

Aus der Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Chirurgische Klinik I  
Campus Benjamin Franklin

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

**Etablierung des Nachweises direkter antibakterieller Wirkung  
humaner Defensine  
für die Untersuchung der Defensinproduktion im menschlichen  
Darm bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andreas Andreou

aus Warburg

Gutachter:           1. Priv.-Doz. Dr. med. A. J. Kroesen  
                          2. Prof. Dr. med. N. Senninger  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Siegmund

Datum der Promotion:       03.09.2010

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFU	Kolonie-bildende Einheiten
Coomassie	Coomassie <i>Brilliant Blue</i> R-250
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Gemisch aus vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
<i>g</i>	Einheit der relativen Zentrifugationsbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GST	Gluthation-S-Transferase
HBD	Humanes $\beta$ -Defensin
HD-5/-6	Humanes Defensin-5/6
His	6 Histidinreste als Fusionspartner für rekombinante Proteine
HNP	humane neutrophile Peptide
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M1	Größenstandard für Proteine: 11-170 kDa
M2	Größenstandard für Proteine: 1.060-26.600 Da
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MHK	minimale Hemmstoffkonzentration
$M_r$	Molekulargewicht
mRNA	Boten-RNA
NF	nukleärer Faktor
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit enzymatischer Aktivität

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Prinzipien und natürliche Verbreitung antibakterieller Substanzen .....	1
1.2	Die epitheliale Barriere .....	2
1.3	Humane Defensine .....	5
1.4	Defensine in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED).....	8
1.5	Humanes $\beta$ -Defensin (HBD)-2 im Darm bei CED.....	9
1.6	Nachweismethoden für antibakterielle Wirkungen.....	10
1.7	Aufgabenstellung .....	11
2	Material und Methoden .....	12
2.1	Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	12
2.2	Materialien und Geräte .....	14
2.3	Gewebeproben .....	15
2.4	Oligonukleotide und Sequenzierung.....	16
2.5	Plasmide .....	16
2.6	Stämme von <i>E. coli</i> .....	17
2.7	Lösungen und Medien für die Bakterienkultur .....	17
2.8	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion .....	18
2.9	Transformation und Screening transformierter <i>E. coli</i> .....	20
2.10	Klonierung von PCR-Produkten in pCR2.1.....	21
2.11	Präparation von Plasmid-DNA.....	21
2.11.1	Puffer und Lösungen .....	21
2.11.2	Minipräparation .....	22
2.11.3	Maxipräparation .....	23
2.12	Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren .....	24
2.13	Restriktion von DNA .....	24
2.14	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	25
2.15	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	25
2.16	Dephosphorylierung der Enden linearisierter Vektorplasmide.....	26

## Inhaltsverzeichnis

2.17	Ligation linearisierter DNA.....	27
2.18	Induzierte Expression von HBD-2-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> BL21.....	27
2.19	Analytische Darstellung von Proteinen.....	28
2.19.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.19.2	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250.....	29
2.19.3	HBD-2-spezifischer Western-blot.....	30
2.20	Präparative Darstellung von Fusionsproteinen.....	32
2.20.1	Lyse von Bakterien für die Gewinnung von Fusionsproteinen.....	32
2.20.2	Glutathion-Affinitätschromatografie.....	32
2.20.3	Gelfiltration.....	33
2.21	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure.....	34
2.22	Freisetzung von HBD-2 aus HBD2-GST durch Thrombin.....	35
2.23	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen.....	35
2.24	Korrelation zwischen OD <sub>600</sub> und der Bakterienanzahl der Suspension.....	36
2.25	Präparation von Proteinen aus menschlichen Darmproben.....	37
2.26	Mathematische Auswertung.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Herstellung eines antimikrobiellen rekombinanten HBD-2-Fusionsproteins.....	39
3.1.1	Strategie der prokaryontischen Expression von HBD-2-Fusionsproteinen.....	39
3.1.2	Klonierung von HBD-2-spezifischer cDNA in pCR2.1.....	40
3.1.3	Reklonierung der HBD-2-Fragmente in die Expressionsvektoren pQE30 und pGEX-2T.....	42
3.1.4	Induktion von HBD2-His in <i>E. coli</i> BL21.....	48
3.1.5	Induktion von HBD2-GST in <i>E. coli</i> BL21.....	49
3.1.6	Optimierung der Bakterienkultur zur Induktion von HBD2-GST in <i>E. coli</i> BL21...51	
3.1.7	Affinitätschromatografische Reinigung von HBD2-GST.....	53
3.1.8	Entfernung von Glutathion und Salzen aus affinitätschromatografisch gereinigten HBD2-GST-Präparationen.....	56
3.2	Etablierung einer densitometrischen Methode für den Nachweis der antimikrobiellen Aktivität von HBD-2.....	58
3.2.1	Auswahl des Bakterienstammes.....	58
3.2.2	Korrelation zwischen OD <sub>600</sub> und der Bakterienanzahl der Suspension.....	59
3.2.3	Optimierung der Kulturbedingungen für <i>E. coli</i> JM109.....	60

## Inhaltsverzeichnis

3.2.4	Optimierung des Mediums für die Kultur von <i>E. coli</i> JM109 .....	61
3.3	Antibakterielle Aktivität von HBD-2 aus dem HBD2-GST-Fusionsprotein .....	64
3.3.1	Nachweis der antibakterieller Aktivität von gereinigtem HBD2-GST .....	64
3.3.2	Freisetzung von HBD-2 aus HBD2-GST durch Thrombinspaltung.....	65
3.3.3	Einfluss von GST auf die antibakterielle Wirkung des HBD2-GST .....	66
3.3.4	Effekt der Wasserstoffionen-Konzentration auf die antibakterielle Wirkung von HBD2-GST.....	68
3.3.5	Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die antibakterielle Aktivität.....	69
3.3.6	Wiederherstellung der antibakteriellen Aktivität von HBD2-GST nach Pufferaustausch.....	70
3.4	Untersuchung von Proben aus dem menschlichen Darm auf das Vorhandensein von HBD-2. ....	71
4	Diskussion .....	74
5	Zusammenfassung .....	94
6	Literaturverzeichnis.....	96
	Danksagung.....	109
	Erklärung .....	110
	Lebenslauf .....	111

## 1 Einleitung

### 1.1 Prinzipien und natürliche Verbreitung antibakterieller Substanzen

Antibakterielle Wirkmechanismen sind die wesentlichen Prinzipien mit dem Organismen ihren Lebensraum behaupten oder ihre Integrität aufrecht erhalten. Sie sind mit höchst unterschiedlichen Mechanismen und Strukturen in allen Lebensformen verbreitet. Typische Ansatzpunkte antimikrobieller Wirkungen sind Strukturen, in denen sich der Zielmikroorganismus vom Produzenten des antibiotischen Prinzips unterscheidet. Zur Abwehr von Bakterien durch andere Organismen gehören bakterielle Zellwände und Membranen sowie Bakterien-spezifische Synthesemechanismen.

Eine große Gruppe antimikrobieller Chemotherapeutika, die überwiegend aus Mikroorganismen stammen oder synthetischer Natur sind, haben bakterio-statische und bakterizide Eigenschaften.

Penicillin, ein  $\beta$ -Lactam ursprünglich aus dem Pilz *Penicillium notatum* beschrieben, war das erste Bakterien-spezifische Prinzip, das klinisch zur Anwendung kam [Fleming, 1929]. Aus dem Grundgerüst der 6-Amino-Penicillansäure abgeleitete halbsynthetische  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wirken über den gleichen Mechanismus antibakteriell. Penicilline binden an das Penicillin-Binde-Protein, einen typischen bakteriellen Zellwandbestandteil, der für das Entstehen der Peptidbindungen in der Zellwand und die Quervernetzung des Mureins zuständig ist. Wegen zu geringer Mengen des Penicillin-Binde-Proteins entstehen während des Bakterienwachstums Läsionen in der Zellwand, die Membran verliert ihre selektive Permeabilität, kann die Zusammensetzung des Zytoplasmas nicht mehr regulieren und das Bakterium wird lebensunfähig [Pratt, 1948; Pal, 2008]. Auch Ampicillin zählt zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika; es stört die Zellwandsynthese der Bakterien und destabilisiert die Zellumhüllung der betroffenen Mikroorganismen.

Andere bakterizide Stoffe wie die Novobiocin aus dem Aktinomyzeten *Streptomyces niveus* hemmen das Enzym DNA-Gyrase, das für das Verdrillen der DNA-Stränge und damit für die korrekte DNA-Replikation unverzichtbar ist [Gellert, 1976; Reusser, 1977]. Aminoglykoside wie Streptomycin aus *Streptomyces griseus* lagern sich so an die 30 S-Untereinheit bakterieller Ribosomen und führen zur Bildung von nicht-funktionellen Proteinen [Schatz, 2005].

Bakterio-statische Substanzen wie Tetrazykline und Makrolide hemmen das Wachstum von Bakterien durch Inhibition der Translation. Tetrazykline wie Aureomycin aus *Streptomyces aureofaciens* verhindern die Anlagerung der Transfer-RNA an die 30 S-Untereinheit bakterieller Ribosomen und so die Proteinsynthese [Duggar, 1948]. Makrolide wie Erythromycin aus *Saccharopolyspora erythraea* binden an die



50 S-Untereinheiten und blockieren so den Tunnel, durch den die neu gebildeten Polypeptidketten das Ribosom verlassen [McGuire, 1952]. Die bakterielle Folsäuresynthese ist der Angriffspunkt von Sulfonamiden und von Trimethoprim, die so die Nukleotidsynthese stören. Sulfonamide sind Strukturanaloga von p-Aminobenzoessäure, einer Vorstufe von Tetrahydrofolsäure [Domagk, 1957]. Trimethoprim blockiert direkt das Enzym Dihydrofolsäure-Reduktase [Reisberg, 1966].

Die bisher beschriebenen Strukturen und Mechanismen stammen überwiegend aus Mikroorganismen. Auch höhere Organismen verfügen zum Schutz äußerer und innerer Oberflächen über bakteriostatische und bakterizide Prinzipien. Diese Peptide oder Proteine sind Bestandteil der angeborenen Immunität und werden konstitutiv oder induziert exprimiert [Schröder, 1999]. Defensine sind antimikrobielle Peptide, die an der Zellmembran der Bakterien binden und durch die Bildung von Poren zum Absterben des Mikroorganismus führen. Auch ein unmittelbarer Angriff auf die Zellumhüllung durch Defensine bringt die Homöostase des Bakteriums ins Ungleichgewicht [Park, 2005]. Dieser vergleichbare Angriffspunkt von Penicillinen und Defensinen begründet, weshalb Ampicillin für die Etablierung der Methodik zur Bewertung der antibakteriellen Aktivität von Defensinen herangezogen werden kann.

### **1.2 Die epitheliale Barriere**

Die Grenzflächen des Organismus, wie zum Beispiel das Epithel des tracheobronchialen Traktes oder der intestinalen Mukosa kommen ständig mit einer großen Anzahl von Bakterien in Kontakt. Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes stellt mit 200-300 m<sup>2</sup> die größte Kontaktfläche des Organismus mit der äußeren Umwelt dar und ist ein komplexes Ökosystem bestehend aus intestinalem Epithel, Immunzellen und der natürlichen Darmflora [Müller, 2005]. Die intestinale Mukosa ist Veränderungen der Temperatur, der Wasserstoffionen-Konzentration und der Osmolarität sowie bakteriellen Produkten ausgesetzt, die eine lokale oder systemische immunologische Reaktion induzieren können [Cunliffe, 2004].

Die Integrität der Mukosa wird durch ein System sichergestellt, das aus konstitutiven und induzierbaren Mechanismen besteht. Ihre Homöostase besteht aus einem Gleichgewicht von aggressiven und defensiven Faktoren. Das Darmepithel wird durch die physikalische Barriere, die luminale Sekretion von antibakteriellen Substanzen und seine schnelle Regenerationsfähigkeit charakterisiert. Der Organismus schützt das intestinale Epithel also auf verschiedenen Ebenen gegen potentiell schädliche Mikroorganismen [Cunliffe, 2004] (Tabelle 1).

Tabelle 1: **Bestandteile der gastrointestinalen Barriere** nach [Jan-Michel, 2003].

<i>Ebene</i>	<i>Prinzip</i>	<i>Beispiele</i>
Physikalische Barriere	intaktes Epithel	<i>Tight Junctions</i> , <i>Gap Junctions</i>
	Darmmotilität	
Biochemische Barriere	digestive und pankreatobiliäre Sekretion	Magensäure, Gallensäure
	sezernierte antimikrobielle Proteine	Laktoferrin, Lysozym, Defensine
	weitere sezernierte Proteine	Mucine, Immunglobulin (Ig) A
Zelluläre Barriere	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>	
	Physiologische intestinale Flora	

Die Epithelzellen bilden eine Zellschicht bestehend aus vier Zelltypen: den Enterozyten, den enteroendokrinen Zellen, den Becherzellen und den Paneth-Zellen. Die Intaktheit des Epithels wird durch die interzellulären Kontakte wie den *Tight Junctions* und Desmosomen gewährleistet. Der interzellulären Kommunikation dienen die *Gap Junctions* [Eckmann, 2005]. Auch die Darmmotilität ist Bestandteil der physikalischen Barriere [Jan-Michel, 2003].

Als biochemische Barriere wirken digestive und pankreatobiliäre Flüssigkeiten, Gallensäuren und eine Reihe konstitutive oder induzierbare Faktoren, wie Mucin, Laktoferrin, Lysozym, die sekretorische Phospholipase A2 und antimikrobielle Peptide [Jan-Michel, 2003; Eckmann, 2005]. Alle diese Schutzmechanismen des intestinalen Gewebes werden überwiegend der angeborenen Immunität zugeordnet und dienen letztlich der Kontrolle der mikrobiellen Kolonisation und der Prävention der transepithelialen Einwanderung von Pathogenen.

Die physikalische Barriere wurde lange als der Hauptmechanismus zum Schutz der Mukosa gegenüber luminalen Bakterien betrachtet. Das Epithelium hat auch eine aktive Rolle in der immunologischen Reaktion gegenüber Pathogenen, indem es Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide sezerniert [Neutra, 2001; Porter, 2002; Stadnyk, 2002]. Die intestinalen Epithelzellen sind mit Sensoren ausgerüstet, die die Anwesenheit bakterieller Produkte in ihrer Umgebung detektieren. Diese Sensoren sind bekannt unter dem Begriff *Pattern Recognition*-Rezeptoren, die in *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*-Proteine unterteilt werden. Diese Rezeptoren

## Einleitung

erkennen bakterielle Bestandteile, wie Lipopolysaccharid (LPS) aus Gram-negativen Bakterien sowie Lipoproteine und Peptidoglykane aus Gram-positiven Bakterien [Sugawara, 2006; Abreu, 2003; Hershberg, 2002].

Die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden durch die Zellen wird über die TLR reguliert. Die TLR erkennen spezifische Pathogen-assoziierte molekulare Muster der Bakterien, Viren, Pilze und einzelligen Parasiten, und ermöglichen die Aktivierung des Immunsystems [Takeda, 2003; Gewirtz, 2003]. Die Interaktion von TLR mit den spezifischen Pathogen-assoziierten molekularen Mustern führt über definierte Signalkaskaden zur Aktivierung des *Nuclear Factor- $\kappa$ B*. Dieser wiederum reguliert die Produktion und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. von IL-8 [Vora, 2004]. Der TLR-4 und sein akzessorisches Molekül MD-2 sind verantwortlich für die Identifizierung von LPS an der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien. Der TLR-2 erkennt bakterielle Lipopeptide. In Kombination mit TLR-6 sensibilisiert TLR-2 das Immunsystem für Peptidoglykane, Lipoteichonsäure, und den löslichen Tuberkulose-Faktor, die Bestandteile von Gram-positiven Bakterien bzw. von Mykobakterien sind [Vora, 2004].

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch TLR spielt eine entscheidende Rolle zum Schutz der Darmmukosa und anderer Grenzflächen des Organismus. Durch die Sekretion von humanen Defensinen mit ihren direkten antibakteriellen, antiviralen und antifungalen Eigenschaften werden Infektionen limitiert und die Invasion kommensaler Bakterien durch die epitheliale Barriere verhindert. Diese antimikrobiellen Peptide werden von zirkulierenden und epithelialen Zellen produziert. Die Epithelzellen stellen die erste Verteidigungslinie dar. Die zirkulierenden Zellen sezernieren ihre antimikrobiellen Faktoren erst nach einer transepithelialen Invasion von Pathogenen [Hecht, 1999]. Die darauf folgende immunologische Reaktion resultiert in der Freisetzung und Aktivierung antibakterieller Peptide und der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die wiederum zur Rekrutierung von Leukozyten und weiteren Immunzellen beitragen [Lie´vin-Le Moal, 2006]. Freigesetzte Zytokine wirken zusätzlich auf die Expression von antimikrobiellen Substanzen und die Aktivierung des adaptiven Immunsystems [Shih, 2008].

Die Darmmukosa stellt neben einem physikalischen Hindernis durch die an der Oberfläche befindlichen spezialisierten Zellreihen auch einen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar. Diese Zellen sezernieren antimikrobielle Peptide und kontrollieren so aktiv das Wachstum von pathogenen oder apathogenen Bakterien.

### 1.3 Humane Defensine

Die Sekretion antimikrobieller Peptide gewährleistet eine sofortige Reaktion auf die Invasion schädlicher Mikroorganismen ohne die Notwendigkeit eines spezifischen immunologischen Gedächtnisses. Die Hauptklassen dieser Peptide beim Menschen sind die Cathelicidine und die Defensine [Lie´vin-Le Moal, 2006; Wehkamp, 2007]. Das einzige Cathelicidin, das bisher beim Menschen identifiziert worden ist, ist das auch LH-37 genannte *Human Cationic Protein* 18 kDa [Dann, 2007]. Dieses Protein wird von den Epithelzellen des Magens, des Ileums und in den oberflächlichen Krypten des Kolonepithels exprimiert.

Defensine sind endogene antibiotisch wirksame Peptide, die in zahlreichen Organsystemen wie Lunge, Haut, Auge, Uro- und Gastrointestinaltrakt vorkommen [Fellermann, 2001; Dommett, 2005]. Die Defensine sind kationische Peptide aus 30-42 Aminosäureresten und haben Molekulargewichte ( $M_r$ ) von 3-5 kDa. Ihre kodierende genetische Information befindet sich auf Chromosom 8. Allen gemeinsam ist das Vorhandensein von drei Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Cysteinresten. Die intramolekulare Position dieser Brücken ermöglicht eine Unterscheidung zwischen  $\alpha$ -Defensinen,  $\beta$ -Defensinen (HBD), und  $\theta$ -Defensinen (Tabelle 2).

Tabelle 2: **Zuordnung von Defensinen des Menschen** nach [Dommett, 2005; Fellermann, 2001; Schmid, 2004].

Gruppe	Defensin	Herkunft	Expression	Zielorganismen
$\alpha$	HNP-1; -2, -3, -4	Granulozyten		
	HD-5	Panethzellen	induzierbar	<i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Listeria monozytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
	HD-6	Panethzellen		
$\beta$	HBD-1	Epithelzellen	konstitutiv	Gram-negative Bakterien
	HBD-2	Epithelzellen	induzierbar	Gram-positive/Gram-negative Bakterien, <i>Candida spec.</i>
	HBD-3	Epithelzellen	induzierbar	Gram-positive/Gram-negative Bakterien, <i>Candida spec.</i>
	HBD-4	Epithelzellen		Gram-positive/Gram-negative Bakterien, <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

## Einleitung

Bisher wurden beim Menschen sechs  $\alpha$ -Defensine identifiziert. Vier der  $\alpha$ -Defensine wurden in hohen Konzentrationen in den Granula von Granulozyten gefunden, wo sie der nicht-oxidativen Abtötung phagozytierter Mikroorganismen dienen. Deswegen sind diese Defensine auch als humane neutrophile Peptide (HNP)-1 bis HNP-4 bekannt [Ganz, 1998]. Der zweite wichtige Produktionsort humaner  $\alpha$ -Defensine sind die Paneth-Zellen, die in den Krypten des Dünndarms lokalisiert sind. Die Paneth-Zellen exprimieren die  $\alpha$ -Defensine HD-5 und HD-6, die eine sehr wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Mukosa-Barriere spielen [Salzman, 2007]. Sie regulieren die mikrobielle Dichte im Dünndarm, schützen die benachbarten Stammzellen in den Krypten und verhindern die Invasion pathogener Keime [Ayabe, 2000]. Neuere Studien haben gezeigt, dass ein zusätzlicher im Dünndarm vorhandener Zelltyp, die Becherzellen, auch HD-5 sezerniert [Cunliffe, 2001].

Die Regulation und Expression der humanen Defensine ist gegenwärtig Thema intensiver Forschungen. Die HNP werden in den Promyelozyten im Knochenmark als Propeptide synthetisiert und als bioaktive Moleküle in zirkulierenden Neutrophilen gespeichert [Ganz, 1987]. Im Gegensatz dazu wird das HD-5 in den Granula der Paneth-Zellen zusammen mit dem Enzym Trypsinogen als ein Propeptid gespeichert, das für die Aktivierung des Defensins verantwortlich ist [Ghosh, 2002]. Die Expression der  $\alpha$ -Defensine aus den Paneth-Zellen wird durch eine Reihe von Stimuli getriggert wie LPS, proinflammatorische Zytokine und cholinerge Agonisten [Ouellette, 2004].

Die HBD-1 bis HBD-4 sind epithelialen Ursprungs und kommen insbesondere in Haut, Lunge und Darm vor [Schmid, 2004]. Im Darm werden sie von den Epithelzellen der Krypten, der Lumenoberfläche und der Villi im gesamten Dünndarm und Kolon sezerniert [O'Neil, 1999]. Das HBD-1 wird im gesamten gastrointestinalen Trakt konstitutiv exprimiert und dient als Überwachungsmolekül der epithelialen Homöostase [Bajaj-Elliott, 2002].

Der Zusammenhang zwischen TLR und der Produktion antibakterieller Peptide wurde schon in einer Reihe von Studien untersucht. Es wurde gezeigt, dass das Flagellin-Filament der *Salmonella*-Enteritis die Produktion von HBD-2 in den intestinalen Epithelzellen induziert [Takahashi, 2001; Ogushi, 2001]. Durch die Aktivierung von TLR-2 und TLR-4 wird die Produktion von HBD-2 sowohl in den Epithelzellen der Luftwege, im Darmepithel als auch in den Keratinozyten der Haut reguliert [Birchler, 2001; Wang, 2003; Kawai, 2002; Hertz, 2003]. Die Defensine HBD-2 und HBD-3 werden erst bei einer Infektion oder unter anderen inflammatorischen Bedingungen sezerniert [George, 2003; Zilbauer, 2004; Wehkamp, 2003]. Ihre Expression wird so reguliert, dass diese Moleküle erst im Fall eines entzündlichen Geschehens entstehen. Neben Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  können auch bakterielle Komponenten wie LPS und Lipoproteine

direkt induzierend wirken [Diamond, 2000; Becker, 2000]. Mittels TLR kommt es in Epithelzellen über den *Nuclear Factor-κB* zu einer Aktivierung der Transkription von Defensinen. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Protein-2*, ein intrazellulärer *Pattern Recognition*-Rezeptor, aktiviert den gleichen Signalweg [Siegmond, 2006].

Defensine haben ein sehr breites antimikrobielles Wirkungsspektrum, das Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) oder Vertreter der Gattungen *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Chlamydia*, und *Treponema*, Gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, säurefeste Stäbchen wie *Mycobacterium tuberculosis*, Pilze wie *Candida albicans*, umhüllte Viren wie Herpes-Viren, Protozoen wie *Giardia lamblia* und das humane Immundefizienzvirus umfasst [Schmid, 2004.].

Im Gegensatz zu den bekannten Wirkmechanismen vieler antimikrobieller Stoffe (vgl. Punkt 1.1) ist noch nicht genau verstanden, wie Defensine das Bakterienwachstum verhindern. Die Abbildung 1 zeigt schematisch die Möglichkeiten der Interaktion der kationischen Defensine mit bakteriellen Membranen, die gegenwärtig diskutiert werden.

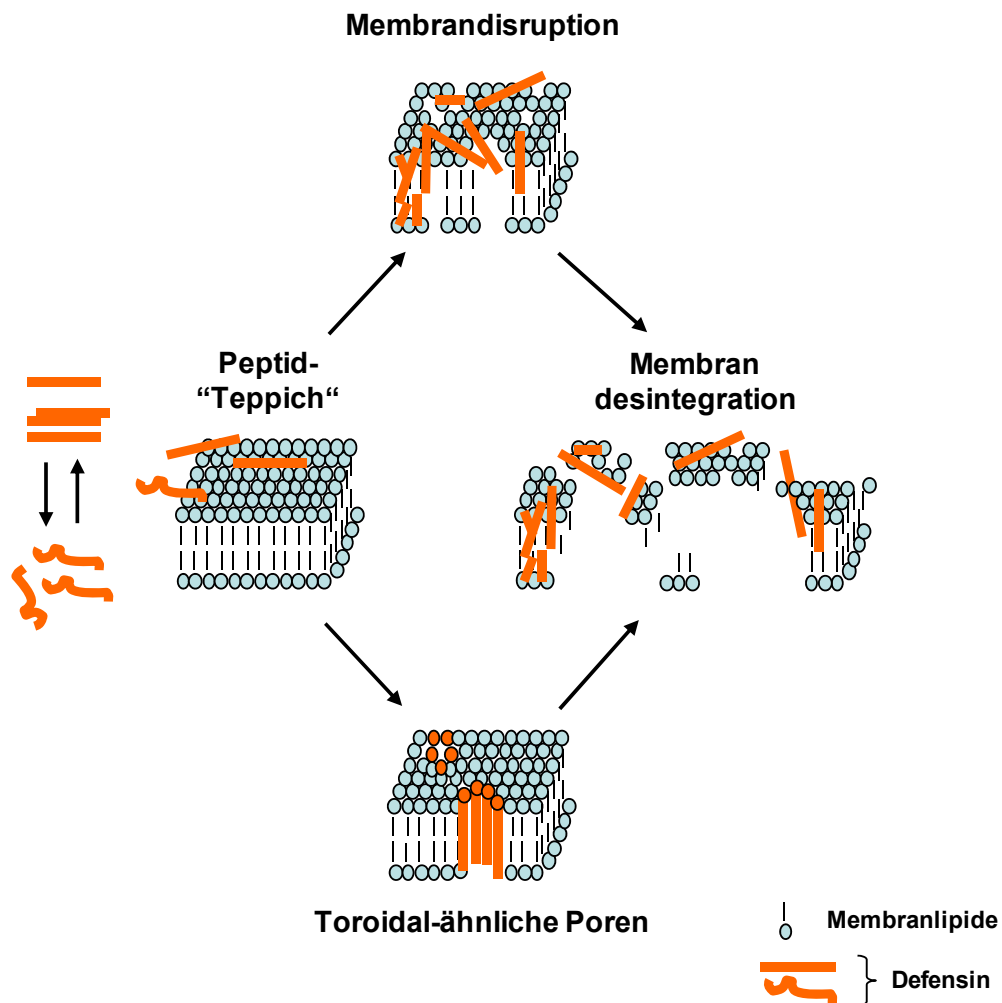


Abbildung 1: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen der Defensinwirkung auf bakterielle Membranen nach [O’Neil, 1999 und Ganz, 2003].

Man geht davon aus, dass die Defensine aufgrund ihrer polaren Natur in Phospholipidmembranen eindringen können und entweder allein oder nach Bildung von Komplexen mit Molekülen der bakteriellen Zellmembran Poren bilden. Die positive Ladung der Defensine führt zu einer elektrostatischen Bindung an die fremde Oberfläche. Es bilden sich Mikroporen, die einen Zusammenbruch des homöostatischen Gleichgewichts sowie schließlich ein Absterben des Fremdorganismus verursachen [Brown, 2005].

Defensine verfügen neben ihrer antimikrobiellen Wirkung auch über chemotaktische Eigenschaften. Sie können dendritische Zellen und Gedächtnis-T-Zellen an den Ort entzündlicher Geschehen in der Darmmukosa rekrutieren und aktivieren. Damit vernetzen sie die primäre, eher unspezifische, angeborene Immunität mit der spezifischen, erworbenen humoralen und zellulären Immunabwehr [Jan-Michel, 2003].

### **1.4 Defensine in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED)**

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gehören Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Enterocolitis regionalis Crohn ist eine chronische, alle Wandschichten des Darms umfassende, granulomatöse Entzündung mit bevorzugter Lokalisation im terminalen Ileum und Kolon. Die Colitis ulcerosa ist eine diffuse chronische mit Ulzerationen einhergehende Erkrankung der Kolonschleimhaut. Die Erkrankung beginnt im Rektum und breitet sich kontinuierlich nach oral aus [Swan, 1998]. Die Pathophysiologie der CED ist nicht abschließend geklärt. Bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa handelt sich um multifaktorielle Geschehen, dessen Entstehung auf der komplexen Interaktion genetischer Prädisposition, verschiedener Umweltfaktoren sowie veränderter Immunreaktionen beruht. Die klinischen Merkmale der CED, die histopathologischen Befunde und die therapeutische Effizienz der immunsuppressiven Medikation weisen auf eine wesentliche Rolle des Immunsystems in der Pathogenese dieser Erkrankungen hin [Strober, 2007]. Die gegenwärtig am häufigsten diskutierten Hypothesen basieren bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa darauf, dass die primäre Dysregulation des mukosalen Immunsystems zu einer übermäßigen immunologischen Reaktion gegen die normale Darmflora führt, die wiederum die Grundlage für die chronische Entzündung darstellt [Bevins, 1999]. Verschiedene Komponenten des mukosalen Immunsystems sind in der Pathogenese der CED beteiligt. Diese beinhalten luminal Antigenen, intestinale Epithelzellen, Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität und durch sie sezernierte Mediatoren [Shih, 2008].

Eine nicht mehr intakte epitheliale Barriere und eine Dysfunktion in der Toleranzentwicklung gegenüber luminalen Antigenen des Darms führen zur Aktivierung

der angeborenen Immunität. Eine mögliche Grundlage für die Entstehung der CED sind genetische Defekte, die zu einer pathologisch überschießenden Antwort gegen Bestandteile der normalen mukosalen Mikroflora führen [Siegmund, 2006; Shih, 2008]. Die veränderte Expression oder die verminderte antibakterielle Wirksamkeit der Defensine könnte zu einer vermehrten bakteriellen Invasion in die Darmschleimhaut führen, die das immunologische Agens für die Entstehung der CED stellen und als eigentliche Ursache für die inadäquate Entzündungsantwort betrachtet werden könnte [Kübler, 2006].

Bereits gezeigt werden konnte, dass bei Morbus Crohn mit Beteiligung des terminalen Ileums eine verminderte Expression von HD-5 und HD-6 vorliegen und im entzündeten Kolon die fehlende Induktion von HBD-2 und HBD-3 sowie eine Abnahme des HBD-1 zu einem Defizit der Schleimhautbarrierefunktion führt [Fellermann, 2003]. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Morbus Crohn als ein Defensin-Mangelsyndrom anzusehen ist. Der Zusammenhang zwischen der Pathogenese der Colitis ulcerosa und der Expression von Defensinen im Darmepithel ist Objekt weiterer intensiver Forschungsarbeit [Wehkamp, 2003; Schmid, 2004; Wehkamp, 2005].

### **1.5 Humanes $\beta$ -Defensin (HBD)-2 im Darm bei CED**

Das HBD-1 wird konstitutiv exprimiert und nicht durch inflammatorische Stimuli induziert. Es ist sowohl in entzündeten als auch im gesunden Kolon nachweisbar [O'Neil, 1999]. Interessant ist, dass die Produktion von HBD-1 beim Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zu den nicht-entzündeten Darmproben vermindert ist [Schmid, 2004; Strober, 2007]. Das HBD-2 ist im nicht-entzündeten Darm nicht nachweisbar und wird im Gegensatz zu HBD-1 durch inflammatorische Stimuli induziert. Sowohl HBD-2 als auch HBD-3 sind bevorzugt im entzündeten Dickdarm, insbesondere im Kolon von Patienten mit Colitis ulcerosa, zu finden. Im Gegensatz dazu sind HBD-2 und HBD-3 im entzündeten Dickdarm von Patienten mit Morbus Crohn deutlich weniger nachweisbar und adäquate Anstiege beider antimikrobieller Peptide fehlen [Gersemann, 2008; Wehkamp, 2002; Fellermann, 2003]. Die fehlende Induktion der beiden Defensine, die koordiniert reguliert werden, könnte einen funktionellen Defekt in der antibakteriellen Barriere der Kolonmukosa verursachen, der zur bakteriellen Adhärenz und mukosalen Invasion führt.

Das Wissen über die Mechanismen, die zur Dysregulation der induzierbaren Defensine oder zum Verlust ihrer antibakteriellen Aktivität führen, könnte zum Verständnis der Pathogenese der CED und des therapeutischen Potentials von  $\beta$ -Defensinen beitragen [Salzman, 2007; Müller, 2005; Fellermann, 2003].



## 1.6 Nachweismethoden für antibakterielle Wirkungen

Eine wichtige Theorie zur Ätiologie der CED basiert auf der Annahme, dass die endogenen antibakteriellen Peptide, wie die Defensine, vermindert aktiv sind, Bakterien die Darmmukosa infiltrieren und überschießende, unkontrollierte immunologische Reaktionen im Epithel verursachen [Müller, 2005].

Für die Untersuchung der Produktion humaner Defensine im Darm von CED-Patienten und ihrer Rolle in der Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist ein sensitiver spezifischer Nachweis der antibakteriellen Wirkung von Defensinen erforderlich.

Substanzen, die das Bakterienwachstum hemmen, wirken bakterio­statisch. Substanzen, die Bakterien auch außerhalb ihrer Vermehrungsphase abtöten, wirken bakterizid. Die Unterscheidung zwischen bakterizider und bakterio­statischer Wirkung wird durch das Verhältnis zwischen minimaler bakterizider Konzentration (MBK) und minimaler Hemmstoffkonzentration (MHK) bestimmt [Nicolau, 2003; Levison, 2000]. Die MHK ist die niedrigste Konzentration, bei der Bakterien sichtbar in ihrem Wachstum im Plasma oder Gewebe des Patienten gehemmt werden. Die MBK ist die niedrigste Konzentration, die 99,9% der Bakterien im Plasma oder Gewebe abtötet. Antibakterielle Substanzen mit einem MBK/MHK-Verhältnis  $<4$  werden als bakterizid eingestuft. Antibakterielle Substanzen mit einem höherem MKB/MHK-Verhältnis töten vorhandene Bakterien überwiegend in ihrer Vermehrungsphase ab und werden als bakterio­statisch bezeichnet [Hessen, 2000; Rotschafer, 1992].

Übliche Methoden für die qualitative Erfassung der Wirksamkeit antibakterieller Substanzen sind die Mikrodilution und die radiale Diffusion. Bei der Mikrodilution werden Titrationen antimikrobieller Stoffe in Versuchsansätzen mit Mikrotiterplatten und flüssigen Medien getestet [Tilton, 1974; Stobberingh, 1987]. Die radiale Diffusion geht davon aus, dass lösliche Substanzen von einem definierten Punkt aus durch verfestigte Nähmedien diffundieren und dort das Wachstum aufliegender Indikatororganismen verhindern [du Toit, 2000]. Eine semiquantitative Methode ist die Zählung der sogenannten Koloniebildenden Einheiten (CFU), also der nach Inkubation mit den antimikrobiellen Substanzen aus jeweils einem Bakterium unter definierten Kulturbedingungen hervorgegangenen Einzelkolonien [Mattie, 1981]. Alle Methoden wurden auch in Studien mit verschiedenen Defensinen verwendet. Mit Hilfe der radialen Diffusion wurde die antibakterielle Aktivität von HNP-1, HNP-2 und HNP-3 untersucht [Takemura, 1996]. Die Mikrodilution wurde zum Nachweis der biologischen Wirkung von HBD-3 angesetzt, während das HD-5 eine Breitspektrum-Aktivität bei der Bestimmung der CFU aufwies [Porter, 1997].

Neben diesen weit verbreiteten Methoden ist die Densitometrie die wichtigste Technik zur quantitativen Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von Defensinen [Xu, 2006(1);

Xu, 2006(2)]. Diese beruht auf dem Prinzip verminderter Trübung einer wachsenden Bakterienkultur in Folge einer antibakteriellen Behandlung. Die Densitometrie wird häufig auch in der Pharmakologie für die Untersuchung der biologischen Aktivität von Antibiotika verwendet. Beispiele dafür sind der Nachweis der antibakteriellen Wirkung von Ampicillin [Bartzatt, 2004] und Streptomycin-Derivaten [Abad, 1987]. Man bestimmt hier photometrisch die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm und einem Messweg von 1 cm ( $OD_{600}$ ). In dieser Methode wird das bakterielle Wachstum auf der Ebene der Gesamtpopulation bewertet. Sie gibt keinen Hinweis auf den Angriffspunkt des antibakteriellen Prinzips. Aus der logarithmischen Beziehung von  $OD_{600}$  und Konzentration der antibakteriellen Substanz ergibt sich die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) des entsprechenden Stoffes [Xu, 2006(1)]. Die  $IC_{50}$  dient dem Vergleich der Wirksamkeit aller Agenzien, die mit dieser Methode getestet werden und erlaubt aussagekräftige Schlussfolgerungen über ihre antibakterielle Potenz.

### 1.7 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Nachweis direkter antibakterieller Wirkung humaner Defensine experimentell zu etablieren, der Untersuchungen der Defensinproduktion im Darm von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ermöglicht.

Dabei waren folgende Fragen bedeutsam:

- Welches rekombinante HBD-2-Fusionsprotein ist als Standardmolekül in einem Nachweissystem geeignet? Können antimikrobielle rekombinante Fusionsproteine von HBD-2 in *E. coli* produziert werden?
- Unter welchen Bedingungen kann die antimikrobielle Aktivität von HBD-2 mit einer densitometrischen Methode nachgewiesen werden? Wie lauten die optimierten Kulturbedingungen für *E. coli* JM109?
- Aus welchem molaren Konzentrationsbereich und unter welchen Bedingungen kann die antibakterielle Aktivität von HBD-2-Fusionsproteinen direkt im densitometrischen Ansatz gezeigt werden? Beeinflusst der Fusionspartner die antibakterielle Aktivität von HBD-2 als experimentelle Kontrolle zum direkten Nachweis der Wirkung von Defensinen?
- Unter welchen Bedingungen können die für den Nachweis der antimikrobiellen Aktivität notwendigen HBD-2-Mengen aus bestimmten Darmabschnitten von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa dargestellt werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, DE
Acetonitril	Merck, Darmstadt, DE
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung, 37:1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Affinitätsmatrix: Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Agarose, Standard für die Molekularbiologie	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Aktivkohle	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, DE
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<i>Antarctic</i> Phosphatase, 5.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt/M., DE
Antikörper: Aktin-spezifisch, Klon AC-15, IgG aus Maus, unkonjugiert.	Sigma-Aldrich, St Louis, US
Antikörper: HBD-2-spezifisch, polyklonal, IgG aus Ziege, unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US
Antikörper: spezifisch für Maus IgG, polyklonal, aus Kaninchen, Meerrettichperoxidase konjugiert	Dako, Hamburg, DE
Antikörper: spezifisch für Ziege IgG(Fc), polyklonal, aus Esel, Meerrettichperoxidase konjugiert	Jackson ImmunoResearch West Grove, US
Bacto-Agar	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Bacto-Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Blockierungsreagenz, proteinfrei	Roche, Mannheim, DE
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, DE
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, DE
Chromatografiesäule: Glutathion-Sepharose GST Trap <sup>TM</sup> FF (GST Trap)	GE Healthcare, München, DE
Chromatografiesäule: Sephadex G-25 (PD-10)	GE Healthcare, München, DE
Coomassie <i>Brilliant Blue</i> R-250 (Coomassie)	Merck, Darmstadt, DE
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen, DE
DNA-Polymerase AmpliTaq <sup>®</sup> mit PCR-Puffer 10fach konzentriert und 50 mM MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
DNase I-Lösung	Promega, Mannheim; DE
Eisessig	Merck, Darmstadt, DE
Entwicklungsreagenz für Chemilumineszenz; Lumi-Light <sup>PLUS</sup>	Roche, Mannheim, DE
Ethanol, reinst	Merck, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid-Lösung, 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethylendiamin-tetra-Essigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, DE
Glukose	Merck, Darmstadt, DE
Glutathion, reduziert	Fluka, Buchs, CH
Glycerol	Merck, Darmstadt, DE

## Material und Methoden

Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Größenstandard für DNA: 100 bp DNA-Leiter, extended (Marker)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Größenstandard für Proteine: <i>Color Marker Ultra-Low Range</i> , 1.060-26.600 Da (M2)	Sigma, Deisenhofen, DE
Größenstandard für Proteine: <i>Page Ruler™, Prestained Protein Ladder</i> , 11-170 kDa (M1)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Guanidin-HCl	Merck, Darmstadt, DE
HBD-2, rekombinant aus <i>E. coli</i>	Strathmann, Hamburg, DE
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kit für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit Bicinchoninsäure (BCA) einschließlich Serumalbumin (BSA)-Standard	Pierce, Bonn, DE
Kit für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen PureLink Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Kits für die Plasmid-Präparation; Mini: Nucleospin, Maxi: Nucleobond	Macherey Nagel, DE
LB-Agar nach Lennox	Carl Roth, Karlsruhe, DE
LB-Medium nach Lennox	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Lysozym	Merck, Darmstadt, DE
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen, DE
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, Buchs, CH
NaCl	Sigma, Deisenhofen, DE
NaN <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, DE
NaOH	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4; sterile Lösung	PAA Laboratories, Cölbe, DE
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen, DE
Reagenz für die Bakterienlyse <i>Bug Buster</i> , 10fach konzentriert	Novagen-Merck, Darmstadt, DE
Restriktionsendonukleasen <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI und <i>Hind</i> III, jeweils 2x10 <sup>4</sup> U/ml mit Restriktionspuffer 10fach konzentriert	New England Biolabs, Frankfurt/M., DE
HCl	Merck, Darmstadt, DE
Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP (dNTP)	Peqlab, Erlangen, DE
T4-DNA-Ligase, 4x10 <sup>5</sup> U/ml, mit Ligasepuffer 10fach konzentriert	New England Biolabs, Frankfurt/M., DE
Thrombin	GE Healthcare, München, DE
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan Base (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, DE

## Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien Reagenzien und Lösungen hatten den höchsten verfügbaren Reinheitsgrad.

### 2.2 Materialien und Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, DE
Anlage für <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> (FPLC)	LKB Pharmacia, Uppsala, SE
Autoklav; Varioklav 500E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
<i>Blotting</i> -Papier	BioRad, München, DE
Brutschrank, 37°C	Bachofer, Reutlingen, DE
Einfrieröhrchen, Polypropylen, 2 ml	Nunc, Roskilde, DK
Einmalküvette, Polystyren, 1,5 ml	Brand, Wertheim, DE
Eisbereiter	Scotsman, Bettolino di Poliano, IT
Gradientenmischer für Polyacrylamidgele	BioRad, München, DE
Gerät für die Detektion der Chemilumineszenz; LAS 1000 Detektion mit Programm Image Reader	Fujifilm Life Sciences, Düsseldorf, DE
Horizontal-Schüttler für 50-200 rpm, GFL 3017	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Kammern für die horizontale Agarose-Gel- elektrophorese; Model B2	Owl Separation Systems Portsmouth, US
Photometer für Mikrotiterplatten mit Programm EasyWinFitting	Tecan Deutschland, Crailsheim, DE
Kammer für vertikale Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE); Mini-Protean II mit Gelgießeinrichtung	Bio-Rad, München, DE
Kühlschrank, 4°C	Liebherr, Biberach, DE
Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße 0,5-2 ml; Biofuge fresco	Heraeus/Kendro, Hanau, DE
Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge, CH-J2 ME	Beckman, Krefeld, DE
Kühlzentrifuge; Megafuge 2.0R	Heraeus/Kendro, Hanau, DE
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart, DE
Perfusorpumpe	B.Braun, Melsungen, DE
pH-Meter; 766 Calimatic mit Einstab-Meßelektrode	Knick, Berlin, DE
Membran für den Western-blot; Polyvinylidendifluorid Westran S, 0,22 µm	Whatman Schleicher & Schüll, Dassel, DE
Reibeschale und Pistill	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Schüttelinkubator; TH25 mit Temperierhaube	Edmund Bühler, Hechingen, DE
Spektrophotometer; Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Stromversorger; 2301 Macrodrive 1	LKB, Bromma, SE
Thermocycler; PTC100	Research, Waltham, US
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr, Biberach, DE

## Material und Methoden

Tiefkühlschrank -80°C	Forma Scientific, Karlsruhe, DE
Ultraschallbad	VWR, Darmstadt, DE
Ultraschallgerät mit Geltip-Sonde	Bandelin, Berlin, DE
Mixer, Vortex Reax 2000	Heidolph, München, DE
Wasserbad	VWR, Darmstadt, DE
Faltenfilter aus Zellulose, mittelschnell filtrierend	Whatman Schleicher & Schüll, Dassel, DE
Mikrotiterplatte, 96-Loch, Flachboden	Nunc, Roskilde, DK
Polaroid-Filme	Polaroid, Minnetonka, US
Quarzglasküvetten	Hellma, Mülheim, DE
Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm	Whatman Schleicher & Schüll, Dassel, DE
Anlage zur Herstellung von VE-Wasser	Millipore, Bedford, US
Bunsenbrenner; Typ 1040, Erdgas	Usbeck Laborgeräte über Roth, Karlsruhe, DE
Flachbettscanner; OpticPro 64+ mit Programm OpticTwain	Plustek, Norderstedt, DE
Folienschweißgerät	LKB Wallac, Uppsala, SE
Gefriertrocknungsanlage; Beta 1-8K	Christ, Osterode, DE
Inkubator; 400H4	Bachofer, Reutlingen, DE
Magnetrührer; Ikamag RH	IKA, Staufen, DE
Multipette mit Combitips	Brand, Wertheim, DE
Oberschalenwaage	Kern, Balingen-Frommern, DE
Programm: Adobe PhotoShop 7.0	Adobe Systems, München, DE
Programm: Image J	National Institutes of Health, Bethesda, US
Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom; Herasafe 1.8	Kendro, Langenselbold, DE
Tank-Transfereinheit; Hoefer TE 22	Amersham Biosciences, Heidelberg, DE
Thermostatischer Zirkulator; 2219 Multitemp II	LKB Wallac, Uppsala, SE
Transilluminator mit Dunkelschacht und Polaroid-Aufsatzkamera	Kurt Migge Labortechnik, Heidelberg, DE
Schutzschild für ultraviolettes Licht	VWR, Darmstadt, DE
Werkbank für Nukleinsäurearbeiten; Captair bio	Erlab, Köln, DE

### 2.3 Gewebeproben

Alle Proben aus dem Darm von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und kolorektalem Karzinom wurden mit Einverständnis der Patienten in der Chirurgischen Klinik I, Campus Benjamin Franklin, Charité - Universitätsmedizin Berlin bearbeitet. Alle Proben stammten aus therapeutischen chirurgischen Eingriffen, die nicht eigens für diese Untersuchungen im Magen-Darm-Trakt von Patienten reseziert wurden und durch die Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin genehmigt waren.

## Material und Methoden

<i>Herkunft</i>	<i>Zustand/Diagnose</i>	<i>Anzahl Proben</i>
Duodenum, Jejunum, terminales Ileum	gesund	10
Kolon	gesund*	20
terminales Ileum	entzündlich/Morbus Crohn	10
Kolon	entzündlich/Morbus Crohn	10
Kolon	entzündlich/Colitis ulcerosa	10

\* Proben aus gesunden Darmbereichen von Patienten mit kolorektalem Karzinom

### 2.4 Oligonukleotide und Sequenzierung

Als Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. für die Sequenzierung verwandte Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, DE) bezogen.

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' - 3')</i>
sense <i>Bam</i> HI	CTCTTCCAGGTGGATCCGGTGGTATAGG
antisense <i>Eco</i> RI	GCTTCTTGGCCGAATTCTGGCTTTTTGC
antisense <i>Hind</i> III	GCTTCTTGGCCTAAGCTTGGCTTTTTGC
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

### 2.5 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, zirkuläre DNA-Elemente. Im Labor werden zusammengesetzte Plasmidvektoren für die Klonierung und Expression verwendet. Solche Vektoren enthalten neben einem Resistenzgen einen bakteriellen Replikationsursprung, der eine autonome Vermehrung des Plasmids in der Bakterienzelle ermöglicht.

Alle Klonierungsarbeiten in der Sicherheitsstufe 1 nach Gentechnikgesetz und Gentechnik-Sicherheitsverordnung wurden in der gentechnischen Anlage der Medizinischen Klinik I, Campus Benjamin Franklin, Charité - Universitätsmedizin Berlin (Aktenzeichen: VC 112-5907/1.0.0-21/91) durchgeführt. Klonierte PCR-Produkte wurden unter Verwendung der M13-spezifischen Primer durch die Firma SeqLab (Göttingen, DE) sequenziert. Eine cDNA aus HT-29-Zellen wurde freundlicherweise von Annekatrin Coordes zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Plasmide verwendet.

Name	Eigenschaften und Funktion	Hersteller
pCR2.1-TOPO (pCR2.1)	Topoisomerase-vermittelte Ligation von PCR-Produkten, Sequenzierung mit M13-Standardprimern	Invitrogen, Karlsruhe, DE
pGEX-2T	Prokaryontische Expression von Fusionsproteinen mit der Glutathion-S-Transferase (GST), carboxyterminale Fusion	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, FR
pQE30	Prokaryontische Expression von Fusionsproteinen mit sechs Histidinresten (His), carboxyterminale Fusion	Qiagen, Hilden, DE

## 2.6 Stämme von *E. coli*

Alle verwandten Stämme waren als Laborstämme Abkömmlinge von *E. coli* K12 und wurden von der Firma <sup>§</sup>Promega (Mannheim, DE) bzw. <sup>‡</sup>Invitrogen (Karlsruhe, DE) bezogen.

Bezeichnung	Genotyp
JM109 <sup>§</sup>	F' traD36 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17
TOP10 <sup>‡</sup>	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 λ <sup>-</sup>
BL21 Star™(DE3)pLysS <sup>‡</sup> (BL21)	F- ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm rnel31 (DE3)pLysS (Cam <sup>r</sup> )

## 2.7 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur

Die *Lysogeny broth* (LB) ist eine komplexe Nährlösung zur Anzucht von Bakterien und verschiedene Typen unterscheiden sich nur in der Salzkonzentration [Bertani, 1951]. LB-Medium nach Lennox (LB-Lennox) hat eine hohe Konzentration von NaCl und ist das in der Molekularbiologie am häufigsten verwendete Medium zur Anzucht von Laborstämmen von *E. coli*.

LB-Lennox:	5 g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l Bacto-Trypton 5 g/l NaCl
LB-Agar:	LB-Lennox mit 15 g/l Bacto-Agar



## Material und Methoden

Transformationsmedium:	LB-Lennox 20 mM Glukose 20 mM MgCl <sub>2</sub>
Ampicillin-Stammlösung:	100 mg/ml Ampicillin
Selektionsmedium:	LB-Lennox mit 100 µg/ml Ampicillin
Selektionsagar:	LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Luria:	5 g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l Bacto-Trypton 0,5 g/l NaCl
2x YT-Medium:	1 g/l Bacto-Trypton 16 g/l Bacto-Hefeextrakt 10 g/l NaCl

Die Komponenten für das entsprechende Medium wurden eingewogen und in 800 ml *A. dest.* gelöst. Die Wasserstoffionen-Konzentration wurde kontrolliert und ggf. vor dem Auffüllen der Lösung mit *A. dest.* auf 1 l durch 1 M HCl/1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Die Medien wurden bei 121°C und 1 atm Überdruck 25 min autoklaviert. Nach dem Sterilisieren lag der pH-Wert zwischen 7,2 und 7,5. Nach dem Abkühlen auf ca. 65°C wurden jeweils 15 ml LB-Agar unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (ø 10 cm) gegossen. Für den Selektionsagar wurde eine entsprechende Menge der Ampicillin-Stammlösung dem abgekühlten LB-Agar kurz vor dem Gießen zugesetzt. Nach dem Erkalten wurden die Petrischalen bei 4°C im Kühlschrank gelagert und bis zu 4 Wochen verwendet. Unmittelbar vor der Verwendung wurden sie maximal 20 min im Luftstrom der Sicherheitsbank getrocknet. Alle anderen Medien wurden bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 2 Wochen verwendet.

Für das Transformationsmedium wurde LB-Lennox mit Glukose und MgCl<sub>2</sub> gemischt, sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Medien LB-Lennox 1:6 und LB-Lennox 1:3 wurden unter sterilen Bedingungen unmittelbar vor der Verwendung aus autoklavierten Einzelkomponenten, also 10 ml LB-Lennox und 50 ml bzw. 20 ml *A. dest.*, zusammengestellt.

### 2.8 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte *in vitro*. Wichtigste Voraussetzung ist die Temperaturbeständigkeit der DNA-Polymerase, die ursprünglich aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wurde. Nukleinsäuredoppelstränge werden bei 95-99°C aufgeschmolzen (Denaturierung). Anschließend lagern sich spezifische Sense- und Antisense-Primer an den komplementären Bereichen der Einzelstränge (*Annealing*). Die *Annealing*-Temperatur wird durch den GC-Gehalt, die Länge und die Passfähigkeit dieser Oligonukleotide

## Material und Methoden

bestimmt. Sie liegt üblicherweise im Bereich von 50-72°C und wird, um unspezifische Vervielfältigung zu vermeiden, so hoch wie möglich gewählt. Im dritten Schritt synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase, von den Primern ausgehend, neue komplementäre Stränge (*Extension*). Die *Taq*-Polymerase denaturiert nicht bei 95-99°C und behält ihre enzymatische Aktivität. In jedem Zyklus aus Denaturierung-*Annealing*-*Extension* verdoppelt sich theoretisch die Anzahl der gewünschten Moleküle. Wiederholt man diesen Zyklus zum Beispiel 35mal, entstehen aus einem definierten Einzelstrang  $2^{35}$  ( $= 3,4 \times 10^{10}$ ) identische Kopien. Nach Beendigung der Kettenreaktion stabilisieren sich die DNA-Doppelstränge bei 72°C und die Polymerase synthetisiert an den Strangenden 3'-überhängende Adenosinreste (*Final Extension*) [Saiki, 1985]. Für alle Arbeiten mit RNA oder DNA wurde Diethylpyrocarbonat-behandeltes [Fedorcsak, 1966], autoklaviertes, voll entsalztes Wasser verwendet, das mit *A. dest.* bezeichnet wird.

<b>Ansatz:</b>	<i>Ausgangs-</i> <i>konzentration</i>	<i>Volumen</i>
PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl)	10x	5 µl
dNTP	10 mM	1 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 µl
Primer: sense <i>Bam</i> HI	10 µM	2,5 µl
Primer: antisense <i>Eco</i> RI oder antisense <i>Hind</i> III	10 µM	2,5 µl
Ampli <sup>®</sup> Taq	5 U/µl	0,2 µl
cDNA	625 ng/µl	5 µl
<i>A. dest.</i> ad 50 µl		32,3 µl

Die Reaktion erfolgte nach folgendem Schema im *Step-cycle*-Modus:

<i>Reaktionsschritt</i>	<i>Anzahl der Zyklen</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i> (°C)	
Initiales Denaturieren	1	4 min	95	
Amplifikation	Denaturierung	30 sec	95	
	<i>Annealing</i>	30	45 sec	55
	<i>Extension</i>		90 sec	72
<i>Final Extension</i>	1	7 min	72	

Alle PCR-Reaktionsansätze für HBD-2 wurden einer zweiten PCR zugeführt. Es wurde 1 µl der DNA aus dem Ansatz der ersten PCR und 9 µl frischer PCR-Mix für weitere 30 Zyklen im Thermocycler inkubiert. Alle Reaktionsansätze wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.9 Transformation und Screening transformierter *E. coli***

Die Zellumhüllung von Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase wird in Gegenwart hoher Konzentrationen zweiwertiger Ionen durchlässig für Makromoleküle, wie z.B. DNA. Die Bakterien werden „kompetent“. Der Zusatz von Glycerol und Dimethylsulfoxid zum Transformationspuffer stabilisiert die Zellstruktur und verhindert die Bildung von Kristalleis beim Einfrieren [Hanahan, 1983]. Ringförmig geschlossene Plasmid-DNA lagert sich an die Zellhülle kompetenter Bakterien und tritt während der Erwärmung auf 42°C in die Zelle über. In flüssigem Medium ohne Antibiotika und mit Glukose, die die Viskosität des Mediums erhöht, kann sich die Zellumhüllung rekonstruieren und die Resistenz etablieren. Auf antibiotikahaltigen Kulturmedien können nur solche Bakterienzellen zu Kolonien auswachsen, die mit dem aufgenommenen Plasmid auch das Gen für eine Antibiotikaresistenz erhalten haben.

Vor dem Beginn der Arbeiten wurde die Arbeitsfläche gründlich mit vergälltem 70%igem Ethanol gereinigt. Alle Arbeiten wurden in der Nähe der Flamme eines Bunsenbrenners durchgeführt. Die Öffnungen der Gefäße zeigten dabei in Richtung der Brennerflamme. Öffnungen von Glasflaschen wurden grundsätzlich nach dem Öffnen und vor dem Schließen abgeflammt.

Kompetente *E. coli* TOP10 bzw. *E. coli* BL21, die bei -80°C gelagert waren, wurden langsam auf Eis getaut. Zu jeweils 20 µl kompetenter Bakterien wurde maximal 1 µg DNA pipettiert. Die Transformationsansätze wurden 30 min auf Eis und anschließend exakt 90 sec im Wasserbad bei 42°C inkubiert bevor sie für 1 min auf Eis gestellt wurden. Nach der Zugabe von 250 µl Transformationsmedium wurden die Ansätze 1 h bei 37°C und 220 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Aus den Transformationsansätzen wurden 20 µl, 50 µl und 100 µl Bakteriensuspension auf Selektionsagar und 20 µl Bakteriensuspension auf LB-Agar mit einem sterilen Glasspatel plattiert. Die Petrischalen wurden bei 37°C, über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Von diesen Kulturen wurden Ampicillin-resistente Einzelkolonien mit sterilen Pipettenspitzen auf eine Petrischale mit Agarmedium übertragen und die Pipettenspitze anschließend in ein analog beschriftetes Zentrifugenröhrchen mit 2 ml Selektionsmedium überführt. Die beiden Kulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert; die Petrischale im Brutschrank und die Flüssigkeitskulturen in den Zentrifugenröhrchen unter Schütteln bei

220 rpm. Die Petrischale wurde bis zu 2 Wochen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Aus den Flüssigkeitskulturen wurden die Plasmide isoliert.

## 2.10 Klonierung von PCR-Produkten in pCR2.1

Alle PCR-Produkte wurden zunächst in den Vektor pCR2.1 kloniert, bevor das Insert daraus über die mit der PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen in die eigentlichen Expressionsvektoren umkloniert wurden. Die Besonderheit des verwendeten Systems ist die mit einem linearisierten Plasmid verknüpfte Topoisomerase, die zwei DNA-Stränge an ihren Enden miteinander verbinden kann. Topoisomerasen dienen der Relaxation von DNA-Strängen, indem sie Phosphodiesterbindungen spalten und dabei eine kovalente Bindung mit der DNA ausbilden. Durch eine Reaktion mit einer 5'-Hydroxylgruppe des anderen DNA-Stranges wird die Topoisomerase wieder freigesetzt und die DNA-Stränge werden verbunden [Shuman, 1991; Shuman, 1994]. Der verwendete Vektor pCR2.1 hat an den 3'-Enden überhängende Thymidinreste, die komplementär zu den Adenosinresten des PCR-Produktes sind und so die schnelle, ungerichtete Klonierung von PCR-Produkten gestatten [Brownstein, 1996].

<b>Ansatz:</b>	<i>Menge</i>
PCR-Produkt	2 µl
pCR2.1	1 µl
Salzlösung (aus dem Kit)	1 µl
<i>A. dest.</i>	2 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	6 µl

Der Ligationsansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraus wurden anschließend 2 µl in *E. coli* TOP10 transformiert und transformierte Bakterien über die Ampicillinresistenz identifiziert.

## 2.11 Präparation von Plasmid-DNA

### 2.11.1 Puffer und Lösungen

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
 10 mM EDTA  
 100 µg/ml RNase A

Lysepuffer: 200 mM NaOH  
 1% SDS

## Material und Methoden

Neutralisierungspuffer:	2,8 M Kaliumacetat (pH 5,1)
Waschpuffer:	Waschpuffer (firmeneigene Rezeptur)
Equilibrierungspuffer:	100 mM Tris-Phosphat (pH 6,3) 15% Ethanol 900 mM KCl 0,15% Triton X-100
Waschpuffer/Maxi:	100 mM Tris-Phosphat (pH 6,3) 15% Ethanol 1,15 M KCl
Elutionspuffer:	100 mM Tris-Phosphat (pH 8,5) 15% Ethanol 1 M KCl
Ethanol/70%	70% Ethanol absolut mit <i>A. dest.</i>
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,5) 10 mM EDTA

### 2.11.2 Minipräparation

Zur Freisetzung des Zellinhaltes werden die Bakterien mit einem Detergenz lysiert. Durch die alkalischen Bedingungen werden Proteine und Nukleinsäuren denaturiert. Bakterielle RNA wird in diesem Schritt durch eine RNase abgebaut. Denaturierte Proteine, hochmolekulare DNA, Zellreste und SDS werden bei der Neutralisation der Lösung durch einen sauren Kaliumacetatpuffer präzipitiert. Die relativ kleine, kovalent geschlossene Plasmid-DNA renaturiert unter diesen Bedingungen und bleibt in Lösung [Birnboim, 1979]. Aus dem klaren Überstand der Fällung bindet die Plasmid-DNA bei hohen Salzkonzentrationen spezifisch an eine Silicagel-Matrix. Anhaftende Verunreinigungen werden mit einer ethanolhaltigen Lösung mittlerer Salzkonzentration von der Matrix gewaschen. Die Plasmid-DNA wird anschließend bei geringer Salzkonzentration oder salzfrei eluiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 2.000 g und Raumtemperatur. Jeweils 2 ml Übernachtskultur wurden 1 min zentrifugiert und das Sediment in 250 µl Resuspensionspuffer durch Pipettieren resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 250 µl Lysepuffer pipettiert und durch vorsichtiges Kippen maximal 5 min gemischt, bis die Lösung klar erschien. Zu dem Lysat wurden 300 µl Neutralisierungspuffer pipettiert, beides gemischt und anschließend 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde direkt auf eine Spin-Säule pipettiert und diese 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 600 µl Waschpuffer wie oben zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Waschpuffers aus dem Sammelgefäß wurde die nahezu trockene Säule nochmals 1 min zentrifugiert. Danach wurden 50 µl TE-Puffer direkt auf die Säule pipettiert und 1 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Gelöste Plasmid-DNA wurde durch 2 min Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Die Präparationen wurden bei -20°C im Tiefkühler aufbewahrt und direkt für die Restriktion sowie für die Sequenzierung verwendet.

### 2.11.3 Maxipräparation

Um zu sichern, dass nur plasmidhaltige Bakterienzellen in großen Kulturansätzen vermehrt werden, wurden diese auf antibiotikahaltigem Medium unmittelbar vor der Flüssigkultur zur Einzelkolonie ausgestrichen. Eine kurze Vorkultur synchronisiert das Bakterienwachstum, d.h. alle Zellen beginnen die Hauptkultur aus der späten Phase exponentiellen Wachstums [Weide, 1979]. In dem hier verwendeten Prinzip wird die niedermolekulare Plasmid-DNA aus dem klaren Überstand der Fällung bei niedriger Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert durch das negativ geladene Phosphorsäurerückgrat der DNA spezifisch an einen Anionenaustauscher gebunden. Bei mittlerer Salzkonzentration werden gebundene RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen von der Matrix gewaschen. Die Plasmid-DNA wird mit hoher Salzkonzentration eluiert und anschließend durch Fällung mit Isopropanol entsalzt.

Aus einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden 200 ml für 30 min bei 6.000 g, und 4°C zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 12 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Zu dieser Suspension wurden 12 ml Lysepuffer sowie 12 ml Neutralisierungspuffer pipettiert und die Röhrrchen jeweils 3 min bei Raumtemperatur bei langsamen Rotationen um ihre Längsachse inkubiert. Eine Filtrationseinheit bestehend aus einem Faltenfilter, einer Anionenaustauschersäule und einem Sammelgefäß wurde mit 10 ml Equilibrierungspuffer equilibriert. Das komplette Bakterienlysat wurde in den Faltenfilter gegeben. Nach dem Durchlaufen des Filtrates, wurde die Säule mit 32 ml Waschpuffer/Maxi gewaschen und mit 15 ml Elutionspuffer in ein Zentrifugenröhrrchen eluiert. Das Eluat wurde gleichmäßig auf 14 Reaktionsgefäße verteilt und in jedes Röhrrchen 786 µl Isopropanol hinzupipettiert. Beides wurde gut gemischt und 30 min bei 2.000 g und 4°C zentrifugiert. Das durchsichtige Pellet wurde mit 500 µl Ethanol/70% gewaschen und 10 min wie oben zentrifugiert. Die Pellets wurden mit geöffnetem Deckel 15 min unter dem Abzug bei Raumtemperatur getrocknet, und jedes Pellet in 40 µl TE-Puffer aufgenommen. Das Lösen der DNA wurde durch 10 min Inkubation im Wasserbad bei 56°C unterstützt. Schließlich wurden alle DNA-Lösungen vereinigt, die Konzentration bestimmt und die DNA im Tiefkühler (-20°C) aufbewahrt.

## 2.12 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren

Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) und wird spektrophotometrisch bestimmt. Die Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$  ergibt sich aus der bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessenen  $OD_{260}$ , die mit einem nukleinsäurespezifischen Faktor multipliziert wird (DNA: 50; RNA: 40). Kontaminierende aromatische Verbindungen (z.B. Phenol) oder Proteine, die aromatische Aminosäurereste enthalten, absorbieren überwiegend UV-Licht einer Wellenlänge von 280 nm ( $OD_{280}$ ). Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  ist ein Maß für die Qualität von Nukleinsäurepräparationen (DNA: 1,8 bis 1,9; RNA: >1,9) [Sambrook, 1989].

Das Spektrophotometer wurde mit dem Lösungsmittel für die zu messende Probe kalibriert. Bei gemessenen  $OD_{260}$  über 1,0 wurde die Probe soweit verdünnt, dass die  $OD_{260}$  zwischen 0,1 und 1,0 lag. Jede Probe wurde zweimal gemessen und die Konzentration aus dem Mittelwert errechnet.

## 2.13 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind bakteriellen Ursprungs und erkennen spezifische Sequenzen von mindestens vier Nukleotiden in einer doppelsträngigen DNA und spalten hydrolytisch Phosphodiesterbindungen mit überhängenden Einzelstrangenden oder glatten Enden. Da jede dieser Sequenzen nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in einer längeren Basenfolge vorkommt, wird die DNA nach einem charakteristischen Muster fragmentiert. Restriktionsendonukleasen können somit zur Charakterisierung, Identifizierung sowie Isolierung doppelsträngiger DNA-Moleküle eingesetzt werden [Nathans, 1975].

Restriktionspuffer:           1 M Tris-HCl (pH 7,9)  
                                  500 mM NaCl  
                                  100 mM  $\text{MgCl}_2$   
                                  10 mM Dithiothreitol

DNA-Ladepuffer:           10 mM Tris-HCl (pH 7,6)  
                                  60% Glycerol  
                                  60 mM EDTA  
                                  0,03% Bromphenolblau

Für die Analyse enthielt jeder Restriktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  insgesamt 1-2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA, 2  $\mu\text{l}$  Restriktionspuffer und 1  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Restriktionsendonuklease *Bam*HI, *Eco*RI oder *Hind*III. Die Restriktionsansätze wurden 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 5  $\mu\text{l}$  DNA-Ladepuffer für die Gelelektrophorese beendet.

Für die Präparation von DNA-Fragmenten aus Plasmiden wurden 50-100 µg Plasmid-DNA mit 20 µl Restriktionspuffer und 2 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease pro Mikrogramm Plasmid-DNA in Ansätzen von 200 µl zusammengeführt und diese 2 h bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min auf 65°C erhitzt und danach 50 µl DNA-Ladepuffer dazu gegeben.

### 2.14 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Bei neutralem pH-Wert sind Nukleinsäuren negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Große Moleküle werden in einer netzartigen Agarosematrix stärker aufgehalten als kleine oder stark verknäulte Moleküle. Ethidiumbromid lagert sich spezifisch in den Nukleinsäurestrang und dieser wird durch die durch ultraviolettes Licht induzierte Emission des Farbstoffes sichtbar [Helling, 1974].

50x TAE-Puffer:	2 M Tris-Acetat (pH 8,0-8,5) 64 mM EDTA
TAE-Puffer:	20 ml 50x TAE-Puffer 980 ml <i>A. dest.</i>
DNA-Färbelösung:	1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer
DNA-Längenstandard:	100 µg/ml 100 bp-Leiter/extended Größen der Einzelbanden (bp): 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500/500, 400, 300, 200, 150, 100

In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA wurden 1-1,8% Agarose in TAE-Puffer aufgenommen und 10 min bei 160 W in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarosepartikel erhitzt. Die Agaroselösung wurde im Wasserbad auf 65°C temperiert und die Trenngele in die vorbereiteten Elektrophoresekammern gegossen. Nach dem Erkalten des Gelbettes wurden für die Restriktionsanalyse jeweils 20 µl der mit dem DNA-Ladepuffer vermischten Proben in die Auftragesaschen pipettiert; für die Präparation von DNA-Fragmenten wurden 220 µl des Restriktionsansatzes aufgetragen. In jedem Gel wurde in einer weiteren Tasche 1 µg DNA-Längenstandard in 10 µl mit aufgetrennt. Die Trennung erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von 6 V/cm Lauflänge des Gels. Unter leichtem Schütteln bei 80 rpm wurden die Gele 20 min bei Raumtemperatur mit 250 ml DNA-Färbelösung im Dunklen inkubiert. Die gefärbten Gele wurden bei einer Wellenlänge von 366 nm dokumentiert.

### 2.15 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Natriumjodid oder Natriumperchlorat verringern die Schmelztemperatur von Agarose und bringen so die Agarose aus Gelen auch bei Raumtemperatur in Lösung. Unter definierten



Pufferbedingungen bindet darin vorliegende gelöste, anionische DNA an eine Siliziumoxid-Matrix und kann bei geringer Salzkonzentration mit einer wässrigen Lösung von der Matrix abgelöst werden [Vogelstein, 1979].

GS-Puffer: Gelverflüssigungspuffer mit Natriumperchlorat  
(firmeneigene Rezeptur)

Waschpuffer Gel: Ethanolhaltiger Waschpuffer  
(firmeneigene Rezeptur)

Alle Geräte und Materialien wurden vor der Verwendung gründlich gesäubert, mit Ethanol/70% abgewischt und es wurde eine frische DNA-Färbelösung angesetzt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten 1 min bei 2.000 g und Raumtemperatur. Die DNA aus präparativen Restriktionsansätzen wurde im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der gewünschte Gelbereich wurde im ultravioletten Licht mit einem Skalpell als möglichst schmaler Streifen ausgeschnitten, eingewogen und mit 30 µl GS-Puffer pro Milligramm Gel gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden im Wasserbad bei 50°C maximal 15 min inkubiert bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde sukzessive auf Gelextraktionssäulen übertragen und diese jeweils 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Danach wurden 700 µl Waschpuffer Gel auf jede Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Nach Abgießen des Waschpuffers aus dem Sammelgefäß wurden die Säulen nochmals zentrifugiert und die DNA aus den Säulen mit 50 µl auf 65°C erwärmtem TE-Puffer durch Zentrifugation eluiert. Aus den Eluaten wurden die Konzentrationen bestimmt und bei -20°C eingefroren.

### 2.16 Dephosphorylierung der Enden linearisierter Vektorplasmide

Bei der Dephosphorylierung des linearisierten Vektors wird vom 5'-Ende der Vektor-DNA der Phosphatrest abgespalten, um bei Klonierungen eine Selbstligation des linearisierten Vektors zu verhindern [Sambrook, 1989a].

Ligasepuffer: 500 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Dithiothreitol  
10 mM Adenosintriphosphat

Jeder Dephosphorylierungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt 5 µg linearisierten Vektor, 1 µl Ligasepuffer und 2 µl *Antarctic* Phosphatase. Der Dephosphorylierungsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, bevor das Enzym durch Hitzebehandlung 5 min bei 65°C inaktiviert wurde und mit *A. dest.* eine Endkonzentration von 100 µg/µl DNA eingestellt wurde.

### 2.17 Ligation linearisierter DNA

Überhängende, komplementäre DNA-Einzelstrangenden oder glatte Enden, die durch die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen, lagern sich aneinander. Diese Verbindung wird durch ein hochvisköses Medium stabilisiert. Unter Spaltung von Adenosintriphosphat verknüpft die DNA-Ligase die 3,'-Hydroxylenden mit den 5,'-terminalen Phosphorsäureresten einzelsträngiger Nukleinsäuren [Gumport, 1981].

Der dephosphorylierte Vektor und aus dem Agarosegel isolierte Fragmente wurden in einem Ligationsansatz so gemischt, dass equimolare Verhältnisse von Vektor und Fragment hergestellt waren, oder dass das Fragment im 10fachen molaren Überschuss vorlag. Jeder Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt neben Vektor und Fragment 2 µl Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase. Der Ligaseansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor das Enzym durch Hitzebehandlung 5 min bei 65°C inaktiviert wurde. Der Erfolg der Ligation wurde in einem 1%igen Agarosegel kontrolliert und die Ligaseansätze direkt in kompetente *E. coli* TOP10 transformiert.

### 2.18 Induzierte Expression von HBD-2-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21

Das Bakterium *E. coli* kann Laktose zur Energiegewinnung verwenden. Dazu benötigt es drei Enzyme, deren genetische Information im so genannten lac-Operon organisiert und reguliert ist, und nur in Anwesenheit von Laktose zur Verfügung steht [Boos, 1967; Boos, 1968]. Teile dieses komplexen Systems werden häufig in Expressionsvektoren für die induzierbare Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* genutzt. Die Transkription wird von einem Repressor verhindert, der nach Bindung des Substrats Laktose vom DNA-Strang entfernt wird. Für die kontrollierte Fremdgenexpression wird das Substrat durch ein Struktur analogon, das IPTG, ersetzt, das ohne Permease in die Zelle gelangen und die Transkription induzieren kann.

IPTG-Lösung: 200 mg/ml IPTG

Eine einzelne Kolonie des mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformierten *E. coli* BL21 wurde in 12 ml Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 240 rpm inkubiert. Für die Etablierung optimaler Bedingungen für die Expression der HBD-2-Fusionsproteine wurden die Zeiten vor und nach der Zugabe von IPTG sowie die IPTG-Konzentrationen variiert. Im standardisierten Verfahren für die präparative Darstellung wurde schließlich die Kultur 1:100 mit Selektionsmedium verdünnt und in einem Rundstandkolben 4-5 h bei 37°C und 240 rpm kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von >1,0 erreicht worden war. Durch Zugabe von IPTG zu Endkonzentrationen von 200 µg/ml bis 4 mg/ml erfolgte die Induktion der Fusionsproteinexpression für 2 h bei 37°C und 240 rpm. Anschließend wurden die Bakterien 20 min bei 6.000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet

wurde in 3 ml PBS resuspendiert, die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

### 2.19 Analytische Darstellung von Proteinen

#### 2.19.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Hitze und das starke anionische Detergenz SDS lösen nicht-kovalente Wechselwirkungen in Proteinen. Reduzierende Agenzien heben Disulfidbrücken auf. So entstandene SDS/Protein-Komplexe haben vergleichbare Ladungsdichten und unterscheiden sich nur in der Größe. Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) bewegen sich die Komplexe im elektrischen Feld zur Anode. Das kleinporigere Gel wirkt wie ein Sieb und führt zu einer größenabhängigen Trennung der Proteine [Laemmli, 1970; Walker, 1996]. Trenngele mit einem Gradienten der Polyacrylamidkonzentration erlauben die gleichmäßige Trennung von Proteinen in einem sehr weiten Größenbereich (250 Da bis 10 kDa) bei kurzen Gesamtlaufstrecken [Schägger, 1987; Schrimpf, 2002; Walker, 1994]. Homogene Gele mit einem Polyacrylamidanteil um 18% trennen Proteine mit einer Größe von 30-70 kDa sicher auf [Smith, 1994; Gallagher, 2006].

4x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,4% SDS
Trenngel/22,5%:	4x Trenngelpuffer 22,5% Acrylamid/BisAcrylamidlösung (37:1)
Trenngel/10%:	4x Trenngelpuffer 10% Acrylamid/BisAcrylamidlösung (37:1)
Trenngel/18%:	4x Trenngelpuffer 18% Acrylamid/BisAcrylamidlösung (37:1)
4x Sammelgelpuffer:	500 mM Tris-HCl (pH 6,8) 0,4% SDS
Sammelgel:	4x Sammelgelpuffer 4% Acrylamid/BisAcrylamidlösung (37:1)
APS-Lösung:	10% APS in <i>A.dest.</i>
4x Tris/Glycin-Puffer:	100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 750 mM L-Glycin (pH 8,3)
Reservoirpuffer:	4x Tris/Glycin-Puffer 0,5% SDS
Ladepuffer:	30 mM Tris-HCl (pH 8,0) 3% SDS 3 mM EDTA 15% Glycerol 0,09% Bromphenolblau 3% 2-Mercaptoethanol

## Material und Methoden

Größenstandards: M1, Bereich 11-170 kDa  
M2, Bereich: 1,060-26,600 Da

Für die SDS-PAGE wurden homogene Gele mit einem Acrylamidanteil von 18% oder Gradientengele mit Acrylamidkonzentrationen von 10-22,5% mit einer Dicke von 1 mm hergestellt. Für die homogenen Gele wurde 5 ml Trenngel/18% mit 20 µl APS und 8 µl TEMED in einem kleinen Becherglas gemischt und in die zwischen zwei Glasplatten entstandene Kammer gegossen. Für die Gradientengele wurden in die beiden kommunizierenden Gefäße des Gradientenmischers bei geschlossenem Verbindungsstück je 2,6 ml Trenngel/10% bzw. Trenngel/22,5% pipettiert. Die Lösung im rechten Gefäß wurde mit einem Magnetstab gerührt. In beide Gefäße wurden jeweils 6 µl APS-Lösung und 1,5 µl TEMED pipettiert, die Verbindung geöffnet und die Lösungen mit 2 ml/min über eine Kanüle (45 mm, Ø 0,8 mm) direkt in die Kammer zwischen den Glasplatten gepumpt. In dem Trenngel baute sich dabei ein von unten nach oben absteigender Acrylamidgradient auf. Für die 30 min Polymerisationsdauer wurde die Matrix der Gele mit *A. dest.* überschichtet und das Wasser möglichst vollständig abgegossen. Für die Auftragesaschen wurden 2 ml Sammelgel mit 15 µl APS-Lösung und 4 µl TEMED gemischt und diese Lösung auf das Trenngel pipettiert. Der Kamm für die Auftragesaschen wurde eingeschoben und nach 30 min das fertige Polyacrylamidgel in die Elektrophoresekammer eingehängt. Um die innere Pufferkammer zu schließen, wurden zwei Gele verwendet. Die innere und äußere Pufferkammer wurden mit frischem Reservoirpuffer befüllt.

In Ladepuffer aufgenommene Proben wurden getaut und 6 min im Wasserbad aufgeköcht. Ungelöste Bestandteile wurden 2 min bei 2.000 g und 4°C abzentrifugiert. In jede Auftragesasche wurden 10-100 µg Protein in maximal 20 µl Volumen aufgetragen. In jedem Gel wurde als gefärbter  $M_r$ -Standard 5 µl M1 und/oder 10 µl M2 mit aufgetrennt. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 100 V und maximal 12 mA pro Gel aufgetrennt.

### 2.19.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250

Proteine können direkt im Gel mit dem Farbstoff Coomassie *Brilliant Blue* R-250, einem Triphenylmethanfarbstoff, angefärbt werden [Bennett, 1971]. Je nach Farbstoffbindevermögen verschiedener Proteine erreicht man eine Nachweisempfindlichkeit von 100 ng bis 1 µg Protein [Syrový, 1991].

Waschlösung: 40% Methanol  
10% Eisessig in *A. dest.*

Färbelösung: 0,1% Coomassie in Waschlösung

Die Färbelösung wurde unmittelbar vor der Verwendung durch einen Faltenfilter filtriert. Das Gel wurde nach der Auftrennung der Proteine von den Glasplatten in eine fest verschließbare Plastikschale mit 50 ml Färbelösung überführt und darin unter Schütteln 20 min bei 50 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Die Färbelösung wurde abgegossen, das Gel zweimal mit 10 ml Waschlösung gespült und anschließend drei- bis viermal in ~200 ml Waschlösung inkubiert. Für die Auswertung wurden die Gele direkt in einem Flachbettscanner digitalisiert.

### 2.19.3 HBD-2-spezifischer Western-blot

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden in einem elektrischen Feld aus der Gelmatrix auf eine Membran mit hoher Bindungskapazität für Proteine transferiert und so immobilisiert. Die Effektivität des Transfers wird von Ionenkonzentration, Transferzeit, pH-Wert des Puffers und Temperatur beeinflusst [Görg, 1988]. Transfermembranen unterscheiden sich durch ihr Material in der Hydrophobizität der Oberfläche, der Oberflächenstruktur, Porengröße und damit in der Bindungsaffinität für Proteine [Mansfield, 1994]. Im Western-blot kann die Bindung spezifischer Antikörper durch Chemilumineszenz, also durch eine chemische Reaktion emittiertes Licht, nachgewiesen werden. Ist der Antikörper mit einer Peroxidase gekoppelt, die die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid katalysiert, bei der Licht emittiert wird, und wird diese Chemiluminiszenz durch eine phenolische Lösung verstärkt, kann das durch eine hochempfindliche Kamera aufgenommen werden [Whitehead, 1979].

Transferpuffer:	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20% Methanol 0,1% SDS
TBS:	50 mM Tris-HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl
TBST:	0,1% Tween-20 in TBS
Maleinsäure-Puffer:	100 mM Maleinsäure (pH 7,5) 150 mM Natriumchlorid
10x Blockierungspuffer:	10% Blockierungsreagenz im Maleinsäure-Puffer Lösen bei Erhitzen in der Mikrowelle. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.
Blockierungspuffer:	2 ml 10x Blockierungspuffer 18 ml TBST
Detektionsreagenz 1:	Luminollösung mit Verstärker (firmeneigene Rezeptur)
Detektionsreagenz 2:	Stabilisierte Peroxidlösung (firmeneigene Rezeptur)

## Material und Methoden

Die Polyvinylidendifluoridmembran wurde mit Methanol benetzt. Polyacrylamidgel, Membran und *Blotting*-Papier wurden mit Transferpuffer durchfeuchtet und mit festgelegter Reihenfolge in die Tankbloteinheit gehängt. Die Proteine wurden 1 h mit 300 mA aus dem Gel auf die Membran transferiert. Diese wurde auf dem Schüttler nacheinander je 5 min bei 100 rpm in Transferpuffer und TBS inkubiert sowie mindestens eine Stunde an der Luft getrocknet. Die trockene Membran wurde in einem Folienbeutel mit 10 ml frisch hergestelltem Blockierungspuffer nahezu luftfrei eingeschweißt, unter Schütteln über Nacht bei 600 rpm und 4°C inkubiert und in einem offenen Polypropylengefäß zweimal 20 min in 20 ml TBST bei 100 rpm und Raumtemperatur gewaschen. Der HBD-2 spezifische Erstantikörper aus der Ziege wurde im Blockierungspuffer zu einer Endkonzentration von 200 ng/ml aufgenommen und die Membran mit 3 ml der Antikörperlösung in einen neuen Folienbeutel eingeschweißt, unter Schütteln (2 h, 300 rpm, Raumtemperatur) inkubiert und wie oben beschrieben dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Der mit Meerrettichperoxidase gekoppelte für IgG der Ziege spezifische Zweitantikörper wurde zu einer Endkonzentration von 16 ng/ml in frischem Blockierungspuffer verdünnt, die Membran mit 5-10 ml der Antikörperlösung eingeschweißt, 1,5 h bei 300 rpm und Raumtemperatur inkubiert und wie oben mit TBST gewaschen. Unmittelbar vor der Verwendung wurden gleiche Mengen Detektionsreagenz 1 und 2 gemischt und 1,5 ml Entwicklerlösung auf die Membran pipettiert. Diese wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Lösung mit Zellstofflagen vollständig abgesaugt. Die feuchte Membran wurde luftblasenfrei abgedeckt, in der Detektionskammer aufgenommen. Zur Detektion der mit Farbstoff gekoppelten Proteine des Markers wurde die Membran 1/30 sec bei Tageslicht belichtet.

Zur Kontrolle des gleichmäßigen Probenauftrags wurden die Membranen zweimal 10 min in *A. dest.* gekocht und anschließend einem Aktin-spezifischen Western-blot unterzogen. Wie oben beschrieben wurde die Membran mit dem Aktin-spezifischen Antikörper im Verhältnis 1:10.000 in Blockierungspuffer und mit dem mit Meerrettichperoxidase gekoppelten für IgG der Maus spezifische Zweitantikörper im Verhältnis 1:1.000 inkubiert, gewaschen und die Bindung der Antikörper durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

## 2.20 Präparative Darstellung von Fusionsproteinen

### 2.20.1 Lyse von Bakterien für die Gewinnung von Fusionsproteinen

Zur Freisetzung von Proteinen, die in den Zellen produziert werden und zytoplasmatisch vorliegen, ist eine Lyse der Bakterienzelle notwendig, die mit Hilfe lytischer Enzyme und Detergenzien erreicht werden kann [Salazar, 2008]. *Bug Buster* ist im Wesentlichen eine Mischung nicht-ionischer Detergenzien, bei der Proteine ohne Denaturierung freigesetzt werden.

Lysis-Puffer:	5 ml 10x Bug Buster 45 ml <i>A. dest.</i>
DNase I-Lösung:	200 µg/ml DNase I
Lysozymlösung:	50 µg/ml Lysozym
CaCl <sub>2</sub> -Lösung:	100 mM CaCl <sub>2</sub>
MgCl <sub>2</sub> -Lösung:	1 M MgCl <sub>2</sub>

Nach dem Auftauen der Suspension transformierter *E. coli* BL21 wurden ein gleiches Volumen Lysis-Puffer sowie das Lysozym zu einer finalen Konzentration von 50 µg/ml dazugegeben. Nach Inkubation für 10 min bei 37°C wurden die Bakterien mit Ultraschall in Zyklen von 25 Schlägen über jeweils 1 min mit 30% der Gesamtleistung behandelt. Diese Zyklen wurden dreimal wiederholt. Die Lyse war erfolgreich, wenn die Lösung eine erhöhte Viskosität aufwies. Die viskose Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur mit 500 µM CaCl<sub>2</sub>, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 mg/ml DNase I inkubiert. Unlösliche zelluläre Bestandteile wurden durch 15 min Zentrifugation bei 2.000 g und 4°C sedimentiert.

### 2.20.2 Glutathion-Affinitätschromatografie

Die Affinitätschromatografie beruht auf der spezifischen und reversiblen Bindung eines Proteins an einen Liganden, der kovalent an eine Trägermatrix gekoppelt ist. Die Affinität der GST zu ihrem Substrat wird für die chromatografische Reinigung rekombinanter Fusionsproteine mit der GST genutzt, indem das Glutathion z.B. an Sepharose 4B immobilisiert ist. Aus Proteingemischen binden nur GST-Fusionsproteine spezifisch an diese Matrix und können mit reduziertem Glutathion in Lösung eluiert werden. So lässt sich das gewünschte Protein in einem Schritt mit einem Reinheitsgrad >90% aus Rohextrakten isolieren [Smith, 1988; Simons, 1977].

Für kleine Probenmengen und zur Etablierung der Elutionsbedingungen wurde die Glutathion-Sepharose 4B im *Batch*-Verfahren eingesetzt. Jeweils 100 µl Bakterienlysat wurden mit der Sepharose unter ständigem Mischen bei 4°C inkubiert. Nach 2 h wurde die Lösung 1 min bei 2000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

## Material und Methoden

Das Pellet wurde mit 1 ml PBS gewaschen und 20 µl Ladepuffer hinzugegeben. Die gewaschenen Trägerkügelchen wurden direkt in der SDS-PAGE eingesetzt.

Die präparative affinitätschromatografische Darstellung von HBD2-GST und der freien GST erfolgte in einem FPLC-System mit einer Säule oder zwei in Reihe geschalteten GST Trap-Säulen nach dem folgenden Schema:

Schritt	Puffer/Lösung	Volumen (ml)		Geschwindigkeit (ml/min)
		eine Säule	zwei Säulen	
Äquilibrieren	50 mM TrisHCl (pH 8,0) 100 mM NaCl	20	40	2
Probenauftrag	Bakterienlysat		40	
Waschen	50 mM TrisHCl (pH 8,0) 100 mM NaCl	20	40	2
Eluieren	50 mM TrisHCl (pH 8,0) 20 mM Glutathion	8	8	
Reaktivieren	6 M Guanidin-HCl	8	8	
	Ethanol 80%	20	40	
	Ethanol 20%	20	40	

Auf die Säule gebundenes Protein wurde in Fraktionen von je 1 ml gesammelt. Die reaktivierten Säulen wurden verschlossen und bei 4°C gelagert. Die Reinheit der Produkte wurde mit SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie oder einem HBD-2-spezifischen Western-blot kontrolliert. Fraktionen mit der GST oder dem HBD2-GST wurden vereinigt, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.20.3 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration wandern Moleküle durch eine inerte poröse Matrix in die sich kleine Moleküle, wie Salze, einlagern. Große Moleküle, wie Proteine, passieren die Partikel und werden zuerst aus der Säule eluiert. Probenvolumen, Länge der Trennstrecke und Porengröße der Partikel bestimmen Trennschärfe und -bereich. So können die Pufferbedingungen einer Lösung verändert werden. Durch die Peptidbindungen und aromatische Aminosäurereste haben Proteine Absorptionsmaxima bei Wellenlängen von 220 und 280 nm, die zur Detektion der Proteine während der Auftrennung genutzt werden [Scopes, 1994] (Abbildung 2).



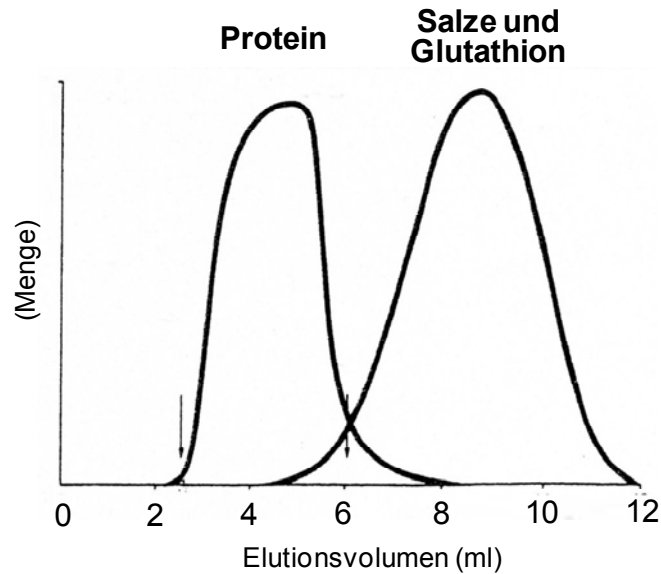


Abbildung 2: **Schematisches Elutionsprofil einer PD-10-Säule.** Die Matrix Sephadex-G25 in diesen vorgepackten, standardisierten Säulen sind Polymerenpartikel aus modifiziertem Dextran, die eine Ausschlussgröße von ca. 5 kDa haben.

Tris-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Aufbewahrungspuffer: PBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub>

Eine PD-10-Säule wurde mit 25 ml Tris-Puffer equilibriert und anschließend die Probe in einem Volumen von 2,5 ml aufgetragen. Nach dem Einlaufen der Probe wurden 3,5 ml Tris-Puffer auf den oberen Filter pipettiert. Das Eluat wurde in einem Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen aufgefangen und die Säule anschließend mit 25 ml Tris-Puffer gespült. Der gesamte Vorgang, beginnend mit dem Auftrag von jeweils 2,5 ml Probe, wurde wiederholt bis in der gesamten Lösung der Puffer ausgetauscht und die Proteine in das gleiche Röhrchen wie oben eluiert waren. Das Eluat wurde zwischen den Schritten auf Eis gelagert. Nach dem letzten Auswaschen der Salze wurde die Säule mit 25 ml Aufbewahrungspuffer gespült und mit Parafilm verschlossen. Jede Säule wurde mehrfach verwendet und zwischenzeitlich bei 4°C aufbewahrt.

## 2.21 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure

Peptidbindungen sowie die Aminosäurereste Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan wirken als Reduktionsmittel für Cu<sup>2+</sup>, das als Cu<sup>+</sup> unter alkalischen Bedingungen mit BCA einen Komplex bildet, der bei einer Wellenlänge von 562 nm sein Absorptionsmaximum hat. Die Intensität des entstehenden Farbstoffs ist proportional der Proteinkonzentration [Smith, 1987].

## Material und Methoden

Reagenz A:	firmeneigene Rezeptur, enthält: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , BCA und Natriumtartrat in 100 mmol/L NaOH
Reagenz B:	4% CuSO <sub>4</sub>
BCA-Lösung:	50 Teile Reagenz A 1 Teil Reagenz B
BSA-Standard:	Konzentrationen des Standards für BSA (gelöst in PBS): 0 µg/mL; 200 µg/mL, 800 µg/mL und 1,2 mg/mL

Jeweils 10 µl Standardlösung oder der Probe, die ggf. verdünnt wurde, wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gefüllt und zu jedem Ansatz 200 µl der BCA-Lösung pipettiert. Alle Ansätze erfolgten als Doppelbestimmungen. Die Mikrotiterplatte wurden 30 min bei 37°C inkubiert und bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde nach Abzug des Leerwertes, bei dem *A. dest.* an Stelle der Probe mit dem BCA-Reagenz gemischt wurde, aus der Gleichung der Regression der Standardkurve mit BSA ermittelt.

### 2.22 Freisetzung von HBD-2 aus HBD2-GST durch Thrombin

Durch den Expressionsvektor pGEX-2T wird zwischen der GST und dem Fusionspartner die Aminosäuresequenz Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser eingeführt, die eine Erkennungsstelle für Thrombin darstellt [Chang, 1985, Smith, 1988]. Das bedeutet, dass mit Hilfe dieser spezifischen Endopeptidase die Freisetzung von HBD-2 aus dem HBD2-GST-Fusionsprotein möglich ist.

Thrombinlösung: Thrombin in PBS

HBD2-GST-Lösung: 2,5 µg/µl HBD2-GST in TBS

Für die Thrombinspaltung wurden die Konzentration der Thrombinlösung (5-25 U/µl) und die Inkubationszeit (30-120 min) bei 37°C variiert. Der Spaltungserfolg wurde durch SDS-PAGE geprüft und die Lösung für die Bestimmung der biologischen Aktivität in der Densitometrie eingesetzt.

### 2.23 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die Bestimmung der optischen Dichte ist eine Streulichtmessung bei langen Wellenlängen. Dabei werden Partikel mit einer Größe von etwa 1-2 µm und von Wasser abweichenden Dichte gemessen. Lenken diese Partikel das langwellige Licht im Strahlengang eines Photometers ab, entsteht ein "Lichtverlust", der als OD<sub>600</sub> bestimmt werden kann. Der Streulichtverlust korreliert direkt mit der Bakterienkonzentration. So

kann die Wirksamkeit von Substanzen auf das Bakterienwachstum aus dieser Messung abgeleitet werden [Krist, 1998].

Die verschiedenen Laborstämme von *E. coli* wurden auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zehn Einzelkolonien wurden in 4 ml PBS durch Vortex resuspendiert. Von diesen Bakteriensuspensionen wurden 100 µl mit 12 ml Medium in einem Erlenmeyerkolben aufgenommen und bei 220 rpm und 37°C inkubiert. In diesen Vorkulturen wurden die Art des Mediums und die Kulturzeit von 3-4 h variiert. Die Vorkulturen wurden mit dem entsprechenden Medium verdünnt und erneut bei 220 rpm und 37°C inkubiert. Für diese Hauptkulturen wurden Medium, Kulturzeit und Verhältnis von Vorkultur und frischem Medium verändert.

Im etablierten densitometrischen Test mit *E. coli* JM109 wurden die Vorkulturen in LB-Lennox für die Hauptkulturen mit LB-Lennox 1/6 im Verhältnis 1:20 verdünnt und ggf. die antimikrobiellen Substanzen titrierten Konzentrationen zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5-6 h wurde 1 ml dieser Hauptkulturen in die Küvette pipettiert und die OD<sub>600</sub> der Bakterienkultur im Vergleich zu LB-Medium bestimmt. Alle Hauptkulturen erfolgten in Dreifachansätzen.

### **2.24 Korrelation zwischen OD<sub>600</sub> und der Bakterienanzahl der Suspension**

Als Standard zur Angabe der antibakteriellen Wirkung eines Agens werden die Veränderungen der Bakterienanzahl in der Suspension angegeben. Diese werden mit der OD<sub>600</sub> der Bakterienkulturen korreliert [Elbing, 2002].

Bakterien des Stammes *E. coli* JM109 wurden auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Jeweils eine Einzelkolonie eines frischen Ausstrichs wurde mit 12 ml LB-Lennox in einem Erlenmeyerkolben aufgenommen und bei 220 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Aus jeder Stufe von log 2-Verdünnungsreihen dieser Kulturen wurden die OD<sub>600</sub> bestimmt. Aus jeder Verdünnungsstufe, bei der die OD<sub>600</sub> mit 0,1-1,0 im Bereich der optimalen Messbedingungen für die Densitometrie lag, wurden weitere log 10-Verdünnungen in LB-Lennox hergestellt. Aus diesen Verdünnungen wurden jeweils 100 µl Bakteriensuspension auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Die Bakterienzahlen wurden aus den CFU und den entsprechenden Verdünnungsfaktoren ermittelt. Diese wurden graphisch mit den OD<sub>600</sub> der Verdünnungen korreliert, die Gleichungen für die Regressionen bestimmt und daraus in allen Auswertungen aus den experimentell bestimmten OD<sub>600</sub> die Zahlen der in den Kulturen vorhandenen Bakterien errechnet.

## 2.25 Präparation von Proteinen aus menschlichen Darmproben

Die Extraktion von Proteinen mit geringem  $M_r$  und von Peptiden kann unter denaturierenden Bedingungen mit Azetonitril und Trifluoressigsäure erfolgen. Ein hoher Säure- und Ionengehalt des Extraktionspuffers löst Peptide, präzipitiert Proteine höheren Molekulargewichtes und inaktiviert proteolytische Enzyme [Bateman, 1996].

Lösung 1: 60% Azetonitril in *A. dest.*

Lösung 2: 1% Trifluoressigsäure in *A. dest.*

Mischlösung: 6 Teile Lösung 1  
4 Teile Lösung 2

Darmabschnitte mit einer Größe von  $2\text{ cm}^2$  wurden auf einem mit silikonbeschichteten Brett mit Hilfe von Kanülen so aufgespannt, dass die Mukosa auf der Silikonoberfläche auflag. Die vom Darmlumen entfernten Schichten waren dem Bearbeiter zugewandt und wurden mit Pinzette und Skalpell abgetrennt. Die Mukosa wurde in ein 2 ml-Einfrierröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und falls erforderlich bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Das gefrorene Gewebe wurde in einen Mörser überführt, der sich in einem mit Eis gefüllten Styroporgefäß befand. Mit Hilfe eines Mörsers wurde die Mukosa unter wiederholter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu Pulver zerkleinert. Das Pulver wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5-10 ml frisch hergestellter Mischlösung aufgefüllt. Die Ansätze wurden 20 min in ein mit Eiswasser gefülltes Ultraschall-Bad gehängt und anschließend in Portionen von 2 ml in Reaktionsgefäße verteilt. Diese wurden 20 min bei 16.000 g und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen. Überstände und Pellets wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Die Überstände wurden bei einer Kondensortemperatur von  $-50^\circ\text{C}$  und einem Vakuum  $\sim 0,003\text{ mbar}$  innerhalb von maximal 48 h gefriergetrocknet. Lyophilisierte Überstände wurden in *A. dest* mit einem geringeren als dem Ausgangsvolumen aufgenommen. Nicht gelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation über 10 min bei 16.000 g und  $4^\circ\text{C}$  sedimentiert und diese Überstände bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.26 Mathematische Auswertung

Bei mehr als zwei Messwerten in einer Gruppe wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung (SD) nach folgender Formel ermittelt, wobei n die Anzahl der Messwerte einer Gruppe,  $X_i$  der Messwert und  $\bar{X}$  der Mittelwert waren:

$$\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

Mit dem Programm Microsoft Excel wurden Regressionen aus graphischen XY-Darstellungen erstellt und die Gleichungen sowie der Korrelationskoeffizient  $R^2$  ermittelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung eines antimikrobiellen rekombinanten HBD-2-Fusionsproteins

##### 3.1.1 Strategie der prokaryontischen Expression von HBD-2-Fusionsproteinen

Zur Herstellung des rekombinanten HBD-2 in *E. coli* boten sich verschiedene Fusionsvarianten an, die die Aufreinigung und Isolierung des 5-10 kDa großen Proteins vereinfachen sollten (Abbildung 3).

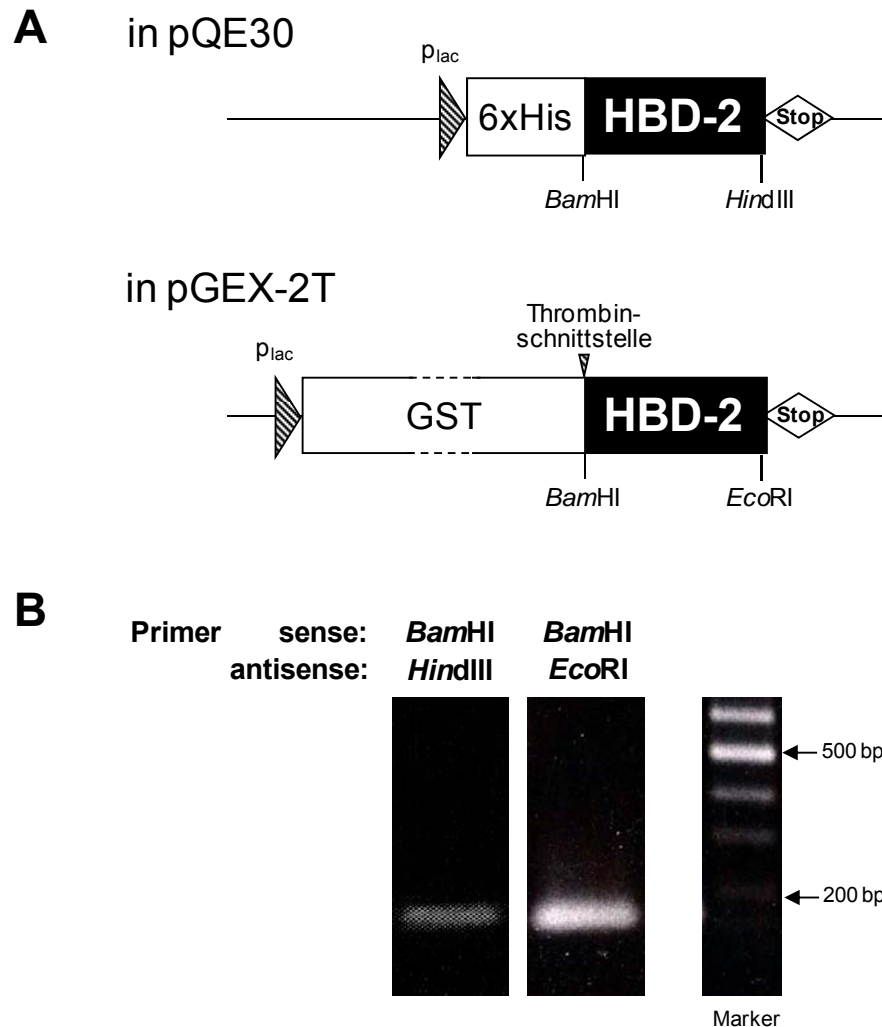


Abbildung 3: **Konstrukte für die Expression von HBD-2-Fusionsproteinen.** (A) Schematische Darstellung von HBD2-His bzw. HBD2-GST in den Vektoren pQE30 bzw. pGEX-2T zur Herstellung von rekombinanten HBD-2-Fusionsproteinen. Aus dem Vektor stammten neben dem entsprechenden Fusionspartner 6xHis und GST der lac-Promotor für die induzierbare prokaryontische Expression ( $P_{lac}$ ) sowie das Terminationscodon für die Translation des entsprechenden Fusionsproteins (Stop). Die Restriktionsorte *Bam*HI, *Hind*III bzw. *Eco*RI für die Klonierung flankierten die HBD-2-cDNA. (B) Eine cDNA aus HT-29-Zellen, die 6 h mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  inkubiert waren, wurde in PCR mit dem spezifischen Primerpaaren sense *Bam*HI/antisense *Hind*III bzw. sense *Bam*HI/antisense *Eco*RI eingesetzt. Die Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Charakteristische Banden des DNA-Größenstandards (Marker) sind angezeigt.

## Ergebnisse

Für die gerichtete Klonierung von HBD-2-cDNA in die Vektoren pQE30 bzw. pGEX-2T sollte die spezifische cDNA zunächst über PCR vermehrt werden. Gleichzeitig mit der Amplifikation wurde über entsprechend ausgewählte Primer Restriktionsorte eingeführt, die die cDNA flankieren. Sowohl His als auch die GST wurden an den N-Terminus in das Leseraster von HBD-2 fusioniert. In beiden Konstrukten wurde nur die Sequenz des reifen Proteins ohne das HBD-2-eigene Stopcodon verwendet (Abbildung 3A). Im Agarosegel war aus einer PCR jedes Produktes nur eine Bande mit einer Größe von 140 bp nachweisbar (Abbildung 3B). Das entsprach der Erwartung für die beiden HBD-2-spezifischen cDNA und konnte damit direkt weiter kloniert werden.

### 3.1.2 Klonierung von HBD-2-spezifischer cDNA in pCR2.1

Die HBD-2-spezifischen PCR-Produkte wurden zur Stabilisierung der Produkte und für die Sequenzierung der Amplifikate unter Standardbedingungen zunächst in den Vektor pCR2.1 kloniert (Abbildung 4).

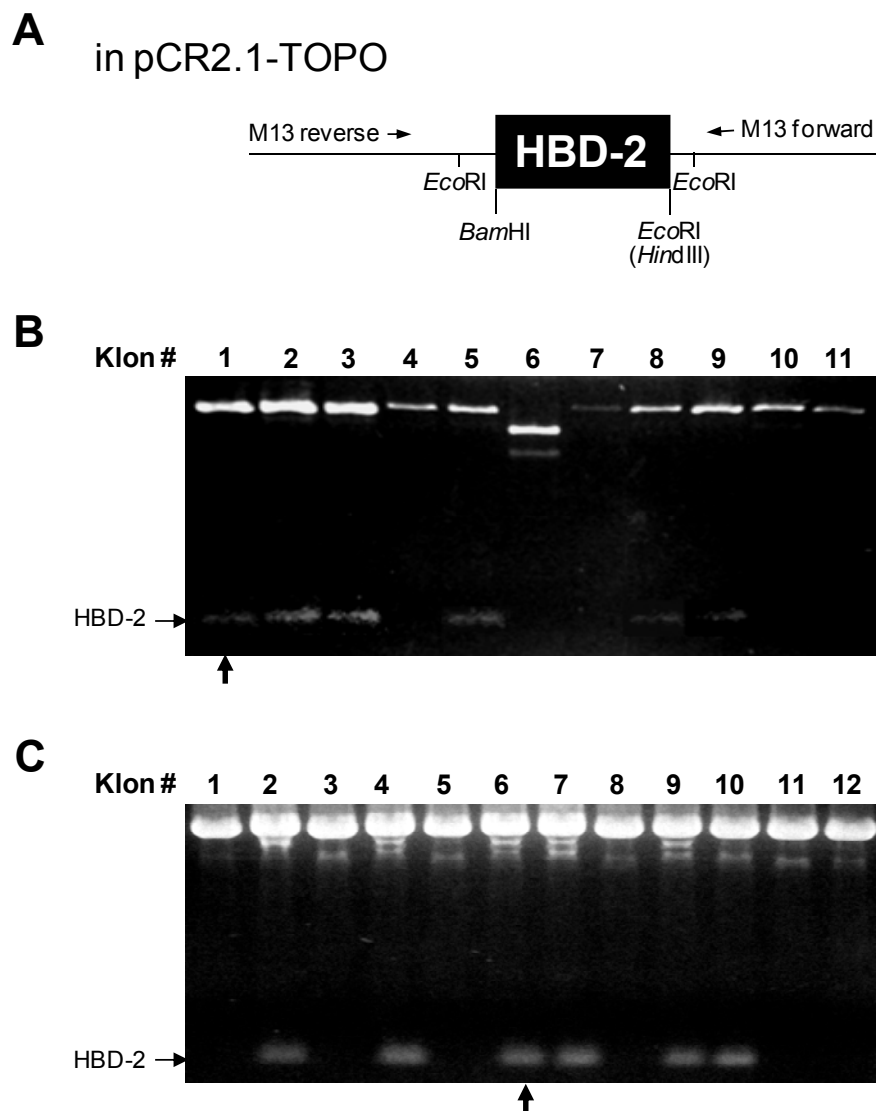


Abbildung 4: **Kontrolle der Klonierung der Produkte aus HBD-2-spezifischen PCR in pCR2.1.** (A) Schematische Darstellung der HBD-2-spezifischen cDNA in pCR2.1. Eingezeichnet sind die Lage der Bindungsorte für die Sequenzierungsprimer M13 reverse und M13 forward, sowie der Spaltorte im Ausgangsvektor und im klonierten PCR-Produkt. Nach Ligation des Vektors mit den PCR-Produkten, die mit den Primerpaaren sense *Bam*HI/antisense *Hind*III (B) bzw. sense *Bam*HI/antisense *Eco*RI (C) erhalten wurden, wurden die Plasmide aus 11 bzw. 12 Einzelkolonien mit dem entsprechenden Ligationsprodukt transformierter *E. coli* TOP10 isoliert. Die Plasmid-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI gespalten, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die erwartete Größe der klonierten HBD-2-spezifischen PCR-Produkte und die in der weiteren Arbeit verwendeten Klone pHBD2-H1 und pHBD2-E6 sind angezeigt.

Die HBD-2-spezifischen PCR-Produkte wurden zunächst ungerichtet mit Hilfe der am 5'-Ende überhängenden Adenosinreste der Amplifikate und der am 3'-Ende überhängenden Thyminreste in den linearen Vektor pCR2.1 kloniert. Neben den durch die PCR an den entsprechenden Stellen an die Sequenz für das reife HBD-2 eingeführten Spaltorten *Bam*HI und *Eco*RI bzw. *Hind*III konnten zwei die klonierten PCR-Produkte flankierende *Eco*RI-Orte für ein schnelles *Screening* plasmidhaltiger *E. coli* TOP10 genutzt werden (Abbildung 4A). Nach der Spaltung der Plasmid-DNA aus ausgewählten Einzelkolonien, die mit dem Ligationsprodukt von pCR2.1 und dem HBD-2-Fragment für die Klonierung in pQE30 transformiert waren, wurden in sechs von insgesamt 11 untersuchten Klonen fragmenthaltige Plasmide gefunden (Abbildung 4B). Im Falle des *Bam*HI/*Eco*RI-Fragments für die Reklonierung von HBD-2 in pGEX-2T waren sechs von insgesamt 12 Kolonien positiv und wiesen das erwartete Fragment auf (Abbildung 4C).

Da die korrekte Basenfolge der zu klonierenden HBD-2-Fragmente eine wesentliche Bedingung für eine erfolgreiche Expression der Fusionsproteine war, wurde jeweils ein Klon ausgewählt und das klonierte Fragment aus beiden Richtungen sequenziert. Für die Sequenzierung des PCR-Produkts mit dem Primerpaar sense *Bam*HI/antisense *Hind*III wurde der Klon pHBD2-H1 (Abbildung 4B) und für sense *Bam*HI/antisense *Eco*RI der Klon pHBD2-E6 (Abbildung 4C) ausgesucht. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit der veröffentlichten Sequenz des reifen HBD-2 verglichen (Abbildung 5).



## Ergebnisse

```
(1) gtttttGGTGGTATAGGCGATCCTGTTACCTGCCTTAAGAGTGGAG
(2) ggatccGGTGGTATAGGCGATCCTGTTACCTGCCTTAAGAGTGGAG
(3) ggatccGGTGGTATAGGCGATCCTGTTACCTGCCTTAAGAGTGGAG

(1) CCATATGTCATCCAGTCTTTTGCCCTAGAAGGTATAAACAAATTGG
(2) CCATATGTCATCCAGTCTTTTGCCCTAGAAGGTATAAACAAATTGG
(3) CCATATGTCATCCAGTCTTTTGCCCTAGAAGGTATAAACAAATTGG

(1) CACCTGTGGTCTCCCTGGAACAAAATGCTGCAAAAAGCCAtgaggga
(2) CACCTGTGGTCTCCCTGGAACAAAATGCTGCAAAAAGCCAgaattc
(3) CACCTGTGGTCTCCCTGGAACAAAATGCTGCAAAAAGCCAagctta
```

Abbildung 5: **Ergebnis der Sequenzierung der in pCR2.1 klonierten PCR-Produkte von HBD-2.** Die veröffentlichte Sequenz der cDNA von HBD-2 (1; PubMed Acc. Nr. XM\_001128061) wurde mit den Ergebnissen der Sequenzierungen von pHBD2-E6 (2) und pHBD2-H1 (3) abgeglichen. Der für reifes HBD-2 kodierende Bereich ist mit Großbuchstaben hervorgehoben. Über die Primer für die PCR eingeführte Sequenzen der Spaltorte für die Reklonierung in pGEX-2T bzw. pQE30 sind unterstrichen und der ursprüngliche Translationsstop eingerahmt.

Die HBD-2-Sequenzen, die in den beiden untersuchten Plasmiden pHBD2-E6 und pHBD2-H1 gefunden wurden, entsprachen der bekannten cDNA-Sequenz für das reife HBD-2. Erwartete Unterschiede bestanden an den Enden der amplifizierten HBD-2-Fragmente, wo die erwünschten Sequenzen für die Bindung der Restriktionsendonukleasen eingefügt worden waren. Damit konnten diese Plasmide genutzt werden, die entsprechenden HBD-2-spezifischen Sequenzen zu vermehren und sie in die eigentlichen Expressionsvektoren zu reklonieren.

### 3.1.3 Reklonierung der HBD-2-Fragmente in die Expressionsvektoren pQE30 und pGEX-2T

Die gerichtete Reklonierung der HBD-2-Fragmente erfolgte für beide HBD-2-Fusionsproteine parallel in mehreren Schritten, die in der Abbildung 6 schematisch gezeigt sind.

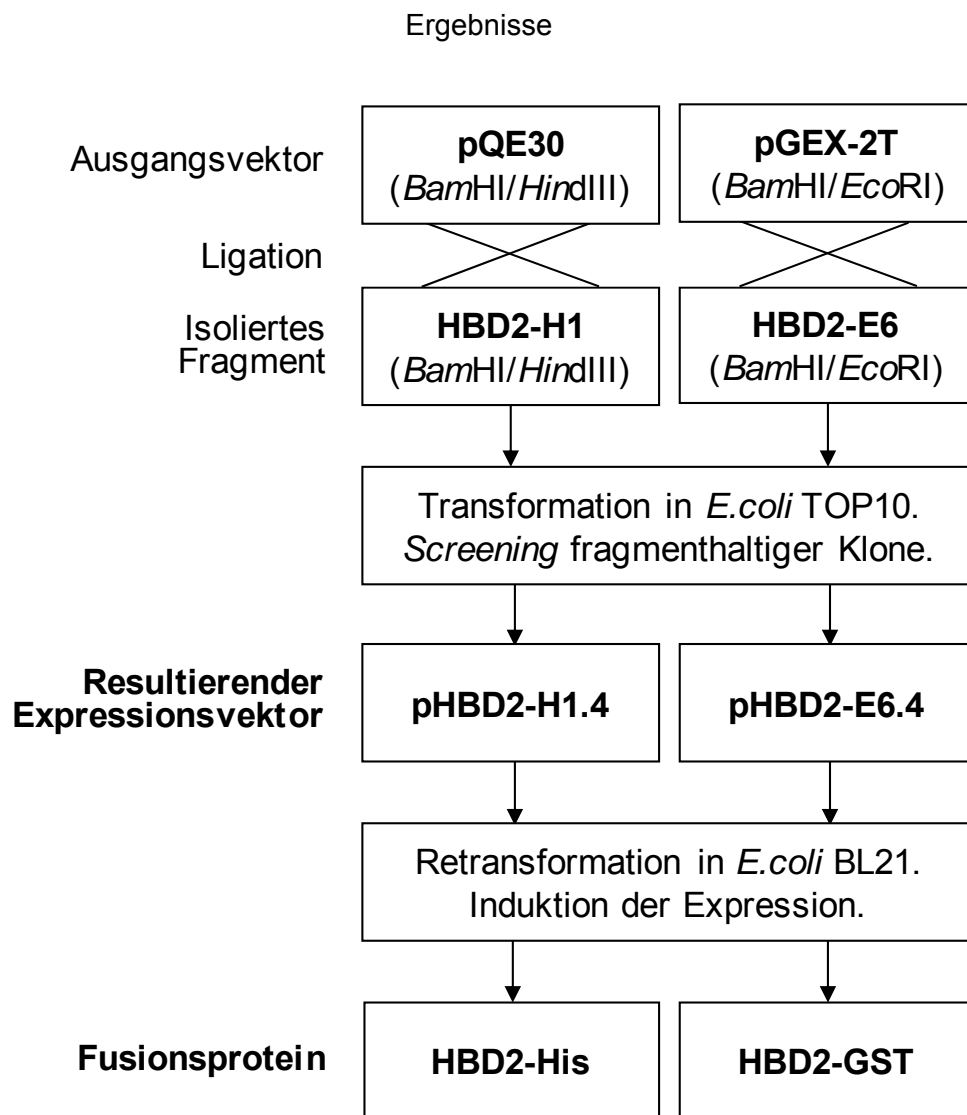


Abbildung 6: Fließschema für die Reklonierung der HBD-2-cDNA in die Expressionsvektoren pQE30 und pGEX-2T.

Ausgangsmaterial für die Reklonierung war präparierte Plasmid-DNA der Expressionsvektoren und der klonierten HBD-2-Fragmente. Im ersten Schritt wurden pQE30 und pGEX-2T mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiert und die endständigen Phosphorsäurereste durch Behandlung mit der *Antarctic* Phosphatase entfernt. Die Plasmide pHBD2-H1 und pHBD2-E6 wurden ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen gespalten und die HBD-2-Fragmente aus präparativen Agarosegelen isoliert. Die linearisierten und dephosphorylierten Vektoren wurden mit den entsprechenden HBD-2-Fragmenten ligiert, die Ligationsprodukte für das Screening fragmenthaltiger Expressionsvektoren in *E. coli* TOP10 retransformiert. Ausgewählte Plasmide wurden anschließend in *E. coli* BL21 transformiert und in diesem Stamm mit IPTG die Expression der Fusionsproteine HBD2-His bzw. HBD2-GST induziert.

Für die Klonierung von HBD-2 in pQE30 bzw. pGEX-2T wurden die Vektoren vorbereitet und die entsprechenden HBD-2-Fragmente aus pHBD2-H1 bzw. pHBD2-E6 isoliert (Abbildung 7).

## Ergebnisse

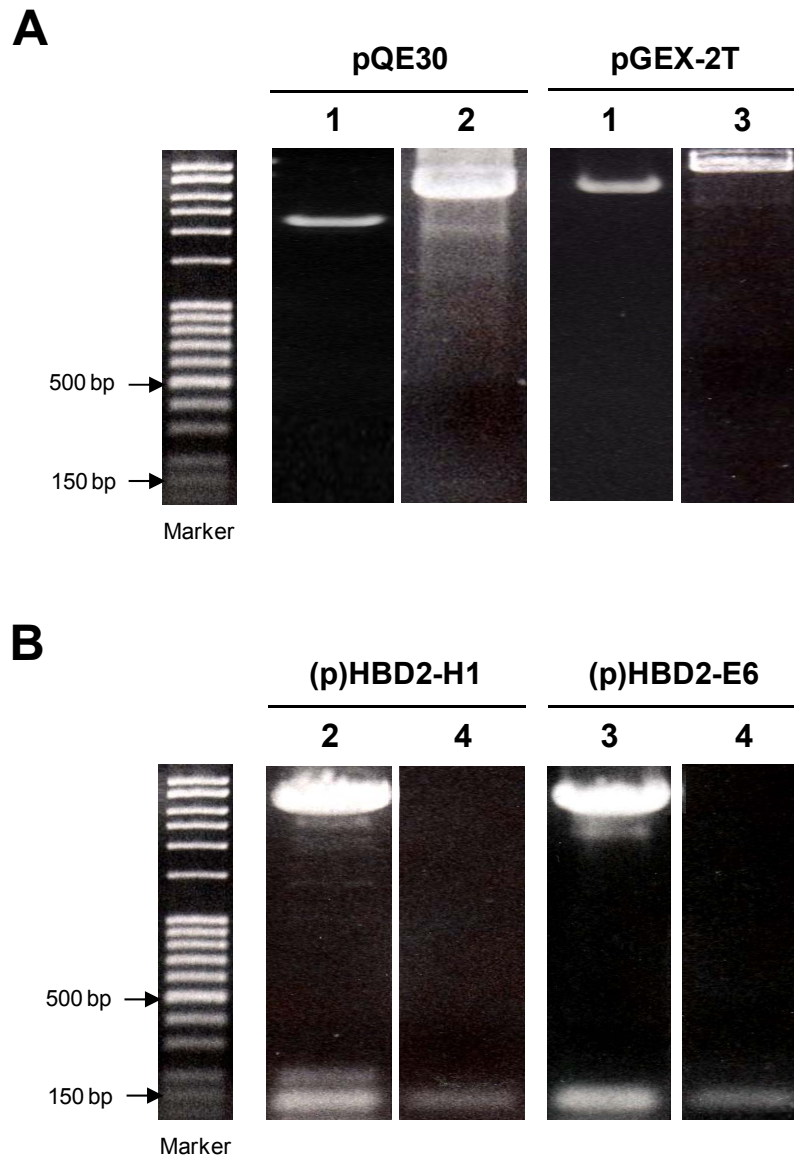


Abbildung 7: **Vorbereitung von Expressionsvektoren und Fragmenten für die Reklonierung HBD-2-spezifischer Fragmente.** (A) Die Expressionsvektoren pQE30 und pGEX-2T waren nativ (1) oder wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI/*Hind*III (2) bzw. *Bam*HI/*Eco*RI (3) gespalten. (B) Aus den mit *Bam*HI/*Hind*III bzw. *Bam*HI/*Eco*RI gespaltenen Plasmiden pHBD2-H1 (2) und pHBD2-E6 (3) wurden die HBD-2-Fragmente isoliert (4), die mit den entsprechend vorbereiteten Vektoren aus (A) ligiert werden sollten. Die Ergebnisse der Spaltungen und der Fragmentisolierung wurden im Agarosegel dargestellt. Charakteristische Banden des DNA-Größenstandards (Marker) sind angezeigt.

Durch Doppelspaltungen von pQE30 und pGEX-2T mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden die Vektoren linearisiert und so für die anschließende Ligation mit dem jeweiligen HBD2-Fragment vorbereitet. Das native Plasmid erschien im Agarosegel durch die verknäulte, ringförmig geschlossene Form der DNA kleiner als die DNA nach der Spaltung, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass beide Plasmide tatsächlich linearisiert waren (Abbildung 7A). Nach entsprechender Spaltung der

## Ergebnisse

Plasmide pHBD2-H1 bzw. pHBD2-E6, die die klonierten und sequenzierten HBD-2-Fragmente enthielten, entstanden neben der Bande mit einem hohen  $M_r$ , die den Grundvektor pCR2.1 repräsentiert, Banden von ca. 140 bp mit dem HBD-2-Fragment. Diese HBD-2-spezifischen Banden wurden aus Agarosegelen präpariert und die Reinheit der isolierten Fragmente hier ebenfalls wieder im Agarosegel bestätigt (Abbildung 7B).

Die isolierten Fragmente HBD2-H1 und HBD2-E6 wurden nun mit den Vektoren pQE30 bzw. pGEX-2T ligiert (Abbildung 8, 9).

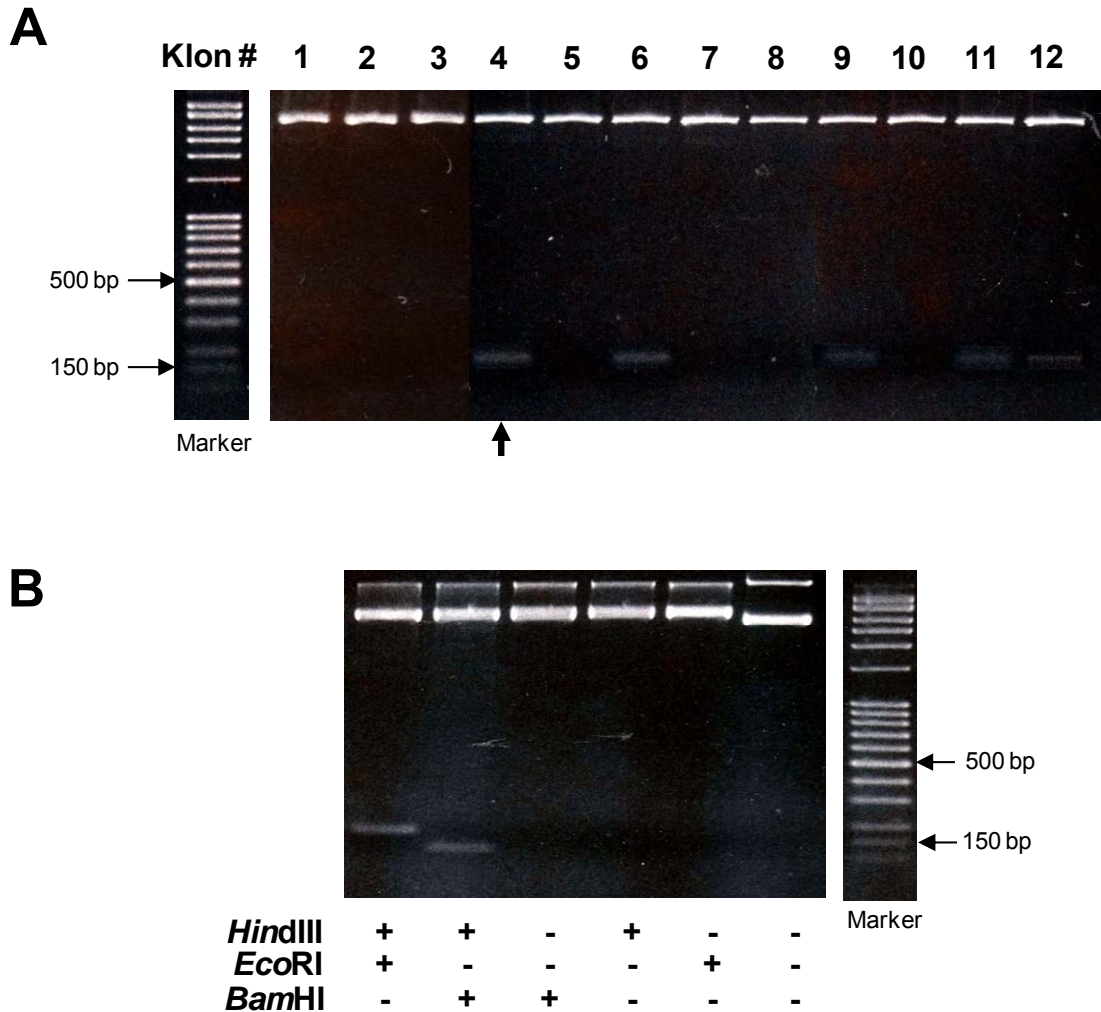


Abbildung 8: **Ligation von HBD2-H1 mit dem Vektor pQE30.** (A) Der Ligationsansatz von HBD2-H1 mit dem Vektor pQE30 wurde in *E. coli* TOP10 transformiert. Zur Suche fragmenthaltiger Klone wurden aus zwölf Ampicillin-resistenten Einzelkolonien die Plasmide isoliert, die DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III gespalten und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der in der weiteren Arbeit verwendete Klon pHBD2-H1.4 ist angezeigt. (B) Das Plasmid aus dem ausgewählten Klon pHBD2-H1.4 wurde mit den Enzymen *Hind*III, *Eco*RI und *Bam*HI allein oder in Kombination inkubiert. Alle Spaltungsansätze wurden in Agarosegelen aufgetrennt und sichtbar gemacht. Charakteristische Banden des DNA-Größenstandards (Marker) sind angezeigt.

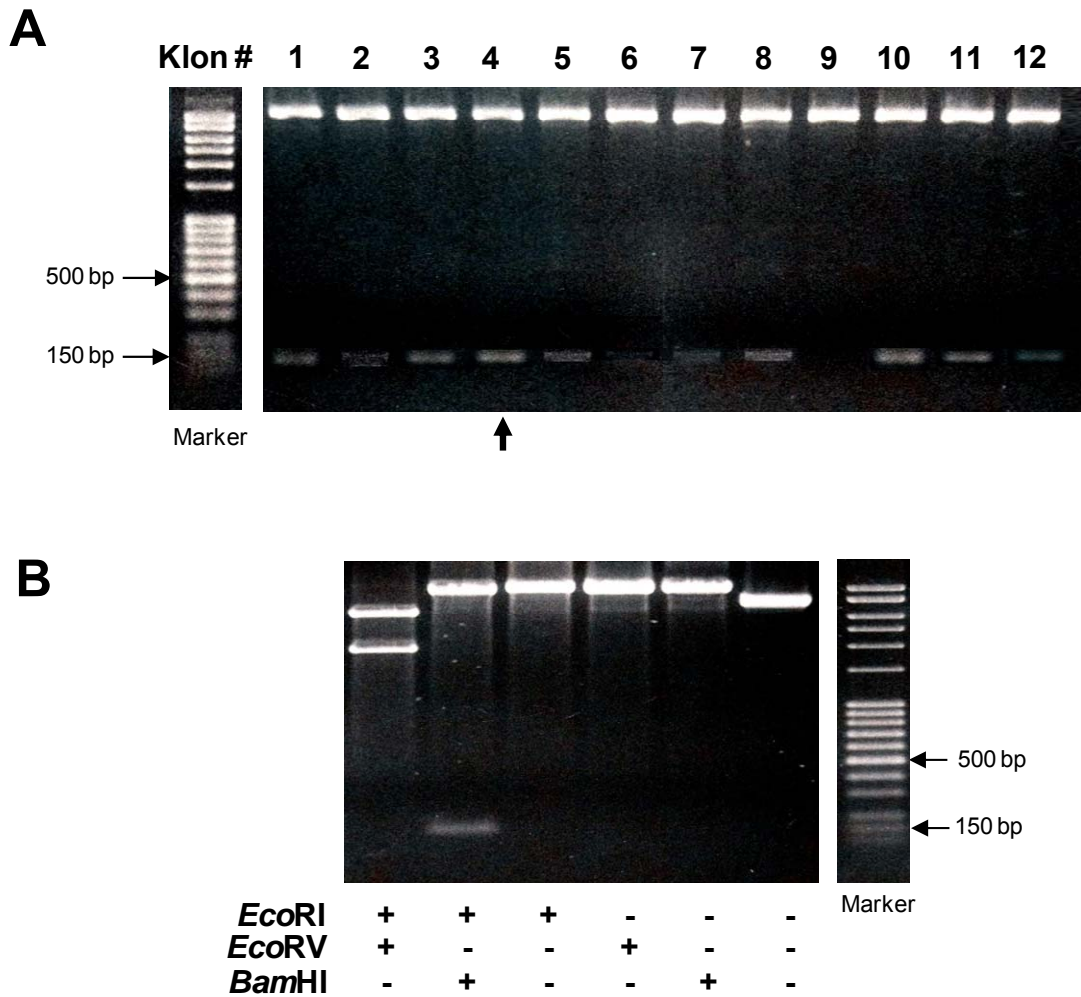
## Ergebnisse

Die Klonierung von HBD-2 in den Vektor pQE30 wurde durch gezieltes Herausschneiden des Fragmentes über die bei der Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III kontrolliert. In fünf der 12 untersuchten Klone wurde das entsprechende HBD-2-Fragment, das sich in einer Bande bei ~140 bp darstellte, gefunden (Abbildung 8A). Diese Kontrollspaltung, über die das HBD-2-Fragment begrenzenden Spaltorte von *Bam*HI und *Hind*III, konnte nicht unterscheiden, ob wie gewünscht nur ein HBD-2-Fragment in den Vektor ligiert wurde oder multiple Fragmente vorlagen. Deswegen wurden diese 5 Klone durch weitere Restriktionsspaltungen geprüft.

Da das Ausgangsplasmid pQE30 einen singulären *Eco*RI-Ort etwa 20 bp vor dem für die Klonierung genutzten *Bam*HI-Ort hatte, sollte eine kombinierte Spaltung mit diesen beiden Enzymen nur dann eine Bande von ~160 bp ergeben, wenn nur ein HBD-2-Fragment vorlag. Die Abbildung 8B zeigt exemplarisch das Ergebnis mit dem Plasmid aus Klon 4, das pHBD2-H1.4 genannt wurde. Einzelspaltungen mit jedem der Enzyme linearisierten das Plasmid, was durch eine Verschiebung der Bande im Agarosegel nach oben verdeutlicht wurde. Die Doppelspaltung mit *Bam*HI/*Hind*III ergab wieder die Bande von ~140 bp und mit *Eco*RI/*Hind*III eine Bande von ~160 bp. Das bedeutete, dass das Plasmid pHBD2-H1.4 tatsächlich nur ein HBD-2-Fragment aufgenommen hatte und somit für die Expression eines HBD2-His-Fusionsproteins durch *E. coli* BL21 geeignet war.

Für die Klonierung des HBD-2-Fragmentes in pGEX-2T zur Expression eines HBD2-GST-Fusionsproteins wurde analog zu pQE30 für das HBD2-His verfahren (Abbildung 9).

## Ergebnisse



**Abbildung 9: Ligation von HBD2-E6 mit dem Vektor pGEX-2T.** (A) Der Ligationsansatz von HBD2-E6 mit dem Vektor pGEX-2T wurde in *E. coli* TOP10 transformiert. Zur Suche fragmenthaltiger Klone wurden aus zwölf Ampicillin-resistenten Einzelkolonien die Plasmide isoliert, die DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI gespalten und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der in der weiteren Arbeit verwendete Klon pHBD2-E6.4 ist angezeigt. (B) Das Plasmid aus dem ausgewählten Klon pHBD2-E6.4 wurde mit den Enzymen *Eco*RI, *Eco*RV und *Bam*HI allein oder in Kombination inkubiert. Alle Spaltungsansätze wurden in Agarosegelen aufgetrennt und sichtbar gemacht. Charakteristische Banden des DNA-Größenstandards (Marker) sind angezeigt.

Hier wurden klonierte HBD-2-Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI kontrolliert und in zehn der 12 untersuchten Klone mit der Bande bei ~140 bp das entsprechende HBD-2-Fragment gefunden (Abbildung 9A). Diese Klone wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RV, für die ein Spaltort im Ausgangsvektor pGEX-2T vorlag, und mit *Eco*RI, die auch für die Klonierung von HBD-2 genutzt wurde, geprüft. Bei nur einem HBD-2-Fragment in der korrekten Leserichtung für die Expression sollte ein charakteristisches Fragment von ca. 2 kb entstehen. Die Abbildung 9B zeigt exemplarisch das Plasmid aus dem Klon 4, das mit pHBD2-E6.4 bezeichnet wurde. Einzelspaltungen

## Ergebnisse

mit jedem der Enzyme linearisierten auch hier das Plasmid, was wiederum durch eine Verschiebung der Bande im Agarosegel nach oben verdeutlicht wurde. Die Doppelspaltung mit *Bam*HI/*Eco*RI ergab die Bande von ~140 bp für HBD-2. Nach Spaltung mit *Eco*RI/*Eco*RV entstand die erwartete Bande von ~2 kb. Das bedeutete, dass auch in dem Plasmid pHBD2-E6.4 ein singuläres HBD-2-Fragment vorlag und dieses Plasmid für die Expression eines HBD2-GST-Fusionsproteins in *E. coli* BL21 verwendet werden konnte.

### 3.1.4 Induktion von HBD2-His in *E. coli* BL21

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob mit dem Plasmid pHBD2-H1.4 transformierte *E. coli* BL21 nach Induktion mit IPTG ein HBD2-His-Fusionsprotein exprimierten (Abbildung 10).

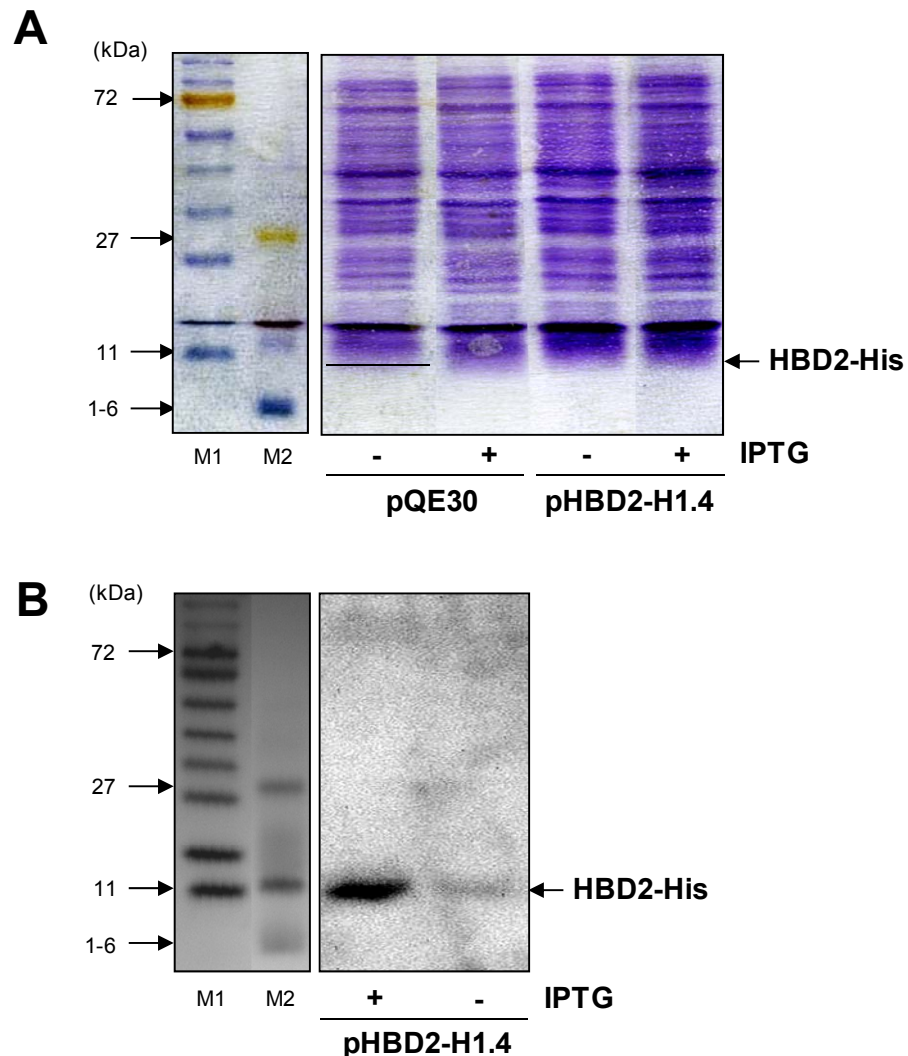


Abbildung 10: **Induktion der Expression von HBD2-His in *E. coli* BL21.** *E. coli* BL21 wurden mit pQE30 oder pHBD2-H1.4 transformiert und jeweils eine Einzelkolonie in



## Ergebnisse

Vorkulturen mit 12 ml Selektionsmedium über Nacht inkubiert. Für die Hauptkultur wurde die Vorkultur im Verhältnis 1:100 mit frischem Selektionsmedium verdünnt. Nach 4 h wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml hinzugegeben und nach einer Gesamtkulturzeit von 6 h der Versuch beendet. Proben der Bakterienkulturen vor (-) und nach Induktion mit IPTG (+) wurden mittels Ladepuffer lysiert. Die Proteine wurden im Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und (A) alle Proben mit Coomassie gefärbt oder (B) das HBD-2 in einem spezifischen Western-blot detektiert. Charakteristische Banden der Protein-Größenstandards (M1, M2) und der Größenbereich für das erwartete HBD2-His-Fusionsprotein sind angezeigt.

In den Gradientengelen wurden alle Proteine aus den *E. coli* BL21 gleichmäßig aufgetrennt. Die Färbung mit Coomassie war aber nicht empfindlich genug Proteine bzw. Peptide mit  $M_r < 11$  kDa darzustellen. Im Größenordnungsbereich um 8 kDa, in dem ein HBD2-His-Fusionsprotein in den mit pHBD2-H1.4 transformierten *E. coli* BL21 nach Induktion mit IPTG erwartet wurde, wurde im Vergleich zu den Kontrollen mit dem Ausgangsplamid pQE30 bzw. pHBD2-H1.4 ohne IPTG nach der Färbung mit Coomassie keine Bande gefunden (Abbildung 10A).

Dass unter der Kontrolle des lac-Promotors aus dem Plasmid ein HBD-2-enthaltendes Molekül durch die mit pHBD2-H1.4 transformierten *E. coli* BL21 produziert wurde, zeigte eine Bande bei ~8 kDa im HBD-2-spezifischen Western-blot, die durch die Induktion mit IPTG verstärkt wurde (Abbildung 10B).

In Vorversuchen für die Produktion konnte das HBD2-His aus Lysaten mit pHBD2-H1.4 transformierten *E. coli* BL21 weder durch die Chromatografie mit Hilfe immobilisierter  $Ni^{2+}$  noch durch  $Co^{2+}$  spezifisch angereichert werden (Daten nicht gezeigt). Da die Mindestexpression und die Spezifität des Anhangs aus sechs Histidinresten für effektive präparative Darstellung von HBD2- unter den Bedingungen der hier vorliegenden Arbeit nicht ausreichend waren, wurde dieses HBD-2-Fusionsprotein nicht weiter als Kontrolle für den Nachweis antimikrobieller Aktivität von Defensinen in Erwägung gezogen.

### 3.1.5 Induktion von HBD2-GST in *E. coli* BL21

Die weiteren Arbeiten zur Etablierung eines Kontrolldefensins konzentrierten sich auf das HBD2-GST, dass in pGEX-2T kloniert wurde und durch mit dem Plasmid pHBD2-E6.4 transformierte *E. coli* BL21 produziert werden sollte (Abbildung 11).



## Ergebnisse

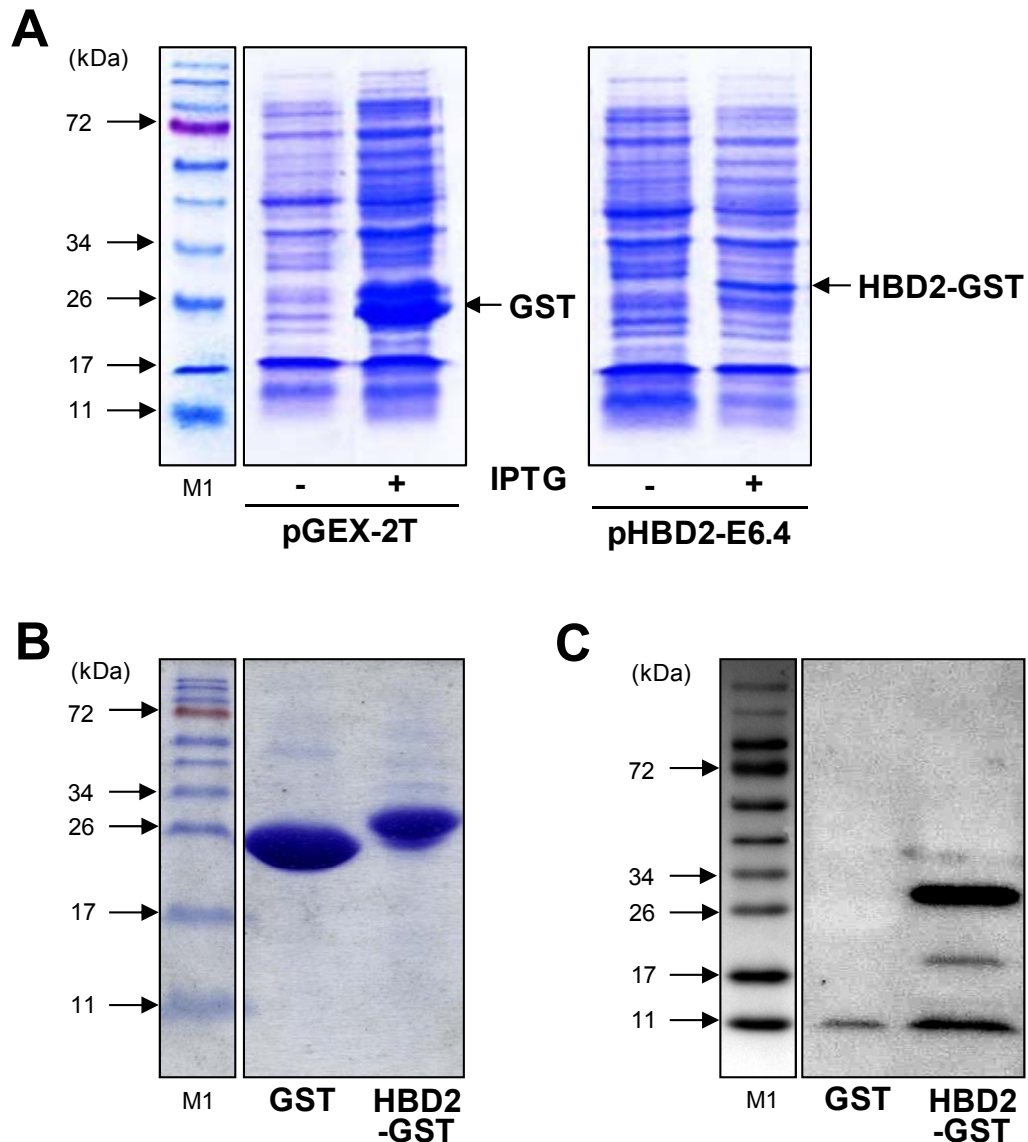


Abbildung 11: **Induktion der Expression von HBD2-GST in *E. coli* BL21.** *E. coli* BL21 wurden mit pGEX-2T bzw. pHBD2-E6.4 transformiert. Die Kulturen zur Expression wurden wie für Abbildung 10 beschrieben durchgeführt. (A) Proben der Bakterienkulturen vor (-) und nach Induktion mit IPTG (+) wurden mittels Ladepuffer lysiert, im Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Der Größenbereich der GST und des HBD2-GST-Fusionsproteins sind angezeigt. (B, C) Bakterien aus den Kulturen nach Induktion mit IPTG wurden lysiert und die klaren Lysate einem chromatografischen Batch-Verfahren mit Glutathion-Sepharose unterzogen. Die an den Sepharosepartikeln gebundenen Proteine wurden mit Hilfe des Ladepuffers abgelöst und im homogenen SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (B) bzw. nach einem Gradientengel in einem HBD2-spezifischen Western-blot dargestellt (C). Charakteristische Banden des Protein-Größenstandards (M1) sind angezeigt.

Nach der Zugabe von IPTG in die Kulturen von mit pHBD2-E6.4 transformierten *E. coli* BL21 war im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE eine ca. 30 kDa große Bande nachweisbar, die ohne IPTG nicht gefunden wurde und dem Fusionsprotein HBD2-GST

entsprach. Vor dem Hintergrund aller Proteine aus den Bakterienlysaten war diese HBD2-GST-Bande weniger stark als die ca. 26 kDa große GST-Bande aus den mit dem Ausgangsvektor pGEX-2T transformierten *E. coli* BL21 (Abbildung 11A). Die in größeren Mengen exprimierte GST im Vergleich zum HBD2-GST gab einen ersten Hinweis auf die antibakterielle Wirkung von HBD2-GST auf die Produzenten selbst. Diese Darstellung konnte nicht unterscheiden, ob das HBD2-GST zytoplasmatisch gelöst oder denaturiert in so genannten *Inclusion Bodies* vorlag.

Nach Lyse der Bakterien und Abtrennung der unlöslichen Bestandteilen wurde aus den klaren Bakterienlysaten mit Hilfe von Glutathion-Sepharose im Batch-Verfahren durch SDS-PAGE nach Färbung mit Coomassie jeweils nur eine Bande für GST bzw. HBD2-GST aus den entsprechend transformierten *E. coli* BL21 gefunden (Abbildung 11B). Im HBD-2-spezifischen Western-blot mit den so affinitätsgereinigten rekombinanten Proteinen wurde der Fusionspartner GST allein nicht dargestellt. Eine Bande ~11 kDa war offensichtlich bakterienspezifisch, da sie aus beiden Lysaten sichtbar war. In den Lysaten mit dem Plasmid pHBD2-E6.4 war eine HBD-2-spezifische Bande vorhanden, die in ihrer Größe dem HBD2-GST entsprach (Abbildung 11C).

Nach der Transformation von *E. coli* BL21 mit pHBD2-E6.4 wurde aus den Bakterienlysaten mit Glutathion-Sepharose ein Protein angereichert, das mit einem HBD-2-spezifischen Western-blot dargestellt werden konnte. Durch die Bakterien wurde also tatsächlich ein zytoplasmatisch gelöstes HBD2-GST-Fusionsprotein gebildet. Diese Methode für Herstellung von HBD2-GST musste optimiert werden. Rekombinante GST wurde in gleicher Weise gewonnen und in den Versuchen zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von HBD2-GST als Kontrolle eingesetzt.

### **3.1.6 Optimierung der Bakterienkultur zur Induktion von HBD2-GST in *E. coli* BL21**

Zur Optimierung der Kulturbedingungen für die Herstellung des HBD2-GST-Fusionsproteins aus *E. coli* BL21 wurden die Kulturzeiten vor und nach der Induktion der Fusionsproteinexpression durch IPTG, sowie die Konzentrationen des Induktors variiert (Abbildung 12).

## Ergebnisse

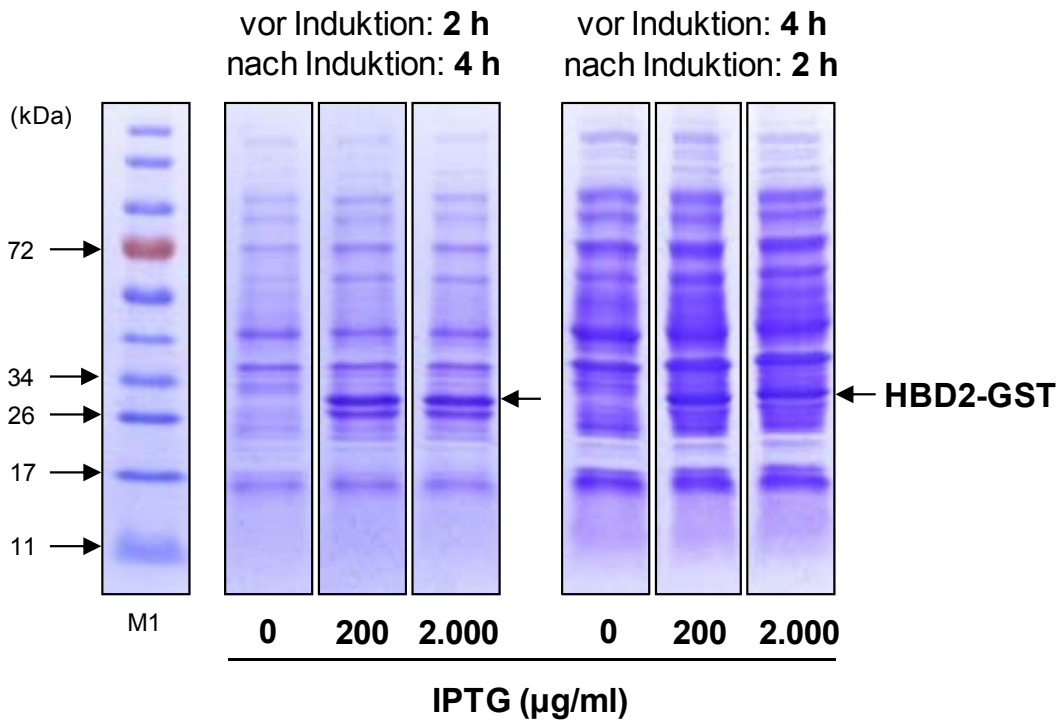


Abbildung 12: **Variation von Kulturzeit und IPTG-Konzentration zur Herstellung von HBD2-GST aus *E. coli* BL21.** Eine Einzelkolonie von mit pHBD2-E6.4 transformierten *E. coli* BL21 wurde in einer Vorkultur mit 12 ml Selektionsmedium über Nacht inkubiert. Für die Hauptkulturen wurde die Vorkultur im Verhältnis 1:100 mit frischem Selektionsmedium verdünnt. Nach 2 h bzw. 4 h wurden zu den Kulturen IPTG zu Endkonzentrationen von 200 µg/ml oder 2 mg/ml gegeben oder die Kulturen erhielten kein IPTG. Nach einer Gesamtkulturzeit von 6 h wurden die Bakterien aus jeweils 1 ml Kulturen mit Ladepuffer lysiert. Die Proteine wurden in einem Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei vergleichbare Versuche. Pfeile markieren die nur nach Zugabe von IPTG nachweisbare Bande für HBD2-GST. Charakteristische Banden des Protein-Größenstandards (M1) sind angezeigt.

Ohne Zugabe von IPTG war unabhängig von der Kulturzeit keine Bande in der Größenordnung für ein HBD2-GST-Fusionsprotein nachweisbar. Innerhalb der gleichen Inkubationszeit bestand zwischen 200 µg/ml und 2 mg/ml IPTG kein Unterschied in der Stärke der induzierten Banden (Abbildung 12). Verdünnungsverhältnisse von 1:50, 1:100 und 1:200 der Vorkultur in die Hauptkultur für die Produktion hatten keinen Effekt auf die Höhe der Expression des HBD2-GST-Fusionsproteins (Daten nicht gezeigt) und es wurde eine Verdünnung von 1:100 für die Produktionsansätze festgelegt.

Das Standardverfahren für die GST-Expression umfasste eine Wachstumszeit der Bakterienkultur von 2 h vor der Zugabe von IPTG und eine Inkubationszeit von 4 h danach. Unter diesen Bedingungen war aus den mit pHBD2-E6.4 transformierten *E. coli* BL21 sowohl eine Bande bei ~30 kDa für das HBD2-GST-Fusionsprotein, als auch eine kleinere, etwas schwächere Bande darunter, die der freien GST entsprach

## Ergebnisse

(Abbildung 12, linke Seite). Das Verhältnis beider Banden betrug etwa 2:1 zugunsten von HBD2-GST. Aus der vierstündigen Inkubation der Bakterienkultur vor der Induktion mit IPTG resultierten insgesamt stärkere Banden, die auf eine höhere Zellzahl in der Kultur im Vergleich zum Ansatz mit der kürzeren Phase vor der Induktion und damit auch auf die mögliche antibakterielle Wirkung des produzierten HBD2-GST hinweisen. Das Verhältnis von HBD2-GST zu GST war mit etwa 20:1 stärker zugunsten des Fusionsproteins verschoben (Abbildung 12, rechte Seite).

Schlussfolgernd war, bezogen auf das einzelne Bakterium die Produktivität bei längerer Kulturzeit vor der Zugabe von IPTG nicht höher, doch aufgrund der insgesamt größeren Bakterienanzahl und der bevorzugten Expression von HBD2-GST wurde dieses Zeitregime für die Produktion verwendet.

### **3.1.7 Affinitätschromatografische Reinigung von HBD2-GST**

Unter optimierten Bedingungen für das Wachstum der Bakterienkultur und die Induktion der Expression von HBD2-GST bzw. GST wurden entsprechend transformierte *E. coli* BL21 kultiviert. Die Bakterien wurden lysiert und die klaren Lysate affinitätschromatografisch über Glutathion-Sepharose gereinigt. Die Abbildung 13 zeigt exemplarisch für beide rekombinante Proteine eine Aufreinigung von HBD2-GST an einer FPLC.

## Ergebnisse

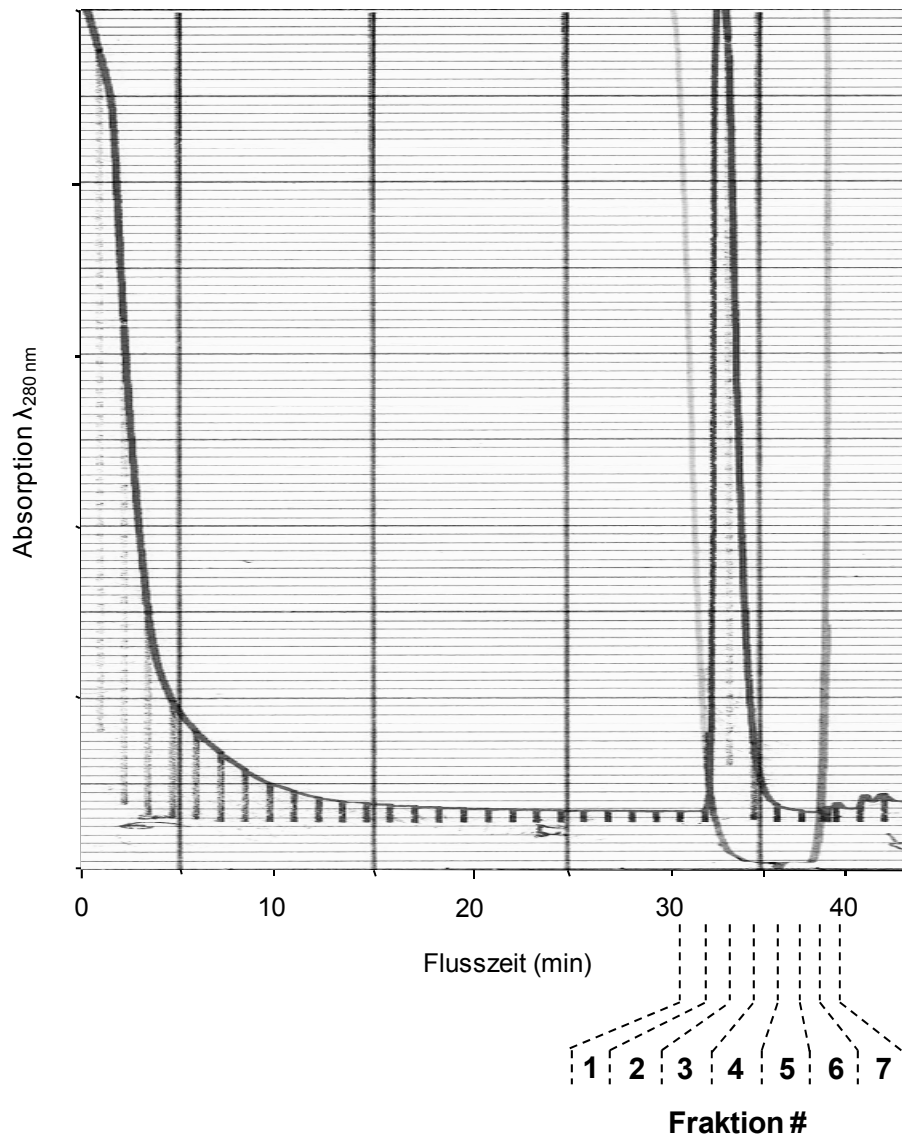


Abbildung 13: **Aufreinigung von HBD2-GST über Glutathion-Sepharose.** Wie in Punkt 2.20.2. beschrieben, wurden klare Lysate von mit pHBD2-E6.4 transformierten *E. coli* BL21 nach Induktion der Produktion von HBD2-GST mit IPTG affinitätschromatografisch über Glutathion-Sepharose an einer FPLC-Anlage gereinigt. Das Diagramm zeigt das Elutionsprofil, dass bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen wurde. Die Fraktionen von jeweils 1 ml, die nach dem Wechsel zum Elutionspuffer mit 20 mM reduziertem Glutathion gesammelt wurden, sind angezeigt.

Nach dem Auftrag der Bakterienlysate wurde die Säule mit einem Puffer aus 50 mM TrisHCl (pH 8,0) mit 100 mM NaCl gründlich gewaschen. Dabei wurden alle bei einer Wellenlänge von 280 nm detektierbaren Stoffe, die nicht an die Säule gebunden hatten entfernt. Nach Austausch des Waschpuffers durch den NaCl-freien Elutionspuffer mit 20 mM reduziertem Glutathion erschien über der durch das Waschen erreichten Basislinie ein Peak, der die Freisetzung von HBD2-GST durch den Anstieg nach der 32. Minute signalisierte. Dieses Protein wurde in jeweils sieben Fraktionen gesammelt und zunächst im SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung auf seine Reinheit geprüft (Abbildung 14).

## Ergebnisse

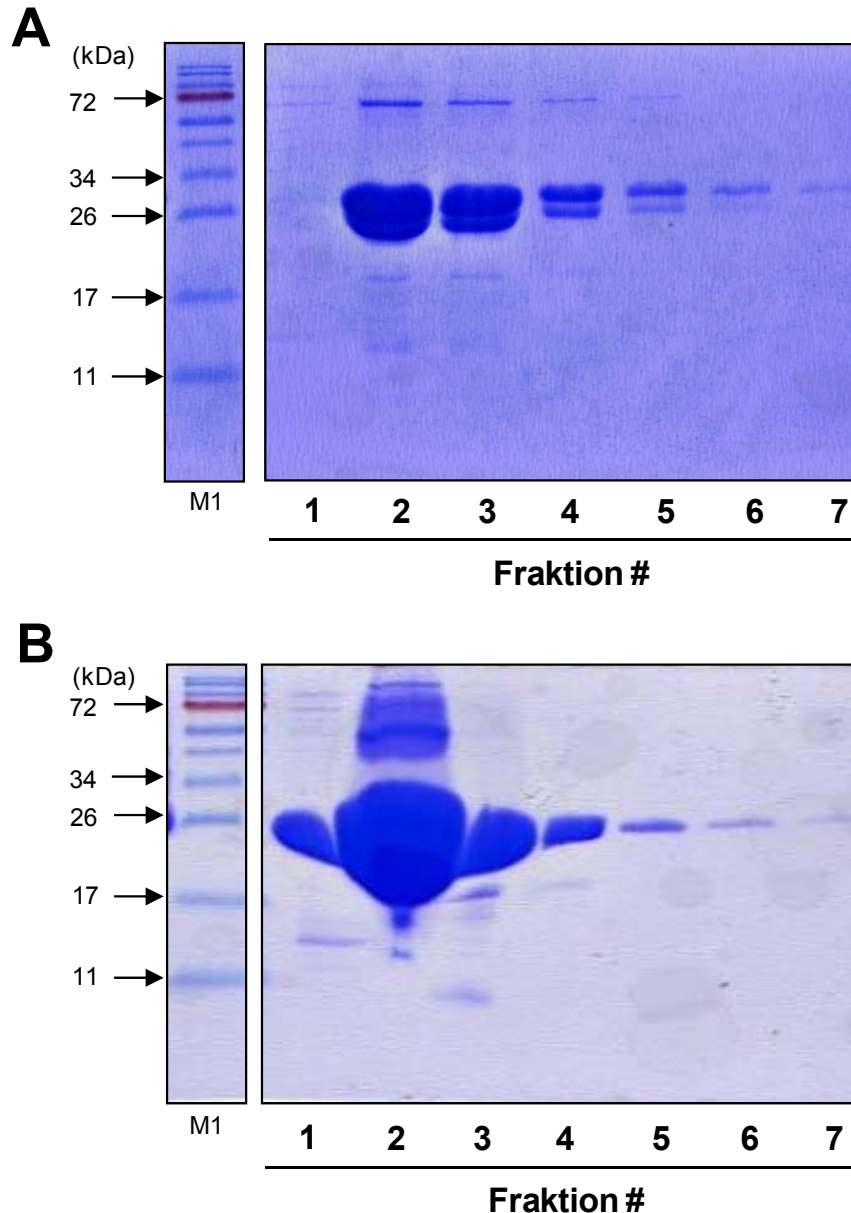


Abbildung 14: **Kontrolle der Aufreinigung von HBD2-GST und GST durch Affinitätschromatografie mit Glutathion-Sepharose.** Jeweils 10  $\mu$ l aus den Fraktionen nach Elution der Glutathion-Sepharose, die mit Bakterienlysaten mit dem HBD2-GST (**A**) bzw. der GST (**B**) beladen waren, wurden im homogenen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie gefärbt. Charakteristische Banden des Protein-Größenstandards (M1) sind angezeigt.

Aus der affinitätschromatografischen Reinigung der Bakterienlysate aus mit pHBD2-E6.4 transformierten *E. coli* BL21 wurde typischerweise in den Fraktionen 2-4 die überwiegende Menge des HBD2-GST-Fusionsproteins gefunden. Während die Banden aus den Fraktionen 2 und 3 deutlich überladen waren, wurde aus der Darstellung der Fraktionen 4 und 5 deutlich, dass etwa ein Fünftel des Proteins die freie GST repräsentierte (Abbildung 14A). Das entsprach den Verhältnissen aus der Produktion des HBD2-GST-Fusionsprotein (Abbildung 12) und war in verschiedenen Präparationen nicht

## Ergebnisse

einheitlich, lag aber immer unter 40% des Gesamtproteins. Die Fraktionen 2-4 wurden zusammengeführt und weiter verwendet.

Entsprechend der effizienteren Produktion der freien GST durch mit pGEX-2T transformierte *E. coli* BL21 (Abbildung 11A) wurde aus der Aufreinigung aus Lysaten mit dem gleichen Volumen der Glutathion-Sepharose insgesamt wesentlich mehr Protein gewonnen, so dass auch insbesondere die Darstellung aus der Fraktion 2 überladen war (Abbildung 14B). Aus der Aufreinigung der 26 kDa großen GST wurden die Fraktionen 1-4 zusammengeführt und als Kontrollprotein genutzt.

### **3.1.8 Entfernung von Glutathion und Salzen aus affinitätschromatografisch gereinigten HBD2-GST-Präparationen**

Eine Bestimmung der Konzentration von aufgereinigtem HBD2-GST bzw. der GST war erforderlich, um die Effizienz der antibakteriellen Wirkung des Defensins definieren zu können und um die Vergleichsmengen des Kontrollproteins festzulegen. Hier störte das Glutathion auf Grund seines Peptidcharakters. Deswegen wurde zunächst der Elutionspuffer durch Gelfiltration über Sephadex-G25 gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) ausgetauscht. Nach diesem Pufferaustausch wurden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe der BCA-Methode im Vergleich zu einem BSA-Standard bestimmt.

Die Zusammensetzung der GST- bzw. der HBD2-GST-Präparationen vor und nach dem Pufferaustausch wurde in SDS-PAGE verglichen und die Integrität des HBD2-GST im HBD-2-spezifischen Western-blot geprüft (Abbildung 15).

## Ergebnisse

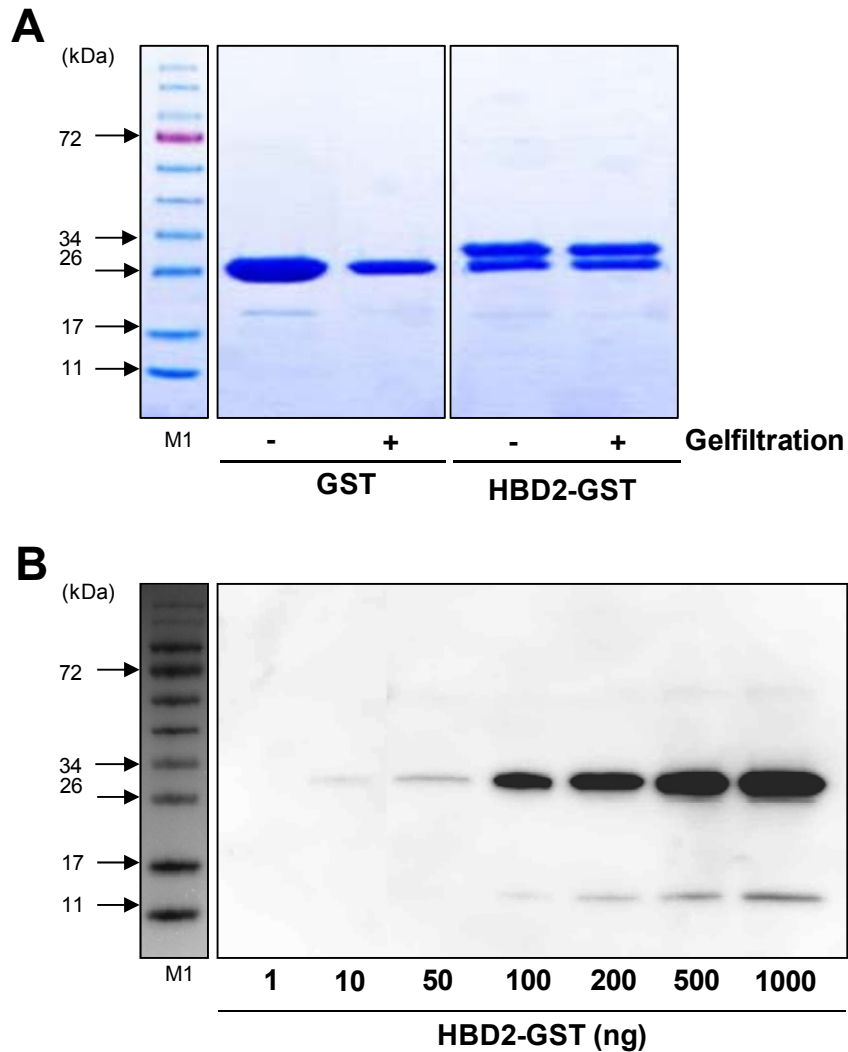


Abbildung 15: **Effekt des Pufferaustausches auf die GST- und HBD2-GST-Präparationen.** Die vereinigten Fraktionen 2-4 für das HBD2-GST bzw. 1-4 für die GST entsprechend Abbildung 14 wurden auf PD-10-Säulen zur Gelfiltration aufgetragen und mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) eluiert. (A) Jeweils 10 µl dieser Präparationen vor und nach der Säule wurden in Gradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie detektiert. (B) Definierte Mengen HBD2-GST wurden nach der Proteinbestimmung mit Hilfe der BCA-Methode im homogenen SDS-PAGE aufgetrennt und im HBD-2-spezifischen Western-blot dargestellt. Charakteristische Banden des Protein-Größenstandards (M1) sind angezeigt.

Nach dem Pufferaustausch war die freie GST nachweisbar, nur in Folge der Volumenvergrößerung durch die Gelfiltration mit etwas verringerter Bandenintensität. Im Falle der Präparation des HBD2-GST-Fusionsproteins wurden wie vorher das HBD2-GST und die GST gefunden. Der Anteil der GST lag in der hier dargestellten Präparation bei etwa 35% des Gesamtproteingehaltes (Abbildung 15A).

Die Konzentrationsbestimmungen durch die BCA-Methode ergab typischerweise Proteinkonzentrationen von 10 mg/ml für die GST und ~3,4 mg/ml für die Präparation von HBD2-GST. Abgeleitet aus dem im SDS-PAGE beobachteten Verhältnis des



Fusionsproteins zur freien GST, entsprach das Konzentrationen um 2,5 mg/ml HBD2-GST. Die GST-Lösung wurde mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) auf eine vergleichbare Konzentration eingestellt.

Wurden entsprechend dieser Proteinbestimmung definierte Mengen des HBD2-GST im Bereich zwischen 1 ng und 1 µg durch der SDS-PAGE aufgetrennt, wurde wie schon in Abbildung 11C gezeigt, im HBD-2-spezifischen Western-blot nur das Fusionsprotein und nicht die freie GST dargestellt. Eine entsprechende Bande war ab einer Menge von 50 ng HBD2-GST detektierbar (Abbildung 15B). Das bedeutete, dass der Western-blot ~2 pmol HBD2-GST nachweisen konnte und damit sehr empfindlich war.

### 3.2 Etablierung einer densitometrischen Methode für den Nachweis der antimikrobiellen Aktivität von HBD-2

#### 3.2.1 Auswahl des Bakterienstammes

Für die Untersuchung der antibakteriellen Wirkung von HBD-2 war eine geeignete Methode erforderlich und sollte als densitometrischer Test über die Trübung einer wachsenden Bakterienkultur etabliert werden. Als erstes wurde der geeignete Bakterienstamm von *E. coli* ausgewählt. Die drei Laborstämme *E. coli* BL21, *E. coli* JM109 und *E. coli* TOP10 wurden auf Ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin verglichen (Abbildung 16).

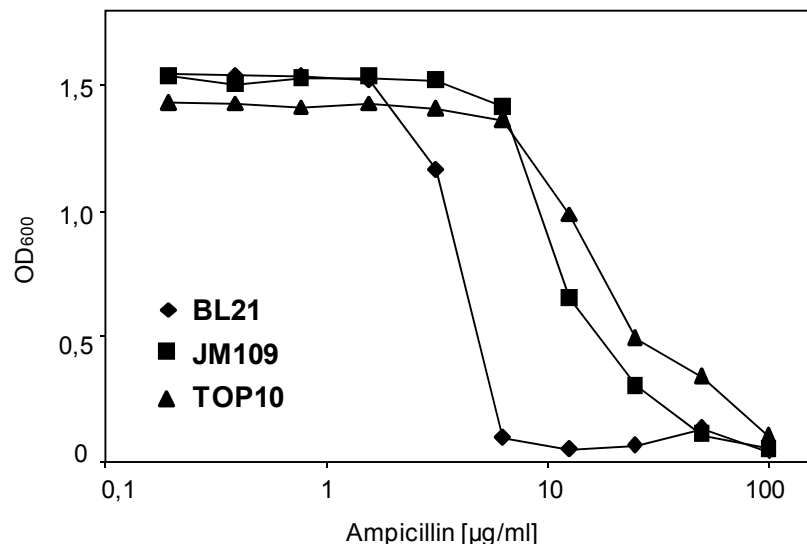


Abbildung 16: **Ampicillin-Empfindlichkeit verschiedener Laborstämme von *E. coli* im densitometrischen Test.** Einzelkolonien von frischen Ausstrichen der drei Bakterienstämme *E. coli* BL21, *E. coli* JM109 bzw. *E. coli* TOP10 wurden als Vorkulturen ohne Antibiotika in LB-Lennox bis zu OD<sub>600</sub> von ~0,20-0,40 inkubiert. In den Hauptkulturen wurden die Bakteriensuspensionen mit Ampicillin zu Endkonzentrationen von 0,1-100 µg/ml vermischt. Nach 4 h wurde die OD<sub>600</sub> der Bakterienkulturen bestimmt. Mittelwerte ± SD aus einem repräsentativen Experiment in Dreifachansätzen.

## Ergebnisse

Alle drei Bakterienstämme erreichten unter den Versuchsbedingungen ohne Antibiotikum maximale OD<sub>600</sub> um 1,5 und bei allen verringerte sich mit steigenden Ampicillin-Konzentrationen die Trübung der Bakterienkultur. Die Stämme unterschieden sich etwas in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Ampicillin. Eine IC<sub>50</sub> um 5 µg/ml Ampicillin bei *E. coli* BL21 zeigte, dass dieser Stamm empfindlicher war als *E. coli* JM109 und *E. coli* TOP10 mit IC<sub>50</sub> um 10 bzw. 11 µg/ml. Für alle weiteren Versuche wurde der Bakterienstamm *E. coli* JM109 mit mittlerer Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin verwendet.

### 3.2.2 Korrelation zwischen OD<sub>600</sub> und der Bakterienanzahl der Suspension

Als Standard zur Angabe der antibakteriellen Wirkung eines Agens sollten die Veränderungen der Anzahl von Bakterien in der Suspension angegeben und zur OD<sub>600</sub> korreliert werden (Abbildung 17).

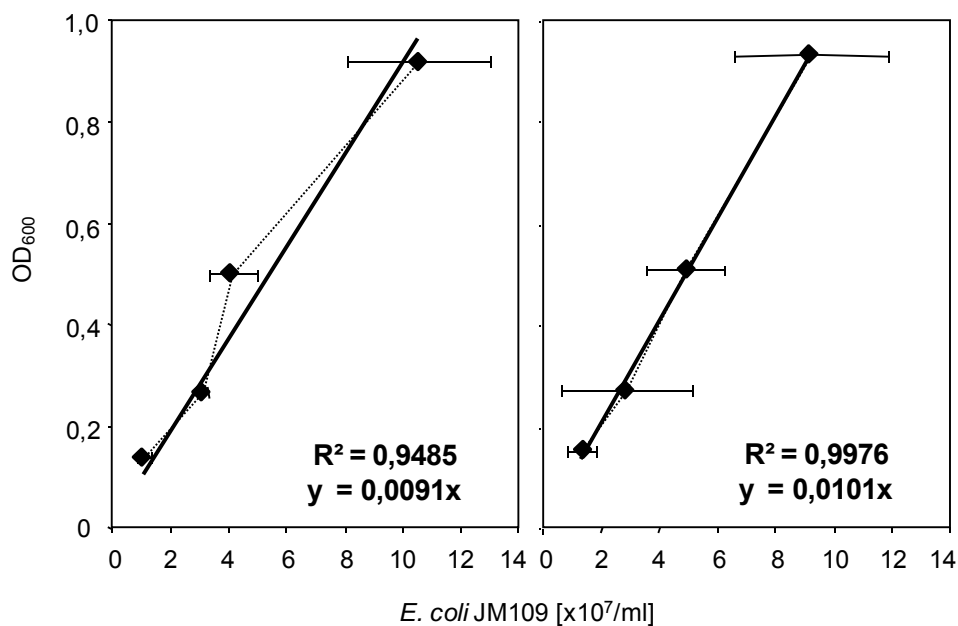


Abbildung 17: **Korrelation zwischen OD<sub>600</sub> und Bakterienanzahl der Suspension für *E. coli* JM109.** Jeweils eine Einzelkolonie eines frischen Ausstrichs von *E. coli* JM109 wurde über Nacht inkubiert und aus Verdünnungsreihen die OD<sub>600</sub> bestimmt. Aus jeder Verdünnungsstufe, die für die Messung der OD<sub>600</sub> hergestellt wurde und in der die OD<sub>600</sub> zwischen 0,1-1,0 lag, wurden weitere Verdünnungen hergestellt, jeweils 100 µl auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Die Anzahl der Bakterienzellen wurde aus der Anzahl gewachsener Einzelkolonien und den Verdünnungsfaktoren ermittelt. Zwei Experimente als Mittelwerte ± SD aus Dreifachansätzen. Angegeben sind der Regressionskoeffizient R<sup>2</sup> und die Gleichungen der Regressionsgeraden.

Wurden entsprechende Verdünnungen der Bakteriensuspensionen aus dem optimalen Messbereich der Densitometrie von OD<sub>600</sub> 0,1-1,0 auf LB-Agar verteilt, korrelierten die aus den CFU und den entsprechenden Verdünnungsfaktoren ermittelten Bakterienzahlen

## Ergebnisse

linear mit den OD<sub>600</sub>. Die durch die Näherung erhaltenen Regressionen entsprachen mit R<sup>2</sup> ≥ 0,95 hinreichend genau den experimentellen Daten. Die Geradengleichungen dieser Regressionen stellten im o.g. Bereich der OD<sub>600</sub> den mathematischen Zusammenhang zwischen der Trübung in der Kultur, die experimentell günstig spektrophotometrisch bestimmt werden konnten und der Anzahl in der entsprechenden Kultur vorhandenen *E. coli* JM109 her. Die aus den parallelen Versuchen gemittelte Gleichung:

$$E. coli JM109 = (OD_{600}/0,01 ml) \times 10^6$$

wurde in allen folgenden Ansätzen genutzt aus den OD<sub>600</sub> die entsprechenden Bakteriendichten in den Kulturen zu ermitteln.

### 3.2.3 Optimierung der Kulturbedingungen für *E. coli* JM109

Voraussetzung für die Verwendung der densitometrischen Methode waren für den Nachweis antimikrobieller Wirkungen optimierte Kulturbedingungen für *E. coli* JM109. Wichtige Faktoren die eine solche Bakterienkultur beeinflussen und geprüft wurden, waren die Inkubationszeit der Vorkultur sowie die Animpfdichte und die Inkubationszeit der Hauptkultur (**Abbildung 18**).

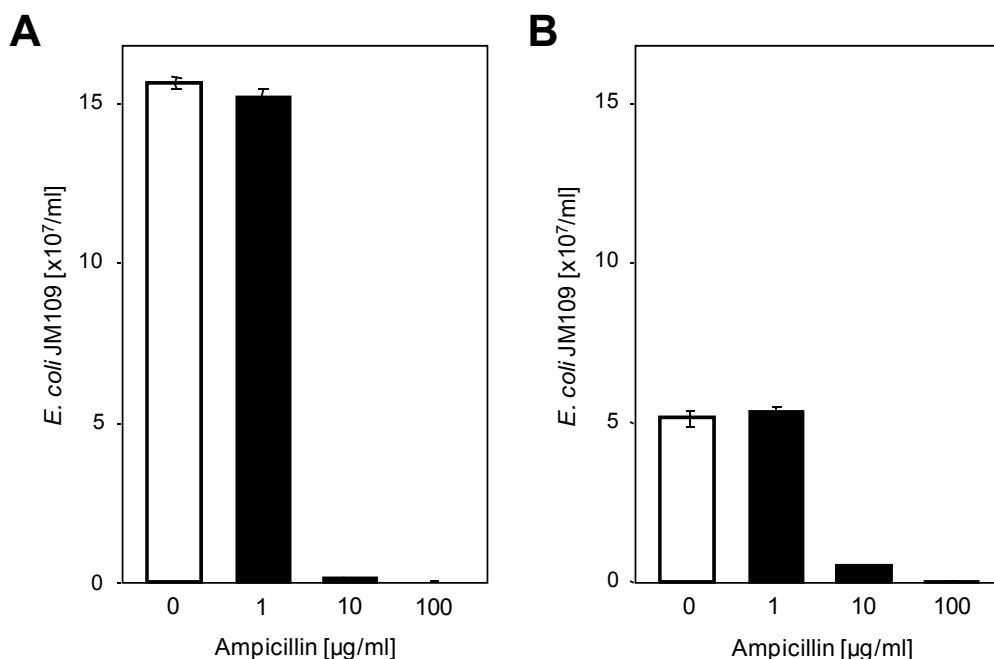


Abbildung 18: **Optimierung der Kulturbedingungen für *E. coli* JM109.** Einzelkolonien eines frischen Ausstrichs von *E. coli* JM109 wurden als Vorkulturen ohne Antibiotika in LB-Lennox inkubiert und in den Hauptkulturen in LB-Lennox mit Ampicillin zu den angegebenen Endkonzentrationen vermischt. (A) Nach einer Vorkultur über 4 h wurde diese 1:20 für die Hauptkultur verdünnt und die Hauptkultur 6 h inkubiert. (B) Nach einer Vorkultur über 1,5 h, wurde diese 1:100 für die Hauptkultur verdünnt und die Hauptkultur 4 h inkubiert. Mittelwerte ± SD aus einem repräsentativen Experiment in Dreifachansätzen.

## Ergebnisse

Zum Zeitpunkt der Messung war die maximale Bakteriendichte aus den Kulturen von *E. coli* JM109 bei langer Vorkultur, hoher Animpfdichte der Hauptkultur und langer Hauptkultur (Abbildung 18A) etwa um den Faktor drei höher als in den anderen Kulturen (Abbildung 18B). Unabhängig von den Kulturbedingungen zeigte 1 µg/ml Ampicillin keine Wirkung auf die Vermehrung der Bakterien. In dem genutzten Medium waren die *E. coli* JM109 bei geringerer Verdünnung der Vorkultur und längerer Hauptkultur sensitiver gegenüber der Wirkung von Ampicillin in Konzentrationen >10 µg/ml. Diese Verfahrensweise war für eine routinemäßige Anwendung dieser densitometrischen Methode sinnvoll und es wurden erneut die Bedingungen unter besonderer Berücksichtigung des Kulturmediums untersucht.

### **3.2.4 Optimierung des Mediums für die Kultur von *E. coli* JM109**

Ausgehend von LB-Lennox, einer häufig für Laborstämme von *E. coli* verwendeten komplexen Nährlösung, wurden für die Kultur *E. coli* JM109 der Gesamtnährstoffgehalt und, mit Hinblick auf die Salzempfindlichkeit der Defensinwirkung, der Salzgehalt des Mediums variiert (Abbildung 19, Tabelle 3).

## Ergebnisse

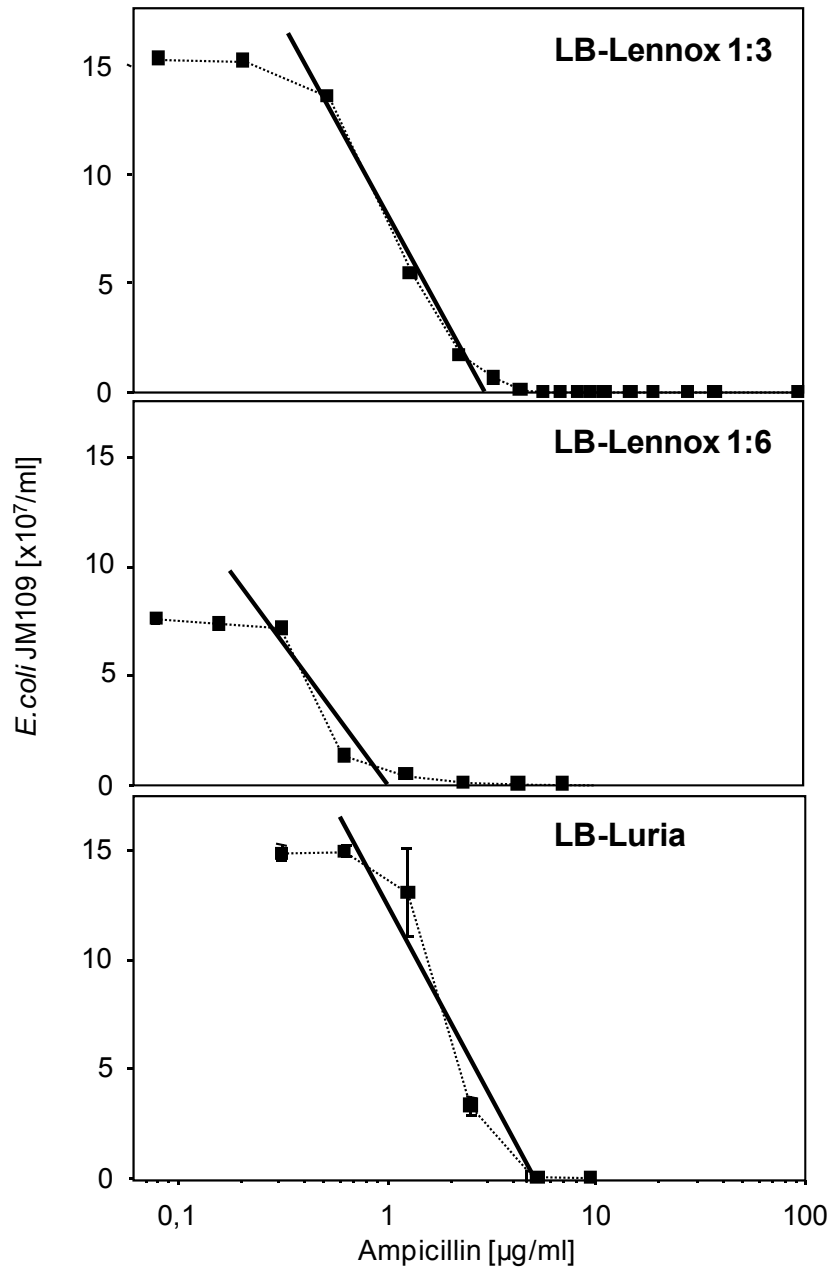


Abbildung 19: **Optimierung des Kulturmediums für den Nachweis antibakterieller Wirkungen auf *E. coli* JM109.** Eine Einzelkolonie eines frischen Ausstrichs von *E. coli* JM109 wurde als Vorkultur über 4 h ohne Antibiotika in LB-Lennox inkubiert. Für die Hauptkulturen wurde die Vorkultur 1:20 in dem entsprechenden Medium mit Ampicillin zu den angegebenen Endkonzentrationen vermischt und 6 h inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus repräsentativen Experimenten in Dreifachansätzen und die Regressionen.

## Ergebnisse

Tabelle 3: **Abhängigkeit der IC<sub>50</sub> von Ampicillin für *E. coli* JM109 vom Gesamtnährstoffgehalt bzw. Salzgehalt des Kulturmediums.** *E. coli* JM109 wurde wie für **Abb. 19** beschrieben in Gegenwart von Ampicillin inkubiert und die IC<sub>50</sub> aus den Regressionen der Korrelation von Bakterienzahl in der Kultur und der Ampicillinkonzentration im Medium ermittelt.

<i>Medium</i>	<i>LB-Lennox 1:3</i>	<i>LB-Lennox 1:6</i>	<i>LB-Luria</i>
R <sup>2</sup>	0,9316	0,8633	0,9324
Regressionsgleichung	$y = -0,76 \ln(x)+1,60$	$y = -0,38 \ln(x)+0,89$	$y = -0,77 \ln(x)+1,75$
<i>E. coli</i> JM109 min [x10 <sup>7</sup> /ml]	0	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,01
max	15,60 ± 0,28	7,80 ± 0,84	14,50 ± 0,39
bei IC <sub>50</sub>	7,80	3,65	7,20
IC <sub>50</sub> [µg/ml]	3,1	3,9	3,7

Unter den optimierten Bedingungen für die Kulturführung für *E. coli* JM109 war das Maximum des Bakterienwachstums bei LB-Luria, das die größten Anteile von Bactotrypton und Hefeextrakt enthielt, und bei LB-Lennox 1:3 vergleichbar, während eine weitere Reduktion der Nährstoffe in LB-Lennox 1:6 dieses Maximum etwa halbierte. Der Salzgehalt des Mediums nahm in der Reihenfolge LB-Lennox 1:3 > LB-Lennox 1:6 > LB-Luria ab. Unabhängig vom Salzgehalt lagen die IC<sub>50</sub> für Ampicillin vergleichbar zwischen 3,1 µg/ml und 3,9 µg/ml. Unter Berücksichtigung der möglichen Salzempfindlichkeit von Defensinwirkungen wurde LB-Lennox 1:6 als Medium mit geringem Salzgehalt für die Bakterienkultur ausgewählt.

Daraus wurden für die optimierte densitometrische Bestimmung antibakterieller Wirkungen folgende Parameter definiert:

- Indikatororganismus war der Laborstamm *E. coli* JM109 und es wurden immer Einzelkolonien von Übernacht-Kulturen auf LB-Agar verwendet.
- Als Vorkultur wurden Einzelkolonien in LB-Lennox ohne Antibiotika in der Regel über 4 h maximal bis zu OD<sub>600</sub> von 0,25 bis 0,35 inkubiert.
- Die Vorkulturen wurden 1:20 in LB-Lennox 1:6 verdünnt und in Hauptkulturen mit dem antimikrobiellen Agens in der Regel 6 h maximal bis zu OD<sub>600</sub> von 0,65 bis 0,75 im Kontrollansatz ohne antimikrobielles Agens inkubiert.
- Über die Formel: *E. coli* JM109 = (OD<sub>600</sub>/0,01 ml) x 10<sup>6</sup> wurde aus den OD<sub>600</sub> einzelner Kulturen die Bakterienzahl in einer Milliliter Kultur ermittelt.

### 3.3 Antibakterielle Aktivität von HBD-2 aus dem HBD2-GST-Fusionsprotein

#### 3.3.1 Nachweis der antibakterieller Aktivität von gereinigtem HBD2-GST

Nach Expression und Aufreinigung des HBD2-GST sowie der Etablierung der densitometrischen Methode für die Untersuchung der antibakteriellen Aktivität war der Nachweis der biologischen Aktivität des Fusionsproteins möglich (Abbildung 20).

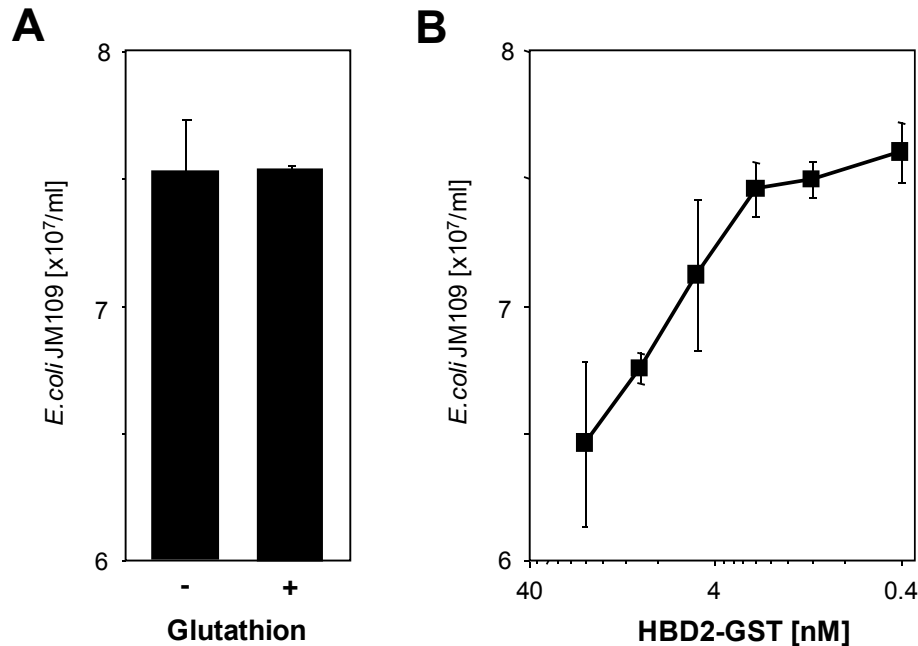


Abbildung 20: **Nachweis der antibakteriellen Aktivität von HBD2-GST und Einfluss des Elutionspuffers.** Unter optimierten Bedingungen wurde *E. coli* JM109 im densitometrischen Test eingesetzt. (A) Als Kontrolle erhielten die Hauptkulturen keine Zusätze oder den Elutionspuffer aus der Affinitätschromatografie mit 20 mM reduziertem Glutathion. (B) Gereinigtes HBD2-GST in Elutionspuffer wurde in verschiedenen Konzentrationen der Hauptkultur zugesetzt. Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem repräsentativen Experiment in Dreifachansätzen.

Das Glutathion, das aus der Affinitätschromatografie mit in der HBD2-GST-Präparation vorlag, reduzierte die Bakterienanzahl in der Kultur nicht im Vergleich zur Kontrolle ohne Puffer (Abbildung 20A). Das bedeutete, dass der Puffer selbst den Nachweis einer antibakteriellen Wirkung von HBD2-GST nicht störte und das Fusionsprotein nach nur einem Reinigungsschritt bereits zum Test zur Verfügung stand. Mindestens 2 nM HBD2-GST waren in dem etablierten Test notwendig für eine nachweisbare Reduktion der Vermehrung von *E. coli* JM109 und wurde durch eine weitere Steigerung der HBD2-GST-Konzentration verstärkt (Abbildung 20B). Obwohl dieser antimikrobielle Effekt nicht so markant war wie der von Ampicillin (Abbildung 19, Mitte) und eine  $IC_{50}$  von HBD2-GST aus den maximalen Konzentrationen des Fusionsproteins in den zur Verfügung stehenden Präparationen nicht ermittelt werden konnte, wies HBD2-GST eine eindeutige konzentrationsabhängige antibakterielle Aktivität auf.

### 3.3.2 Freisetzung von HBD-2 aus HBD2-GST durch Thrombinspaltung

Die Fusion von HBD-2 mit der GST erleichterte aufgrund der Größe des resultierenden Moleküls seine Darstellung, konnte aber wegen der Größenverhältnisse - das HBD-2 war bis zu 5fach kleiner als der Fusionspartner - ein Risiko für die biologische Aktivität von HBD-2 darstellen. Um diese Annahme zu prüfen, sollten die Bedingungen für die Freisetzung des HBD-2 aus dem Fusionsprotein über die durch die Klonierung in pGEX-2T eingeführte Thrombin-Spaltungsstelle zwischen HBD-2 und GST geprüft werden (Abbildung 21).

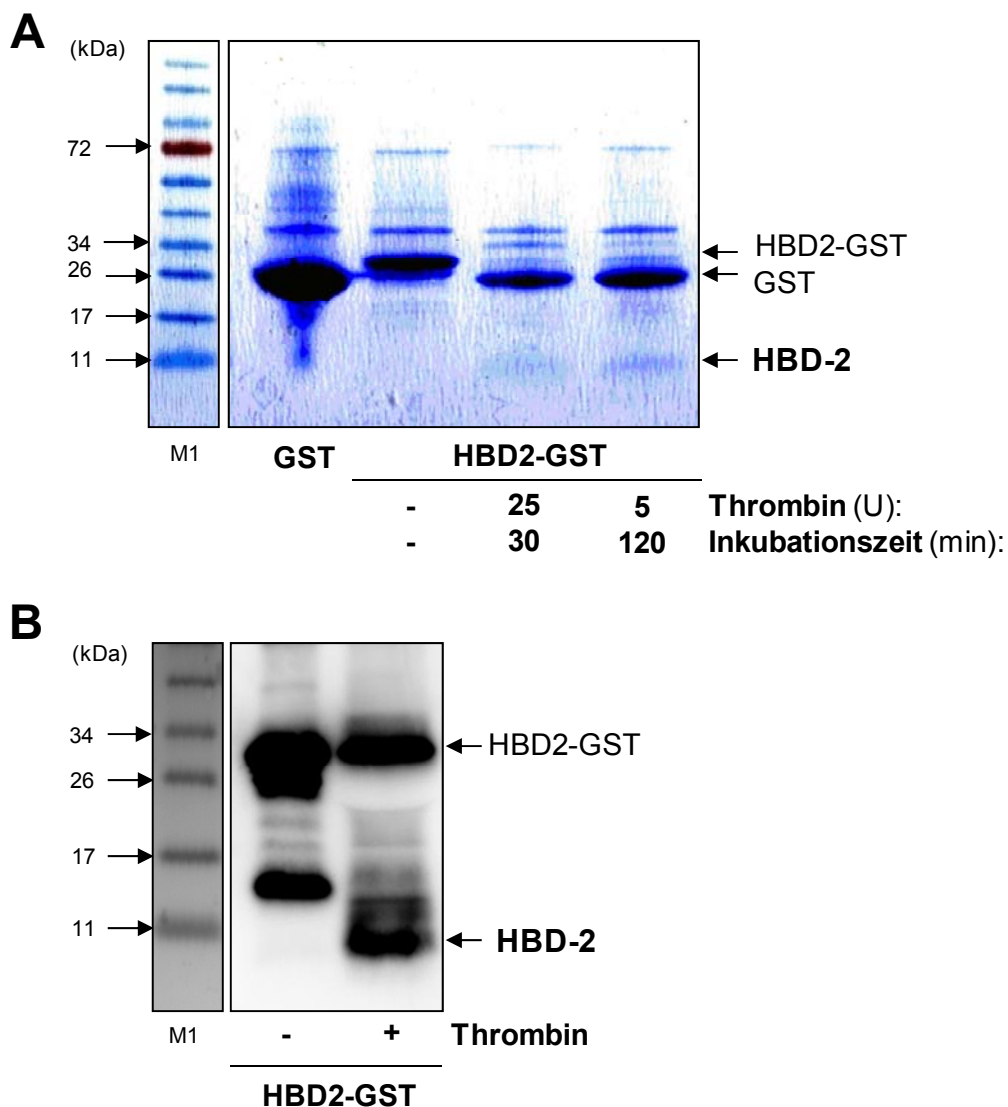


Abbildung 21: **Thrombinspaltung von HBD2-GST.** (A) Jeweils 30 µg gereinigtes HBD2-GST-Fusionsprotein in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) mit 100 mM NaCl wurden unter Variation der Inkubationszeiten und der Thrombinmengen bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten ebenfalls affinitätsgereinigte GST und HBD2-GST ohne Thrombin. Alle Ansätze wurden im Gradientengel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. (B) Jeweils 1 ml transformierte Bakteriensuspension mit pHBD2-E6.4 aus den Kulturen nach Induktion mit IPTG wurden lysiert und die klaren Lysate einem chromatografischen Batch-Verfahren mit Glutathion-Sepharose unterzogen (vgl. Abbildung 11B), 750 µl



## Ergebnisse

dieser Suspension wurden mit 50 U Thrombin für 60 min bei 37°C inkubiert. Die an den Sepharosepartikeln gebundenen Proteine mit bzw. ohne Inkubation mit Thrombin wurden mit Hilfe des Ladepuffers abgelöst, im Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und in einem HBD-2-spezifischen Western-blot dargestellt. Charakteristische Banden des Protein-Größenstandards (M1) sind angezeigt.

Während aus der GST-Präparation überwiegend eine starke Bande erschien, die ein geringeres  $M_r$  repräsentierte als die aus dem gereinigten HBD2-GST, war nach der Behandlung des HBD2-GST mit Thrombin unabhängig von der Enzymmenge und der Inkubationszeit die Bande des Fusionsproteins in der unempfindlichen Coomassie-Färbung nicht mehr deutlich. Die nach der Thrombinspaltung von HBD2-GST entstandene Bande von ~8 kDa entsprach dem durch die Spaltung freigesetzten HBD-2 und die bei 26 kDa befindliche Bande der GST (Abbildung 21A). Die größere Dichte der 8 kDa Bande nach der Behandlung des Fusionsproteins mit 5 U Thrombin für 120 min wies auf die bessere Effizienz der HBD-2-Freisetzung hin. Diese Bedingungen wurden für die folgenden Thrombinspaltungen verwendet.

Im HBD-2-spezifischen Western-blot wurde in der nicht mit Thrombin behandelten Probe die für HBD2-GST typische Bande von ~30 kDa detektiert. Weitere Banden entstanden durch unspezifische Bindungen des Antikörpers an andere Bakterienproteine. Die Thrombinspaltung setzte das HBD-2 frei, das eine zusätzliche Bande bei ~8 kDa lieferte (Abbildung 21B). Der sensitive Western-blot zeigte, dass die Spaltung des Fusionsproteins, entgegen der Annahme, nach der Coomassie-Färbung nicht vollständig, aber für biologische Tests ausreichend war.

### **3.3.3 Einfluss von GST auf die antibakterielle Wirkung des HBD2-GST**

Noch war offen, ob die GST selbst Einfluss auf die antibakterielle Aktivität des HBD-2 nahm. Deswegen wurde die Wirkung der rekombinanten, gereinigten GST mit der des HBD2-GST mit und ohne Thrombinbehandlung im densitometrischen Test mit *E. coli* JM109 untersucht (Abbildung 22).

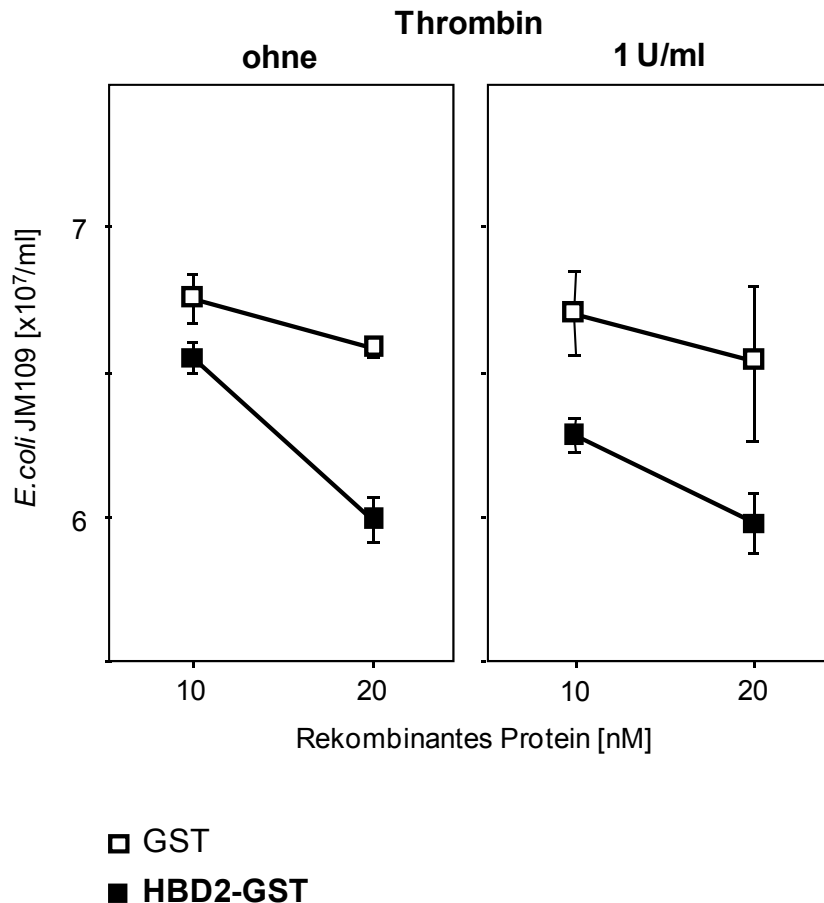


Abbildung 22: **Einfluss von GST auf die antibakterielle Wirkung des Fusionsproteins.** Unter optimierten Bedingungen wurden *E. coli* JM109 im densitometrischen Test eingesetzt. Die Hauptkulturen erhielten GST bzw. gereinigtes HBD2-GST mit und ohne Behandlung mit 5 U Thrombin über 120 min in Elutionspuffer mit 20 mM reduziertem Glutathion. Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem repräsentativen Experiment in Dreifachansätzen.

Während Glutathion und freie GST das Bakterienwachstum nicht beeinträchtigten, hatte das HBD2-GST mit und ohne Thrombinbehandlung eine eindeutige antibakterielle Aktivität. Die Freisetzung des HBD-2 aus dem Fusionsprotein durch die Behandlung mit Thrombin veränderte die antibakterielle Wirkung nicht. Die GST hatte also nicht nur selbst keine antibakterielle Aktivität sondern störte die Wirksamkeit des HBD-2 auch in der Fusion nicht. Eine Freisetzung des HBD-2 aus dem HBD2-GST und zusätzliche, verlustträchtige Reinigungsschritte waren für die Nutzung dieses HBD-2-Moleküls als Standardprotein in diesem biologischen Test nicht erforderlich.

### 3.3.4 Effekt der Wasserstoffionen-Konzentration auf die antibakterielle Wirkung von HBD2-GST

Die Abhängigkeit der antibakteriellen Wirkung des HBD2-GST von der Wasserstoffionen-Konzentration während des Nachweises im densitometrischen Test mit *E. coli* JM109 wurde als nächstes geprüft (Abbildung 23).

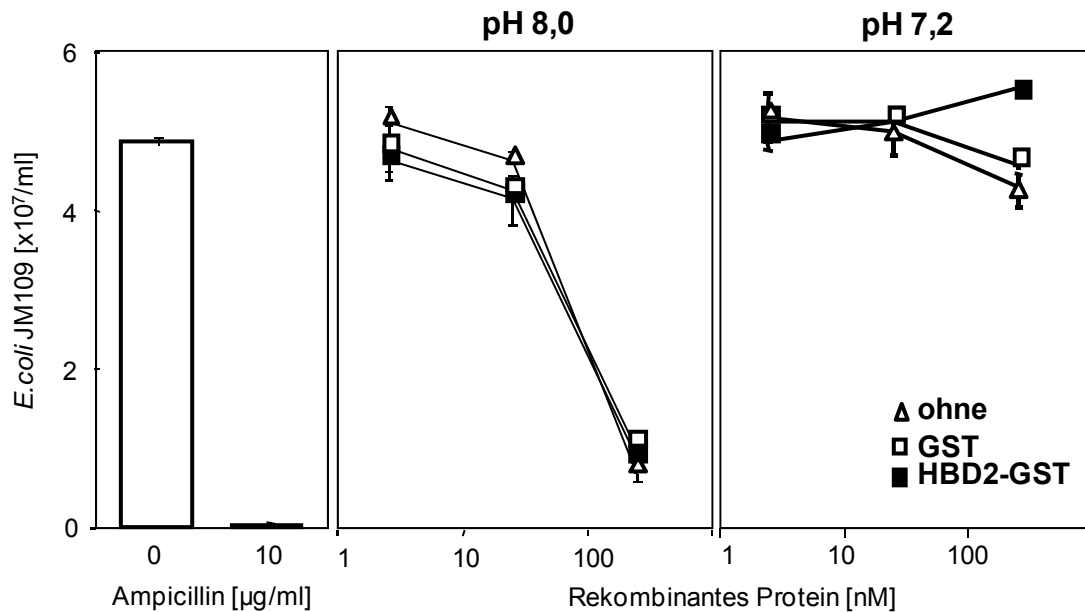


Abbildung 23: **Rolle des pH-Wertes für die antibakterielle Wirkung.** *E. coli* JM109 wurde unter den optimierten Bedingungen im densitometrischen Test verwendet. In den Hauptkulturen mit titrierten Konzentrationen gereinigter GST bzw. des HBD2-GST in 50 mM Tris-HCl mit 100 mM NaCl wurden in den Ansätzen mit den höchsten Konzentrationen die Wasserstoffionen-Konzentration in der gesamten Kultur mit entsprechenden Pufferkonzentrationen auf pH-Werte von 8,0 bzw. 7,2 eingestellt. Als Kontrollen erhielten die Hauptkulturen entweder keine Zusätze oder 10 mg/ml Ampicillin unter Standardbedingungen. Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem repräsentativen Experiment in Dreifachansätzen.

Während eine Wasserstoffionen-Konzentration im Neutralbereich von pH 7,2 optimal für das Bakterienwachstum waren, zeigte sich hier kein antimikrobieller Effekt des HBD2-GST. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes in einen schwach basischen Bereich bei pH 8,0 wirkten hohe Pufferkonzentrationen allein bereits stark antibakteriell. Vor diesem Hintergrund stellte sich keine antibakterielle Aktivität des HBD2-GST dar.

Über die hohe Pufferkapazität wurde der pH-Wert strenger reguliert als in anderen Ansätzen aus den vorhergehenden Experimenten und hatte möglicherweise die antibakterielle Wirkung des HBD2-GST behindert. Das und die generelle pH-Empfindlichkeit der Bakterien wiesen auf die große Bedeutung der Umgebung auch *in situ* und auf ein komplexes Geschehen in der antibakteriellen Aktivität, nicht nur der Defensine, hin. Außerdem unterstrich dies erneut, dass eine Bearbeitung des HBD-2 aus

## Ergebnisse

Gewebe unter nativen Bedingungen helfen könnte, die Integrität des Moleküls für den Nachweis der antimikrobiellen Aktivität zu schützen.

### 3.3.5 Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die antibakterielle Aktivität

Aus der Proteinbestimmung lag die HBD2-GST in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) ohne Zusatz von NaCl und ohne das Glutathion aus dem Elutionspuffer vor. Mit Hinblick auf Aufarbeitungsprozeduren für Defensine aus Proben menschlichen Darmgewebes war es interessant, ob eine solche starke Veränderung der Pufferbedingungen die antibakterielle Aktivität des HBD-2 beeinflusst (**Abbildung 24**).

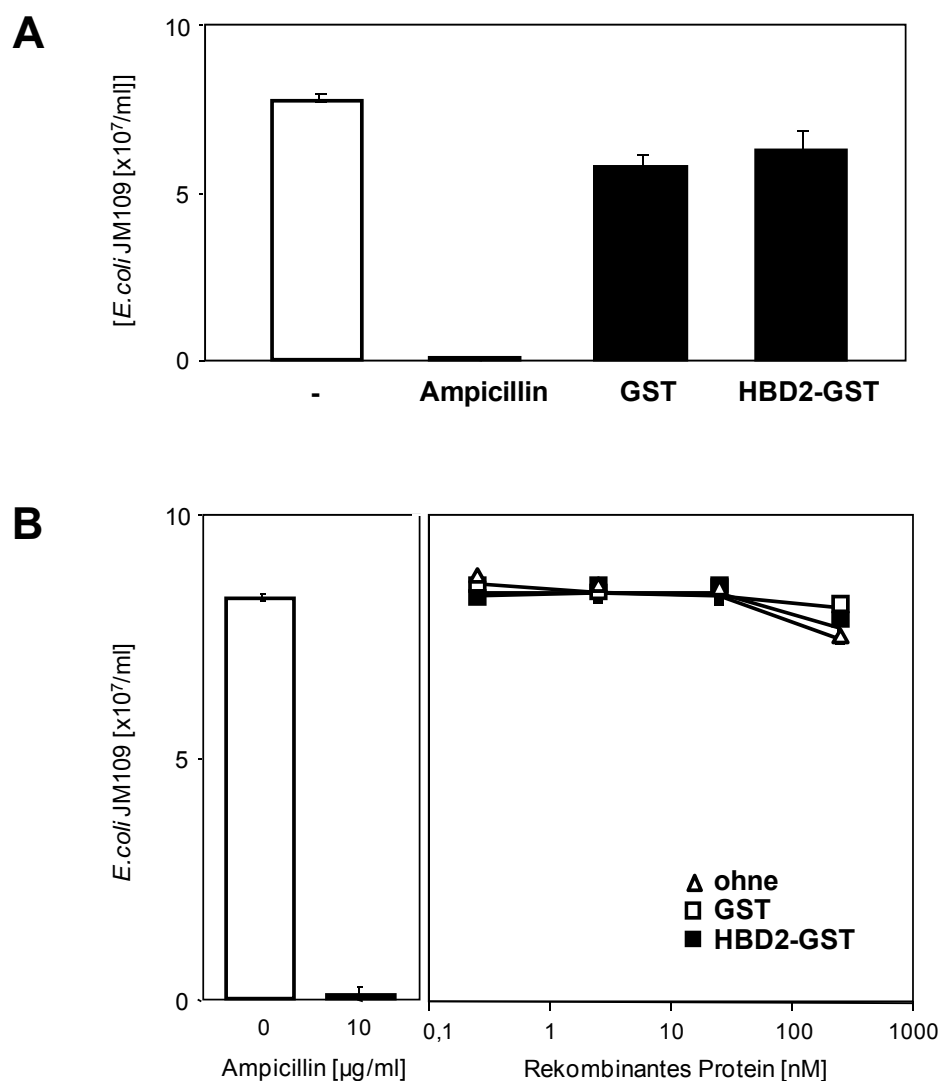


Abbildung 24: **Antibakterielle Aktivität von HBD2-GST nach Pufferaustausch gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)**. Unter optimierten Bedingungen wurde *E. coli* JM109 im densitometrischen Test eingesetzt. (A) Jeweils 20 nM oder (B) gleiche titrierte Konzentrationen gereinigter GST bzw. des HBD2-GST in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) wurden den Hauptkulturen zugesetzt. Als Kontrollen erhielten die Hauptkulturen entweder keine Zusätze oder 10 mg/ml Ampicillin. Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem repräsentativen Experiment in Dreifachansätzen.

## Ergebnisse

Im Gegensatz zu den Befunden mit dem HBD2-GST im Elutionspuffer (Abbildung 20B und Abbildung 22) hatte das Fusionsprotein keinen Einfluss mehr auf das Wachstum der *E. coli* JM109. Dieses war den Kontrollen mit der GST und dem Puffer allein vergleichbar (Abbildung 24A). Dieser Verlust der antibakteriellen Aktivität konnte durch eine Erhöhung der HBD2-GST-Konzentrationen im Test nicht aufgehoben werden. Unabhängig von den Konzentrationen war kein Unterschied im Bakterienwachstum feststellbar (Abbildung 24B). Eine Möglichkeit war, dass der Entzug des Glutathions zu Aggregationen und konformationellen Änderungen von HBD2-GST und somit auch zum Verlust der antibakteriellen Wirkung führte.

### 3.3.6 Wiederherstellung der antibakteriellen Aktivität von HBD2-GST nach Pufferaustausch

Hier wurde untersucht, ob durch Freisetzung des HBD-2 aus dem Fusionsprotein die antibakterielle Wirkung des Defensins, die nach dem Entzug von Glutathion und NaCl durch Austausch des Elutionspuffers gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) verloren gegangen war, wiederherstellbar war (Abbildung 25).

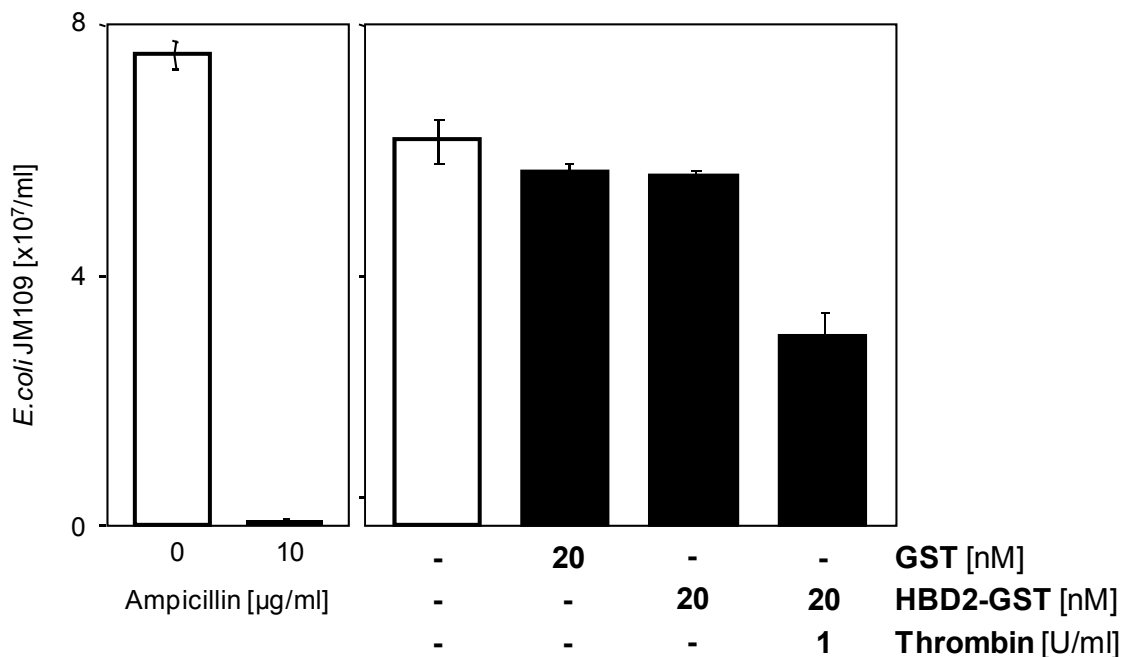


Abbildung 25: **Antibakterielle Aktivität von HBD2-GST nach Pufferaustausch gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) und Thrombinspaltung.** Unter optimierten Bedingungen wurde *E. coli* JM109 im densitometrischen Test eingesetzt. Jeweils 20 nM gereinigter GST bzw. HBD2-GST in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) mit und ohne Behandlung durch Thrombin wurden den Hauptkulturen zugesetzt. Als Kontrollen erhielten die Hauptkulturen entweder keine Zusätze oder 10 mg/ml Ampicillin. Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem repräsentativen Experiment in Dreifachansätzen.

## Ergebnisse

Wieder wies das HBD2-GST nach der dem Pufferaustausch keine antibakterielle Wirkung auf *E. coli* JM109 im optimierten densitometrischen Test auf und war den Kontrollen mit der GST und dem Puffer allein vergleichbar. Nach der Behandlung mit Thrombin zeigte dieser Versuch eine antibakterielle Aktivität, die auf freigesetztes HBD-2 zurückgeführt werden könnte. Das war ein Hinweis, dass die oben angenommenen Konformationsänderungen eher das Zusammenspiel beider Fusionspartner als das HBD-2 allein betrafen. Das wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

### **3.4 Untersuchung von Proben aus dem menschlichen Darm auf das Vorhandensein von HBD-2.**

Für die Untersuchung der Defensinproduktion im menschlichen Darm und dem Nachweis der antibakteriellen Wirkung daraus isolierter Defensine wurden Proben von Darmepithel von Patienten mit CED, sowie mit nicht-entzündlichen Erkrankungen des Darms als Kontrolle asserviert. Diese stammten aus dem Kolon von Patienten mit Colitis ulcerosa, dem terminalen Ileum von Patienten mit Morbus Crohn bzw. aus dem Kolon und dem Ileum von Patienten mit Kolon-Karzinom und sollten eine Korrelation der Verteilung von Defensinen im Epithel bestimmter Darmabschnitte mit Unterschieden im Krankheitsbild sowie der antimikrobiellen Wirkung der Defensine gestatten.

Aus der denaturierenden Aufarbeitung präparierter Epithelien standen die Überstände nach der Gefriertrocknung und Wiederaufnahme in wässriger Lösung sowie die Sedimente aus diesem Schritt zur Verfügung. Die wasserlöslichen Rückstände aus der Extraktion allein verhinderten das Wachstum der *E. coli* JM109 (Daten nicht gezeigt), so dass diese Proben nicht direkt in dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten densitometrischen Test eingesetzt werden konnten.

Deswegen wurde zunächst mit einem HBD-2-spezifischen Western-blot untersucht, ob und in welcher Fraktion überhaupt Defensine nachweisbar waren (Abbildung 26).

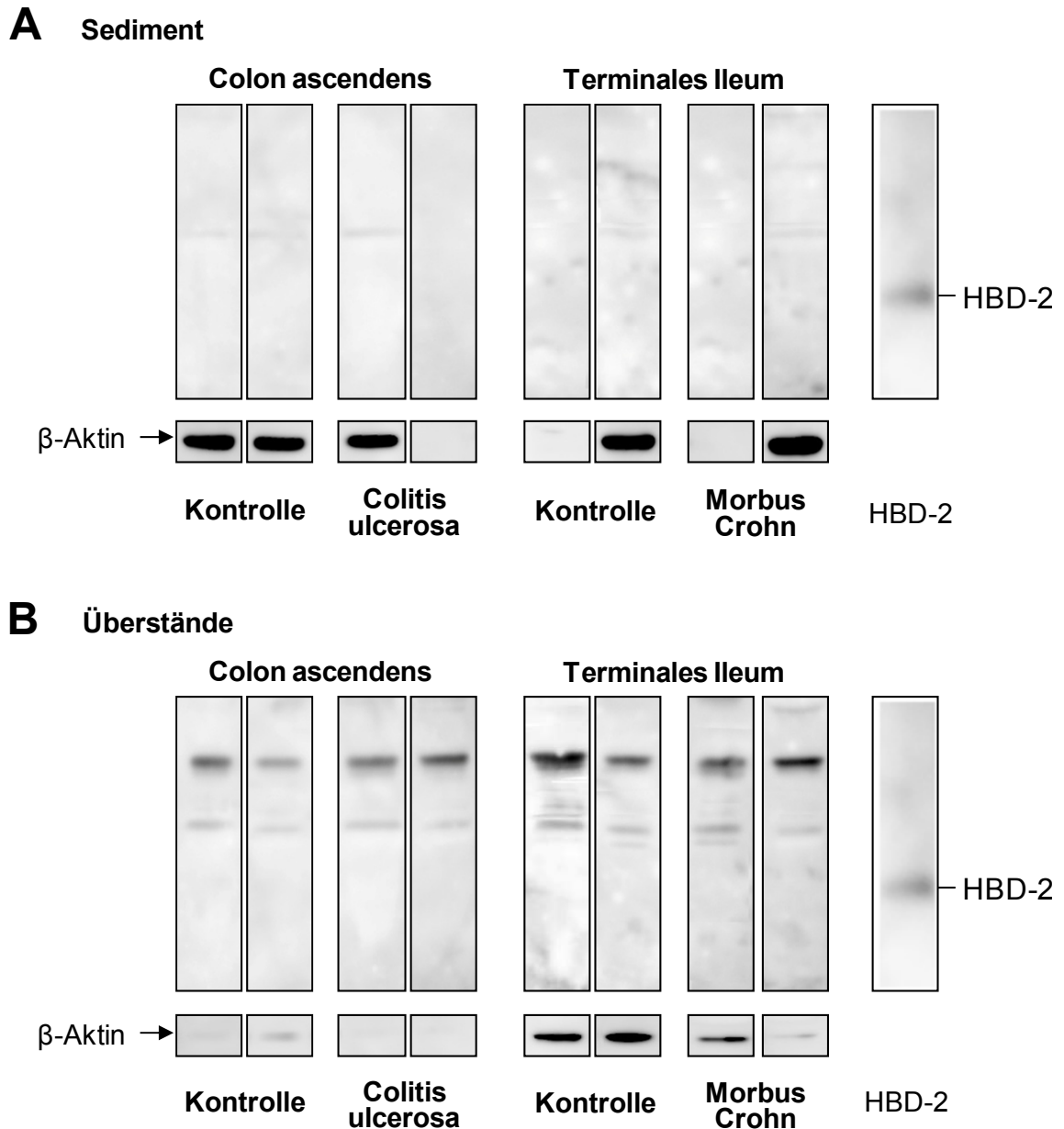


Abbildung 26: **Untersuchung von Proben aus dem menschlichen Darm auf das Vorhandensein von HBD-2.** Aus allen präparierten Epithelien wurden die Proteine mit einem gepufferten Gemisch aus Acetonitril und Trifluoressigsäure gefällt und die Überstände lyophilisiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden (A) die Sedimente und (B) die lyophilisierten Überständen in einem HBD-2-spezifischen Western-blot auf das Vorhandensein von HBD-2 untersucht. Als Kontrolle dienten 10 nmol rekombinantes HBD-2. Die Proteinbeladung wurde auf den gleichen Membranen über einen  $\beta$ -Aktin-spezifischen Western-blot geprüft. Repräsentative Proben für die präparierten Darmepithelien.

Trotz seiner hohen Sensitivität, die durch die Darstellung von 10 nmol rekombinantem HBD-2 belegt wurde, wies der HBD-2-spezifische Western-blot kein HBD-2 aus den Sedimenten und Überständen der aufgearbeiteten Proben der Darmepithelien nach. Das  $\beta$ -Aktin, ein relativ großes Protein mit  $\sim 42$  kDa, wurde durch die Fällung präzipitiert

## Ergebnisse

reicherte sich vor allem in den Sedimenten an (Abbildung 26A). Das HBD-2 als sehr kleines Protein mit ~8 kDa wurde in den Überständen erwartet. Dort zeigte sich aber nur eine Bande aus allen Proben, die wegen ihrer Größe als unspezifisch befunden wurde (Abbildung 26B).

Die Frage, ob das HBD-2 im Sediment oder Überstand vorlag, blieb auf Grund zu geringer Defensinmengen, die aus den Darmpräparaten mit der verwandten Methodik gewonnen werden konnten, also unbeantwortet. Dieser Befund und die Empfindlichkeit des im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und auf seine antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* JM109 geprüften HBD2-GST-Fusionsproteins gegenüber den Umgebungs- und Pufferbedingungen legte nahe, dass nicht-denaturierende Isolations- und Anreicherungsmethoden für Defensine aus menschlichen Darmepithelien für eine anschließende direkte Quantifizierung der antimikrobielle Aktivität *in vitro* geprüft werden sollten.



#### 4 Diskussion

Bei den CED wird ein Defekt auf Defensinebene vermutet, die letztlich zur bakteriellen Invasion durch die beeinträchtigte Barriere führt [Schmid, 2004]. In diesem Zusammenhang ist es interessant, ob aus dem Darmgewebe dargestellte Defensine unmittelbar bakterizid bzw. bakteriostatisch sind und ob diese Defensinwirkung bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zum nicht entzündeten Darm verändert ist.

Eine wichtige Voraussetzung für den reproduzierbaren Nachweis biologischer Aktivität ist eine geeignete Kontrolle, vorzugsweise mit dem gleichen, oder einem vergleichbaren Wirkmechanismus. Da dieser für Defensine nicht im Detail aufgeklärt ist, war ein Analogieschluss nicht möglich und es kamen nur Defensine selbst für den unmittelbaren Vergleich in Frage. Die Untersuchung von HBD-2 als Modell für induziert exprimierte Defensine erschien besonders interessant, da es Hinweise gibt, dass im Gastrointestinaltrakt die Regulation seiner Expression im Gegensatz z.B. zum konstitutiv exprimierten HBD-1, abhängig von inflammatorischen Prozessen ist [O'Neil, 1999]. Weiterhin verfügen Defensine neben antibakteriellen auch über chemotaktische Eigenschaften [Niyonsaba, 2004]. Ausgehend davon konzentriert sich die hier vorliegende Arbeit auf die Etablierung eines Systems für den direkten Nachweis der antibakteriellen Wirkung von Defensinen.

Im Folgenden werden die eigenen Ergebnisse mit Bezug auf die zentralen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit diskutiert.

#### **Welches rekombinante HBD-2-Fusionsprotein ist als Standardmolekül in einem Nachweissystem geeignet? Können antimikrobielle rekombinante Fusionsproteine von HBD-2 in *E. coli* produziert werden?**

Für die Untersuchung der biologischen Aktivität von Defensinen war es zunächst erforderlich diese kationischen, antimikrobiellen Peptide in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen. Als reifes Molekül besteht das HBD-2 aus insgesamt 42 Aminosäureresten [O'Neil, 1999]. Wie alle durch Zellen sezernierten Proteine werden Defensine im Lumen des endoplasmatischen Retikulums prozessiert, d.h. posttranslational modifiziert, gefaltet und oligomerisiert. Das endoplasmatische Retikulum bietet ein einzigartiges oxidierendes Milieu für die Faltung von Membranproteinen, von sekretorischen Proteinen mit Disulfidbrücken, die an die Zelloberfläche transportiert werden, sowie von Proteinen, die für die Lokalisation in andere Organellen wie Lysosomen und den Golgiapparat bestimmt sind. Chaperone und andere Faltungshelferproteine wie z.B. das Bindungsprotein BiP [Gething, 1999], das Glucose-regulierte Protein Grp94 [Argon, 1999], die Proteindisulfidisomerasen [Noiva, R. 1999], die

## Diskussion

Peptidylprolylisomerasen [Xu, 1999], das Hitzeschockprotein Hsp47 [Lamandé, 1999] oder Calnexin und Calreticulin [Chevet, 1999] im endoplasmatischen Retikulum unterstützen die Ausbildung der Konformation neu synthetisierter Proteine. Die Helferproteine des endoplasmatischen Retikulums sind nicht isoliert an der Faltung von Proteinen beteiligt, sondern bilden vielmehr ein Netzwerk, in dem sie gleichzeitig oder nacheinander ihre Funktion erfüllen. Bei Defensinen sind die Faltung und die Position der intermolekularen Disulfidbrücken so wesentlich für die Funktionalität des Peptids, dass man die ganze Gruppe dieser Peptide aufgrund typischer Faltungsmuster in  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\theta$ -Defensine unterteilt. Die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der Defensine gilt als mitverantwortlich für die antimikrobielle Wirkung der Defensine [Schneider, 2004].

Für die Herstellung definiert großer Mengen reiner Peptide oder kleiner Proteine, zu denen Defensine gehören, kommen prinzipiell zwei Möglichkeiten in Frage: eine chemische Synthese oder die rekombinante Herstellung nach Überexpression in einem geeigneten System.

In der chemischen Festphasensynthese von Peptiden stellt dessen biologische Funktion während der Herstellung kein Problem dar. Als wesentliches Hindernis für eine präparative synthetische Darstellung von Defensinen haben sich die für die biologische Aktivität notwendigen intermolekularen Disulfidbrücken erwiesen. Die Standardmethode über die Kettenverlängerung mit Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppen kann zu inkorrekten Faltungen und damit zu fehlender biologischer Aktivität führen [Chang, 1978]. Erfolgreiche chemische Synthesen mit zusätzlichen, konformationsunterstützenden Schritten wurden z.B. für ein defensinähnliches Peptid aus dem Japanischen Riesenkäfer *Allomyrina dichotoma* [Saido-Sakanaka, 1999], für  $\beta$ 2-Defensin aus dem Schwein [Veldhuizen, 2008],  $\beta$ 12-Defensin aus dem Rind [Mandal, 2002], ein komplett artifizielles antimikrobielles Peptid mit definierten Cysteinresten für intermolekulare Disulfidbrücken [Krishnakumari, 1999] oder für HBD-1 [Mandal, 2002] berichtet. Verkürzungen von Defensinen aus dem Rind und dem Menschen auf ihre C-Termini vereinfachen die Synthese und können die biologische Aktivität erhalten [Krishnakumari, 2003; Krishnakumari 2006]. Insgesamt haben sich chemische Synthesen auf diesem Gebiet nicht durchgesetzt.

Die üblichere Methode für Defensine ist die rekombinante Produktion, bei der ein zellulärer Produktionsapparat mit allen Mechanismen der Kontrolle und Fehlerkorrektur auf transkriptioneller und translationaler Ebene verwendet wird. Damit wird sicher gestellt, dass die rekombinanten Proteine ihre richtige molekulare Struktur annehmen.

Eine Variante ist die so genannte *in-vitro*-Translation rekombinanter Konstrukte in Systemen mit zellfreien Extrakten aus Weizenkeimen oder aus *E. coli*. Diese Extrakte

## Diskussion

enthalten alle für die Produktion von Fremdgenen aus klonierten Sequenzen notwendigen Enzyme und Vorstufen [Zubay, 1971; Nevin, 1991; Schwarz, 2007]. Dieser Methode wird wegen der damit verbundenen hohen Kosten selten eingesetzt. Ein Fusionsprotein aus HBD-2 und einem grün fluoreszierenden Protein wurde mit Extrakten aus *E. coli* exprimiert [Xu, 2005].

Bei der rekombinanten Herstellung von Defensinen in eukaryontischen Zellen, wie die von HBD-3 in der Fibroblastenzelllinie COS-7, wurde die HBD-3-cDNA in die produzierenden Zellen transfiziert. Ziel dieses Ansatzes war die Etablierung einer Zelllinie für die stabile Expression von HBD-3. Das exprimierte Protein wurde in das Medium sezerniert und wies eine antibakterielle Aktivität auf [Tuo, 2004]. Mit dieser Methode wurde zusätzlich ein Fusionsprotein mit HNP-1 in COS-7-Zellen produziert. Das antimikrobielle Peptid wurde intrazellulär exprimiert und konnte auch sezerniert werden. Dieser Ansatz stellte die Grundlage für die Untersuchung der Wirkung dieses Peptids dar [Liu, 2006]. Das HBD-2 wurde eukaryontisch sowohl in COS-7-Zellen [Cai, 2003] als auch in den Insektenzellen Sf21 hergestellt [Cai, 2004]. Bei beiden Herstellungsmethoden wurden das myc-Onkogen und His als Fusionspartner verwendet. Das entstandene Konstrukt HBD-2-mycHis wurde sowohl im Lysat als auch im Überstand nachgewiesen und zeigte im antimikrobiellen Versuch eine biologische Aktivität. Die in eukaryontischen Zellen exprimierten Peptide sind nicht toxisch für ihre Produzenten, doch ist dieser Ansatz nur wenig produktiv und daher wenig geeignet für die Herstellung größerer Mengen HBD-2.

Ein Vorteil der molekularen Struktur von Defensinen ist, dass ihre Wirkung nicht von der Glykosylierungen abhängig ist [De Smet, 2005]. Damit kommen sie für die Herstellung im prokaryontischem System in Frage. Am häufigsten werden rekombinante Defensine in *E. coli* exprimiert. Spezielle Produzentenstämme von *E. coli* gewährleisten formal eine hinreichend gute Produktivität bei der Herstellung rekombinanter Proteine. Der Stamm *E. coli* BL21 ist einer der am häufigsten verwendeten Produzentenstämme für die optimale Produktion rekombinanter Proteine. Beispiele der Synthese von Peptiden oder kleiner Proteine in *E. coli* BL21 sind die Expression der murinen Thymidylat-Synthase [Zhang, 1989] und die Herstellung der aktiven humanen DNA-Ligase I [Teraoka, 1993].

Präparationen von rekombinantem HBD-2 aus *E. coli* sind inzwischen von verschiedenen Firmen wie z.B. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, US) oder Strathmann (Hamburg, DE) kommerziell erhältlich. Die biologische Aktivität dieser gereinigten rekombinanten Proteine ist ausschließlich über ihre Fähigkeit zur Chemotaxis gegenüber unreifen dendritischen Zellen beschrieben. Die dafür notwendigen Konzentrationen liegen um 10 ng/ml (1-100 ng/ml) und sind damit im nanomolaren Bereich (~2 nM; 200 pM-20 nM). Die Stabilität des vergleichsweise kleinen HBD-2 war für das kommerziell erhältliche

## Diskussion

Defensine problematisch und eine direkte antibakterielle Wirkung nicht beschrieben. Der experimentelle Nachweis der antibakteriellen Aktivität erfordert z.B. in der Densitometrie Konzentrationen von 20 µg/ml [Tomita, 2000], die vierfach höher sind als die für Chemotaxis (5 µg/ml) erforderliche [Niyonsaba, 2004].

Grundsätzlich wird der rekombinante Ansatz zur Produktion von Defensinen in Bakterien dadurch erschwert, dass Defensine mit einem  $M_r$  von 5-10 kDa sehr kleine Proteine bzw. Peptide sind, was besondere Anforderungen an die Trennschärfe der Aufreinigungsmethoden stellt. Weiterhin kann freies Defensin toxisch für die produzierenden Bakterien sein.

Um das Problem der Größe zu lösen, können Defensine mit weiteren Proteinen fusioniert werden. Der Fusionspartner soll hierbei das Protein vergrößern und zusätzlich definierte, vom Defensinanteil unabhängige Eigenschaften in das Gesamtmolekül einführen, die die analytische und präparative Darstellung des Defensinmoleküls erleichtern. Bedingung ist weiterhin, dass der Fusionspartner bezüglich der biologischen Wirkungen des Defensins inert ist.

Prokaryontisch wurden humane Defensine mit einer Reihe von Fusionspartnern hergestellt. Die Bedingungen der Expression von HBD-2 in *E. coli* wurden untersucht und optimiert in Ansätzen mit den Fusionspartnern His [Xu, 2006(1); Sahly, 2006] und Thioredoxin (TrxA) [Zhong, 2006]. Die exprimierten Fusionsproteine wurden dann in antibakteriellen Methoden für den Nachweis ihrer Wirkung gegen *E. coli* [Xu, 2006(1); Zhong, 2006] und *Klebsiella*-Stämme verwendet. Das HBD-3 wurde mit der GST [Si, 2007], TrxA [Huang, 2006; Huang, 2007], und His fusioniert [Sahly, 2006]. Diese Arbeiten haben die Expression von HBD-3 etabliert und seine antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* [Huang, 2006], *Klebsiella* [Sahly, 2006], und *Staphylococcus aureus* [Si, 2007] untersucht. Weitere Vertreter der Gruppe der  $\beta$ -Defensine, das HBD-4, HBD-5 und HBD-6 wurden ebenfalls prokaryontisch in *E. coli* hergestellt und mit Hilfe ihrer Fusionspartner GST und TrxA isoliert und aufgereinigt. Das HBD4-GST wurde synthetisiert um die Präparation seines polyklonalen Antikörpers zu ermöglichen [Cao, 2008(1); Cao, 2008(2)]. Antibakterielle Versuche mit TrxA-HBD4 haben gezeigt, dass das Fusionsprotein gegen *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* aktiv ist [Xu, 2006(2)], während TrxA-HBD5 und TrxA-HBD6 *E. coli* aber nicht *Staphylococcus aureus*-Bakterien abtöten [Huang, 2008].

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde HBD-2 für eine prokaryontische Expression rekombinant mit His bzw. der GST fusioniert. In beiden Konstrukten wurde in den Plasmiden pQE30 und pGEX-2T das HBD-2 in das Leseraster hinter dem Fusionspartner kloniert; die Fusion war also C-terminal. Bei dieser Strategie war von Vorteil, dass durch die Klonierung in die *Multiple Cloning Site* die für die Transkription und

## Diskussion

Translation des Genprodukts optimale Anordnung der regulierenden Strukturen nicht unwägbar verändert wurde (vgl. Abbildung 3A).

Auf zwei Ebenen wurde aber gewährleistet, dass die antibakteriell wirksamen Defensine die Bakterienzellen während der Expression nicht behindern. Die durch eukaryontische Zellen sezernierten Defensine wirken über die bakteriellen Membranen [Schröder, 1999]. In beiden Konstrukten für die prokaryontische Expression der HBD-2-Fusionsproteine wurden nur die 42 Aminosäurereste des reifen HBD-2 ohne die Signalsequenz, über die normalerweise die Ausschleusung aus der Produzentenzelle vermittelt wird, kloniert und entsprechend mit den Sequenzen für His bzw. GST verknüpft. Die durch *E. coli* BL21 exprimierten Fusionsproteine blieben im Zytoplasma der Produzentenzellen.

Die Integrität produzierender Bakterienzellen kann ebenfalls dadurch geschützt werden, dass die Expression partiell von der Vermehrung der Bakterienzellen entkoppelt wird. Eine solche, so genannte induzierte Expression, wird über bestimmte Regionen auf den Expressionsvektoren kodiert. Wichtigste Strukturen sind die Promotoren, von denen aus die Transkription der spezifischen RNA gestartet wird. Beispielsweise benutzen pET-Vektoren einen Wechsel der Temperatur während der Bakterienkultur [Cantrell, 2003]. Das am häufigsten verwendete System, das auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, basiert auf den Regulationsprinzipien des lac-Systems mit dem IPTG-induzierbaren tac-promotor und einem Repressorprotein aus dem LacI<sup>q</sup>-Gen. Die regulierte Expression sowohl durch den Vektor pQE30 als auch durch pGEX-2T basiert auf diesem Prinzip der Induktion der Fremdgenexpression durch IPTG, ein Substratanalogon der Galaktose [Boos, 1967; Boos, 1968]. Bei potentiell nicht toxischen Genprodukten wählt man in dem lac-System in der Regel längere Phasen nach der Induktion, wie z.B. 4 h für die Expression der Methioninsulfoxid-Reduktase mit dem Vektor pGEX-2T [Rahman, 1992] oder 3 h für die Expression von Colicin 5 mit dem Vektor pQE30 [Yang, 2007]. Die Expression rekombinanter Defensine erfolgte in vergleichbaren Systemen. Das Fusionsprotein HBD3-GST wurde mit dem Vektor pGEX-KG in *E. coli* BL21 hergestellt. Die Bakterien wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 inkubiert bevor die Expression mit 500 µM IPTG induziert wurde [Si, 2007]. Das DNA-Fragment smHBD2 wurde in den Vektor pET-32a kloniert und das entstandene Plasmid in *E. coli* BL21 transformiert. Die Expression des Fusionsproteins TrxA-HBD2 wurde mit 400 µM IPTG induziert und die Produktion erreichte ihr Maximum nach 6 h [Zhong, 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von HBD2-GST mit 4 h Kulturphase vor der Induktion der Fremdgenexpression durch die Zugabe von IPTG und einer nur 2 h andauernden eigentlichen Produktionsphase gesichert, so dass ausreichend vitale Produzentenzellen in der Kultur vorhanden waren. So hatte der mögliche toxische Effekt

## Diskussion

dieses antimikrobiellen Peptids keinen wesentlichen Einfluss auf die Vitalität der produzierenden Bakterien des Stammes *E. coli* BL21.

Der mit der Klonierung in pQE30 eingeführte Fusionspartner His ist mit nur sechs zusätzlichen Aminosäureresten sehr klein und es wurde davon ausgegangen, dass dieser Anhang die biologischen Eigenschaften des HBD-2 weniger wahrscheinlich ändert als ein größerer Partner. Die Aufreinigung solcher Fusionsproteine erfolgt in der Chromatografie über eine Chelatbildung der Imidazolringe der Histidinreste mit an einer Gelmatrix gekoppelten zweiwertigen Ionen wie  $\text{Ni}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$  [Porath, 1975; nach pET System Manual 1997, Novagen]. Bedingung für eine starke Bindung an das Säulenmaterial sind lokal konzentrierte, multiple Histidinreste. Diese werden im rekombinanten His-Fusionsprotein durch die sechsfache Wiederholung eines Histidinrestes erreicht. Neben der Reihung von Histidinresten in der Primärstruktur kann auch in Sekundär- und Tertiärstrukturen anderer Proteine aus den Produzentenstämmen durch die Faltung eine lokale Häufung von Histidinresten entstehen. Diese Proteine binden auch an die chelierende Säulenmatrix und können so die Spezifität der Aufreinigung für das gewünschte rekombinante Fusionsprotein verringern [Arnau, 2006]. Für das HBD2-His wurde direkt aus den Lysaten transformierter *E. coli* BL21 mit Hilfe eines HBD-2-spezifischen Western-blot eine Bande in der erwarteten Größe um 8 kDa gefunden. Eine Anreicherung des HBD2-His aus den Gesamtlisaten, bei denen der pH-Wert optimiert war, war weder mit Hilfe von immobilisierten  $\text{Ni}^{2+}$  noch mit  $\text{Co}^{2+}$  effizient möglich (Daten nicht gezeigt). Obwohl also die mit pHBD2-H1.4 transformierten Bakterien ein HBD-2 (vgl. Abbildung 10) bildeten, war die Produktivität so gering, dass eine präparative Darstellung im Rahmen dieser Arbeit nicht sinnvoll war. Ähnlich geringe Produktivitäten wurden auch in anderen Konstrukten mit nicht antibakteriellen Genprodukten auf der Basis des Vektors pQE30 gefunden (Ulrike Erben, persönliche Mitteilung), so dass davon ausgegangen wurde, dass dieses Vektorsystem auch für die Herstellung eines HBD2-His nicht geeignet war. Andere Expressionsvektoren für His-Fusionsproteine wie die pET- oder der pBAD-Reihe (Invitrogen, Karlsruhe, DE) mit anderen (regulierbaren) Promotoren für die Fremdgenexpression wären denkbar, wurden aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geprüft.

Die Arbeiten konzentrierten sich auf die über das lac-System regulierbare Expression einer Fusion von reifem HBD-2 mit der GST, einem Enzym, das die Bindung von Glutathion an organismusfremde organische Verbindungen katalysiert. Physiologisch werden so gebildete Konjugate aus der Zelle transportiert oder über den Import in Vakuolen und den darin erfolgenden Abbau aus dem Zellstoffwechsel entfernt. Die GST spielt also bei der Entgiftung organischer Stoffe eine wichtige Rolle [Marrs, 1996; Leustek, 2000].

## Diskussion

Im Zusammenhang mit der Herstellung nativer rekombinanter Fusionsproteine wird die molekulare Enzym/Substrat-Interaktion zwischen der GST und oxidiertem bzw. reduziertem Glutathion in ein spezifisches affinitätschromatografisches Verfahren umgesetzt [Smith, 1988]. Die GST ist mit ~26 kDa im Vergleich zu His ein relativ großes Molekül, was *per se* die Aufreinigung und Wiederfindung von Fusionsproteinen unter chromatografischen Standardbedingungen für native Proteine erleichtert. Zu Beginn der Arbeiten war nicht bekannt, ob die GST durch ihre Größe die chemische Struktur von HBD-2 so weit verändert, dass die antibakterielle Wirksamkeit des Defensinanteils beeinträchtigt wird. GST diente schon als Fusionspartner für das HBD-3. Das in *E. coli* BL21 exprimierte Fusionsprotein zeigt keine antibakterielle Wirkung gegen die Produzentenzellen, wirkte jedoch gegen *Staphylococcus aureus* in der Mikrodilution [Si, 2007]. Andere Beispiele von Fusionsproteinen, die in ihrer antimikrobiellen Wirkung vom Fusionspartner nicht beeinträchtigt wurden, sind das TrxA-HBD2 [Xu, 2006(1)], TrxA-HBD3 [Huang, 2006] und TrxA-HBD4 [Xu, 2006(2)]. Mit Hilfe einer densitometrischen Methode und der Bestimmung der OD<sub>600</sub> wurde die biologische Aktivität der Fusionsproteine gegen *E. coli* [Xu, 2006(1); Huang, 2006] bzw. für TrxA-HBD4 auch gegen *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen [Xu, 2006(2)].

Obwohl daraus geschlossen werden konnte, dass die Fusion von HBD-2 mit der um den Faktor 5-7 größeren GST die biologische Wirkung des HBD-2 nicht zwangsläufig behindern würde, wurde für die Expression des HBD2-GST in *E. coli* BL21 der Vektor pGEX-2T gewählt, der zwischen der C-terminalen GST und dem HBD-2 eine Thrombinschnittstelle zur selektiven Freisetzung des HBD-2 einführte. Thrombin ist eine endolytische Serinprotease, die natürlicherweise die Arg-Gly-Verbindungen des Fibrinogens spaltet, um Fibrin zu bilden und die Fibrinopeptide A und B freizusetzen. Diese Eigenschaft von Thrombin wird ausgenutzt, um durch eine Spaltung hinter dem Argininrest in der Sequenz Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser [Steiner, 1987] einen Fusionspartner freisetzen zu können.

Die Produktivität transformierter *E. coli* BL21 unterschied sich, wenn sie entweder mit dem Ausgangsvektor pGEX-2T für die Gewinnung freier GST als Kontrollprotein oder mit pHBD2-E6.4 für das HBD2-GST transformiert waren. Für jeweils 1 mg rekombinanten Proteins waren für die GST 46 ml Bakteriensuspension ausreichend, während nach der Fusion mit HBD-2 mindestens 360 ml notwendig waren. Das war ein erster Hinweis auf die antibakterielle Wirkung des gebildeten HBD2-GST-Fusionsproduktes und eine Beobachtung, die zum ersten Mal für ein Fusionsprotein mit rekombinatem Defensin beschrieben wurde (vgl. Abbildung 11).

## Diskussion

Obwohl der Stamm *E. coli* BL21 durch Defekte in den zwei zytoplasmatischen Proteasen der Loci *Lon* und *OmpT* überwiegend gelöste, intakte Genprodukte exprimiert [Strauch, 1988; Grodberg, 1988; Sugimura, 1988; Schmidt, 1999], lag nach der Lyse der Bakterien ein Teil des gebildeten Genprodukts in den festen Bestandteilen vor. Sehr wahrscheinlich befand sich das HBD2-GST auch in unlöslicher Form in Einschlusskörpern, den so genannten *Inclusion Bodies*, die häufig bei hoher intrazytoplasmatischer oder interperiplasmatischer Expression rekombinanter Proteine durch *E. coli* entstehen [Bowden, 1991; Singh, 2005]. Dieser unlösliche Teil wurde wegen der aufwendigen und voraussichtlich verlustreichen Aufarbeitung bis hin zu biologisch einsetzbarem HBD2-GST nicht weiter verarbeitet [Fischer, 1993].

Zytoplasmatisch gelöstes HBD2-GST-Fusionsprotein wurde sukzessive aus dem klaren Lysat chromatografisch über Glutathion-Sepharose gereinigt. Bei der Prüfung der Reinheit der so erhaltenen HBD2-GST-Präparationen in der SDS-PAGE ergaben sich nach der Färbung mit Coomassie zwei gleich starke Banden im Bereich um 30 kDa. Ein HBD2-spezifischer Western-blot bestätigte, dass nur die Bande, die der größeren  $M_r$  entsprach, ein Fusionsprotein mit HBD-2 enthielt. Die Bande mit dem geringeren  $M_r$  wurde als freie GST identifiziert. Möglicherweise wurde HBD-2 während der Präparation durch unvollständige Inhibition von Serinproteasen über Thrombin-ähnliche bakterielle Endopeptidasen aus dem HBD2-GST freigesetzt [Tripathi, 2008]. Eine weitere Ursache könnte ein vorzeitiger Abbruch der Transkription sein, wodurch der freie C-terminale Partner und nicht das gewünschte Fusionsprotein gebildet wurde. Entscheidend für die Verwendung dieser HBD2-GST-Präparationen in biologischen Testsystemen war, dass die GST selbst nicht antibakteriell wirkt. Dafür wurden bei der Kalkulation der Konzentrationen der HBD2-GST-Lösungen die molaren Verhältnisse der beiden Proteine aus der HBD2-GST-Präparation berücksichtigt und freie GST in äquimolaren Konzentrationen in zusätzlichen Kontrollansätzen immer mitgeführt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe von BCA musste das Glutathion, das selbst als Tripeptid in die Bestimmung eingeht, aus der Lösung entfernt werden. Auf Grund des Größenunterschieds zwischen der GST oder dem HBD2-GST-Fusionsprotein kamen hierfür Dialyse, Ultrafiltration oder Gelfiltration in Frage. Die Dialyse funktioniert nach dem Prinzip des Konzentrationsausgleichs von Substanzen in zwei Flüssigkeiten durch Diffusion, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind. Moleküle, die klein genug sind, die Poren der Membran zu passieren, bewegen sich in die Richtung der geringeren Konzentration. Diese Methode wird hauptsächlich für die Entfernung von Salzen aus einer Proteinlösung verwendet und ist ungeeignet für die effiziente Trennung von Proteinen [Andrew, 2001]. Die Ultrafiltration beruht, ähnlich der Dialyse, auf der Trennung von Proteinen durch Membranen mit definierter Porengröße. Anders als bei der



Dialyse wird hier mit Druck bzw. Unterdruck durch das Anlegen eines Vakuums gearbeitet und die Trennschärfe ist durch die Beschaffenheit der Membranen in der Regel gering [Schratter, 1993].

Die Gelfiltration ist eine Säulenchromatografie, die ausnutzt, dass die Partikel der Säulenmatrix Poren definierte Durchmesser haben. Die Trennsäulen sind mit kleinen Kugeln eines porösen hochvernetzten Materials gefüllt. Eluiert wird nun eine Probe mit Molekülen verschiedener Größe. Kleine Moleküle verbleiben in den Poren des Gels bis sie dort wieder heraus diffundieren. Zuerst eluieren die großen Moleküle. Der Vorteil dieser Methode ist die gute Trennung nach der Größe mit nur geringer Vergrößerung des Probenvolumens. Dieses Verfahren ist nicht denaturierend und beeinträchtigt die biologische Aktivität nicht [Porath, 1959; Hagel, 2001]. Die aus der Glutathion-Sepharose-Säule eluierten Volumina von ~7 ml waren gering genug, dass der Gelfiltration über standardisierte PD-10-Säulen der Vorzug gegeben wurde. Nach dem Austausch des Elutionspuffers gegen einen Puffer mit geringem Salzgehalt wurden Konzentrationen von 1 mg/ml, bezogen auf den Gehalt von HBD2-GST eingestellt. Bei einem  $M_r$  des HBD2-GST-Fusionsproteins von ~30 kDa hatte diese Stammlösung eine molare Konzentration von 35  $\mu$ M HBD2-GST.

Mit dem in *E. coli* produzierten rekombinanten HBD2-GST Fusionsprotein und der freien GST als Kontrolle standen affinitätschromatografisch gereinigte Standardmoleküle in ausreichenden Mengen für die Etablierung eines Systems zum Nachweis der antimikrobiellen Aktivität von HBD-2 zur Verfügung.

**Unter welchen Bedingungen kann die antimikrobielle Aktivität von HBD-2 mit einer densitometrischen Methode nachgewiesen werden? Wie lauten die optimierten Kulturbedingungen für *E. coli* JM109?**

Für die Quantifizierung der antibakteriellen Wirkung von Defensinen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine zuverlässige, sensitive Methode etabliert werden in der das HBD2-GST-Fusionsprotein als Standard genutzt wird.

Zunächst wurde eine radiale Diffusion in Erwägung gezogen. In diesem semiquantitativen Test wird ein Nähragar in einer Kulturschale mit Weichagar überschichtet, der Indikatorbakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase enthält. In die Agarschicht werden Löcher gestochen, in die die zu testende Lösung pipettiert wird oder die Testlösung in Filterabschnitte aufgenommen, die auf die Bakterien-haltige Schicht aufgelegt werden. Nach der Inkubation wird die antibakterielle Aktivität durch die Messung klarer Höfe ohne Bakterienwachstum im Vergleich zu einem definierten Standardantibiotikum gemessen [Lehrer, 1991; Harwig, 1994]. Diese Methode erlaubt die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität bei multiplen Proben eines Agens. Die

## Diskussion

Verwendung der radialen Diffusion als Standardtest ist problematisch u.a. aufgrund der fraglichen Hitzestabilität der Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase, der Notwendigkeit absolut gerader Brutschränke und der Abhängigkeit der Größe der Höfe auch von den Wachstumsbedingungen wie z.B. von der individuellen Dicke der Agarschichten [du Toit, 2000]. Diese Versuchsanordnung stellt auch die antibakterielle Wirkung von synthetischem murinem  $\beta$ 3-Defensin auf verschiedene Bakterienspezies in einem Konzentrationsbereich von 25-50  $\mu\text{g/ml}$  dar [Burd, 2002].

Aus den gereinigten HBD2-GST-Präparationen wies die radiale Diffusion weder mit Probenlöchern in der Agarschicht, noch mit aufgelegten Filterabschnitten, die mit der HBD2-GST-Lösung getränkt waren, eine antibakterielle Wirkung auf die Laborstämme *E. coli* JM109 und *E. coli* BL21 nach (Daten nicht gezeigt). Daraus wurde gefolgert, dass dieser Versuchsansatz hier für den Nachweis des Effektes von Defensinen nicht empfindlich genug war.

Eine weitere Möglichkeit war ein densitometrischer Test, bei dem die antimikrobielle Wirkung über das Wachstum einer Bakterienkultur bestimmt wird [Xu, 2006(1)]. Die Densitometrie ist eine etablierte Methode, um quantitative Aussagen über die biologische Aktivität eines Stoffes machen zu können. Entscheidend für den Erfolg der Methode ist die Kulturführung, die alle Bakterien in die mittlere exponentielle Wachstumsphase bringt. Einzelkolonien eines frischen Ausstrichs von *E. coli* JM109 wurden als Vorkulturen ohne Antibiotika in LB-Lennox über 1,5 h inkubiert und in den Hauptkulturen in LB-Lennox 1:6 mit dem Kontrollantibiotikum Ampicillin bzw. mit dem antimikrobiellen Agens HBD2-GST zu den angegebenen Endkonzentrationen vermischt und über maximal 6 h inkubiert. Die  $\text{OD}_{600}$  wurde im Vergleich zum Medium bestimmt. Die  $\text{IC}_{50}$  von Ampicillin wurde aus der Regression der Beziehung zwischen  $\text{OD}_{600}$  und Ampicillin-Konzentration berechnet. Die typischen Konzentrationsbereiche für die  $\text{IC}_{50}$  unter den etablierten Bedingungen lagen zwischen 3,1 und 3,9  $\mu\text{g/ml}$  und stellen ein Vergleichsmaß für die gute Empfindlichkeit der Methode gegenüber allen antibakteriellen Substanzen dar.

Für einige humane Defensine wurden mit Hilfe densitometrischer Nachweise die Wirkungsspektren und die effektiven Dosen gezeigt. Die beiden Klassen der humanen Defensine und ihre Unterklassen unterscheiden sich im Spektrum der durch sie inhibierten Mikroorganismen. Das HD-5 beispielweise weist besonders gute Aktivität gegen *E. coli*, *Candida albicans*, *Listeria monozytogenes* und *Salmonella typhimurium* im Test mit CFU auf [Porter, 1997]. Das HBD-2 wirkt bevorzugt gegen Gram-negative Bakterien mit einer 90%-igen Reduktion der CFU bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  [Harder, 1997], während HBD-3 insbesondere den Gram-positiven Bereich abdeckt. Die Aktivität des HBD-3 gegen *Staphylococcus aureus* wurde auch durch die Bestimmung der

## Diskussion

CFU analysiert [Harder, 2001; García, 2001(1)]. Das HBD-4 hat eine schwache generelle antibakterielle Wirkung. Gegen einzelne Vertreter wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staphylococcus carnosus* wirkt es stark. Die antibakterielle Wirkung dieses Vertreters der  $\beta$ -Defensine wurde mit Hilfe der radialen Diffusion und der Mikrodilution kontrolliert [García, 2001(2)].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Bedingungen für den densitometrischen Nachweis antimikrobieller Aktivität über die  $OD_{600}$  mit dem gegen die Ausbildung der Bakterienzellwand aktiven Ampicillin als Standard optimiert. Dabei wurden folgende Parameter variiert: (i) Bakterienstamm als Indikator für die antimikrobielle Aktivität, (ii) Salz- und Gesamtnährstoffgehalt des Kulturmediums und (iii) Kulturführung vor und während der eigentlichen Testphase.

Anhand des bekannten Wirkungsspektrums von HBD-2 [Harder, 1997] waren bei der vorliegenden Arbeit Stämme der Gram-negativen *E. coli* als Kontrolle der antibakteriellen Aktivität des rekombinanten HBD-2-Fusionsproteins geeignet. Mit der Entscheidung für HBD-2 und durch die allgemeine Ausstattung der Labore war die Auswahl der Indikatorbakterien auf definierte Laborstämme, die alle Abkömmlinge von *E. coli* K12 waren, beschränkt. Die Bedingungen, unter denen mit diesen Stämmen in nahezu jedem Labor gearbeitet werden kann, sind, dass sie apathogen und von anderen Bakterien unterscheidbar sind [Casali, 2003]. Hohe Ansprüche an die Kulturmedien durch bekannte Auxotrophien, also die Abhängigkeiten von bestimmten Nährstoffen, stellen sicher, dass die Bakterien nicht überall wachsen können und sie jederzeit identifiziert werden können [Casali, 2003]. Das Fehlen wesentlicher Pathogenitätsfaktoren reduziert die Anforderungen an die Sicherheitsvorkehrungen bei der Bearbeitung. Ein weiterer Vorteil dieser gut bekannten Laborstämme ist die kurze durchschnittliche Generationszeit von ~20 min [Casali, 2003], was den schnellen Nachweis antimikrobieller Aktivität ermöglicht. Obwohl sich die Physiologie zwischen Laborstämmen und pathogenen Bakterien der Darmmukosa unterscheidet, war dies für die Beschreibung des antibakteriellen Potentials der Defensine *in vitro* mit Hilfe des zu etablierenden Systems unbedeutend. Aus drei Stämmen wurde *E. coli* JM109 als Stamm mittlerer Empfindlichkeit für alle Untersuchungen mit dem rekombinanten HBD2-GST-Fusionsprotein ausgewählt (vgl. Abbildung 16).

Die Rolle des Salzgehaltes des Milieus bei der antimikrobiellen Wirkung von Defensinen wird z.B. durch die Rolle der Salz-induzierten Inaktivierung von  $\beta$ -Defensinen in der Pathogenese der zystischen Fibrose verdeutlicht. Hohe Konzentrationen von NaCl in der Mukosa der Luftwege von Patienten mit zystischer Fibrose kompromittiert die Abwehr gegen bakterielle Eindringlinge durch die Inaktivierung von Defensinen. Diese Patienten

## Diskussion

sind anfällig für opportunistische Infektionen der Luftwege [Goldmann, 1997; Bals, 1998]. Wie bei der Pathogenese der zystischen Fibrose, die abhängig vom Wirkungsverlust der Defensine im salzreichen Milieu durch den Chloridkanal-Defekt ist, könnten ähnliche Milieuveränderung auch den Darm anfällig für bakterielle Invasionen machen.

Diese Abhängigkeit der Wirkung antimikrobieller Peptide, wie der Defensine vom Salzgehalt des umgebenden Milieus, kann eine Vielfalt möglicher Ursachen haben. Seitens der Bakterien kann unter Testbedingungen ein hoher Salzgehalt des Kulturmediums das Wachstum beschleunigen und die hohe Wachstumsgeschwindigkeit der Gesamtpopulation die Abtötung der einzelnen Bakterien erschweren [Sherman, 1922]. Der möglicherweise wichtigere Zusammenhang geht auf die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der Defensine zurück [Schibli, 2002; Mani, 2005]. Die als Wirkmechanismus angenommene Disruption der Membranen empfindlicher Mikroorganismen durch die Defensine basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den kationischen Peptiden und der anionischen Membranoberfläche. Aufgrund der höheren positiven Ladungsdichte im Vergleich zu offenen Konformationen ist die elektrostatische Anziehung zwischen Membranoberfläche und den antimikrobiellen Peptiden bei der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur am höchsten. Eine Erhöhung der Salzkonzentration und damit der Anzahl der Ionen in der Lösung beeinträchtigt diese Interaktion, indem sie die Raumstruktur hin zur offenen Konformation der linearen Peptide verschiebt, was insgesamt in schwächeren bakteriziden Effekten auf die Membranen der Bakterien resultiert [Lai, 2006]. Der Einfluss des Salzgehaltes auf die antibakterielle Wirkung verschiedener antimikrobieller Peptide wurde durch mehreren Arbeitsgruppen auch in Testsystemen *in vitro* gezeigt. Nicht alle Defensine sind in gleichem Maße salzsensitiv. Eine Konzentration von 100 mM NaCl senkte fast vollständig die antimikrobielle Aktivität von HD-5 im Test mit CFU gegen *Salmonella typhimurium*, während das rekombinante Protein weiterhin bakterizid gegen *Listeria monocytogenes* blieb [Porter, 1997]. Das antibiotische Peptid HBD-1, das in den Luftwegen des Menschen exprimiert wird, zeigte einen deutlichen Verlust seiner antibakteriellen Wirkung gegenüber verschiedenen Mikroorganismen, unter anderem *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, bei steigenden Salzkonzentrationen im Bereich von 50-125 mM. Die salzabhängigen Veränderungen der biologischen Aktivität wurden für das synthetische HBD-1 durch die Zählung der gebildeten Kolonien nachgewiesen [Goldmann, 1997]. Das HBD-2 wurde rekombinant hergestellt und mit Hilfe der Mikrodilution bezüglich der Salzsensitivität untersucht. Die Wirkung gegen *E. coli* hatte bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM achtfach im Vergleich zur Kontrolle mit 10 mM NaCl nachgelassen [Bals, 1998]. Eine durchflusszytometrische Methode wurde verwendet, um das antibakterielle Verhalten des rekombinant hergestellten HBD-3 zu kontrollieren. Als Indikatorbakterien dienten *E. coli* und *Staphylococcus aureus*. Während

## Diskussion

das HBD-3 seine Wirkung gegen *E. coli* vollständig verlor, waren 60% der *Staphylococcus aureus* auch bei einer Salzkonzentration von 150 mM immer noch intakt [Nuding, 2007]. Das HBD-4 wurde ebenfalls rekombinant synthetisiert und in der Mikrodilution mit *Staphylococcus carnosus* untersucht. Seine Fähigkeit das Wachstum dieses Bakteriums zu inhibieren reduzierte sich vierfach bei einem Anstieg der NaCl-Konzentration auf 25 mM, achtfach bei 50 mM und sechzehnfach bei physiologischen Konzentrationen [García, 2001(2)]. Im Gegensatz zu den Defensinen bleiben andere antimikrobielle kationische Peptide wie die Protegrine trotz hoher Salzkonzentration weiter vollständig aktiv [Lai, 2006].

In Versuchen zur Optimierung des Kulturmediums wurde der Nährstoffgehalt des Mediums z.T. auch unabhängig vom Salzgehalt variiert. Bei sehr nährstoffreichen Medien wie 2x YT oder einem NZYM genannten Medium war kein optimales Bakterienwachstum nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Das LB-Lennox ist ein komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien und besteht aus Hefeextrakt, Trypton und NaCl. Ein Medium dieser Zusammensetzung wurde im Jahr 1951 zum ersten Mal verwendet und ist seit dem das am häufigsten verwendete Medium zur Anzucht von Laborstämmen von *E. coli*. Verschiedene Rezepturen des LB-Mediums wurden in der Molekularbiologie für die Präparation von Plasmid-DNA und rekombinanten Defensinen eingesetzt und waren weiterhin Standardmedium für die Anzucht rekombinanter Stämme von *E. coli* [Bertani, 1951] (vgl. Abbildung 19).

Zur Etablierung der Methode zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von HBD-2 wurde nach dem geeigneten Medium gesucht. Aufgrund der bekannten Salzeempfindlichkeit der Defensine wurde das salzarme LB-Luria ausgesucht. Weiterhin wurde LB-Lennox, das eine zehnfach höhere Salzkonzentration als LB-Luria hat, im Verhältnis von 1:3 und 1:6 verdünnt. Das optimale Bakterienwachstum bis zu einer  $OD_{600}$  von ~0,75 wurde allein mit LB-Lennox 1:6 erreicht, während bei LB-Luria und dem 1:3 verdünnten LB-Lennox die *E. coli* so stark wuchsen ( $OD_{600}$  ~1,5), dass diese Medien ungeeignet für ihre Verwendung im antibakteriellen Test waren. Entscheidend für die Auswahl des Mediums war nicht nur der Gehalt an Salz, sondern auch der Gesamtnährstoffgehalt. In LB-Lennox 1:6 war nicht nur die Konzentration von NaCl reduziert, sondern auch aus allen anderen Nährstoffen, die mit dem Trypton und dem Hefeextrakt zugeführt wurden, so dass die Empfindlichkeit der Bakterienkultur gegenüber Ampicillin gewährleistet und die antibakterielle Wirkung der Defensine nicht beeinträchtigt war.

Die Optimierung des Kulturmediums und der Kulturführung für den Nachweis antibakterieller Wirkungen auf *E. coli* JM109 sollte sichern, dass alle Bakterien in einer

## Diskussion

Kultur physiologisch einheitlich sind. Nachdem man eine Bakterienkultur angelegt hat, kommt es zunächst zu einer Verzögerungsphase, in der sich die Bakterien an die neuen Bedingungen anpassen. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass die Bakterien Enzyme herstellen, um die angebotenen Substrate nutzen zu können. Die Kultur wächst sehr langsam. In der darauf folgenden Wachstumsphase vermehren sich die Bakterien ohne Nährstofflimitation mit ihrer maximalen Teilungsrate. Die Vermehrung erfolgt exponentiell und die Generationszeit nimmt ihren kleinsten Wert an. In dieser Phase sind die Bakterien am empfindlichsten gegenüber bakteriziden bzw. bakteriostatischen Substanzen. Daher ist der Ansatz der Vor- und Hauptkultur zur Synchronisation der Bakterienkulturen in der Phase des exponentiellen Wachstums erforderlich, um die Wirkung des antimikrobiellen Agens untersuchen zu können [Monod, 1949]. Wenn die im Nährmedium vorhandenen Nährstoffe verbraucht werden, tritt die stationäre Phase ein. Die Bakterien geben Endprodukte ihres Stoffwechsels an ihre Umgebung ab, die toxisch sein können. In dieser Phase liegen Vermehrung und Absterben im Gleichgewicht. Viele Bakterien sichern durch eine Zellwandverdickung ihr Überleben und sind in dieser Phase resistenter gegenüber der Wirkung von Antibiotika. Die Sterbephase folgt bei vielen Bakterien auf die stationäre Phase, da kaum noch Nährstoffe des Nährmediums vorhanden sind und es häufig zu einer Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukten kommt [Monod, 1949].

Die Kulturführung für das Nachweissystem wurde dadurch standardisiert, dass die Vorkulturen immer aus Einzelkolonien von Übernachtskulturen frischer Ausstriche angesetzt wurden, die Vorkulturen ohne Antibiotika in Vollmedium bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,25-0,35 und die Hauptkulturen LB-Lennox 1:6 bis zu einer  $OD_{600}$  ~0,65-0,75 in der Kontrollkultur ohne antibakterielles Agens geführt wurden. Die Hauptkulturen für den Nachweis biologischer Aktivität wurden mit der antimikrobiellen Substanz über 6 h inkubiert und die Wirkung als Reduktion der  $OD_{600}$  angegeben. Als Standard zur Angabe der antibakteriellen Wirkung eines Agens gelten die Veränderungen der Anzahl von Bakterien in der Suspension. Sie wurden zum optimalen Messbereich der  $OD_{600}$  von 0,1-1,0 korreliert (vgl. Abbildung 17).

Für die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität des HBD-2 im HBD2-GST-Fusionsprotein wurde eine densitometrische Methode mit dem Laborstamm *E. coli* JM109 etabliert. Optimale Bedingungen für den Nachweis mit Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase werden über eine zweistufige Kulturführung gewährleistet, wobei in Gegenwart des antibakteriell wirksamen Prinzips der Nährstoff- und Salzgehalt von LB-Lennox um den Faktor 6 im Vergleich zum Standardmedium reduziert ist.

**Aus welchem molaren Konzentrationsbereich und unter welchen Bedingungen kann die antibakterielle Aktivität von HBD-2-Fusionsproteinen direkt im densitometrischen Ansatz gezeigt werden? Beeinflusst der Fusionspartner die antibakterielle Aktivität von HBD-2 als experimentelle Kontrolle zum direkten Nachweis der Wirkung von Defensinen?**

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte densitometrische Methode mit *E. coli* JM109 wies die antibakterielle Wirkung von HBD2-GST in einem Bereich zwischen 400 pM und 40 nM nach (vgl. Abbildung 20). Andere Arbeitsgruppen haben antibakterielle Effekte bei höheren oder vergleichbaren HBD-2-Konzentrationen gezeigt. Das Fusionsprotein HBD2-His wurde im Test mit CFU kontrolliert und zeigte seine Aktivität gegen *Klebsiella* im Bereich von 200 nM-1,6 µM [Sahly, 2006]. Das rekombinant hergestellte TrxA-HBD2 war in der densitometrischen Nachweismethode antibakteriell wirksam gegen *E. coli* in einem Konzentrationsbereich von 8,3-60 nM [Xu, 2006(1)]. Nach der Spaltung von seinem Fusionspartner TrxA war HBD-2 ebenfalls wirksam gegen *E. coli* in einer Konzentration von 2-10 µM [Chen, 2004].

Wie auch für HBD3-GST, dessen antimikrobieller Wirkung mit der Mikrodilution bei einer Konzentration von 400 nM nachgewiesen wurde [SI, 2007], hatte die hier vorgestellte Fusion mit der GST selbst keinen Einfluss auf die biologische Aktivität von HBD-2. Weder die Anwesenheit des GST-Substrates Glutathion noch die Freisetzung des HBD-2-Anteils aus dem HBD2-GST-Fusionsprotein durch die Endopeptidase Thrombin behinderte die biologische Wirkung des HBD-2. Präparationen von HBD2-GST konnten unmittelbar nach Elution von der Glutathion-Sepharose als Standard in der Densitometrie eingesetzt werden. Für die Ermittlung der IC<sub>50</sub> von HBD-2 aus dem Fusionsprotein mit Hilfe der etablierten densitometrischen Methode mit *E. coli* JM109 sind höhere HBD2-GST-Konzentrationen notwendig, als sie aus den unmittelbar im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Präparationen vorlagen. Solche können aber mit *E. coli* BL21, die mit dem pGEX-2T-basierten Expressionsvektor pHBD2-E6.4 transformiert sind, wie in dieser Arbeit beschrieben, hergestellt und in einem Schritt affinitätschromatografisch gereinigt werden.

Der densitometrische Test über die OD<sub>600</sub> stellt nur die relative Dichte einer Bakterienkultur im Vergleich zu einer definierten Kontrolle dar. Bedingung ist auch, dass die untersuchten Bakterien kultivierbar sein müssen. Der Effekt einer reduzierten Bakteriendichte macht keine Aussagen über einzelne Bakterien. Ob die antimikrobielle Wirkung auf ein direktes Abtöten der Bakterien oder auf eine möglicherweise reversible Bakteriostase zurückgeht, kann nicht differenziert werden. Für nicht kultivierbare Bakterien oder auch für Aussagen über Wirkmechanismen bieten sich fluorimetrische

Verfahren an, die in den letzten Jahren entwickelt wurden und kommerziell verfügbar sind. Ein Beispiel dafür ist der *Live/dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit* der Firma Invitrogen (Karlsruhe, DE). Zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe werden in Abhängigkeit von der Vitalität einzelner Bakterien aufgenommen und diese können fluorezenzmikroskopisch bewertet oder durchflusszytometrisch quantifiziert werden [Gant, 1993; Veal, 2000]. Solche Methoden wurden bereits für Defensine eingesetzt. Dabei wurde der antibakterielle Effekt von synthetischem HBD-3 auf *E. coli* und *Staphylococcus aureus* in einem Konzentrationsbereich von 300 nM-1,25 µM ermittelt [Nuding, 2006; Morgera, 2008]. Dieser Test würde mechanistische Aussagen gestatten, und könnte in einem nächsten Schritt hinsichtlich seiner Empfindlichkeit mit der für HBD2-GST etablierten Densitometrie verglichen werden.

### **Unter welchen Bedingungen können die für den Nachweis der antimikrobiellen Aktivität notwendigen HBD-2-Mengen aus bestimmten Darmabschnitten von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa dargestellt werden?**

Defensine sind auf verschiedenen Ebenen an der Aufrechterhaltung der mukosalen Barriere im Darm beteiligt. In erster Linie kontrollieren sie die luminale bakterielle Besiedelung [Bevins, 1999]. Unter physiologischen Bedingungen im gesunden Darm findet man im distalen Ileum und im Kolon hohe Bakterienkonzentrationen von  $>10^{12}$  Organismen pro Gramm Gewebe [Shih, 2008]. In chronischen Entzündungen des Darms scheint weniger die Gesamtzahl besiedelnder Bakterien als die Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora anders als in gesunden Individuen zu sein [Schultsz, 1999; Linskens, 2001; Shih, 2008]. Bei CED-Patienten beobachtet man überwiegend eine verminderte bakterielle Vielfalt. Diese äußert sich im Verlust zur Normalflora gehörender anaerober Bakterien wie den Gattungen *Pevotella*, *Eubacterium* und *Lactobacillus* [Ott, 2004; Heimesaat, 2007]. Eine Veränderung in den Mengen von *Bacteroides* ist umstritten. In der CED wurde sowohl eine Akkumulation von *Bacteroides*-Species [Swidsinski, 2002; Swidsinski, 2005] als auch ein Rückgang berichtet [Heimesaat, 2007]. Der Verlust der Varianz der bakteriellen Darmflora kann zur Dysbiose mit gravierenden Konsequenzen für die Intaktheit der Mukosa führen. Ein weiterer Unterschied bei den CED ist die Dominanz von *Enterobacteriaceae*-Species wie die *E. coli* [Kleessen, 2002; Heimesaat, 2007]. Einen Anstieg zeigen auch weitere apathogene und pathogene Bakterien der Gattungen *Clostridium*, *Bacillus*, *Pectinatus*, *Sutterella*, *Fusobacterium*, *Verrucomicrobium* und der Arten *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes* oder *Helicobacter hepaticus* [Colletti, 2004; Seksik, 2006].

Insgesamt weisen die Veränderungen der bakteriellen Darmflora auf eine Störung der primären antimikrobiellen Abwehr in der Darmmukosa hin, zu deren Hauptbestandteil die



Defensine gehören [Shih, 2007]. Ein Mangel, die Dysfunktion oder die verminderte Induktion dieser antimikrobiellen Peptide verursachen ein gestörtes Gleichgewicht zwischen der vorhandenen Bakterien und erlauben die Invasion von Pathogenen, die normalerweise nicht zu der üblichen Flora des Darmes gehören und der Aufrechthaltung der CED dienen. Mit einer starken immunologischen Antwort reagiert das Immunsystem gegen die Veränderungen der Normalflora, die durch einen übermäßigen Anstieg von *E. coli* charakterisiert wird [Schultsz, 1999; Linskens, 2001]. Die Unfähigkeit der Defensine diese Gram-negativen Bakterien unter Kontrolle zu halten, könnte ein wesentlicher Zusammenhang aus der angeborenen Immunität sein, der in der Entstehung der CED beteiligt ist [Kleessen, 2002].

Bei den CED findet man in den betroffenen Darmabschnitten starke immunologische Reaktionen. Die vorhandene Entzündung zerstört die Epithelzellen und verändert die Morphologie der Darmmukosa [Swan, 1998; DeJaco, 2003]. Bei Morbus Crohn kommt es zu einer transmuralen Entzündung. Histologisch zeigen sich Lymphozyten, eosinophile Granulozyten sowie Histiozyten. Es bilden sich Lymphozytenansammlungen und die zugehörigen Lymphknoten werden hyperplastisch. Typisch für den Morbus Crohn sind auch Epitheloidzellgranulome, die sich aus Riesenzellen, herdförmigen Lymphozyteninfiltraten und eosinophilen Granulozyten zusammensetzen [Malatjalian, 1987; Odze, 2003]. Die Colitis ulcerosa äußert sich durch das Vorhandensein von Ulzeration und der nachfolgenden Fibrosierung. Die Entstehung von Granulationsgewebe zusammen mit der Hyperplasie der übrigen Mukosa führt zur Bildung von Pseudopolypen. Histologisch sind auch Kryptenabszesse zu finden [Malatjalian, 1987; Odze, 2003].

Diese Befunde sprechen für eine radikale Veränderung der Darmarchitektur bei den CED. Darunter leiden auch die Produzentenzellen der Defensine mit entsprechenden Folgen für die Zusammensetzung der antimikrobiellen Peptide. Die häufigste Lokalisation des Morbus Crohn ist das terminale Ileum. Die Zerstörung der HD-5- und HD-6-produzierenden Panethzellen in diesem Darmabschnitt führt zum weiteren Verlust dieser Defensine [Wehkamp, 2005]. Der Mangel an  $\alpha$ -Defensinen und die nachfolgende Invasion der Mukosa durch Mikroorganismen verstärkt die chronische Entzündung. Eine Schädigung der HBD-2- und HBD-3-produzierenden Epithelzellen im Kolon könnte auch eine Ursache ihrer verminderten Induktion in diesem Darmabschnitt sein [Schmid, 2004]. Auf der anderen Seite wurden im entzündenden Kolon metaplastische Panethzellen nachgewiesen, die eine Reaktion auf die permanente bakterielle Invasion in der CED darstellen können [Cunliffe, 2001].

Das stellt die Frage nach den Bedingungen unter denen der im Rahmen dieser Arbeit etablierte densitometrische Test geeignet wäre, mögliche Unterschiede in der lokalen,

## Diskussion

durch Peptide vermittelten direkten antibakteriellen Aktivität aus Proben des menschlichen Darms darzustellen. Der wichtigste Punkt dabei war, ob die Mengen der sezernierten Defensine, die aus Gewebeproben gewonnen werden können, ausreichend waren.

Insgesamt wurden etwa 60 Proben aus verschiedenen Darmabschnitten von Patienten mit Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Kolon-Karzinom entnommen. Die Proben der Patienten mit CED waren makroskopisch entzündet und zeigten eine stark veränderte Morphologie. Die Diagnose Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn wurden für die betroffenen Darmabschnitte auch histologisch gesichert [Swan, 1998; DeJaco, 2003]. Die Resektate nach einer Hemikolektomie beim Kolonkarzinom wurden vom Pathologen untersucht, bevor Proben mit einem Sicherheitsabstand zum Tumor entnommen wurden. Alle Proben stammten aus der Mukosa und waren ca. 2x1 cm groß. Das waren jeweils 10 Proben aus dem Kolon von Patienten mit Colitis ulcerosa, aus dem Kolon sowie dem terminalen Ileum von Patienten mit Morbus Crohn und aus nicht entzündeten Bereichen des Kolons (20 Proben) sowie des Ileums von Patienten mit Kolon-Karzinom, die als Kontrolle verwendet wurden. Aus allen präparierten Epithelien wurden die Proteine mit einem gepufferten Gemisch aus Acetonitril und Trifluoressigsäure extrahiert und die Überstände der Extraktion wurden lyophilisiert. Diese Methodik wurde von Bateman *et al.* für die Darstellung von  $\alpha$ -Defensin Corticostatin-related peptide RK-1 aus der Niere vorgeschlagen [Bateman, 1996]. Die antibakterielle Wirkung von RK-1 gegen *E. coli* wurde im Test mit CFU nachgewiesen. Die Isolation von Defensinen und speziell HD-5 und HD-6 erfolgte aus dem terminalen Ileum. Die Proben wurden mit einer Mischung aus Essigsäure und Protease-Inhibitoren behandelt, um die Defensine mit Hilfe einer Kationenaustausch-Matrix aus den Biopsien zu extrahieren [Porter, 1998]. Die kationischen Peptide zeigten in einer durchflußzytometrischen Methode starke bakterizide Wirkung gegen *E. coli* und *Staphylococcus aureus* [Nuding, 2005].

Die in Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Methode hat sich als sehr sensitiv für den Nachweis der antibakteriellen Wirkung rekombinanter Defensine erwiesen. Die hohe Empfindlichkeit der Methode resultiert möglicherweise daraus, dass die zu testenden Defensinen nicht denaturiert sind. Die Extraktionsmethode aus dem menschlichen Darm könnte die Konformation der kationischen antimikrobiellen Peptide so verändern, dass der Nachweis ihrer Wirkung behindert wird. Vor dem Einsatz dieser Proben in der hier etablierten densitometrischen Methode wurde der Einfluss der Probenaufarbeitung auf die Indikatorbakterien untersucht. Nach dem Lösen der Lyophilisate in PBS wirkten die Lösungsmittelrückstände allein bereits stark bakterizid (Daten nicht gezeigt), so dass die Methodik mit der Extraktion ohne weiteren renaturierenden Schritt zur Beantwortung der Frage nach einer möglichen Korrelation in der Verteilung antimikrobieller Aktivität im

## Diskussion

Epithel bestimmter Darmabschnitte mit dem Krankheitsbild von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa nicht geeignet war.

Unter optimierten Bedingungen bei einem Salzgehalt  $<50$  mM und im neutralen bis leicht basischen pH-Bereich konnte die Densitometrie mit dem Laborstamm *E. coli* JM109 eine antibakterielle Wirkung bei einer Konzentration von 40 nM HBD-2 nachweisen. In einem HBD-2-spezifischen Western-blot, der vor dem Hintergrund anderer zellulärer Proteine aus Rohextrakten zuverlässig 70 nmol nachweist (Annekatriin Coordes, persönliche Mitteilung), wurden weder in den Überständen noch in den Sedimenten der asservierten Proben HBD-2-spezifische Banden gezeigt (vgl. Abbildung 26). Das bedeutete, dass nicht ausreichend HBD-2 mit der verwendeten Extraktionsmethode darstellbar war.

Die Schwierigkeiten bei der Darstellung können Ursachen auf verschiedenen Ebenen haben. Eher allgemeingültig ist der Stichprobenfehler, der sich umgekehrt proportional zur Probengröße verringert, also bei Biopsiematerial gravierender sein kann als im Material aus Extraktionen [Calhoun, 2003]. Neben einer hohen Anzahl insgesamt untersuchter Proben zur Erhöhung der Sicherheit einer Aussage spielt die zelluläre Zusammensetzung des Darmabschnittes, aus dem die Proben stammen, eine zentrale Rolle. Finden sich keine Produzentenzellen für Defensine, wie Epithel- oder Panethzellen, sinken die Chancen diese Peptide aus den Proben darzustellen. Eine begleitende Defensin- und/oder Zelltyp-spezifische (immun)histologische Untersuchung kann hier zusätzliche Anhaltspunkte liefern, die eine Aussage zum Gesamtproteingehalt einer Probe allein nicht zwingend zulässt [Hamanaka, 2001; Wehkamp, 2004]. Aus den Ergebnissen zur Salz- und Pufferempfindlichkeit der antimikrobiellen Wirkung der Defensine, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurden, kann grundsätzlich über Isolationsmethoden nachgedacht werden, bei denen die Defensine nicht denaturieren.

Darüber hinaus interessiert der diagnostische und/oder therapeutische Wert eines Nachweises der antibakteriellen Wirkung humaner Defensine direkt aus dem Darm von Patienten mit CED. Ein wichtiger Punkt ist, dass Informationen über die lokale Defensinproduktion und Funktion bei diesen Patienten helfen könnten, die komplizierte Ätiologie dieser multifaktoriellen Erkrankung zu entschlüsseln.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Vorgehen bei Untersuchungen dieser Art sich nicht auf nur einen methodischen Aspekt beschränken darf. Aus den eigenen Ergebnissen und der Sichtung der entsprechenden Literatur resultiert der folgende Vorschlag zu einer Verfahrensweise für die Untersuchung der Defensinproduktion im menschlichen Darm bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Aus der Kenntnis der zellulären Zusammensetzung entnommener Proben aus Darmabschnitten und dem Vorhandensein von Produzentenzellen können Rückschlüsse

## Diskussion

auf die Anwesenheit von Defensinen in den Proben gemacht werden. Dem gleichen Zweck dient auch die Suche nach Defensin-spezifischer mRNA. Nach einer nativen Extraktion niedrigmolekularer Proteine und Peptide liefert ein Western-blot Informationen über die vorhandenen Defensinmengen. In einem densitometrischen Nachweis mit einem selbst hergestellten, affinitätsgereinigten HBD2-GST-Fusionsprotein als Standard mit einer Nachweisgrenze von minimal 400 pM HBD-2 kann die antibakterielle Aktivität der isolierten Defensine bestimmt werden. Parallel dazu könnte die Untersuchung der Zusammensetzung der luminalen Bakterienflora zusätzliche Hinweise auf mögliche Defensindysfunktion im untersuchten Darmabschnitt liefern. Die kumulierten und korrelierten Daten können dann Aufschluss über die lokale antimikrobielle Aktivität, die durch Defensine vermittelt wird, geben.

Zusammenfassend wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zwei Fusionsproteine mit HBD-2 konstruiert, die beide als Standard im Western-blot verwendet werden können. Das Fusionsprotein von HBD-2 mit der GST kann in einem affinitätschromatografischen Schritt aus dem Zytoplasma transformierter Bakterien in ausreichenden Mengen in gereinigter Form zur Verfügung gestellt werden. In einer hier etablierten densitometrischen Methode unter Verwendung des Gram-negativen Laborstammes *E. coli* JM109 wurde eine direkte antibakterielle Wirkung des HBD2-GST-Fusionsproteins gezeigt, wobei diese Aktivität durch die Konformation der GST beeinflusst werden kann. Einerseits ist dieses Nachweissystem selbst empfindlich gegen Rückstände strenger, Extraktionsbedingungen, andererseits weist es den Weg zu nicht denaturierenden Isolationsmethoden für Defensine. Damit schafft diese Arbeit die wichtigsten methodischen Voraussetzungen für den Nachweis der antibakteriellen Wirkung humaner Defensine direkt aus dem Darm von Patienten mit CED.

### 5 Zusammenfassung

*Titel:* Etablierung des Nachweises direkter antibakterieller Wirkung humaner Defensine für die Untersuchung der Defensinproduktion im menschlichen Darm bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

*Einleitung:* Als Teil der angeborenen Immunität erhalten Defensine die intestinale Mukosabarriere aufrecht, die in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) beeinträchtigt ist. Interessant ist, ob eine direkte antibakterielle Wirkung von Defensinen aus dem Darmgewebe von Patienten mit CED im Vergleich zu nicht entzündetem Darm verändert ist. Da der Wirkmechanismus der Defensine im Detail nicht bekannt ist, kommen für einen experimentellen Vergleich nur Defensine in Frage. Als ausschließlich transkriptionell reguliert, bot sich das humane  $\beta$ 2-Defensin (HBD-2) an. Ausgehend von der Fragestellung, unter welchen Bedingungen die antimikrobielle Aktivität von HBD-2 dargestellt werden kann, konzentriert sich die hier vorliegende Arbeit auf die Etablierung eines Systems für den direkten Nachweis der antibakteriellen Wirkung von Defensinen.

*Methodik:* Die antibakterielle Aktivität wurde durch die Änderung der optischen Dichte einer wachsenden Bakterienkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) erfasst und die Bedingungen für die Bakterienanzucht mit Ampicillin als Standard optimiert. Zwei HBD-2-Fusionsproteine wurden konzipiert. Über den Vektor pQE30 wurden sechs Histidinreste (HBD2-His) angefügt, so dass die Molekülgröße nicht wesentlich geändert wurde. Die Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus dem Vektor pGEX-2T diente der Vergrößerung des Moleküls sowie der affinitätschromatografischen Aufreinigung mit Glutathion-Sepharose. Zur Freisetzung des HBD-2-Anteils wurde zwischen die Fusionspartner HBD-2 und GST ein Spaltort für Thrombin eingefügt. Beide Fusionsproteine wurden unter Kontrolle des regulierbaren tac-Promoters in *E. coli* BL21 hergestellt. Mit dem Plasmid für HBD2-GST transformierte *E. coli* BL21 wurden vermehrt und HBD2-GST affinitätschromatografisch gereinigt. Die Reinheit des Produktes wurde mit denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach direkter Proteinfärbung geprüft und im HBD-2-spezifischen Western-blot der Gehalt des HBD2-GST-Fusionsproteins kontrolliert. Aus den Präparationen wurde das Glutathion des Elutionspuffers durch Gelfiltration entfernt und die Konzentrationen von 1 mg/ml HBD2-GST eingestellt. Für die Frage, ob die Verteilung der Defensine im Epithel bestimmter Darmabschnitte mit Unterschieden bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa korreliert, wurden humane Darmepithelien mit einem Gemisch aus Acetonitril und Trifluoressigsäure behandelt und in einem spezifischen Western-blot auf die Anwesenheit von HBD-2 untersucht.

*Ergebnisse:* Aus drei Stämmen, alle Abkömmlinge des Laborstammes *E. coli* K12, wurde *E. coli* JM109 als Stamm mittlerer Empfindlichkeit im Kulturmedium *Lysogeny Broth* nach

## Zusammenfassung

Lennox (LB-Lennox) als Indikatororganismus ausgewählt. Die standardisierten Bedingungen für die Kultur beinhalten: (i) Ansetzen der Vorkultur aus Einzelkolonien von Übernacht-Kulturen frischer Ausstriche, (ii) Vorkulturen ohne Antibiotika in Vollmedium bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,25-0,35 und (iii) Hauptkulturen mit Antibiotika in 1:6 verdünntem LB-Lennox bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,65-0,75 in der Kontrollkultur ohne Antibiotikum. Unter diesen Bedingungen wurde eine halbmaximale inhibitorische Konzentration von 3,9  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin ermittelt. Das gereinigte HBD2-GST wurde in der densitometrischen Methode mit *E. coli* JM109 unter diesen optimierten Bedingungen eingesetzt. Im Vergleich zu den Kontrollen mit der freien GST und zu Glutathion war das Bakterienwachstum in Gegenwart des Fusionsproteins reduziert. Die antibakterielle Wirkung von HBD2-GST blieb nach der spaltenden Behandlung des Fusionsproteins mit Thrombin unverändert. Das bedeutet, dass GST die biologische Wirkung des HBD-2 nicht behinderte. Nach dem Pufferaustausch und dem Entfernen des für die Bakterien nicht-toxischen Glutathions aus der HBD2-GST-Präparation, war die biologische Aktivität nicht mehr nachweisbar. Aus den rehydratisierten lyophilisierten Extrakten aus menschlichen Darmepithelien konnte keine antibakterielle Aktivität, die auf die Wirkung von Defensinen zurückgeht, gefunden werden, da sich die Puffer- und Lösungsmittelreste aus der Probenaufarbeitung in dem etablierten antibakteriellen Test bereits als stark bakterizid erwiesen. Im spezifischen Western-blot der 70 nmol HBD-2 vor dem Hintergrund zellulärer Proteine aus Rohextrakten nachweisen konnte, wurde in keiner der Fraktionen aus den extrahierten Darmproben HBD-2 auf Proteinebene nachgewiesen.

*Schlussfolgerung:* Zusammenfassend wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zwei Fusionsproteine von HBD-2 hergestellt, die als Standard im Western-blot verwendet werden können. Das in *E. coli* BL21 exprimierte HBD2-GST-Fusionsprotein kann in einer relativ einfachen Prozedur in ausreichenden Mengen in gereinigter Form zur Verfügung gestellt werden. In einer hier etablierten densitometrischen Methode mit dem Laborstamm *E. coli* JM109 wurde eine direkte antibakterielle Wirkung des HBD2-GST gezeigt, wobei diese Aktivität offenbar von der Konformation der GST abhängig sein kann. Der Verlust der biologischen Aktivität nach Entzug des Glutathions könnte auf Aggregationen zurückzuführen sein, die auch bei der denaturierenden Aufarbeitung der Darmproben wahrscheinlich sind. Diese antimikrobielle Methode ist auch empfindlich für die Lösungsmittelsysteme aus der denaturierenden Proteinfällung aus Epithelien des menschlichen Darms. Neben der Lösungsmittelpfindlichkeit der biologischen Nachweismethodik ist auch die Neigung zu möglichen inaktivierenden konformationellen Änderungen in den Prozeduren für die Probenaufarbeitung zu berücksichtigen und die Befunde durch Ergebnisse anderer Untersuchungsmethoden, wie z.B. eine Histologie zu untermauern.

**6 Literaturverzeichnis**

- Abad JP, León G, Amils R. Biological activity of nitroguaiacol ether derivatives of streptomycin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987 May; 40(5):685-91.
- Abreu MT. Immunologic regulation of toll-like receptors in gut epithelium. *Curr Opin Gastroenterol*. 2003 Nov; 19(6):559-64.
- Andrew SM, Titus JA, Zumstein L. Dialysis and concentration of protein solutions. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001 May; Appendix 3: Appendix 3C.
- Argon Y, Simen BB. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol*. 1999 Oct; 10(5):495-505.
- Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*. 2006 Jul; 48(1):1-13.
- Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*. 2000 Aug; 1(2):113-8.
- Bajaj-Elliott M, Fedeli P, Smith GV, Domizio P, Maher L, Ali RS, Quinn AG, Farthing MJ. Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression during gastritis. *Gut*. 2002 Sep; 51(3):356-61.
- Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest*. 1998 Sep 1; 102(5):874-80.
- Bartzatt R, Cirillo SL, Cirillo JD. Molecular properties and antibacterial activity of the methyl and ethyl ester derivatives of ampicillin. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 2004; 36(2):85-94.
- Bateman A, MacLeod RJ, Lembessis P, Hu J, Esch F, Solomon S. The isolation and characterization of a novel corticostatin/defensin-like peptide from the kidney. *J Biol Chem*. 1996 May 3; 271(18):10654-9.
- Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22; 275(38):29731-6.
- Bennett J, Scott KJ. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem*. 1971 Sep; 43(1):173-82.
- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1951 Sep; 62(3):293-300.
- Bevins CL, Martin-Porter E, Ganz T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*. 1999 Dec; 45(6):911-5.
- Birchler T, Seibl R, Büchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, Aguzzi A, Lauener RP. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol*. 2001 Nov; 31(11):3131-7.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979 Nov 24; 7(6):1513-23.
- Boos W, Schaedel P, Wallenfels K. Investigation on induction of lac-enzyme. 1. Induction process and permeation. *Eur J Biochem*. 1967 Jun; 1(4):382-94
- Boos W, Wallenfels K. Investigation on the induction of the Lac-enzyme. 2. The permeation of galactosylglycerol in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*. 1968 Jan; 3(3):360-3
- Bowden GA, Paredes AM, Georgiou G. Structure and morphology of protein inclusion

- bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*. 1991 Aug; 9(8):725-30.
- Brown KL, Hancock RE. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol*. 2006 Feb; 18(1):24-30.
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*. 1996 Jun; 20(6):1004-6, 1008-10.
- Burd RS, Furrer JL, Sullivan J, Smith AL. Murine beta-defensin-3 is an inducible peptide with limited tissue expression and broad-spectrum antimicrobial activity. *Shock*. 2002 Nov; 18(5):461-4.
- Cai S, Du J, Cheng X, Huang N, Fumihiko N, Takaiki H, Wang B. Expression of recombinant human beta-defensin-2 gene with C terminal of double marks of Myc and poly-histidine in transfected COS-7 cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2003 Jun; 20(2):255-9, 280. Chinese.
- Cai SH, Du J, Huang N, Wang BY. Transfection and expression of recombinant human beta-defensin-2 gene in insect cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2004 Nov; 35(6):832-5. Chinese.
- Calhoun BC, Gomes F, Robert ME, Jain D. Sampling error in the standard evaluation of endoscopic colonic biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2003 Feb; 27(2):254-7.
- Cantrell SA. Vectors for the expression of recombinant proteins in *E. coli*. *Methods Mol Biol*. 2003; 235:257-75.
- Cao Y, Zhang G, Zhang G, Xu Y, Wang L. Construction of prokaryotic expression vector and expression of human beta defensin 4 gene. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2008(2) Oct; 25(5):1166-9. Chinese.
- Cao YH, Zhang GY, Zhang GC. Fusion expression of human beta defensin 4 in *Escherichia coli* and preparation of its polyclonal antibody. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2008(1) Feb; 24(2):150-2. Chinese.
- Casali N. *Escherichia coli* host strains. *Methods Mol Biol*. 2003; 235:27-48.
- Chang CD, Meienhofer J. Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of N alpha-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int J Pept Protein Res*. 1978 Mar; 11(3):246-9.
- Chang JY, Alkan SS, Hilschmann N, Braun DG. Thrombin specificity. Selective cleavage of antibody light chains at the joints of variable with joining regions and joining with constant regions. *Eur J Biochem*. 1985 Sep 2; 151(2):225-30.
- Chen H, Xu Z, Xu N, Cen P. Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. *J Biotechnol*. 2005 Feb 9; 115(3):307-15.
- Chevet E, Jakob CA, Thomas DY, Bergeron JJ. Calnexin family members as modulators of genetic diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 1999 Oct; 10(5):473-80.
- Colletti T. IBD--recognition, diagnosis, therapeutics. *JAAPA*. 2004 May; 17(5):16-8, 21-4.
- Cunliffe RN, Mahida YR. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol*. 2004 Jan; 75(1):49-58.
- Cunliffe RN, Rose FR, Keyte J, Abberley L, Chan WC, Mahida YR. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2001 Feb; 48(2):176-85.
- Dann SM, Eckmann L. Innate immune defenses in the intestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007 Mar; 23(2):115-20.



- De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett.* 2005 Sep; 27(18):1337-47.
- Dejaco C, Oesterreicher C, Angelberger S, Püspök A, Birner P, Poetzi R, Gangl A, Oberhuber G. Diagnosing colitis: a prospective study on essential parameters for reaching a diagnosis. *Endoscopy.* 2003 Dec;35(12):1004-8.
- Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russell JP, Bevins CL. Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun.* 2000 Jan; 68(1):113-9.
- Domagk G. Experimental basis for chemotherapy with sulfonamides. *Antibiot Chemother.* 1957; 4:1-45.
- Dommett R, Zilbauer M, George JT, Bajaj-Elliott M. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Mol Immunol.* 2005 May; 42(8):903-12.
- du Toit EA, Rautenbach M. A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *J Microbiol Methods.* 2000 Oct; 42(2):159-65.
- Duggar BM. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann N Y Acad Sci.* 1948 Nov 30; 51(Art. 2):177-81.
- Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005 Mar; 21(2):147-51.
- Elbing K, Brent R. Growth in liquid media. *Curr Protoc Mol Biol.* 2002 Aug; Chapter 1: Unit 1.2.
- Ericksen B, Wu Z, Lu W, Lehrer RI. Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jan; 49(1):269-75.
- Fedorcsak I, Ehrenberg L. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand* 1966; 20:107-12.
- Fellermann K, Stange EF. Defensins - innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001 Jul; 13(7):771-6.
- Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Jun; 15(6):627-34.
- Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng.* 1993 Jan 5; 41(1):3-13.
- Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929 10 (31): 226-36.
- Gallagher SR. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Mol Biol.* 2006 Aug; Chapter 10:Unit 10.2A.
- Gant VA, Warnes G, Phillips I, Savidge GF. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J Med Microbiol.* 1993 Aug; 39(2):147-54.
- Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol.* 1998 Feb; 10(1):41-4.
- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep; 3(9):710-20.
- Ganz T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1987 Mar; 55(3):568-71.
- García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with

specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 2001(1) Nov; 306(2):257-64.

García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 2001(2) Aug; 15(10):1819-21.

Gellert M, O'Dea MH, Itoh T, Tomizawa J. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Dec; 73(12):4474-8.

George JT, Boughan PK, Karageorgiou H, Bajaj-Elliott M. Host anti-microbial response to *Helicobacter pylori* infection. *Mol Immunol.* 2003 Nov; 40(7):451-6.

Gersemann M, Wehkamp J, Fellermann K, Stange EF. Crohn's disease--defect in innate defence. *World J Gastroenterol.* 2008 Sep 28; 14(36):5499-503.

Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Oct; 10(5):465-72.

Gewirtz AT. Intestinal epithelial toll-like receptors: to protect. And serve? *Curr Pharm Des.* 2003; 9(1):1-5.

Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, Yadav SP, Crabb JW, Ganz T, Bevins CL. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol.* 2002 Jun; 3(6):583-90.

Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell.* 1997 Feb 21; 88(4):553-60.

Görg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 1988 Sep; 9(9):531-46.

Grodberg J, Dunn JJ. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol.* 1988 Mar; 170(3):1245-53.

Gumport RI, Uhlenbeck OC. T4 RNA ligase as a nucleic acid synthesis and modification reagent. *Gene Amplif Anal.* 1981; 2:313-45.

Hagel L. Gel-filtration chromatography. *Curr Protoc Protein Sci.* 2001 May; Chapter 8:Unit8.3.

Hamanaka Y, Nakashima M, Wada A, Ito M, Kurazono H, Hojo H, Nakahara Y, Kohno S, Hirayama T, Sekine I. Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*. *Gut.* 2001 Oct; 49(4):481-7.

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983 Jun 5; 166(4):557-80.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 1997 Jun 26; 387(6636):861.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23; 276(8):5707-13.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23; 276(8):5707-13.

Harwig SS, Ganz T, Lehrer RI. Neutrophil defensins: purification, characterization, and

- antimicrobial testing. *Methods Enzymol.* 1994; 236:160-72.
- Hecht G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol.* 1999 Sep; 277(3 Pt 1):C351-8.
- Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, Fuchs D, Jahn HK, Freudenberg M, Loddenkemper C, Batra A, Lehr HA, Liesenfeld O, Blaut M, Göbel UB, Schumann RR, Bereswill S. Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS ONE.* 2007 Jul 25; 2(7):e662.
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambda-doid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol.* 1974 Nov; 14(5):1235-44.
- Hershberg RM. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Oct; 283(4):G833-9.
- Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismüller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randell SH, Modlin RL. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol.* 2003 Dec 15; 171(12):6820-6.
- Hessen MT, Kaye D. Principles of selection and use of antibacterial agents. In vitro activity and pharmacology. *Infect Dis Clin North Am.* 2000 Jun; 14(2):265-79.
- Huang L, Ching CB, Jiang R, Leong SS. Production of bioactive human beta-defensin 5 and 6 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Protein Expr Purif.* 2008 Oct; 61(2):168-74.
- Huang L, Wang J, Zhong Z, Peng L, Chen H, Xu Z, Cen P. Production of bioactive human beta-defensin-3 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Biotechnol Lett.* 2006 May; 28(9):627-32.
- Huang L, Xu Z, Zhong Z, Peng L, Chen H, Cen P. Enhanced expression and primary purification of soluble HBD3 fusion protein in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2007 Aug; 142(2):139-47.
- Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol.* 1961 Jun; 3:318-56.
- Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2002 Dec; 30(3):185-94.
- Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol.* 2002 Sep; 37(9):1034-41.
- Krishnakumari V, Sharadadevi A, Singh S, Nagaraj R. Single disulfide and linear analogues corresponding to the carboxy-terminal segment of bovine beta-defensin-2: effects of introducing the beta-hairpin nucleating sequence d-pro-gly on antibacterial activity and biophysical properties. *Biochemistry.* 2003 Aug 12; 42(31):9307-15.
- Krishnakumari V, Sharadadevi A, Singh S, Nagaraj R. Single disulfide and linear analogues corresponding to the carboxy-terminal segment of bovine beta-defensin-2: effects of introducing the beta-hairpin nucleating sequence d-pro-gly on antibacterial activity and biophysical properties. *Biochemistry.* 2003 Aug 12; 42(31):9307-15.
- Krishnakumari V, Sharadadevi A, Sitaram N, Nagaraj R. Consequences of introducing a disulfide bond into an antibacterial and hemolytic peptide. *J Pept Res.* 1999 Dec; 54(6):528-35.
- Krishnakumari V, Sharadadevi A, Sitaram N, Nagaraj R. Consequences of introducing a

- disulfide bond into an antibacterial and hemolytic peptide. *J Pept Res.* 1999 Dec; 54(6):528-35.
- Krishnakumari V, Singh S, Nagaraj R. Antibacterial activities of synthetic peptides corresponding to the carboxy-terminal region of human beta-defensins 1-3. *Peptides.* 2006 Nov; 27(11):2607-13.
- Krist KA, Ross T, McMeekin TA. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. *Int J Food Microbiol.* 1998 Sep 8; 43(3):195-203.
- Kübler I, Stange EF, Fellermann K, Wehkamp J. Defensins: endogenous antibiotics as a central part of innate immunity. *Dtsch Med Wochenschr.* 2006 Sep 8; 131(36):1960-4.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15; 227(5259):680-5.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15; 227(5259):680-5.
- Lai JR, Epand RF, Weisblum B, Epand RM, Gellman SH. Roles of salt and conformation in the biological and physicochemical behavior of protegrin-1 and designed analogues: correlation of antimicrobial, hemolytic, and lipid bilayer-perturbing activities. *Biochemistry.* 2006 Dec 26; 45(51):15718-30.
- Lamandé SR, Bateman JF. Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Oct; 10(5):455-64.
- Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods.* 1991 Mar 21; 137(2):167-73.
- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP. PATHWAYS AND REGULATION OF SULFUR METABOLISM REVEALED THROUGH MOLECULAR AND GENETIC STUDIES. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2000 Jun; 51:141-165.
- Levison ME. Pharmacodynamics of antibacterial drugs. *Infect Dis Clin North Am.* 2000 Jun; 14(2):281-91.
- Liévin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr; 19(2):315-37.
- Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 2001; (234):29-40.
- Liu XH, Bai XD, Tong QY, Zhang SF. Expression of alpha-defensin-1 with J chain in the transfected COS-7 cells. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2006 Feb; 18(2):71-3. Chinese.
- Malatjalian DA. Pathology of inflammatory bowel disease in colorectal mucosal biopsies. *Dig Dis Sci.* 1987 Dec; 32(12 Suppl):5S-15S.
- Mandal M, Jagannadham MV, Nagaraj R. Antibacterial activities and conformations of bovine beta-defensin BNBD-12 and analogs: structural and disulfide bridge requirements for activity. *Peptides.* 2002 Mar; 23(3):413-8.
- Mandal M, Nagaraj R. Antibacterial activities and conformations of synthetic alpha-defensin HNP-1 and analogs with one, two and three disulfide bridges. *J Pept Res.* 2002 Mar; 59(3):95-104.
- Mani R, Waring AJ, Lehrer RI, Hong M. Membrane-disruptive abilities of beta-hairpin

antimicrobial peptides correlate with conformation and activity: a <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H NMR study. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Oct 1; 1716(1):11-8.

Mansfield MA, Protein Blotting, A Practical Approach, Oxford University Press, New York, USA 1994.

Marrs KA. THE FUNCTIONS AND REGULATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1996 Jun 47:127-158.

Mattie H, van der Voet GB. The relative potency of amoxycillin and ampicillin in vitro and in vivo. *Scand J Infect Dis*. 1981; 13(4):291-6.

McGuire JM, BUNCH RL, ANDERSON RC, BOAZ HE, FLYNN EH, POWELL HM, SMITH JW. Ilotycin, a new antibiotic. *Schweiz Med Wochenschr*. 1952 Oct 11; 82(41):1064-5.

Monod J. The Growth of Bacterial Cultures. *Ann Rev. Microbiol*. 1949 Oct; 3:371-394.

Morgera F, Antcheva N, Pacor S, Quaroni L, Berti F, Vaccari L, Tossi A. Structuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes. *J Pept Sci*. 2008 Apr; 14(4):518-23.

Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Jun; 62(12):1297-307.

Nakajima Y, Ishibashi J, Yukuhiro F, Asaoka A, Taylor D, Yamakawa M. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Dec 5; 1624(1-3):125-30.

Nathans D, Smith HO. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem*. 1975; 44:273-93.

Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2001 Nov; 2(11):1004-9.

Nevin DE, Pratt JM. A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Lett*. 1991 Oct 21; 291(2):259-63.

Nicolau DP. Optimizing outcomes with antimicrobial therapy through pharmacodynamic profiling. *J Infect Chemother*. 2003 Dec; 9(4):292-6.

Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology*. 2004 Mar; 111(3):273-81.

Noiva R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol*. 1999 Oct; 10(5):481-93.

pET System Manual. 1997. 7th Edition. Novagen, Madison, WI

Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Mueller HA, Stange EF. A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts. *J Microbiol Methods*. 2006 May; 65(2):335-45.

Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Stange EF. Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2007 Sep; 56(9):1240-7.

Odze R. Diagnostic problems and advances in inflammatory bowel disease. *Mod Pathol*. 2003 Apr; 16(4):347-58.

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. Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem*. 2001 Aug 10;

276(32):30521-6.

O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol.* 1999 Dec 15; 163(12):6718-24.

Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004 May; 53(5):685-93.

Otte JM, Kiehne K, Herzig KH. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol.* 2003; 38(8):717-26.

Ouellette AJ. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004 Apr; 18(2):405-19.

Pal RB, Pal P, Jain S, Kulkarni KP. In vitro study to compare sensitivity of amoxicillin+clavulanic acid and cefpodoxime+clavulanic acid among beta-lactamase positive clinical isolates of gram-positive and gram-negative pathogens. *J Indian Med Assoc.* 2008 Aug; 106(8):545-8.

Park Y, Hahm KS. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *J Biochem Mol Biol.* 2005 Sep 30; 38(5):507-16.

Peng L, Xu Z, Fang X, Wang F, Yang S, Cen P. Preferential codons enhancing the expression level of human beta-defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Pept Lett.* 2004 Aug; 11(4):339-44.

Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature.* 1975 Dec 18; 258(5536):598-9.

Porath J, Flodin P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature.* 1959 Jun 13; 183(4676):1657-9.

Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jan; 59(1):156-70.

Porter EM, Poles MA, Lee JS, Naitoh J, Bevins CL, Ganz T. Isolation of human intestinal defensins from ileal neobladder urine. *FEBS Lett.* 1998 Sep 4; 434(3):272-6.

Porter EM, van Dam E, Valore EV, Ganz T. Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect Immun.* 1997 Jun; 65(6):2396-401.

Pratt R, Dufrenoy J. Cytochemical interpretation of the mechanism of penicillin action. *Bacteriol Rev.* 1948 Mar; 12(1):79-103.

Rahman MA, Brot N, Weissbach H. High level expression and purification of peptide methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli*. *Cell Mol Biol.* 1992 Aug; 38(5):529-42. Erratum in: *Cell Mol Biol* 1992 Sep; 38(6):615.

Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Feb; 24(2):202-8.

Reisberg B, Herzog J, Weinstein L. In vitro antibacterial activity of trimethoprim alone and combined with sulfonamides. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda).* 1966; 6:424-9.

Reusser F. Ficellomycin and feldamycin; inhibitors of bacterial semiconservative DNA replication. *Biochemistry.* 1977 Jul 26; 16(15):3406-12.

Rotschafer JC, Zabinski RA, Walker KJ, Vance-Bryan K. Pharmacotherapy and pharmacodynamics in the management of bacterial infection. *J Clin Pharmacol.* 1992 Dec; 32(12):1083-8.

Sahly H, Schubert S, Harder J, Kleine M, Sandvang D, Ullmann U, Schröder JM, Podschun R. Activity of human beta-defensins 2 and 3 against ESBL-producing

- Klebsiella strains. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Mar; 57(3):562-5.
- Saido-Sakanaka H, Ishibashi J, Sagisaka A, Momotani E, Yamakawa M. Synthesis and characterization of bactericidal oligopeptides designed on the basis of an insect anti-bacterial peptide. *Biochem J.* 1999 Feb 15; 338 (Pt 1):29-33.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20; 230(4732):1350-4.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20; 230(4732):1350-4.
- Salazar O. Bacteria and yeast cell disruption using lytic enzymes. *Methods Mol Biol.* 2008; 424:23-34.
- Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol.* 2007 Apr; 19(2):70-83.
- Sambrook J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989a) *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 2nd ed., (p.5.72). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987 Nov 1; 166(2):368-79.
- Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 Aug; (437):3-6.
- Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, Tack BF, Vogel HJ. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8; 277(10):8279-89. Epub 2001 Dec 11.
- Schmid M, Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger K, Stange EF. The role of defensins in the pathogenesis of chronic-inflammatory bowel disease. *Z Gastroenterol.* 2004 Apr; 42(4):333-8.
- Schmidt M, Viaplana E, Hoffmann F, Marten S, Villaverde A, Rinas U. Secretion-dependent proteolysis of heterologous protein by recombinant *Escherichia coli* is connected to an increased activity of the energy-generating dissimilatory pathway. *Biotechnol Bioeng.* 1999; 66(1):61-7.
- Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med.* 2005 Aug; 83(8):587-95.
- Schratter P, Krowczynska AM, Leonard JT. Ultrafiltration in molecular biology. *Am Biotechnol Lab.* 1993 Nov; 11(12):16.
- Schrimpf G, *Gentechnische Methoden*, 3.Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 2002, 46-47.
- Schröder JM. *Biochem Pharmacol.* Epithelial peptide antibiotics. 1999 Jan 15; 57(2):121-34.
- Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria

- compared with controls. *Gastroenterology*. 1999 Nov; 117(5):1089-97.
- Schwarz D, Klammt C, Koglin A, Löhr F, Schneider B, Dötsch V, Bernhard F. Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*. 2007 Apr; 41(4):355-69.
- Scopes RK. (1994) *Protein purification*. Springer-Verlag, New York.
- Seksik P, Sokol H, Lepage P, Vasquez N, Manichanh C, Mangin I, Pochart P, Doré J, Marteau P. Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Oct; 24 Suppl 3:11-8.
- Sherman JM, Holm GE, Albus WR. Salt Effects in Bacterial Growth: III. Salt Effects in Relation to the Lag Period and Velocity of Growth. *J Bacteriol*. 1922 Nov; 7(6):583-8.
- Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 21; 14(3):390-400.
- Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*. 1994 Dec 23; 269(51):32678-84.
- Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*. 1994 Dec 23; 269(51):32678-84.
- Shuman S. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15; 88(22):10104-8.
- Shuman S. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15; 88(22):10104-8.
- Si LG, Liu XC, Lu YY, Wang GY, Li WM. Soluble expression of active human beta-defensin-3 in *Escherichia coli* and its effects on the growth of host cells. *Chin Med J (Engl)*. 2007 Apr 20; 120(8):708-13.
- Siegmund B, Zeitz M. Immunobiology of chronic inflammatory bowel diseases. *Dtsch Med Wochenschr*. 2006 Nov 24; 131(47):2657-60.
- Simons PC, Vander Jagt DL. Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal Biochem*. 1977 Oct; 82(2):334-41.
- Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*. 2005 Apr; 99(4):303-10. Review.
- Smith BJ. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol*. 1994; 32:23-34.
- Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. 1988 Jul 15; 67(1):31-40.
- Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. 1988 Jul 15; 67(1):31-40.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct; 150(1):76-85. Erratum in: *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279.
- Stadnyk AW. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol*. 2002 Apr; 16(4):241-6.
- Steiner V, Chang JY. Chemical modification of the carboxyl groups of protein substrates enhances their thrombin susceptibility. *FEBS Lett*. 1987 Sep 28; 222(1):6-10.



- Stobberingh EE, Houben AW, van Boven CP. In vitro activity of ampicillin alone and in combination with different concentrations of 6 beta-bromopenicillanic acid, clavulanic acid and mecillinam. *Scand J Infect Dis*. 1987; 19(1):105-12.
- Strauch KL, Beckwith J. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 Mar; 85(5):1576-80.
- Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007 Mar; 117(3):514-21.
- Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K, Sugawara S, Sasano T, Takada H. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*. 2006 Jun; 85(6):524-9.
- Sugimura K, Higashi N. A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1988 Aug; 170(8):3650-4.
- Swan NC, Geoghegan JG, O'Donoghue DP, Hyland JM, Sheahan K. Fulminant colitis in inflammatory bowel disease: detailed pathologic and clinical analysis. *Dis Colon Rectum*. 1998 Dec; 41(12):1511-5.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 Jan; 122(1):44-54.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol*. 2005 Feb 28; 11(8):1131-40.
- Syrový I, Hodný Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Chromatogr*. 1991 Sep 13; 569(1-2):175-96.
- Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, Kurazono H, Moss J, Hirayama T, Nakaya Y. Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. *FEBS Lett*. 2001 Nov 23; 508(3):484-8.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:335-76.
- Takemura H, Kaku M, Kohno S, Hirakata Y, Tanaka H, Yoshida R, Tomono K, Koga H, Wada A, Hirayama T, Kamihira S. Evaluation of susceptibility of gram-positive and -negative bacteria to human defensins by using radial diffusion assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Oct; 40(10):2280-4.
- Teraoka H, Minami H, Iijima S, Tsukada K, Koiwai O, Date T. Expression of active human DNA ligase I in *Escherichia coli* cells that harbor a full-length DNA ligase I cDNA construct. *J Biol Chem*. 1993 Nov 15; 268(32):24156-62.
- Tilton RC, Lieberman L. Microdilution assay of antibiotics in body fluids. *Ann Clin Lab Sci*. 1974 May-Jun; 4(3):178-83
- Tomita T, Hitomi S, Nagase T, Matsui H, Matsuse T, Kimura S, Ouchi Y. Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol Immunol*. 2000; 44(9):749-54.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep; 76(9):4350-4.
- Tripathi LP, Sowdhamini R. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes. *BMC Genomics*. 2008 Nov 19; 9:549.
- Tuo XY, Xu MD, Chen B, Chai JK, Sheng ZY. Expression of human beta-defensin 3 in COS-7 cell. *Chin Med Sci J*. 2004 Sep; 19(3):207-11.

- Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21; 243(1-2):191-210.
- Veldhuizen EJ, Rijnders M, Claassen EA, van Dijk A, Haagsman HP. Porcine beta-defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Mol Immunol*. 2008 Jan; 45(2):386-94.
- Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Feb; 76(2):615-9.
- Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 2004 Nov 1; 173(9):5398-405.
- Walker JM, *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, 11,56-61, Totowa, New Jersey, 1996.
- Walker JM. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol*. 1994; 32:35-8.
- Wang X, Zhang Z, Louboutin JP, Moser C, Weiner DJ, Wilson JM. Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *FASEB J*. 2003 Sep; 17(12):1727-9. Epub 2003 Jul 3.
- Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Schwind B, Duchrow M, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF. Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Jul; 14(7):745-52.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2003a Jul; 9(4):215-23.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004 Nov; 53(11):1658-64.
- Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13; 102(50):18129-34.
- Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007 Jan; 23(1):32-8.
- Weide H, Aurich H. *Allgemeine Mikrobiologie*. Jena, Gustav Fischer 1979.
- Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem*. 1979 Sep; 25(9):1531-46.
- Xu M, Meng W, Ma X. PDI-, PPI- and chaperone-catalyzed refolding of recombinant human IL-2 and GM-CSF. *Sci China B*. 1995 Apr; 38(4):429-37.
- Xu Z, Chen H, Yin X, Xu N, Cen P. High-level expression of soluble human beta-defensin-2 fused with green fluorescent protein in *Escherichia coli* cell-free system. *Appl Biochem Biotechnol*. 2005 Oct; 127(1):53-62.
- Xu Z, Peng L, Zhong Z, Fang X, Cen P. High-level expression of a soluble functional antimicrobial peptide, human beta-defensin 2, in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*. 2006(1) Mar-Apr; 22(2):382-6.

## Literaturverzeichnis

Xu Z, Zhong Z, Huang L, Peng L, Wang F, Cen P. High-level production of bioactive human beta-defensin-4 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006(2) Sep; 72(3):471-9.

Yang H, Wan L, Li X, Cai H, Chen L, Li S, Li Y, Cheng J, Lu X. High level expression of His-tagged colicin 5 in *E. coli* and characterization of its narrow-spectrum bactericidal activity and pore-forming action. *Protein Expr Purif.* 2007 Aug; 54(2):309-17.

Zhang HC, Cisneros RJ, Dunlap RB, Johnson LF. Efficient synthesis of mouse thymidylate synthase in *Escherichia coli*. *Gene.* 1989 Dec 14; 84(2):487-91.

Zhong Z, Xu Z, Peng L, Huang L, Fang X, Cen P. Tandem repeat mhBD2 gene enhance the soluble fusion expression of hBD2 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006 Aug; 71(5):661-7.

Zilbauer M, Dorrell N, Boughan PK, Harris A, Wren BW, Klein NJ, Bajaj-Elliott M. Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human beta-defensins 2 and 3. *Infect Immun.* 2005 Nov; 73(11):7281-9.

Zubay G. In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet.* 1973; 7:267-87.

## Danksagung

### **Danksagung**

Diese Doktorarbeit ist aus einer Kooperation der Chirurgischen Klinik I für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie und der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie an der Charité Campus Benjamin Franklin entstanden. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich besonders herzlich bei meiner Betreuerin Dr. Ulrike Erben bedanken, die mir das wissenschaftliche Denken, Arbeiten, Schreiben und Präsentieren beigebracht hat. Sie hat mich in den anspruchsvollen Phasen meiner Doktorarbeit begleitet und gelehrt, dass Geduld eine der wichtigsten Voraussetzungen für den Erfolg einer wissenschaftlichen Arbeit ist. Dr. Ulrike Erben hat ununterbrochen mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Ganz besonders danke ich Annekatrin Coordes, die mir nicht nur die HBD-2-cDNA zur Herstellung der rekombinanten HBD-2-Fusionsproteine zur Verfügung gestellt hat, sondern die mich auch mit ihrem umfangreichen Wissen und ihrer großen Hilfsbereitschaft das erfolgreiche Abschließen meiner Doktorarbeit ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Doktorvater PD Dr. Anton J. Kroesen und Nadia Slavova für die Vergabe des Themas und das Interesse an den Fortschritten der Arbeit und an den Erkenntnissen, die daraus resultiert sind.

Ganz herzlich möchte ich Prof. Dr. Heinz-Johannes Buhr danken. Im Rahmen seiner Klinik konnte ich meine Promotion realisieren. Seine Unterstützung und sein positives Feedback haben mich erheblich zum Erreichen meiner Ziele motiviert.

Weiterhin bedanke ich mich bei PD Dr. Britta Siegmund und ihrer Arbeitsgruppe. Allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und das Interesse an meiner Arbeit im Rahmen vieler Seminare.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Katja Blunert, Tarkan Dagdelen, Dr. Martin Rühl und Sonja Dullat, die mich beim Erlernen verschiedener Methoden unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter Irene, meinem Vater Charalambos und meiner Schwester Areti ganz besonders herzlich bedanken. Sie waren immer für mich da, haben an mich geglaubt und mein ganzes Leben lang gestärkt und liebevoll unterstützt. Sie standen mir während meines Medizinstudiums und meiner Dissertationsarbeit geduldig zur Seite und ich habe Ihnen alles, was ich in meinem Leben erreicht habe, zu verdanken.

**Erklärung**

Ich, Andreas Andreou, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Etablierung des Nachweises direkter antibakterieller Wirkung humaner Defensine für die Untersuchung der Defensinproduktion im menschlichen Darm bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 29.09.2009

**Lebenslauf**

**"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen  
Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."**

Berlin, 12.10.2010