-Wert <0,05

Diese Induktion wird durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 bewirkt. Um die Rolle von PBMCs in der epithelialen Antwort gegenüber *C. albicans* zu untersuchen, haben wir ebenfalls im Rahmen der Vorarbeiten ein Cokulturmodell etabliert (Abb. 11; (Steubesand et al. 2009)). In diesem Modell kommt es durch die PBMCs zu einer deutlich verstärkten Induktion der hBD-2 und hBD-3 Expression unter einer *C. albicans* Inkubation der OE21 Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, durch welche extrazellulären und intrazellulären Signalwege diese Induktion bewirkt wird. Hierzu wurde primär das komplexere Cokulturmodell (Abb. 11) verwendet.

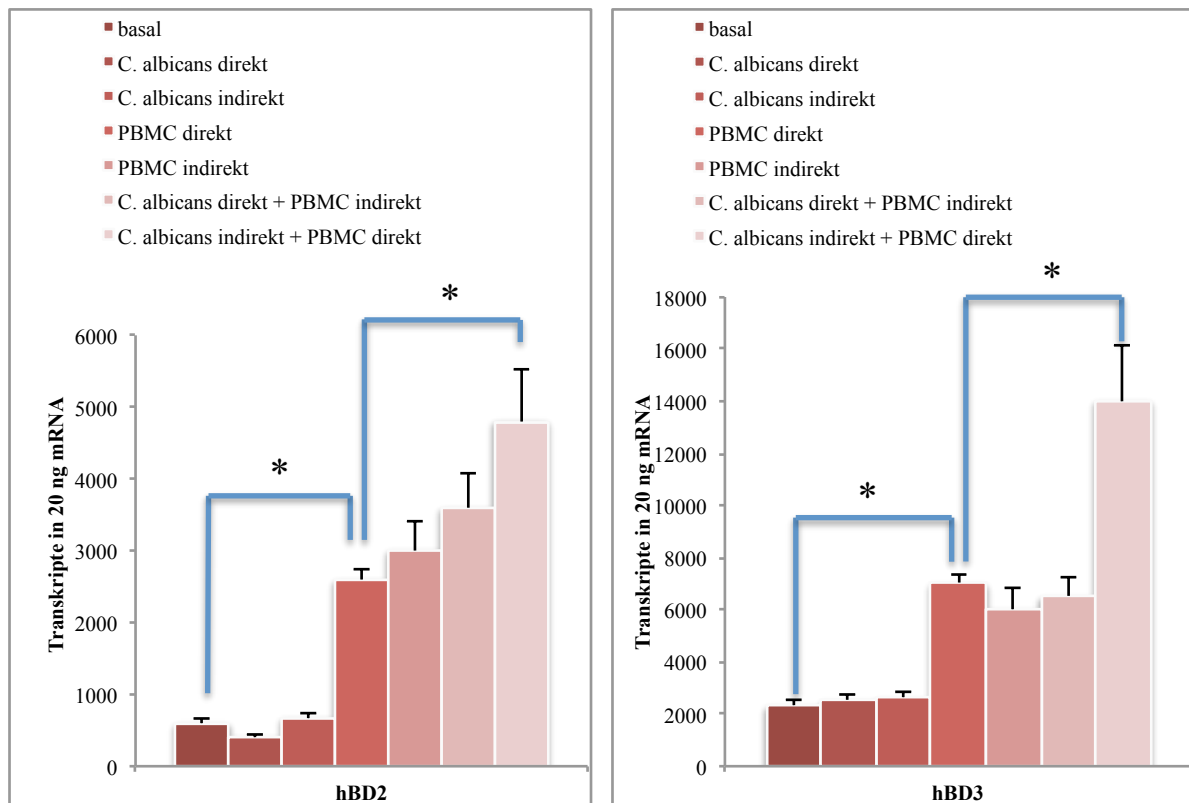


Abbildung 11: Induktion der hBD-2 und hBD-3 Expression im Cokulturmodell

OE21 Zellen wurden mit in den Methoden beschriebenen Cokulturmodell mit *C. albicans* und PBMCs koinkubiert und anschließend die Expression von hBD-2 und hBD-3 mittels q-rt-PCR bestimmt. Versuche mit *direkter* Stimulation hatten einen Zellkontakt untereinander. Bei der *indirekten* Stimulation wurden die OE21 Zellen durch einen semipermeablen Transwelleinstaz (Porengröße 0,4 μm) von entweder *C. albicans*-Zellen oder PBMC getrennt. Ergebnis von 5 unabhängigen Experimenten. * p-Wert <0,05

3.1.1 Interleukin-1 β Expression im Costimulationsversuch

Wie in der Einleitung geschildert, wird eine Funktion von Interleukin (IL)-1 β in der Regulation der β -Defensin Antwort im Rahmen von Candida-Infektionen vermutet. Um eine mögliche Rolle von IL-1 β im Rahmen der *Candida*-Ösophagitis zu untersuchen, wurden zum einen die IL-1 β Expressionslevel untersucht und zum anderen die IL-1 β abhängige Signalkaskade mit einem IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1RA) blockiert und die Auswirkung auf die β -Defensin Expression analysiert.

Hierdurch konnten wir in der Costimulation (*C.albicans*/ PBMC) einen signifikanten Anstieg von IL-1 β nach 3-stündiger Inkubation nachweisen (Abb. 12). Die Mediumkontrolle zeigte 316.110 Kopien (SD 66466) und stieg nach 3 h *C.albicans*/ PBMC auf 1.354.303 Kopien an (SD 433.825). Bei längerer Inkubationszeit von 24 h sank die Zahl wieder auf 762.981 Kopien (SD 90.978) ab (Abb. 12). In parallelen Ansätzen inkubierten wir die OE21 Zellen mit dem IL-1RA (250 ng/ml) 1 h, bevor die Costitulationsversuche mit *C.albicans*/ PBMC durchgeführt wurden. Die Ergebnisse für die Mediumkontrolle mit 249.987 Kopien (SD 65.555) und die 3 h *C.albicans*/ PBMC Costimulation mit 1.477.473 Kopien zeigten vergleichbare Resultate wie bei den Versuchen ohne IL-1RA Verwendung.

Zudem findet man nach 24 h Costimulation mit IL-1RA eine Kopienzahl von 568.595 (SD 13.119), welches zur Vergleichsgruppe (24 h *C. albicans*/PBMC) einer Verringerung um den Faktor 1,34 entspricht (Abb. 12).

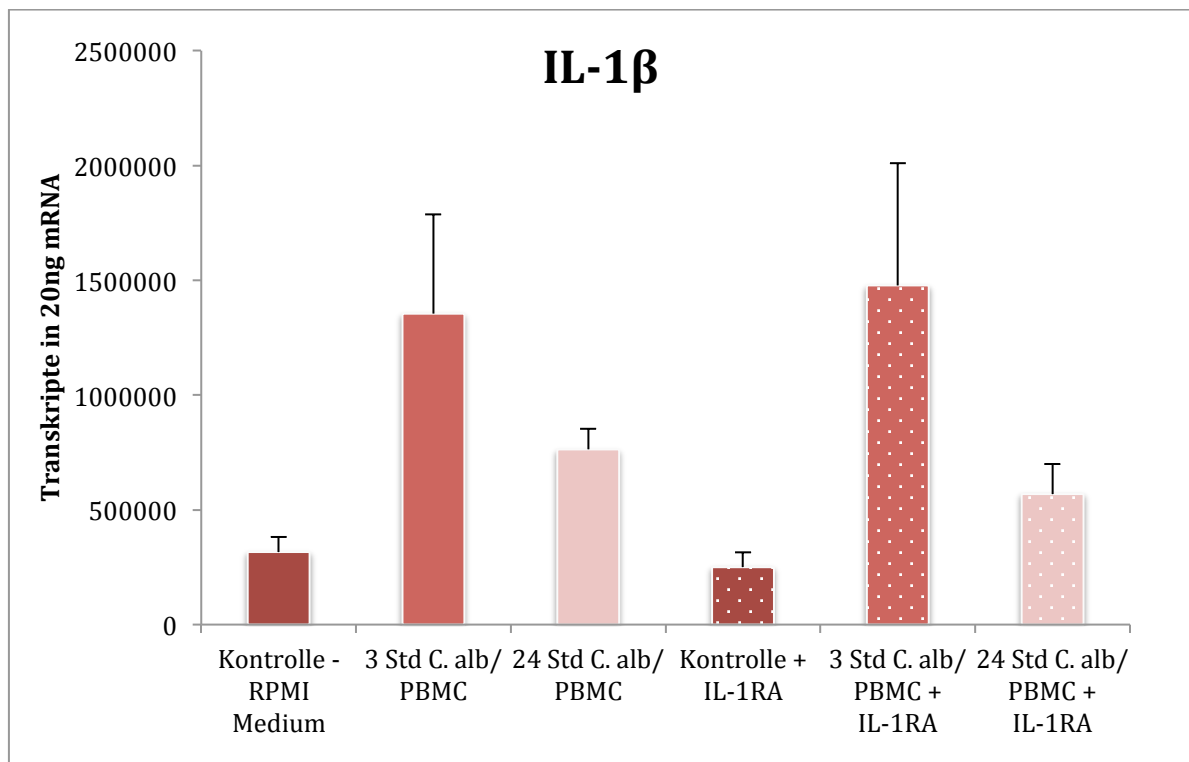


Abbildung 12: IL-1β Expression im Cokulturmodell

OE 21 Zellen wurden direkt mit $0,5 \times 10^6$ PBMC inkubiert und zusätzlich mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$) coinkubiert. Bei den IL-1RA Versuchen wurden die OE 21 Zellen 1h vor der Costimulation mit 250 ng/ml IL-1RA präinkubiert. Gezeigt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen in Doppelansätzen durchgeführten Versuchen.

3.1.2 Inhibition von IL-1β

Als nächstes wurden die Auswirkungen auf die Defensin-Genexpression unter Hemmung von IL-1β getestet. In den Abbildungen sind dabei die Veränderungen in Prozent gegenüber der auf 100 % gesetzten Induktion der hBD-Expression durch die Cokultur der OE21 Zellen mit *C. albicans*/ PBMC dargestellt.

Für hBD-2 zeigt sich unter Präinkubation mit dem IL-1RA ein starker Abfall der Genexpression um den Faktor 2,9 auf 35 % des Ausgangswertes (Abb. 13).

Die Genexpression von hBD-3 wird nicht signifikant von der Vorinkubation mit dem IL-1RA beeinflusst (Abb. 13).

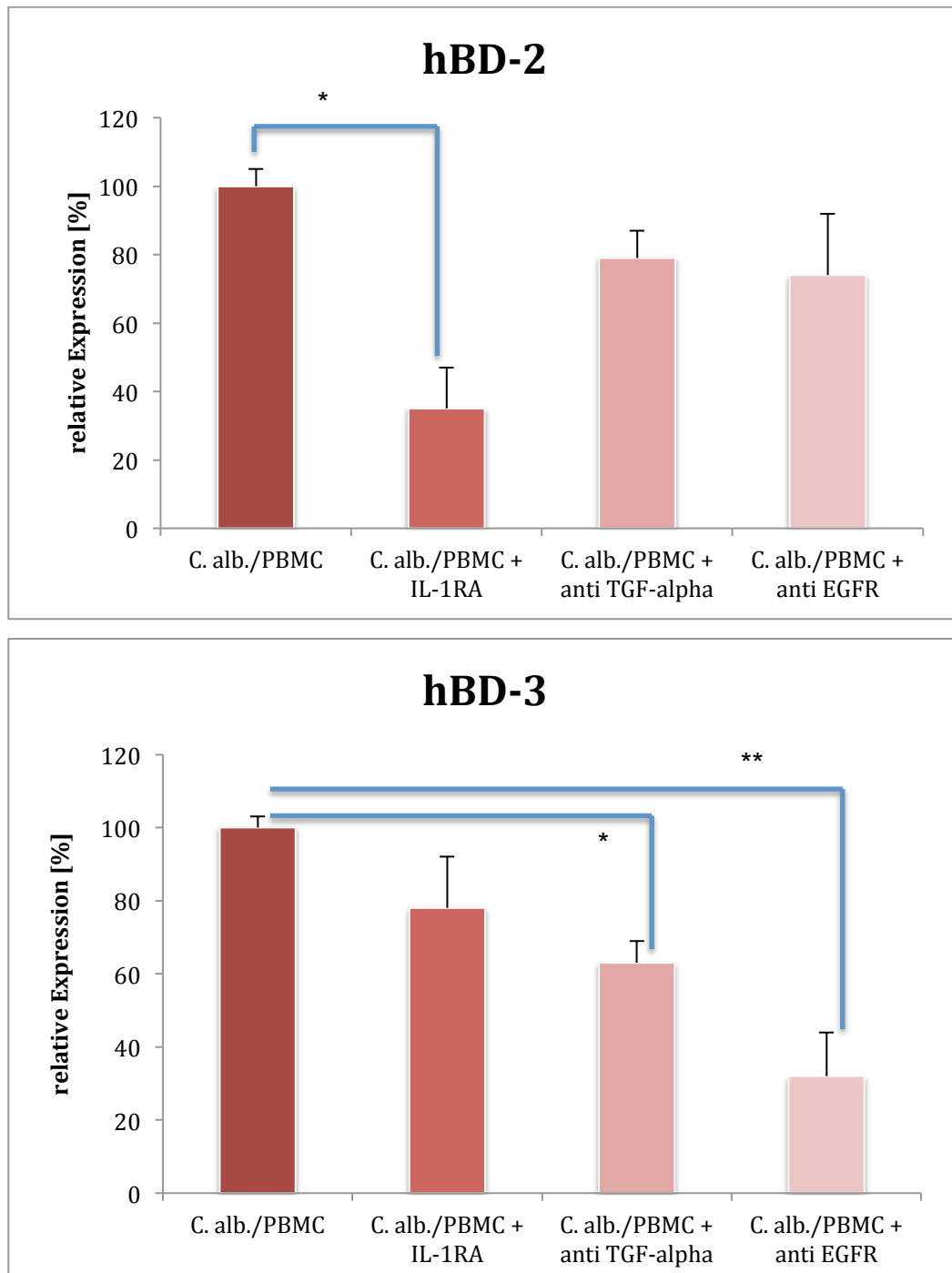


Abbildung 13: hBD-2 und -3 Expression unter Inhibition von IL-1 β , TGF- α oder EGFR

OE 21 Zellen wurden direkt inkubiert mit $0,5 \times 10^6$ PBMC und zusätzlich coinkubiert mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$). Eingesetzte Konzentrationen: EGFR-Antikörper ($10 \mu\text{g/ml}$), TGF- α Antikörper ($1 \mu\text{g/ml}$), und IL-1RA (250 ng/ml). Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen in Doppelsätzen durchgeführten Versuchen. * und ** $p < 0,05$.

3.1.3 Rolle des EGFR

Da einige Berichte eine wichtige Funktion des EGFR an der Regulation der Expression von antimikrobiellen Peptiden im Rahmen verschiedenster Infektionen nahelegten und in den OE21 Zellen durch externe Zugabe von EGF eine starke Induktion der β -Defensine erfolgte (Daten nicht gezeigt),

wurde mittels verschiedener blockierender Antikörper des EGFR und seiner Liganden die Beteiligung dieses Signalwegs an der Induktion der Defensin-Antwort durch *C. albicans* untersucht. Dargestellt sind hierbei nur die Daten für die Blockade des EGFR und von TGF- α . Die Hemmung anderer bekannter Liganden des EGFR hatte keinen signifikanten Effekt auf die Induktion von hBD-2 oder hBD-3 (Daten nicht gezeigt).

3.1.3.1 hBD-2

Für hBD-2 zeigt sich unter Präinkubation mit dem EGFR blockierenden oder TGF- α neutralisierenden Antikörper kein signifikanter Effekt auf die Expression dieses β -Defensins (Abb. 13).

3.1.3.2 hBD-3

Die blockierenden Antikörper gegen TGF- α oder EGFR waren im Gegensatz zu den IL-1RA in der Lage, die Induktion der hBD-3 Expression deutlich zu hemmen. Der anti-TGF- α Antikörper reduzierte die Expression um den Faktor 1,59 (27 %) und der anti-EGFR Antikörper um den Faktor 3,13 (68 %) (Abb. 13).

3.2 Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17

Wie in der Einleitung erläutert, wird das *Shedding* der Liganden des EGFR durch die Metalloproteinasen bewirkt. Nach dem Nachweis der Rolle von TGF- α und des EGF-Rezeptors für die Induktion der hBD-3 Expression im Rahmen der *Candida*-Ösophagitis, wurde im Folgenden die mögliche Beteiligung von ADAM10 und ADAM17 weiter untersucht.

3.2.1 Verteilung im Gastrointestinaltrakt

Bei der Verteilung der beiden Metalloproteinasen (Abb. 14) fiel eine höhere Expression (ca. Faktor 3) von ADAM10 in nahezu dem gesamten Gastrointestinaltrakt auf. Dieses Verhältnis kehrte sich im Ösophagus jedoch um und es lag eine verstärkte Expression von ADAM17 mit 12480 Kopien (SD 1594) zu ADAM10 mit 7179 Kopien (SD 521) vor. Im Magen war die Expression beider Metalloproteinasen niedrig.

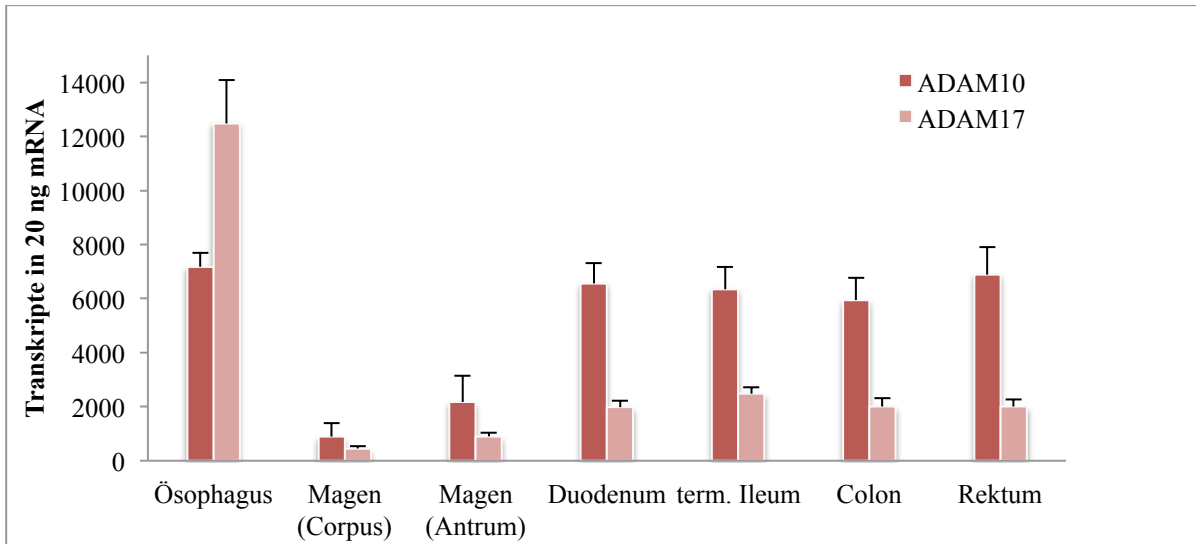


Abbildung 14: Expression von ADAM10 und ADAM17 im Gastrointestinaltrakt

Biopsien wurden mittels q-rt-PCR auf ADAM10 und ADAM17 ausgewertet. Gezeigt sind die Messergebnisse \pm SD von jeweils zehn gesunden Probanden.

3.2.2 Immunhistochemischer Nachweis

Immunhistochemische Analysen der ADAM-Expression und Lokalisation im Ösophagus wurden als Nächstes durchgeführt (Abb. 15). Die Kontrolle zeigte im mittleren Bereich die Basalzellen (verdichtete blaue Linie), die durch die Basalmembran das Epithel von der Lamina propria trennt.

Die Metalloproteinasen stellten sich immunhistochemisch in allen Schichten des Epithels dar (braune Färbung in der Epithelschicht Abb. 15). Bei ADAM17 ließ sich zudem eine leicht verstärkte Immunreaktivität im Stratum basale und intermedium zeigen. In der Lamina propria war keine immunhistologische Anreicherung feststellbar.

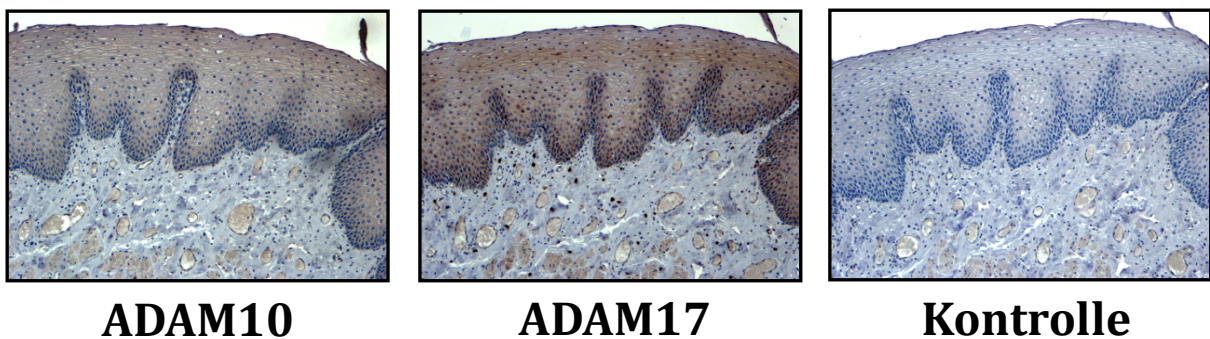


Abbildung 15: ADAM10 und ADAM17 Expression im Ösophagus

Primärer Antikörper Maus anti-ADAM17 Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden, Ger) und Hase anti-ADAM10 Antikörper (Millipore, Schwalbach, Ger). Sekundärer biotinylierte Antikörper (Dianova, Hamburg, Ger).

3.2.3 Auswirkung von Candida-Ösophagitis

Bei den Untersuchungen der Biopsien mit befallenen und unbefallenen Bereichen einer Candida-Ösophagitis (Abb. 16) konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Expression von ADAM10 als auch von ADAM17 in den von *C. albicans* befallenen Bereichen signifikant erhöht war.

Die Transkriptzahl lag für ADAM10 in unbefallenen Bereichen bei 3804 Kopien (SD 272) und in den befallenen Ösophagus bei 10547 Kopien (SD 1406). Bei ADAM17 konnte eine ebenfalls signifikante Steigerung von unbefallenen Bereichen mit 3709 Kopien zu befallenen Bereichen mit 13701 Kopien (SD 3948) nachgewiesen werden.

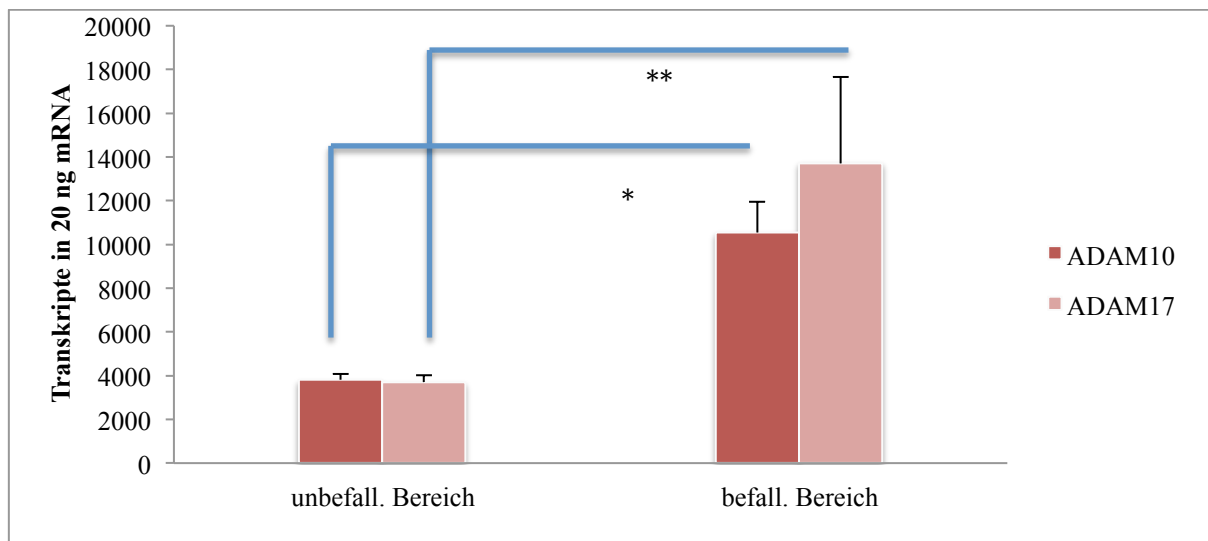


Abbildung 16: Expression von ADAM10 und ADAM17 während der Candida-Ösophagitis

Expressionsanalyse der ADAM-Metalloproteinasen in makroskopisch gesunden und befallenen Bereichen des Ösophagus (n=8). Mittelwert + SD aus jeweils acht Biopsien. * und ** entsprechen $p < 0.05$.

3.2.4 siRNA vermittelte Hemmung der ADAM-Expression

Mittels spezifischer siRNA wurde die Expression der jeweiligen ADAM-Untereinheit als nächstes gezielt herab reguliert. Wie in Abb. 17 gezeigt, konnten hierdurch effizient die Expressionslevel von ADAM10 von 50590 Kopien (SD 7451) auf 3340 Kopien und ADAM17 von 27091 Kopien (SD 2537) auf 2611 Kopien (SD 319) unter Anwendung der entsprechenden siRNA gesenkt werden. So wurde der Wert für ADAM10 um den Faktor 14 und der für ADAM17 um Faktor 10 reduziert. Als zweite Negativkontrolle diente uns eine *scrambled* siRNA. Diese führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Expression der jeweiligen ADAM-Metalloproteinase. Die Spezifität der jeweiligen siRNA konnte durch keine deutlichen Veränderungen der jeweils anderen ADAM-Proteinase nachgewiesen werden (Abb. 17).

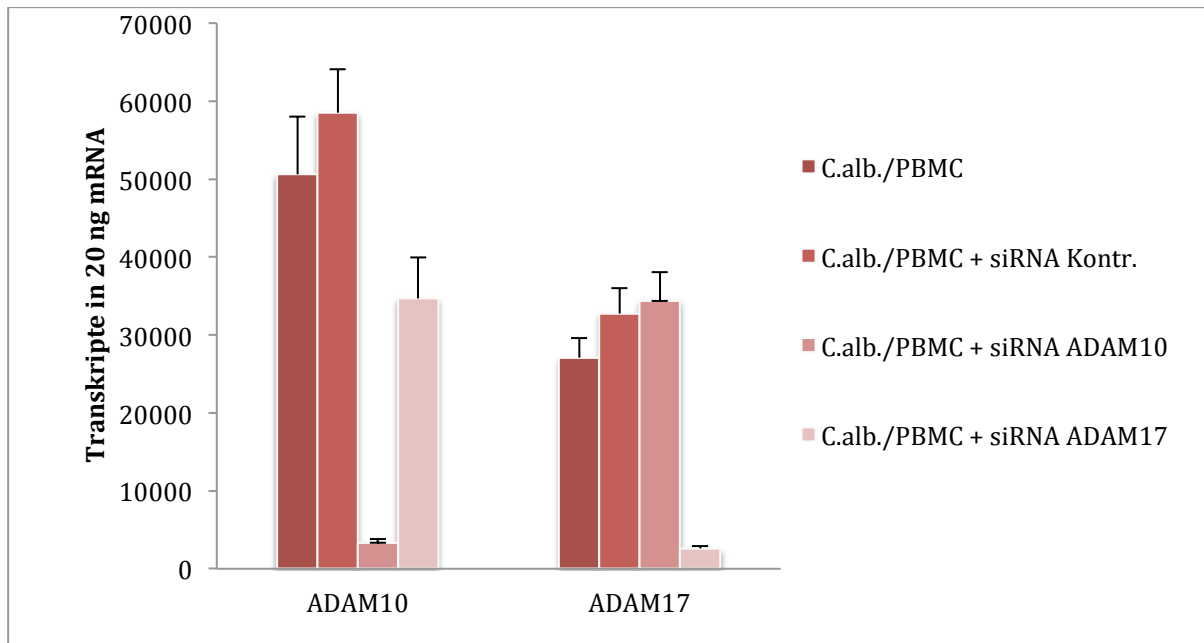


Abbildung 17: Wirkung der siRNA auf die ADAM-Expression

OE 21 Zellen wurden mit $0,5 \times 10^6$ PBMC direkt inkubiert und zusätzlich mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$) coinkubiert. Die Zellen wurden 48 h nach der Aussaat mit der jeweiligen siRNA transfiziert und für weitere 48 h inkubiert. Danach erfolgte für 24 h die Stimulation mit den *C. albicans*/ PBMC und anschließender Isolierung der RNA. Mittelwerte + SD von 5 unabhängigen Experimenten.

Ein *Off-Target-Effekt* der siRNAs wurde durch eine Analyse der Expression der 2',5'-Oligoadenylatsynthase (OAS) untersucht. Diese zeigte bei beiden siRNA's eine vergleichbar schwache Expression im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 18), was eine unspezifische Typ-I Interferonantwort der Zellen und damit eine unspezifische siRNA-Wirkung ausschließt.

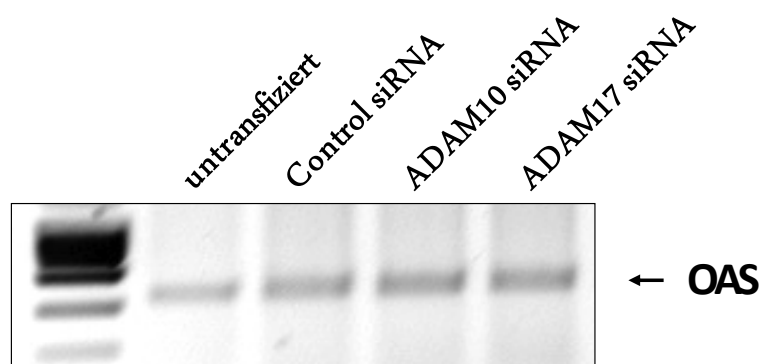


Abbildung 18: Ausschluss einer unspezifischen Typ I Interferonantwort der Zellen

RT-PCR von 2',5'-Oligoadenylatsynthase (OAS) beim Costimulationsmodell nach 3 h. Repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten.

3.3 ADAM17 reguliert die hBD-3 Expression

Im folgenden Abschnitt wurde die Rolle der Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 auf die Expression der humanen Defensine hBD-2 und hBD-3 mittels siRNA (Abb. 17) oder mittels pharmakologischer Inhibitoren untersucht.

3.3.1 Einfluss der ADAM-Inhibition auf die hBD-2 Expression

Die Abb. 19 zeigt die Auswirkungen der siRNA-Transfektion auf die hBD-2-Expression. Der Wert für die mit *C. albicans*/PBMC inkubierten OE21 Zellen betrug 868 Kopien (SD 200). Durch die Transfektion mit siRNA kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg der Expression von hBD-2. Sie beliefen sich bei der Transfektionskontrolle (*scrambled* RNA) auf 1010 Kopien (SD 324), bei der ADAM10-siRNA auf 1257 Kopien (SD 241) sowie bei der siRNA gegen ADAM17 auf 1035 Kopien (SD 168).

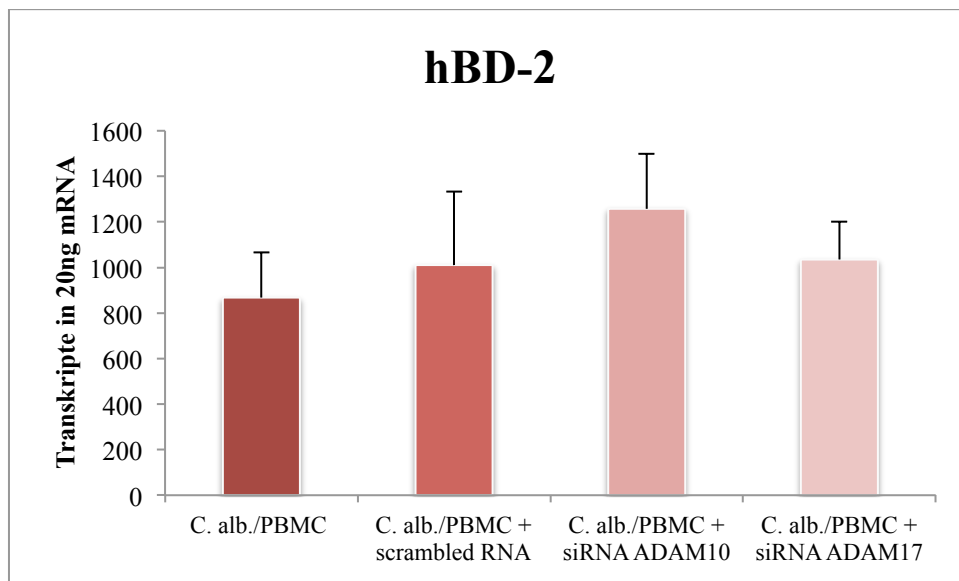


Abbildung 19: Einfluss der ADAM10- oder ADAM17-siRNA auf die hBD-2 Expression

OE 21 Zellen wurden direkt mit $0,5 \times 10^6$ PBMC inkubiert und zusätzlich mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$) coinkubiert und mit siRNA gegen ADAM10 bzw. ADAM17 transfiziert. Mittelwerte + SD von 10 unabhängigen Experimenten.

Bei den Versuchen mit den Inhibitoren (Abb. 20) fiel hingegen ein leichter Abfall der hBD-2 Expression auf, welcher bei allen Inhibitoren ähnlich groß ausfiel, aber nicht signifikant war. Die Kontrolle lag hier bei 511 Kopien (SD 155) gegenüber den um circa Faktor 1,4 verringerten Werten sowohl für den ADAM10 Inhibitor GI254023X mit 375 Kopien (SD 102) als auch für den ADAM17 Inhibitor GW280264X mit 372 Kopien (SD 63) und den unspezifischen Metalloproteinaseninhibitor GM 6001 mit 355 Kopien (SD 52).

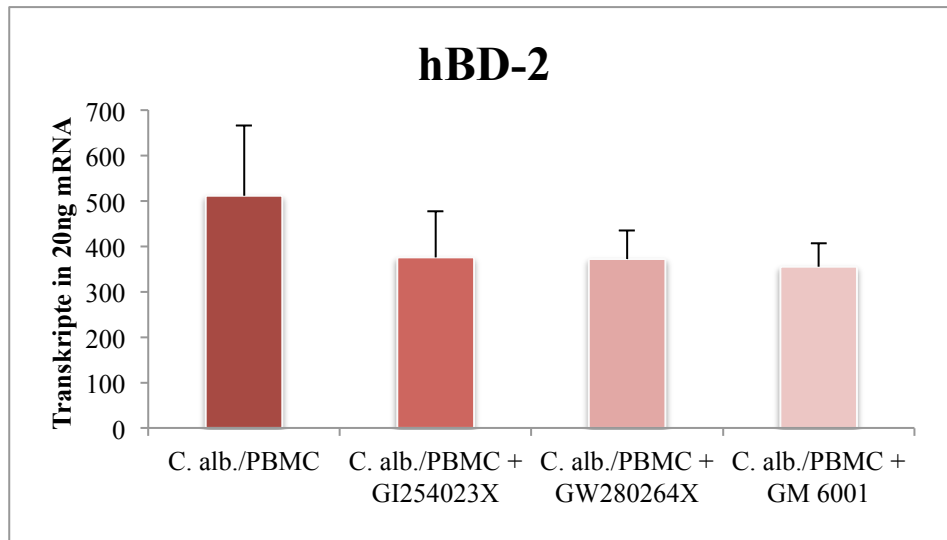


Abbildung 20: hBD-2 Expression unter pharmakologischer ADAM-Inhibition

OE 21 Zellen wurden direkt mit $0,5 \times 10^6$ PBMC inkubiert und zusätzlich mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$) coinkubiert und mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt. Der Inhibitor GI254023X hemmt ADAM10, GW280264X hemmt ADAM17 und GM6001 hemmt unspezifisch Metalloproteinasen. Mittelwerte + SD von 6 unabhängigen Experimenten.

3.3.2 Einfluss der ADAM-Inhibition auf die hBD-3 Expression

Unter der Transfektion mit der Kontroll siRNA lag die hBD-3 Expression bei 5561 Kopien (SD 729). Die ADAM10 siRNA hatte keinen supprimierenden Effekt auf hBD-3, dessen Expressionslevel bei 6499 Kopien (SD 819) lag (Abb. 21).

Eine signifikante Verringerung der Messwerte stellte man bei der Transfektion mit der ADAM17 siRNA mit 3069 Kopien (SD 482; $p = 0,018$) fest. Dieses entspricht einer Verringerung von nahezu 50 % gegenüber der Referenzgruppe.

Wie in Abb. 22 gezeigt, konnte dieser Effekt der ADAM17 Hemmung auch durch pharmakologische Inhibitoren nachvollzogen werden. Die mit *C. albicans*/ PBMC coinkubierten OE21 Zellen weisen 6231 Kopien (SD 593) auf. Der ADAM10 Inhibitor GI254023X zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die mit 6291 Kopien (SD1027) nahezu unveränderte hBD-3 Expression.

Im Gegensatz hierzu reduzierte der ADAM17 Inhibitor GW280264X die hBD-3 Expressionslevel auf 4359 Kopien (SD 454; $p = 0,022$). Damit beträgt die Reduzierung der hBD-3 Genexpression beim ADAM17 Inhibitor 30 %.

Der unspezifische Metalloproteinase Inhibitor GM6001 konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der hBD-3 Expression um 60 % auf 2493 Kopien (SD 219; $p = 0,000039$) bewirken.

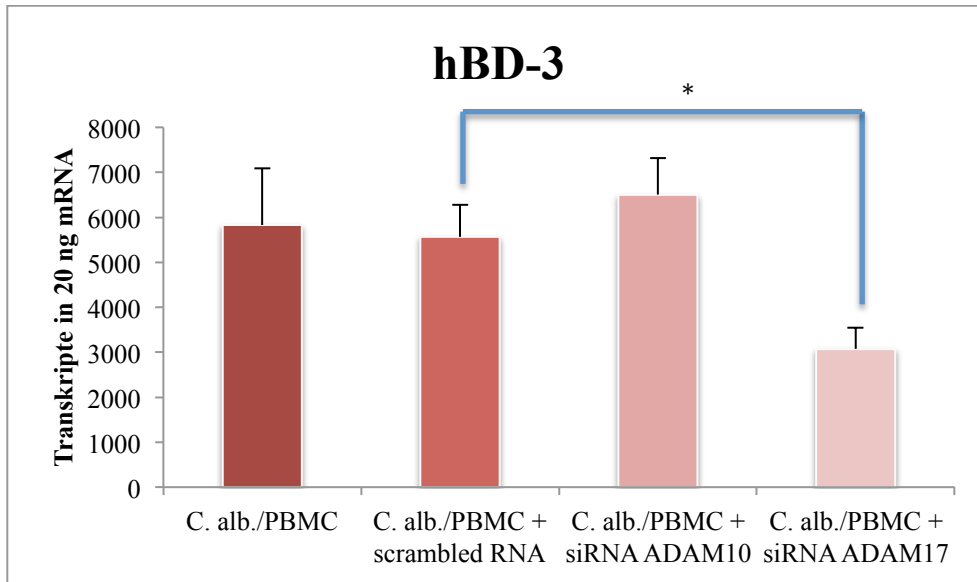


Abbildung 21: Einfluss der ADAM10- oder ADAM17-siRNA auf die hBD-3 Expression

OE 21 Zellen wurden direkt mit $0,5 \times 10^6$ PBMC inkubiert und zusätzlich mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$) coinkubiert und mit siRNA gegen ADAM10 bzw. ADAM17 transfiziert. Mittelwerte + SD von 10 unabhängigen Experimenten. * entsprechen $p < 0.05$.

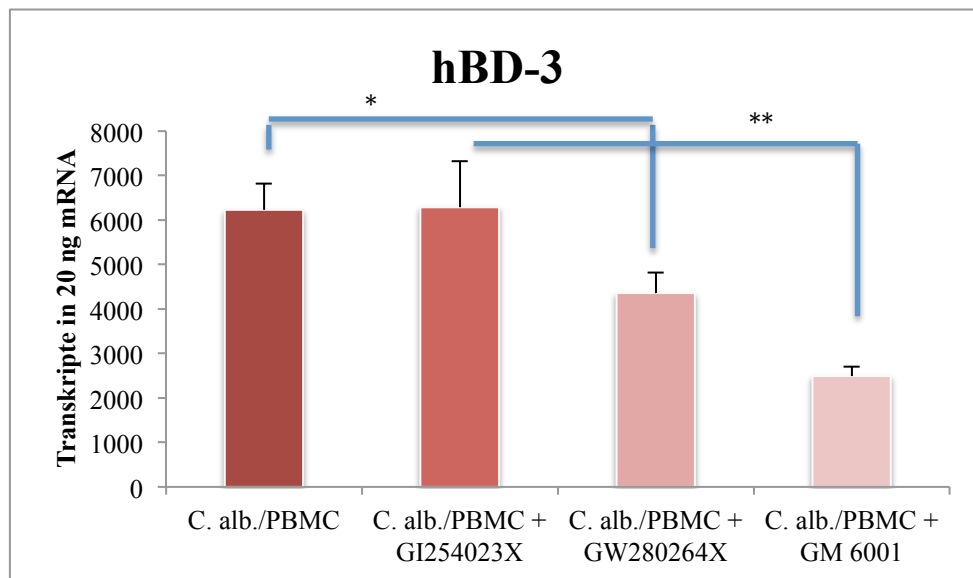


Abbildung 22: hBD-3 Expression unter pharmakologischer ADAM Inhibition

OE 21 Zellen wurden direkt mit $0,5 \times 10^6$ PBMC inkubiert und zusätzlich mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$) coinkubiert und mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt. Der Inhibitor GI254023X hat als Ziel ADAM10, GW280264X das Ziel ADAM17 und GM6001 hemmt unspezifisch Metalloproteinasen. Mittelwerte + SD von 6 unabhängigen Experimenten. * und ** entsprechen $p < 0.05$.

3.4 Einfluss der ADAM-Inhibition auf NFκB und AP-1

In den vorherigen Arbeiten konnten wir zeigen, dass NFκB vor allem für die Induktion der hBD-2 und AP-1 für die hBD-3 Expression im Rahmen der *Candida-Ösophagitis* wichtig sind (Steubesand et al. 2009). Nachdem ADAM17 eine wichtige Funktion in der hBD-3 Expressionsregulation innezuhaben schien (siehe vorheriger Abschnitt) wurde mittels EMSA untersucht, ob die Inhibition einer der beiden Metalloproteinasen ADAM10 oder ADAM17 mit einer Aktivitätsänderung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 einhergeht.

OE21 wurden hierzu initial in dem etablierten Cokulturmodell mit *C. albicans*/PBMC kultiviert und anschließend wurden EMSA an Kernextrakten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurden, für NFκB als auch AP-1 durchgeführt (Abb. 23). Sowohl NFκB als auch AP-1 wurden transient mit einem Maximum nach 3 h Koinkubation mit *C. albicans*/PBMC in OE21 Zellen induziert.

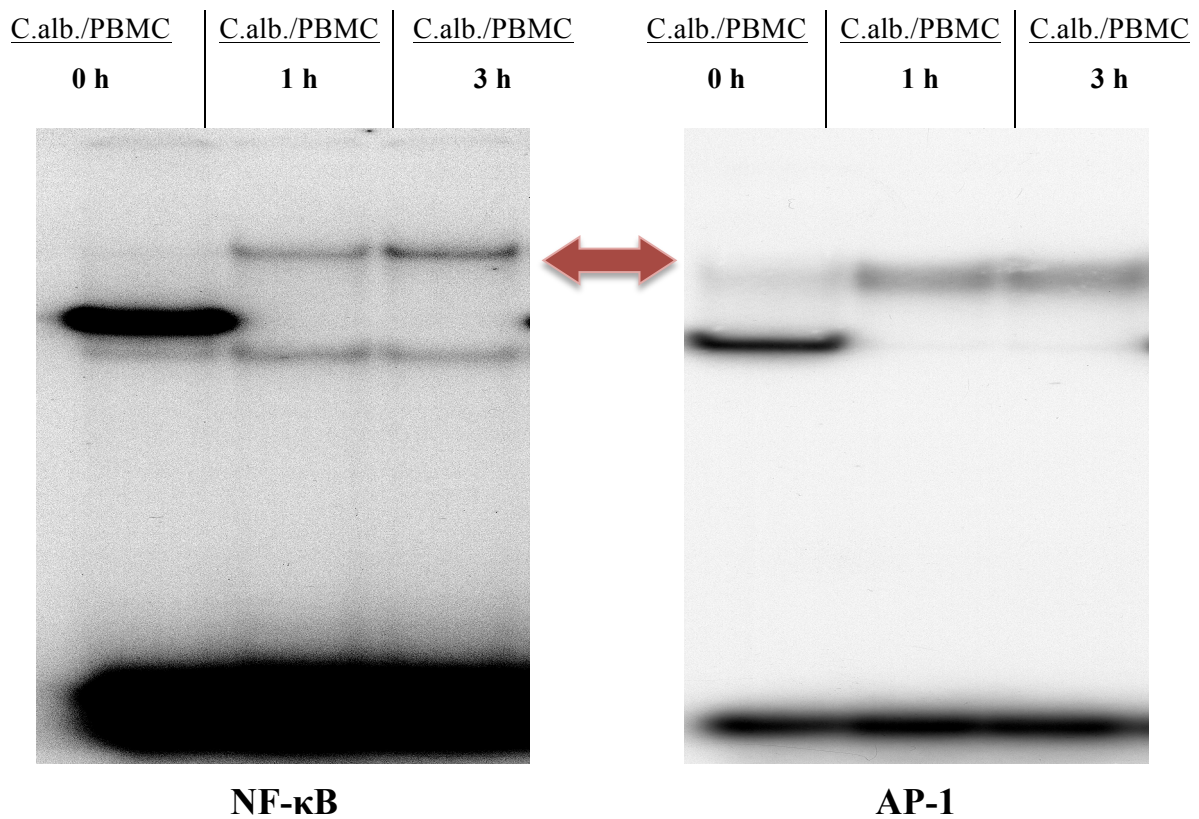


Abbildung 23: NF-κB und AP-1 Aktivität in PBMC/*C. albicans* coinkubierten OE21 Zellen

OE21 Zellen wurden direkt mit $0,5 \times 10^6$ PBMC inkubiert und zusätzlich mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$) coinkubiert. Es wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 3 h) Kernextrakte gewonnen und EMSA mit einer Sonde für NFκB oder AP-1 durchgeführt. Laufrichtung sowie Beschreibung von oben nach unten: spezifische Bande (Doppelpfeil), unspezifische Bande und freie Probe. Repräsentative Ergebnisse von 5 unabhängigen Experimenten.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Inhibition einer der beiden Metalloproteinasen ADAM10 oder ADAM17 Einfluss auf die Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren NFκB oder AP-1 hat. Die OE21 Zellen wurden analog zu den oben gezeigten ADAM-Inhibitionsversuchen behandelt. Wie im oberen Abschnitt der Abb. 24 gezeigt, hatte weder die pharmakologische noch die siRNA vermittelte ADAM-Inhibition einen Einfluss auf die durch PBMC/*C. albicans* in OE21 Zellen induzierte NFκB Aktivität. Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung der OE21 Zellen mit der ADAM17 siRNA (Abb. 24, unten) oder dem ADAM17 Inhibitor GW280264X (Abb. 24, unten) zu einer deutlichen Abschwächung der durch PBMC/*C. albicans* induzierten AP-1 Bindungsaktivität.

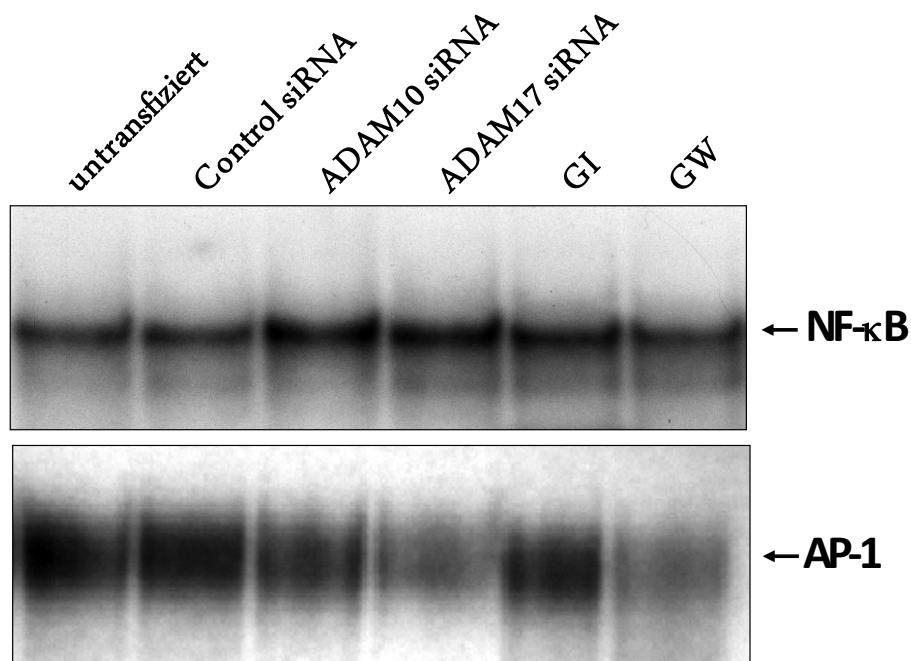


Abbildung 24: Auswirkung der ADAM-Inhibition auf NF-κB und AP-1

OE21 Zellen wurden direkt mit $0,5 \times 10^6$ PBMC inkubiert und zusätzlich mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans* Zellen per Transwell-Einsätzen (Porendichte $0,4 \mu\text{m}$) coinkubiert und entweder mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt oder der angegebene siRNA transfiziert. GI=GI254023X und GW=GW280264X. Nach 3 h Coinkubation erfolgte die Gewinnung der Kernextrakte. Der EMSA mit einer Sonde für NFκB oder AP-1 wurde darauf durchgeführt. Repräsentative Ergebnisse von 5 unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

Das Verständnis über die Grundlagen unseres Immunsystems ist bei der zunehmenden Zahl schwer verlaufender Infektionskrankheiten, die immer schlechter auf die geläufigen Antibiotika ansprechen, von elementarer Bedeutung. Gerade durch die Entdeckung der antimikrobiellen Peptide können neue Ansatzpunkte in der Bekämpfung von Mikroorganismen durch das weitere Entschlüsseln der Mechanismen zur Infektionsabwehr ergründet werden. Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage nach dem molekularen Mechanismus hinter der Induktion der Defensin-Expression in einem von der Arbeitsgruppe etablierten *in vitro* Modellsystem der *Candida*-Ösophagitis.

In diesem Modell und *in vivo* durch *Candida*-Ösophagitis Patienten, konnte eine deutlich erhöhte Expression der β -Defensine hBD-2 und hBD-3 nachgewiesen werden (Kiehne et al. 2005, Steubesand et al. 2009).

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, die Signalwege zu charakterisieren, die zur Induktion der hBD-2 und hBD-3 Expression führten. Hierdurch konnten Rückschlüsse auf die Mechanismen der epithelialen Abwehr im Rahmen der *Candida*-Ösophagitis erhalten werden. Es gelang im Rahmen der vorgelegten Arbeit nachzuweisen, dass IL-1 β hauptsächlich die hBD-2 Expression durch NF κ B im Rahmen der *Candida*-Ösophagitis reguliert. Die hBD-3 Expression wird in diesem Kontext durch einen ADAM17-TGF- α -EGFR-MAPK/AP-1 Signalweg induziert (Abb. 25).

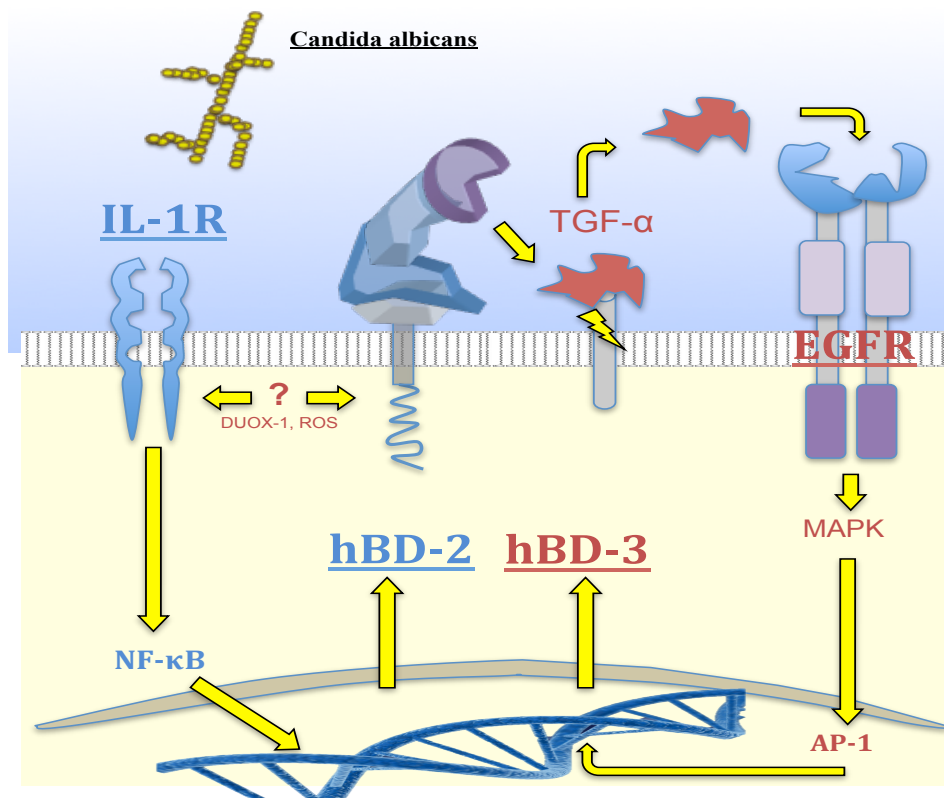


Abbildung 25: Schema der hBD-Expressionsregulation

Signalwege der induzierbaren β -Defensine: IL-1 β \rightarrow IL-1R \rightarrow NF κ B \rightarrow hBD-2 sowie einen weiteren Signalweg für ADAM17 \rightarrow TGF- α \rightarrow EGFR \rightarrow MAPK \rightarrow AP-1 \rightarrow hBD-3.

4.1 Regulation der hBD-2 Expression

Die Expression von hBD-2 wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch *C. albicans* NF κ B abhängig induziert. Es besteht eine Kontroverse zur Relevanz der NF- κ B und AP-1 Bindungsstellen des hBD-2 Promoters für die Antwort auf eine IL-1 β Behandlung oder auch Infektionen. Wehkamp konnte zeigen, dass eine parallele Aktivierung von NF- κ B und AP-1 für eine maximale Induktion der hBD-2 Expression in Keratinozyten nach Behandlung mit Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (Wehkamp et al. 2006) benötigt wird. Ebenso sind beide Transkriptionsfaktoren an der durch *E. coli* bewirkten Aktivierung des hBD-2 Promoters beteiligt (Wehkamp et al. 2004). Andere Studien zeigten eine NF κ B unabhängige Induktion von hBD-2 durch *Fusobacterium nucleatum* in der menschlichen Schleimhaut. *Salmonella enteritidis* (Ogushi et al. 2001) oder *H. pylori* (Wada et al. 2001) können AP-1 unabhängig die hBD-2 Expression regulieren. In den Vorarbeiten (Steubesand et al. 2009) und in dieser Arbeit selbst konnten wir zeigen, dass sowohl NF- κ B als auch AP-1 durch Überstände von *C. albicans* oder in den Kokulturanätzen aktiviert werden. Dabei werden beide Signalwege für die maximale Induktion der hBD-2 Antwort benötigt. Wie in den Ergebnissen und anderen Studien gezeigt, wird IL-1 β eine wichtige Rolle in der Regulation der hBD-2 Antwort während der Infektion von Epithelien zugesprochen. Eine auto- und parakrine Wirkung von IL-1 β scheinen zentral an der Immunantwort gegen eine *Candida*-Infektion beteiligt zu sein (Gross et al. 2009, Hise et al. 2009).

Das in der Arbeit verwendete Kokulturmodell führte zu einem deutlichen Anstieg der IL-1 β Expression in den OE21 Zellen. Weiterhin gelang es durch Rezeptorantagonisten des IL-1R den von *C. albicans*/ PBMCs vermittelten Anstieg der hBD-2 Expression zu hemmen. Diese Beobachtungen entsprechen jüngsten Berichten, dass die durch *C. albicans* bewirkte IL-1 β Zellantwort komplex kontrolliert wird und sowohl eine transkriptionelle Induktion der pre-IL-1 β Expression als auch eine Aktivität des NLRP3 Inflammosoms (Gross et al. 2009, Hise et al. 2009) benötigen. Im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgte eine Fokussierung auf die Regulation der hBD-3 Antwort durch ADAM17/ AP-1. Daher bleibt es spekulativ, ob *C. albicans*/ PBMCs über TLR2 und/oder Dectin-1 (Ferwerda et al. 2008, Gross et al. 2009, Hise et al. 2009, Netea et al. 2002) die IL-1 β Antwort in diesem Zellsystem ansprechen. Zahlreiche Berichte konnten nachweisen, dass die Bildung und Aktivierung des NLRP3 Inflammosoms für eine Produktion von ROS in der Zelle verantwortlich gemacht werden kann (Abdul-Sater et al. 2009, Gross et al. 2009, Schroder et al.). Da eine vermehrte Produktion von ROS im Ösophagus im Rahmen einer Infektion bekannt ist (Olyae et al. 1995) und *C. albicans* durch ROS eine IL-1 β Sekretion in anderen Modellen vermittelt (Gross et al. 2009), liegt eine solche Beteiligung auch hier nahe. Es ist bekannt, dass PBMCs in epithelialen Zellen zu einer vermehrten ROS Bildung führen (Hornbach et al. 2009, Kennedy et al. 2007, Soehnlein et al. 2008), wodurch eine anti-fungale Wirkung durch PBMCs zum Teil erklärt wird (Hornbach et al. 2009, Kennedy et al. 2007). Gerade die in dem hier verwendeten Modellsystem beobachtete Synergie zwischen den PBMCs und Epithelzellen

in Bezug auf die β -Defensin Antwort bestärkt die Vermutung, dass ROS eine wichtige Rolle für die hBD-Induktion spielt (Abb. 25).

4.2 Regulation der hBD-3 Expression

Wie bereits unter 4.1 ausgeführt, ist die Rolle für NF κ B in der Regulation der hBD-2 Antwort relativ gut (auch für andere Infektionen) belegt. Im Gegensatz hierzu ist die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Kontrolle der hBD-3 Expression unklar bzw. kontrovers (Albanesi et al. 2007, Chung et al. 2004, Funderburg et al. 2007). Durch Verwendung von siRNA gegen die RelA/p65 Untereinheit von NF κ B gelang es uns zu zeigen, dass in dem in dieser Arbeit untersuchten Kontext der *C. albicans* Infektion des Ösophagus NF κ B keinen Anteil an der Regulation der hBD-3 Expression hat. Vielmehr konnte nachgewiesen werden, dass hBD-3 durch einen MAPK/AP-1 Signalweg vermehrt in den Epithelzellen gebildet wird. In ähnlicher Weise wie für hBD-2 und NF κ B konnten wir dabei zeigen, dass PBMCs die Antwort der Epithelzellen auf die *C. albicans* Infektion (Cunliffe 2003, Kiehne et al. 2005, Steubesand et al. 2009) durch eine stärkere Aktivierung von AP-1 intensiviert. Die schon in den Vorarbeiten beobachtete stärkere Induktion der hBD-3 Expression (Steubesand et al. 2009) kann im Einklang mit der Theorie gesehen werden, dass hBD-3 eine stärkere fungizide Wirkung als hBD-2 hat (Joly et al. 2004, Vylkova et al. 2006, Vylkova et al. 2007).

Viele infektiöse Stimuli bewirken über den EGFR eine vermittelte Immunantwort (Boots et al. 2009, Boughan et al. 2006, Burgel et al. 2008, Koff et al. 2008). Dieses haben wir durch antikörpervermittelte Hemmung des EGFR und seiner Liganden weiter zu ergründen versucht. Hierdurch gelang es uns nachzuweisen, dass zwar der EGF-Rezeptor, aber nicht EGF als der Ligand, entscheidend für die *Candida*-vermittelte hBD-3 Induktion ist. Vielmehr konnte der Nachweis erbracht werden, dass TGF- α über eine Aktivierung des EGFR einen MAPK/AP-1 Signalweg aktiviert. An dessen Ende steht die Heraufregulation der hBD-3 Expression.

TGF- α , wie die meisten der EGFR Liganden, wird als ein transmembranes Vorläufermolekül gebildet. Die *Sheddases*, die seine Aktivierung durch eine Abspaltung der Ektodomäne bewirken, sind die Mitglieder der ADAM Familie von Membran-Glykoproteinen ADAM10, -12 und -17. Die Rolle dieser Regulatoren des TGF- α -EGFR-Weges in Erkrankungen, und vor allem bei Infektionen, war weitestgehend unbekannt (Boots et al. 2009, Koff et al. 2008, Paulissen et al. 2009). Durch pharmakologische und siRNA vermittelte Hemmung von ADAM10 und ADAM17 konnten wir zeigen, dass ADAM17 die Hauptsheddase im Kontext der Immunantwort auf eine *Candida*-Infektion des Ösophagus ist. Unsere Daten sind dabei für Epithelzellen des Tracheobronchialsystems von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls nachgewiesen worden (Brill et al. 2009, Myers et al. 2009). Wie bereits für die IL-1 β vermittelte hBD-2 Regulation diskutiert, könnten ROS auch eine zentrale Rolle für die ADAM17 Aktivierung spielen. Es ist bekannt, dass ROS durch einen bisher unklaren Mechanismus ADAM17 aktivieren können. Eine kürzlich erschienene Arbeit (Koff et al. 2008)

beschrieb einen Duox1-ROS-ADAM17-TGF α -EGFR Signalweg für die Induktion der IL-8 Produktion im Rahmen einer Infektion des Bronchialsystems .

Aus den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen lässt sich damit die Schlussfolgerung ziehen, dass *C. albicans* zusammen mit PBMCs verschiedene Signalwege aktiviert. Hierdurch wird eine maximale hBD-2 und hBD-3 Antwort in der Epithelzelle hervorzurufen (Abb. 25). Dabei vermittelt ein ADAM17-TGF α -EGFR-MAPK-AP-1 Weg die Induktion von hBD-3 und ein IL-1 β -NF κ B Weg die Expressionskontrolle von hBD-2.

4.3 Ausblick

Die Bekämpfung von bakteriellen und fungalen Infektionen wird weiter einer der zentralen Punkte der Medizin im 21sten Jahrhundert bleiben. Beunruhigend erscheint die Tatsache, dass die Entwicklung neuer wirksamer Antibiotika stark rückläufig ist und es vermehrt zu Resistenzen kommt. Die üblichen vorherrschendem Angriffspunkte wie Zellwandsynthese, ribosomale Proteinsynthese, DNA-Replikation, Folsäuresynthese werden daher an ihre Grenzen stoßen (Holzgrabe 2009). Die Ergründung des genauen Signalwegs der Defesine könnte dazu beitragen, neue Angriffspunkte für Medikamente zu finden, um die Produktion endogener Antibiotika zu steigern und so eine prophylaktische Behandlung für Risikopatienten zu schaffen. Damit könnte das Aufkommen schwerwiegender Infektionen und der hieraus resultierenden intensivmedizinischen Behandlungen gesenkt werden.

Den EGFR-Inhibitoren wie Cetuximab, Erlotinib, Panitumumab und Gefitinib kommt in der onkologischen Therapie ein wachsender Stellenwert zu. Diese kommen in der Behandlung fortgeschrittener, metastasierter und rezidivierender Karzinome wie kolorektaler Karzinome, nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome, der Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses und des Pankreaskarzinoms vor (Wollenberg et al. 2010). Die z.T. stark ausgeprägten Nebenwirkungen, wie akneiforme Exantheme (30 % bis 90 % der Patienten) mit daraus resultierenden Superinfektionen durch Bakterien und Pilze, können bis zum Abbruch der Therapie führen (Wollenberg et al. 2010). Vor allem in der Kombination mit der Strahlentherapie ergeben sich ausgeprägte orale Schleimhautschäden während der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren. Dabei kommt es aus klinischer Erfahrung zu gehäuftem Befall von *Candida albicans* in der Mundhöhle. Im weiteren Verlauf kann es zu seborrheischen Hautveränderungen, Paronychien (Entzündung des Nagelwalls) und Haarveränderungen kommen.

Zu einer mikrobiellen Besiedlung gibt es bislang nur unzureichende Untersuchungen. Eine aktuelle Studie beschäftigt sich mit der Mikroflora der Paronychien von 42 Cetuximab-Patienten (Eames et al. 2010), wobei gram-positve Erreger den Hauptanteil ausmachen und *C. albicans* mit 5 % vertreten ist. Entscheidend wäre die Investition in weitere Untersuchungen, welche aufzeigen, ob neue

therapeutische EGFR-Inhibitoren eine Reduktion der Defensinproduktion bewirken und daraus vermehrte Superinfektionen begründen könnten. Eine prospektive Longitudinalstudie von Mundschleimhautproben der Cetuximab-Patienten, vor und während der Therapie, könnte Aufschluss über eine Veränderung der mikrobiellen Besiedlung geben. Diese könnten in einem parallelen Schritt mit Schleimhaut-Biopsien für die Defensin-Expression korreliert werden.

Das weitere Verständnis der Defensin-Signalwege könnte hierfür Möglichkeiten geben, um Nebenwirkungen der Tumorthherapie besser beherrschbar zu machen und dadurch die Abbruchrate der Therapie zu verringern.

5 Zusammenfassung

Der Gastrointestinaltrakt ist mit einer großen Anzahl von Mikroorganismen besiedelt. Unter normalen Bedingungen verhindern epitheliale Abwehrmechanismen eine Infektion durch diese Erreger. Prädisponierende Bedingungen können die Balance zwischen epithelialen Abwehrmechanismen und der Pathogenität der luminalen Mikroorganismen entscheidend verändern. Dies kann lebensbedrohliche Infektionen mit diesen ansonsten ungefährlichen Keimen zur Folge haben. Antimikrobielle Peptide sind wichtige Bestandteile der epithelialen Abwehrmechanismen.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Rolle gastrointestinaler Abwehrmechanismen und hier vor allem die der antimikrobiellen Peptide bei der *Candida*-Ösophagitis untersucht werden.

Die *Candida*-Ösophagitis repräsentiert eine ernste Bedrohung für einen immunkompromittierten Patienten. Der Verlauf der Infektion ist sowohl durch die Pathogenität des Pilzes als auch durch die Funktionalität der epithelialen Abwehr des Patienten geprägt. Human β -defensine stellen eine zentrale Komponente der mukosalen angeborenen Abwehr dar. Es gelang uns zu zeigen, dass hBD-2 und hBD-3 durch eine Interaktion epithelialer Zellen mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes im Rahmen der *Candida*-Ösophagitis vermehrt exprimiert werden. Hierbei sind divergente Signalwege, die NF κ B oder AP-1 abhängig sind, von entscheidender Bedeutung. Ziel der Arbeit war die Aufklärung der Mechanismen, die zur Induktion von hBD-2 und hBD-3 als Antwort auf eine Infektion des Ösophagus mit *C. albicans* führen.

Um die Mechanismen weiter aufzuklären, welche die hBD-2 und hBD-3 Expression während einer *Candida*-Ösophagitis regulieren, wurde das etablierte Ko-Kultur System (Ösophaguskarzinomzelllinie OE21 und PBMC) sowie Biopsien aus infizierten und gesunden Speiseröhren genutzt.

Blockierende Antikörper zeigten, dass IL-1 β eine Aktivierung von NF- κ B und nachfolgend die Expression von hBD-2 bewirkt. Unabhängig von diesem Mechanismus stellt die Aktivierung des EGFR durch endogenes TGF- α einen entscheidenden Schritt in der Induktion der hBD-3 Expression durch *C. albicans* dar.

Mittels siRNA vermitteltem *knock-down* und spezifischen Inhibitoren galt es zu klären, dass ADAM17 essentiell für diesen TGF/EGFR/AP-1/hBD-3 Signalweg ist. So war durch *Electrophoretic*

Mobility Shift Assays und Western-Blot-Analysen nachweisbar, dass eine Interferenz mit ADAM17 die MAPK/AP-1 Aktivierung, aber nicht den NF- κ B Signalweg hemmt. Real-time PCR-Analysen belegten, dass eine Hemmung von ADAM17 zu einer Reduktion der durch *C. albicans* induzierten hBD-3 Expression führt.

Die Analyse von Biopsien aus gesunden und infizierten *Candida*-Ösophagitis Patienten bestätigte die Involvierung von ADAM17, dessen Expression im Rahmen der *Candida*-Ösophagitis deutlich erhöht ist.

Signaltransduktionswege in einem *in vitro* Modell der *Candida*-Ösophagitis und Biopsien aus Patienten erbrachten den Nachweis von zwei divergenten Signalwegen, die zum einen durch IL-1 β /NF- κ B die hBD-2 Expression und zum anderen durch einen ADAM17/TGF- α /MAPK/AP-1 Weg die hBD-3 Expression kontrollieren.

6 Literaturverzeichnis

Abdul-Sater AA, Said-Sadier N, Ojcius DM, Yilmaz O, Kelly KA (2009). Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. *Drugs Today (Barc)* **45 Suppl B**: 105-112.

Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A (2004). The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **172**: 6362-6372.

Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D, Kaku T (2007). Role of beta-defensins in oral epithelial health and disease. *Medical molecular morphology* **40**: 179-184.

Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, Scarponi C, De Pita O, Leung DY, Howell MD (2007). IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *Journal of immunology* **179**: 984-992.

Angel P, Karin M (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et biophysica acta* **1072**: 129-157.

Anthony S. Fauci EB, Dennis L. Kasper,, Stephen L. Hauser DLL, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo (2009). *Harrisons Innere Medizin*, vol. 17. Auflage. ABW - Wissenschaftsverlag: Berlin.

Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massague J (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *The Journal of biological chemistry* **271**: 11376-11382.

Ben-Neriah Y, Karin M (2011). Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nature immunology* **12**: 715-723.

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG (1995). hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS letters* **368**: 331-335.

Bevins CL, Martin-Porter E, Ganz T (1999). Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut* **45**: 911-915.

Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356**: 248-252.

Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP (2001). Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **33**: 177-186.

Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W (1993). Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS letters* **331**: 134-140.

Boots AW, Hristova M, Kasahara DI, Haenen GR, Bast A, van der Vliet A (2009). ATP-mediated activation of the NADPH oxidase DUOX1 mediates airway epithelial responses to bacterial stimuli. *The Journal of biological chemistry* **284**: 17858-17867.

Borrell-Pages M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J (2003). TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *The EMBO journal* **22**: 1114-1124.

Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, Park JH, Ewings KE, Bowie AG, Ong SJ, Cook SJ, Sorensen OE, Manzo BA, Inohara N, Klein NJ, Nunez G, Atherton JC, Bajaj-Elliott M (2006). Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *The Journal of biological chemistry* **281**: 11637-11648.

Brill A, Chauhan AK, Canault M, Walsh MT, Bergmeier W, Wagner DD (2009). Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target receptor shedding in platelets in a p38-dependent fashion. *Cardiovascular research* **84**: 137-144.

Brown P (2001). Cinderella goes to the ball. *Nature* **410**: 1018-1020.

Burgel PR, Nadel JA (2008). Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* **32**: 1068-1081.

Calderone RA, Fonzi WA (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* **9**: 327-335.

Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L (2011). Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual review of immunology* **29**: 447-491.

Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B (2011). Antimicrobial peptides important in innate immunity. *The FEBS journal* **278**: 3942-3951.

Chalaris A, Adam N, Sina C, Rosenstiel P, Lehmann-Koch J, Schirmacher P, Hartmann D, Cichy J, Gavrilova O, Schreiber S, Jostock T, Matthews V, Hasler R, Becker C, Neurath MF, Reiss K, Saftig P, Scheller J, Rose-John S (2010). Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *The Journal of experimental medicine* **207**: 1617-1624.

Chang L, Karin M (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40.

Chung WO, Dale BA (2004). Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. *Infection and immunity* **72**: 352-358.

Clark TA, Hajjeh RA (2002). Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Current opinion in infectious diseases* **15**: 569-574.

Cunliffe RN (2003). Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. *Molecular immunology* **40**: 463-467.

Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI (1986). Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of virology* **60**: 1068-1074.

Daher KA, Lehrer RI, Ganz T, Kronenberg M (1988). Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 7327-7331.

Damgaard RB, Gyrd-Hansen M (2011). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in regulation of inflammation and innate immunity. *Discovery medicine* **11**: 221-231.

Dempsey PJ, Meise KS, Yoshitake Y, Nishikawa K, Coffey RJ (1997). Apical enrichment of human EGF precursor in Madin-Darby canine kidney cells involves preferential basolateral ectodomain cleavage sensitive to a metalloprotease inhibitor. *The Journal of cell biology* **138**: 747-758.

Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G (2003). The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**: 2604-2621.

Deuss M, Reiss K, Hartmann D (2008). Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Current Alzheimer research* **5**: 187-201.

Eames T, Grabein B, Kroth J, Wollenberg A (2010). Microbiological analysis of epidermal growth factor receptor inhibitor therapy-associated paronychia. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **24**: 958-960.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet infectious diseases* **3**: 685-702.

Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD (2006). Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **25**: 419-425.

Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ (2008). Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cellular microbiology* **10**: 2058-2066.

Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadhowsky J, Harding CV, Weinberg A, Sieg SF (2007). Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18631-18635.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* **76**: 1427-1435.

Ganz T, Lehrer RI (1994). Defensins. *Current opinion in immunology* **6**: 584-589.

Ganz T (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews Immunology* **3**: 710-720.

Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, Yadav SP, Crabb JW, Ganz T, Bevins CL (2002). Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nature immunology* **3**: 583-590.

Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mocsai A, Tschopp J, Ruland J (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* **459**: 433-436.

Hancock RE (1997). Peptide antibiotics. *Lancet* **349**: 418-422.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**: 861.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001). Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The Journal of biological chemistry* **276**: 5707-5713.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science* **117**: 5965-5973.

Higashiyama S, Nanba D, Nakayama H, Inoue H, Fukuda S (2011). Ectodomain shedding and remnant peptide signalling of EGFRs and their ligands. *Journal of biochemistry* **150**: 15-22.

Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, Fitzgerald KA (2009). An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell host & microbe* **5**: 487-497.

Holzgrabe U (2009). New antibiotics in sight? *Pharmazie in unserer Zeit* **38**: 106-108.

Hooper NM (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS letters* **354**: 1-6.

Horiuchi K, Le Gall S, Schulte M, Yamaguchi T, Reiss K, Murphy G, Toyama Y, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP (2007). Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Molecular biology of the cell* **18**: 176-188.

Hornbach A, Heyken A, Schild L, Hube B, Loffler J, Kurzai O (2009). The glycosylphosphatidylinositol-anchored protease Sap9 modulates the interaction of *Candida albicans* with human neutrophils. *Infection and immunity* **77**: 5216-5224.

Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**: 1186-1195.

Huxley-Jones J, Clarke TK, Beck C, Toubaris G, Robertson DL, Boot-Handford RP (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC evolutionary biology* **7**: 63.

Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, Blobel CP, Himanen JP, Lackmann M, Nikolov DB (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* **123**: 291-304.

Janeway CA, Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **54 Pt 1**: 1-13.

Johnston A, Gudjonsson JE, Aphale A, Guzman AM, Stoll SW, Elder JT (2011). EGFR and IL-1 signaling synergistically promote keratinocyte antimicrobial defenses in a differentiation-dependent manner. *The Journal of investigative dermatology* **131**: 329-337.

Joly S, Maze C, McCray PB, Jr., Guthmiller JM (2004). Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *Journal of clinical microbiology* **42**: 1024-1029.

Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, Sutterwala FS (2009). Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *Journal of immunology* **183**: 3578-3581.

Joly S, Sutterwala FS (2010). Fungal pathogen recognition by the NLRP3 inflammasome. *Virulence* **1**: 276-280.

Jones DE, Bevins CL (1992). Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *The Journal of biological chemistry* **267**: 23216-23225.

Jones DE, Bevins CL (1993). Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS letters* **315**: 187-192.

Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG (2007). The activator protein-1 transcription factor in respiratory epithelium carcinogenesis. *Molecular cancer research : MCR* **5**: 109-120.

Kawsar HI, Ghosh SK, Hirsch SA, Koon HB, Weinberg A, Jin G (2010). Expression of human beta-defensin-2 in intratumoral vascular endothelium and in endothelial cells induced by transforming growth factor beta. *Peptides* **31**: 195-201.

Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR (2007). Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *European journal of immunology* **37**: 467-478.

Kiehne K, Brunke G, Meyer D, Harder J, Herzig KH (2005). Oesophageal defensin expression during *Candida* infection and reflux disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* **40**: 501-507.

Kiehne K, Fincke A, Brunke G, Lange T, Folsch UR, Herzig KH (2007). Antimicrobial peptides in chronic anal fistula epithelium. *Scandinavian journal of gastroenterology* **42**: 1063-1069.

Kiss G, Michl H (1962). Uber das Giftsekret der Gelbbauchunke, *Bombina variegata* L. *Toxicon* **Volume 1**: 33-34.

Koenen RR, Pruessmeyer J, Soehnlein O, Fraemohs L, Zerneck A, Schwarz N, Reiss K, Sarabi A, Lindbom L, Hackeng TM, Weber C, Ludwig A (2009). Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* **113**: 4799-4809.

Koff JL, Shao MX, Ueki IF, Nadel JA (2008). Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **294**: L1068-1075.

Kratzer C, Tobudic S (2010). *Candida*-Infektionen - Diagnose und Therapie. *Wiener klinische Wochenschrift Education*: 19-30.

Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, Selsted ME (1988). Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *The Journal of clinical investigation* **81**: 1829-1835.

Lehrer RI, Ganz T (2002). Defensins of vertebrate animals. *Current opinion in immunology* **14**: 96-102.

Liu Y, Filler SG (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryotic cell* **10**: 168-173.

Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD (2005). Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **8**: 161-171.

Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000). Innate immunity. *The New England journal of medicine* **343**: 338-344.

- Medzhitov R (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology* **1**: 135-145.
- Menzies BE, Kenoyer A (2006). Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infection and immunity* **74**: 6847-6854.
- Muller V, Viemann D, Schmidt M, Endres N, Ludwig S, Leverkus M, Roth J, Goebeler M (2007). *Candida albicans* triggers activation of distinct signaling pathways to establish a proinflammatory gene expression program in primary human endothelial cells. *Journal of immunology* **179**: 8435-8445.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**: 263-273.
- Myers TJ, Brennaman LH, Stevenson M, Higashiyama S, Russell WE, Lee DC, Sunnarborg SW (2009). Mitochondrial reactive oxygen species mediate GPCR-induced TACE/ADAM17-dependent transforming growth factor- α shedding. *Molecular biology of the cell* **20**: 5236-5249.
- Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ (2002). The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *The Journal of infectious diseases* **185**: 1483-1489.
- Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, Takahashi A, Asakura H, Makino S, Hojo H, Nakahara Y, Ohsaki M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Moss J, Hirayama T (2001). *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *The Journal of biological chemistry* **276**: 30521-30526.
- Olyae M, Sontag S, Salman W, Schnell T, Mobarhan S, Eiznhamer D, Keshavarzian A (1995). Mucosal reactive oxygen species production in oesophagitis and Barrett's oesophagus. *Gut* **37**: 168-173.
- Pahl R, Brunke G, Steubesand N, Schubert S, Bottner M, Wedel T, Jurgensen C, Hampe J, Schafer H, Zeissig S, Schreiber S, Rosenstiel P, Reiss K, Arlt A (2011). IL-1 β and ADAM17 are central regulators of beta-defensin expression in *Candida* esophagitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **300**: G547-553.
- Paulissen G, Rocks N, Gueders MM, Crahay C, Quesada-Calvo F, Bekaert S, Hacha J, El Hour M, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD (2009). Role of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in airway diseases. *Respiratory research* **10**: 127.
- Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J (2006). Human beta-defensins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **63**: 1294-1313.
- Pelz RK, Lipsett PA, Swoboda SM, Diener-West M, Powe NR, Brower RG, Perl TM, Hammond JM, and Hendrix CW (2000). *Candida* Infections: Outcome and Attributable ICU Costs in Critically Ill Patients. *Journal of Intensive Care Medicine* **15**: 255-261.
- Peschel A, Sahl HG (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature reviews Microbiology* **4**: 529-536.
- Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS pathogens* **6**: e1001067.

Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-related cancer* **8**: 11-31.

Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J (1987). Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *The Journal of cell biology* **104**: 141-149.

Rauci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**: 3716-3727.

Reiss K, Ludwig A, Saftig P (2006). Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacology & therapeutics* **111**: 985-1006.

Reiss K, Saftig P (2009). The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Seminars in cell & developmental biology* **20**: 126-137.

Rodriguez de la Vega RC, Possani LD (2005). On the evolution of invertebrate defensins. *Trends in genetics : TIG* **21**: 330-332.

Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC (2004). Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends in microbiology* **12**: 44-49.

Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology* **164**: 769-779.

Sambrook J FE, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC (2005). Human defensins. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **83**: 587-595.

Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Wagner EF (2011). Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Annals of the rheumatic diseases* **70 Suppl 1**: i109-112.

Schroder JM, Harder J (1999). Human beta-defensin-2. *The international journal of biochemistry & cell biology* **31**: 645-651.

Schroder K, Zhou R, Tschopp J The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* **327**: 296-300.

Selsted ME, Harwig SS (1989). Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *The Journal of biological chemistry* **264**: 4003-4007.

Semple CA, Taylor K, Eastwood H, Barran PE, Dorin JR (2006). Beta-defensin evolution: selection complexity and clues for residues of functional importance. *Biochemical Society transactions* **34**: 257-262.

Shaulian E, Karin M (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**: 2390-2400.

Soehnlein O, Kenne E, Rotzius P, Eriksson EE, Lindbom L (2008). Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clinical and experimental immunology* **151**: 139-145.

Staber P (2007). Grundlagenforschung: AP-1-Transkriptionsfaktoren und Onkogenese. *Jatros Hämatologie & Onkologie* **6**.

Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, Pahl R, Reiss K, Herzig KH, Schubert S, Schreiber S, Folsch UR, Rosenstiel P, Arlt A (2009). The expression of the beta-defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF-kappaB and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of Candida esophagitis. *BMC immunology* **10**: 36.

Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W (1995). The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein science : a publication of the Protein Society* **4**: 823-840.

Tang YQ, Selsted ME (1993). Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **268**: 6649-6653.

Thewes SDH, B. (2008). Untersuchungen zur Invasivität von Candida albicans. *Epidemiologisches Bulletin* 29/2008. Robert Koch-Institut. pp 230-231.

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002). Plant defensins. *Planta* **216**: 193-202.

Vallabhapurapu S, Karin M (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* **27**: 693-733.

Vylkova S, Li XS, Berner JC, Edgerton M (2006). Distinct antifungal mechanisms: beta-defensins require Candida albicans Ssa1 protein, while Trk1p mediates activity of cysteine-free cationic peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 324-331.

Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M (2007). Human beta-defensins kill Candida albicans in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**: 154-161.

Wada A, Ogushi K, Kimura T, Hojo H, Mori N, Suzuki S, Kumatori A, Se M, Nakahara Y, Nakamura M, Moss J, Hirayama T (2001). Helicobacter pylori-mediated transcriptional regulation of the human beta-defensin 2 gene requires NF-kappaB. *Cellular microbiology* **3**: 115-123.

Weeks CS, Tanabe H, Cummings JE, Crampton SP, Sheynis T, Jelinek R, Vanderlick TK, Cocco MJ, Ouellette AJ (2006). Matrix metalloproteinase-7 activation of mouse paneth cell pro-alpha-defensins: SER43 down arrow ILE44 proteolysis enables membrane-disruptive activity. *The Journal of biological chemistry* **281**: 28932-28942.

Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schroder JM, Stange EF (2004). NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infection and immunity* **72**: 5750-5758.

Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF (2007). Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Current opinion in gastroenterology* **23**: 32-38.

Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM, Harder J (2006). Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *The Journal of investigative dermatology* **126**: 121-127.

Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA (1998). Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* **9**: 399-414.

Weindl G, Naglik JR, Kaesler S, Biedermann T, Hube B, Korting HC, Schaller M (2007). Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *The Journal of clinical investigation* **117**: 3664-3672.

Weindl G, Wagener J, Schaller M (2010). Epithelial cells and innate antifungal defense. *Journal of dental research* **89**: 666-675.

Weindl G, Wagener J, Schaller M (2011). Interaction of the mucosal barrier with accessory immune cells during fungal infection. *International journal of medical microbiology : IJMM* **301**: 431-435.

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**: 474-476, 478-481.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **39**: 309-317.

Wollenberg A, Kroth J, Hauschild A, Dirschka T (2010). [Cutaneous side effects of EGFR inhibitors--appearance and management]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **135**: 149-154.

Wong JH, Xia L, Ng TB (2007). A review of defensins of diverse origins. *Current protein & peptide science* **8**: 446-459.

Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y (2002). Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **169**: 2516-2523.

Zakikhany K, Thewes S, Wilson D, Martin R, Albrecht A, Hube B (2008). From attachment to invasion: infection associated genes of Candida albicans. *Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology* **49**: 245-251.

Zenz R, Scheuch H, Martin P, Frank C, Eferl R, Kenner L, Sibilina M, Wagner EF (2003). c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Developmental cell* **4**: 879-889.

Zhao C, Wang I, Lehrer RI (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS letters* **396**: 319-322.

7 Danksagung

Die Dissertation wurde an der Klinik für Innere Medizin I der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten sowie dem Direktor der Klinik Prof. Dr. Stefan Schreiber meinen aufrechten Dank aussprechen.

Besonders, und folglich an erster Stelle, möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Alexander Arlt danken. Mit großer Empathie und detailliertem Wissen wurde ich vom ersten Tag an fortlaufend sachkundig und mit großer Geduld betreut. Ich schätzte besonders die Vermittlung der nötigen Fähigkeiten zur eigenständigen Entfaltung. Seine scharfsinnige und konstruktive Kritik bei dem Erstellen dieser Dissertation und Publikation hat wesentlich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Maßgeblichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit hatte die Unterstützung von Frau Dipl. Biologin Gabriele Brunke. Durch sie wurde ich in das Arbeiten im Labor eingeführt und bekam alle praktischen Fähigkeiten präzise gelehrt. Zu jeder Tageszeit hatte ich eine kompetente Ansprechpartnerin.

Weiter möchte ich allen wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen des Labors für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima danken. Insbesondere Frau Dr. rer. nat. Nadine Steubesand, Frau Conny Wilgus und Frau Gunda Dechow-Seligmann.

Meinem geschätzten Freund Herrn Ingo Plagmann und meinem Cousin Herrn Dipl.-Ing. Christoph Jürgens möchte ich sehr für die kritische Durchsicht dieser Dissertationsschrift Dank aussprechen.

Für all die Jahre der Unterstützung, während meines Studiums und dieser Dissertation, möchte ich an dieser Stelle meine Eltern und meine ganze Familie loben. Danke, dass ihr mich zu dem gemacht habt, der ich heute bin.

Mein letzter Dank gilt meiner mich jederzeit tatkräftig unterstützenden Freundin Eileen Pardun. Ich möchte ihr für die niemals endende Motivation und die unvergesslichen vier Jahre an ihrer Seite danken.

8 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	René Pahl
Geburtsdatum	10. Mai 1983
Geburtsort	Schleswig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Anschrift	Gutenbergstraße 20 24118 Kiel

Studium und Ausbildung

10/2012	Studiengang Master of Hospital Management (HoMa8) CAU Kiel
10/2011 – 10/2016	Ass. Arzt in der Klinik für Strahlentherapie UK-SH Kiel
05/2011	Approbation als Arzt 2. Staatsexamen: Gesamtnote gut (1,83)
02/2010 – 01/2011	Praktisches Jahr <ul style="list-style-type: none"> ▪ Innere Medizin Pontificia Universidad Católica de Chile (Gastroenterologie, Allgemeine Medizin, Kardiologie) ▪ Radiologie am UK-SH <ul style="list-style-type: none"> • Klinik für Strahlentherapie / Radioonkologie • Klinik für Nuklearmedizin, Molekulare Bild Diagnostik und Therapie • Klinik für Diagnostische Radiologie ▪ Chirurgie Westküstenklinikum Heide
09/2004	Humanmedizin Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 1. Staatsexamen: Note sehr gut (1,5)
04/2004 – 09/2004	Diplom-Chemie Christian-Albrecht-Universität zu Kiel
07/2003 – 03/2004	Wehrdienst: Sanitäter im Aufklärungsgeschwader 51 „I“ Kropp/Jagel
08/1994 – 06/2003	Gymnasium Lornsenschule Schleswig
1990 – 1994	Grund- und Hauptschule Schuby.

Studentische Tätigkeiten

10/2012	Stipendium „Master of Hospital Management“ der CAU Kiel und des Vorstands des UKSH, Campus Kiel.
04/2012	Zertifizierung „Medikamentöser Tumorthherapie der Kopf-, Halstumoren“, UKE, Hamburg
01/2012	Wissenschaftliche Weiterbildung Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung
02/2010	Stipendium der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel (Auslandstertial)
01/2009 – 02/2010	wissenschaftliche Hilfskraft unter PD Dr. J. Hampe und PD Dr. C. Schafmayer, MBA
02/2008	Dissertation: I. Medizin Uniklinik Kiel, Hormon & Rezeptorlabor unter PD Dr. A. Arlt
11/2006 – 02/2007	studentische Hilfskraft im Präparierkurs

Veröffentlichungen

- 01/2011 **Pahl R**, Brunke G, Steubesand N, Schubert S, Böttner M, Wedel T, Jürgensen C, Hampe J, Schäfer H, Zeissig S, Schreiber S, Rosenstiel P, Reiss K, Arlt A. IL-1 β and ADAM17 are central regulators of β -defensin expression in Candida esophagitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 Jan 13
- 06/2009 N. Steubesand, K. Kiehne, G. Brunke, **R. Pahl** , K. Reiss, K.-H.Herzig , S. Schubert, S.Schreibe , U. R. Fölsch , P. Rosenstiel and A. Arlt. The expression of the β -defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF- κ B and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of Candida esophagitis. BMC Immunology 2009
- Literatur kommentiert: Strahlentherapie und Onkologie Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics Editor-in-Chief: Rolf Sauer;
- Auswirkung des Mammographie-Screenings auf die Mortalität durch Brustkrebs. Kommentar zu: “Effect of screening mammography on breast-cancer mortality in Norway”. René Pahl, Kiel und Jürgen Dunst, Lübeck
 - Vaginale Brachytherapie versus externe Bestrahlung als adjuvante Therapie beim Endometriumkarzinom. Kommentar zu: “Effect of screening mammography on breast-cancer mortality”. René Pahl, Kiel, und Jürgen Dunst, Lübeck
 - Konventionelle versus hypofraktionierte intensitätsmodulierte Strahlentherapie beim Prostata Karzinom. Kommentar zu: Conventional versus hypofractionated high-dose intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer: preliminary safety results from the CHHiP randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2012. **René Pahl**, Kiel (aktuell im Review von Journal Im Focus Onkologie sowie Strahlentherapie und Onkologie)
 - Conventional versus hypofractionated intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer. Pahl, R. Strahlenther Onkol. 2012 Sep;188(9):841-2.

9 Anhang

9.1 Erklärung Ethik

Die Probeentnahme und Gewebeuntersuchung wurde von der Ethikkommission der Universität Kiel genehmigt (Code AZ.: A158/01).

9.2 Erklärung Doktorarbeit

Erklärung Doktorarbeit

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation mit dem Thema:

„Rolle von IL-1 β und ADAM17 in der Regulation der β -Defensin-Antwort im Rahmen der Candida-Ösophagitis“

abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Ort, Datum _____ Unterschrift _____
(René Pahl)