

Aus der Klinik für Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Humanes Beta-Defensin 3 bei der Infektion von Humanen
Umbilikalvenen-Endothelzellen mit *Listeria monocytogenes*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Florian Pröscholdt

aus Starnberg

Datum der Promotion: 05.12.2014

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Einleitung | 4 |
| 1.1. | Abstrakt | 4 |
| 1.2. | Listeriose | 5 |
| 1.3. | <i>Listeria monozytogenes</i> | 6 |
| 1.4. | Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMP) | 7 |
| 1.4.1 | TLR stimulierende PAMP..... | 7 |
| 1.4.2 | NLR stimulierende PAMP | 9 |
| 1.5. | Immunsystem | 9 |
| 1.5.1 | Unspezifisches Immunsystem | 10 |
| 1.5.2 | Spezifisches Immunsystem | 10 |
| 1.5.3 | Das unspezifische Immunsystem reguliert das spezifische Immunsystem..... | 11 |
| 1.5.4 | PAMP erkennende Rezeptoren (PRR) | 12 |
| 1.5.5 | Toll like Rezeptoren (TLR)..... | 12 |
| 1.5.6 | NOD like Rezeptoren (NLR) | 13 |
| 1.5.7 | Rezeptorprofil von HUVEC..... | 14 |
| 1.6. | Signaltransduktion von PRR | 15 |
| 1.6.1 | TLR induzierte Signaltransduktion | 15 |
| 1.6.2 | NLR induzierte Signaltransduktion..... | 16 |
| 1.6.3 | MAP Kinasen abhängige Signaltransduktion | 17 |
| 1.6.4 | NF-κB abhängige Transkription | 18 |
| 1.7. | Antimikrobielle Peptide | 18 |
| 1.8. | Aufgabenstellung | 20 |
| 2. | Material und Methoden | 22 |
| 2.1. | HUVEC Kultivierung..... | 22 |
| 2.1.1 | HUVEC Isolation | 22 |
| 2.1.2 | HUVEC Anzucht | 22 |
| 2.2. | Bakterien | 24 |
| 2.2.1 | Bakterienkultur..... | 24 |
| 2.2.2 | Inaktivierung von <i>L. monozytogenes</i> | 24 |
| 2.2.3 | Präparation der bakteriellen DNA..... | 26 |
| 2.2.4 | Infektion | 26 |
| 2.2.5 | Inkubationsversuch | 26 |
| 2.3. | Lipofektion | 26 |
| 2.4. | Probenanalyse..... | 27 |
| 2.4.1 | Humanes Interleukin-8 ELISA | 27 |
| 2.4.2 | Humanes beta-Defensin-3 ELISA..... | 27 |
| 2.4.3 | Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion | 28 |
| 2.5. | Statistische Analyse..... | 30 |
| 3. | Ergebnisse | 31 |
| 3.1. | hBD-3 besitzt antimikrobielle Aktivität gegen <i>L. monozytogenes</i> | 31 |
| 3.2. | <i>L. monozytogenes</i> induziert die Expression von hBD-3 in HUVEC..... | 31 |
| 3.3. | <i>L. monozytogenes</i> induziert in HUVEC hBD-3 über einen Internalin-unabhängigen Pathogenitätsfaktor ohne Beteiligung von TLR..... | 33 |
| 3.4. | Die Expression von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit <i>L. monozytogenes</i> ist unabhängig von den MAPK MEK1/2 und p38..... | 40 |
| 3.5. | Die Expression von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit <i>L. monozytogenes</i> erfolgt abhängig von NF-κB..... | 41 |
| 4. | Diskussion | 42 |
| 4.1. | hBD-3 besitzt antimikrobielle Wirkung gegen <i>L. monozytogenes</i> | 42 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2. | HUVEC detektieren <i>L. monozytogenes</i> und exprimieren hBD-3 | 42 |
| 4.3. | Die Expression von hBD-3 in HUVEC durch <i>L. monozytogenes</i> erfolgt unabhängig von Internalin und TLR..... | 43 |
| 4.3.1 | Die Rolle von Internalin..... | 43 |
| 4.3.2 | Nur vitale <i>L. monozytogenes</i> induzieren eine endotheliale Immunantwort | 44 |
| 4.3.3 | Die Rolle von Listeriolysin O | 46 |
| 4.3.4 | Die Rolle von <i>L. monozytogenes</i> DNA | 47 |
| 4.3.5 | Die Rolle von TLR..... | 47 |
| 4.3.6 | Die Rolle von MyD88..... | 49 |
| 4.4. | Die Expression von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit <i>L. monozytogenes</i> erfolgt unabhängig von den MAPK MEK1/2 und p38..... | 50 |
| 4.5. | Die Expression von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit <i>L. monozytogenes</i> erfolgt abhängig von NF- κ B..... | 51 |
| 5. | Zusammenfassung | 53 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | 55 |
| 6.1. | Tabellenverzeichnis..... | 61 |
| 6.2. | Abbildungsverzeichnis | 62 |
| 6.3. | Abkürzungsverzeichnis | 62 |
| 7. | Anhang | 65 |
| 7.1. | Eidesstattliche Versicherung | 65 |
| 7.2. | Lebenslauf | 66 |
| 7.3. | Publikationsliste | 67 |
| 7.4. | Danksagung | 68 |

1. Einleitung

1.1. Abstrakt

Listeriose ist eine durch das Gram positive, fakultativ intrazelluläre Stäbchen *L. monocytogenes* ausgelöste Erkrankung mit dem klinischen Bild einer intrauterinen Infektion, Meningitis, Sepsis oder Gastroenteritis. Die insgesamt seltene Erkrankung zeigt eine steigende Inzidenz mit zunehmender Betroffenheit von über 60jährigen. Während im Menschen die antibiotische Chemotherapie gut wirksam ist, sind in aus Nahrungsmitteln isolierten *L. monocytogenes* Resistenzen gegen viele Antibiotika inklusive Vancomycin nachgewiesen.

Antimikrobielle Peptide sind konservierte Strukturen mit breiter antimikrobieller Wirkung gegen Bakterien, Viren und Pilze. Für die humanen α - und β -Defensine ist sowohl eine antimikrobielle Wirkung gegenüber Pathogenen, als auch ein erhöhtes Vorkommen bei immunologischen und infektiösen Erkrankungen beschrieben.

In einem Inkubationsversuch zeigten wir, dass hBD-3 eine mit Penicillin vergleichbare antimikrobielle Aktivität gegen *L. monocytogenes* erreicht. Bei Infektion von Humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen mit *L. monocytogenes* wiesen wir mit RT-PCR und ELISA eine Induktion von hBD-3 nach. Die Infektion mit verschiedenen Mutanten von *L. monocytogenes* zeigte, dass die hBD-3 Induktion unabhängig von den Pathogenitätsfaktoren Internalin A und B verläuft. Versuche mit RNA Interferenz wiesen darauf hin, dass diese Induktion unabhängig von dem TLR-Adapterprotein MyD88 verläuft. Die Inkubation mit spezifischen Inhibitoren ergab, dass die hBD-3 Induktion durch *L. monocytogenes* unabhängig von den MAP Kinasen MEK1/2 und p38 verläuft. Jedoch besteht eine Abhängigkeit der hBD-3 Induktion von dem Transkriptionsfaktor NF- κ B.

Zusammengefasst: Das körpereigene Peptid hBD-3 zeigte eine mit Penicillin vergleichbare antimikrobielle Aktivität gegen *L. monocytogenes*. Bei Infektion von Humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen mit *L. monocytogenes* beobachteten wir die Induktion von hBD-3. Diese verlief unabhängig von den Pathogenitätsfaktoren Internalin A und B, dem TLR-Adapterprotein MyD88 sowie den MAP Kinasen MEK1/2 und p38, aber abhängig von dem Transkriptionsfaktor NF- κ B.

Infection with *L. monocytogenes*, a Gram negative, facultative intracellular bacterium may lead to intrauterine infections, meningitis, sepsis or gastroenteritis. Listeriosis is rare, but its incidence is rising especially among individuals over 60 years of age. Antibiotics are effective in treatment

of humans, but strains of *L. monocytogenes* isolated from foods are resistant against a wide spectrum of antibiotics including vancomycin.

Antimicrobial peptides consist of highly conserved structures and display antimicrobial activity against bacteria, viruses and fungi. α - and β -defensins have been shown to be active against human pathogens and increased levels have been detected in patients with autoimmune and infectious diseases.

In an incubation experiment hBD-3 exhibited antimicrobial activity against *L. monocytogenes* equal to that of penicillin. RT-PCR and ELISA showed induction of hBD-3 in human umbilical vein endothelial cells infected with *L. monocytogenes*. Infection with varying deletion mutants of *L. monocytogenes* indicated that induction of hBD-3 is independent of the bacterial surface proteins Internalin A and B. RNA interference experiments showed hBD-3 induction to be independent from TLR adapter protein MyD88. Specific inhibition showed that induction of hBD-3 was independent from MAP kinases MEK1/2 and p38. Induction of hBD-3 was dependent on activity of the transcription factor NF- κ B.

In summary, the human peptide hBD-3 shows antimicrobial activity against *L. monocytogenes* equal to that of penicillin. After infection of human umbilical vein endothelial cells with *L. monocytogenes*, increased levels of hBD-3 were detected. This was independent from the bacterial surface proteins Internalin A and B, TLR adapter protein MyD88, and MAP kinases MEK1/2 and p38; however induction of hBD-3 was dependent on NF- κ B.

1.2. Listeriose

Unter dem Begriff Listeriose werden Krankheitsbilder zusammengefasst, die durch den Erreger *L. monocytogenes* verursacht werden. *L. monocytogenes* ist ein Gram positives, begeißeltes, fakultativ intrazelluläres Bakterium mit ubiquitärem Vorkommen. Die Listeriose ist mit 3,6 Fällen pro 1 Million Individuen eine seltene Erkrankung. Die Übertragung erfolgt über kontaminierte Lebensmittel wie Fleisch- oder Rohmilchprodukte. Die häufigsten Manifestationsformen der Listeriose sind Meningitis, Sepsis und Gastroenteritis, sowie intrauterine Infektionen bei Schwangeren. Individuen können einen Trägerstatus mit Persistenz von *L. monocytogenes* im Gastrointestinaltrakt haben, ohne dass klinische Zeichen einer Listeriose auftreten (Swaminathan et al. 2007).

Seit 2001 besteht eine steigende Inzidenz von 2,1 auf 3,6 Fälle pro 1 Million Einwohner. Betroffen sind vor Allem über 60jährige, Immunkompromittierte und Schwangere. Der Anteil der betroffenen über 60jährigen ist angestiegen; dabei leiden diese vor Allem unter der septischen Verlaufsform der Listeriose. Neben der altersspezifischen Verteilung zeigt sich eine

erhöhte Inzidenz in Gruppen mit bestimmten Begleiterkrankungen. Bei Patienten mit malignen Neoplasien konnte ein 5-fach erhöhtes Risiko, an Listeriose zu erkranken, gezeigt werden. Auch Patienten mit Diabetes mellitus, Leberfunktionsstörungen und Niereninsuffizienz waren häufiger von Listeriose betroffen als Patienten mit anderen Begleiterkrankungen (Mook et al. 2011). Bei Schwangeren mit nachgewiesener *L. monozytogenes* Infektion kommt es in 16-45% der Fälle zum Fruchttod (Hoelzer et al. 2012).

Eine antibiotische Chemotherapie kann mit einer Doppeltherapie mit Penicillin und einem Aminoglykosid durchgeführt werden. Bei der Therapie der Listeriose im Menschen scheinen Antibiotikaresistenzen noch keine relevante Rolle zu spielen. Allerdings wurden in aus Nahrungsmitteln isolierten *L. monozytogenes* Resistenzen gegenüber einer grossen Anzahl von Antibiotika inklusive Vancomycin nachgewiesen (Lungu et al. 2011).

1.3. *Listeria monozytogenes*

Listeria monozytogenes (*L. monozytogenes*) ist der Erreger der Listeriose. Die Erstbeschreibung dieses Gram positiven Stäbchens gelang E.G.D. Murray et al. im Jahr 1926. Nachdem die Listeriose zunächst als Zoonose betrachtet worden war, erfolgte 1983 durch Schleich et al. der Nachweis einer Übertragung durch kontaminierte Lebensmittel (Cossart 2007).

In seinem Lebenszyklus invadiert *L. monozytogenes* seine Wirtszelle unter Bildung einer Vakuole bzw. eines Phagosoms. Dabei kann *Listeria* entweder durch professionelle antigenpräsentierende Zellen phagozytiert werden, oder sich bei nicht professionellen Antigen präsentierenden Zellen durch induzierte Endozytose oder direkte Zell-zu-Zell-Verbreitung Zugang verschaffen (Drevets et al. 1995; Hamon et al. 2006). Nach Zersetzung der Vakuolenmembran wird das Bakterium ins Zytosol freigesetzt, wo es repliziert und durch Polymerisierung von F-Aktin aktive Motilität erreicht, um weitere Wirtszellen zu invadieren.

Die Regulation wichtiger Virulenzfaktoren erfolgt durch das Untranslated Region (UTR) - Regulationselement Positive Regulatory Factor A (prfA), dessen Expression von den Umgebungsbedingungen des Bakteriums wie Temperatur, pH und Kohlenhydratangebot abhängig ist (Kreft et al. 2001). So ist das Bakterium in der Lage, seine Syntheseaktivität an seinen aktuellen Aufenthaltsort und Bedarf anzupassen.

Bei der Invasion ermöglichen zwei Pathogenitätsfaktoren das aktive Durchdringen der Zellmembran: Die beiden membranständigen Oberflächenproteine Internalin A (Inl A) und Internalin B (Inl B). Inl A interagiert mit dem membranständigen Adhäsionsprotein E-Cadherin (Mengaud et al. 1996). Der zelluläre Rezeptor für Inl B ist die Tyrosinkinase Met (Shen et al.

2000). Gemeinsame Endstrecke der intrazellulären Signaltransduktion beider Mechanismen ist die strukturelle Veränderung des Aktin-Zytoskeletts, die zum Einschluss des Bakteriums führt.

Um sich aus dem Phagosom zu befreien, sezerniert *L. monozytogenes* das porenbildende Toxin Listeriolysin O (LLO) sowie die Phospholipasen A und B. Listeriolysin O ermöglicht durch pH-abhängige Porenbildung die Lyse der Phagosomenmembran. Im intraphagosomalen sauren Milieu ist das Protein stabil und in der Lage an die Membran zu binden, wo es zum porenbildenden Komplex oligomerisiert. Im neutralen Zytosol hingegen kommt es zu einer verfrühten Entfaltung und die Komplexbildung wird unmöglich (Schuerch et al. 2005). Damit erhält *L. monozytogenes* Zugang zum Zytosol als seinem bevorzugten Replikationsort, ohne diesen durch Lyse der Wirtszelle zu zerstören.

Bei Erreichen des Zytosols rekrutiert *L. monozytogenes* zelluläres F-Aktin, um es für seine Fortbewegung zu nutzen. Dabei polymerisiert es F-Aktin an seiner Oberfläche mit Hilfe des membranständigen Proteins Actin Assembly Inducing Protein A (ActA). Das distale Ende des Aktin-Kometenschweifes liegt im Zentrum der Wirtszelle, während das proximale an einem der Pole des Bakteriums installiert ist. Dieses bewegt sich zur Zellmembran der Wirtszelle und bildet unter Beteiligung der Membranen beider Wirtszellen eine Ausbuchtung in die benachbarte Zelle aus. Es kommt zum Einschluss einer Doppelmembran-Vakuole in der Nachbarzelle, die wiederum durch LLO lysiert wird (Tilney et al. 1989) (Gedde et al. 2000).

1.4. Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMP)

Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMP) sind konservierte Moleküle, die als Bauelemente oder Oberflächenstrukturen in Mikroorganismen vorkommen und an spezifischen Rezeptoren (PAMP erkennende Rezeptoren PRR) des angeborenen Immunsystems eine Signaltransduktion auslösen. Nach der Aktivierung von PRR durch PAMP kommt es zu einer Zytokininduktion um die Pathogenelimination einzuleiten, sowie die spezifische Abwehr zu stimulieren (Akira et al. 2006).

1.4.1 TLR stimulierende PAMP

Lipopolysaccharid (LPS) ist Bestandteil der Zellwand Gram negativer Bakterien und einer der potestenten Immunstimulatoren. Seine Erkennung erfolgt über Toll like Rezeptor 4 (TLR4). Die immunologisch wirksame Komponente ist der Lipidanteil Lipid A, welcher bei seiner Freisetzung im menschlichen Körper als Endotoxin aktiv ist und z.B. durch Auslösen exzessiver TNF- α Sekretion das Toxic Shock Syndrome verursacht (Le Roy et al. 2001). Im Blut bindet freigesetztes LPS an LPS bindendes Protein (LBP). Bei der Bindung an TLR4 interagiert LPS

mit MD-2 (lymphocyte antigen 96), welches den Kontakt mit dem Rezeptor vermittelt (Shimazu et al. 1999). Zur Bindung an TLR4 ist Cluster of Differentiation 14 (CD14) als Kofaktor notwendig, welches mit einem Glykosylinositolphosphat (GPI) Anker in der Zellmembran befestigt ist (Haziot et al. 1988; Wright 1990).

Gram positive Bakterien enthalten mehrere PAMP, darunter Lipoteichonsäure (LTA), Lipoproteine (LP) und Peptidoglykane (PGN) (Akira et al. 2006). TLR2 erkennt LTA, Lipoproteine und Peptidoglykane, wobei die Bindung an Peptidoglykane umstritten ist (Akira et al. 2006; Muller-Anstett et al. 2010). Indem er mit anderen Rezeptoren oligomerisiert, ist TLR2 in der Lage, eine Vielzahl von PAMP zu binden (Kumar et al. 2009). Bei der Pathogenerkennung durch TLR2 kommt es zur Aneinanderlagerung von TLR2 mit TLR1 oder TLR6, was die Unterscheidung verschiedener Substrukturen von PAMP ermöglicht. So kann nur bei gleichzeitiger Expression von TLR2 und TLR6 Macrophage Activating Lipopeptide 2 (MALP-2) von anderen bakteriellen Lipopeptiden unterschieden werden (Takeuchi et al. 2001). Flagellin ist der Hauptproteinbestandteil bakterieller Flagellen und stellt einen wichtigen Immunstimulus dar, der sowohl von Nukleäre Oligomerisierungs Domäne like Rezeptoren (NLR) (siehe 1.3.2), als auch von TLR5 erkannt wird. Die Flagellen setzen sich aus Flagellinmonomeren zusammen, welche nur in ihrer Monomerform vom Immunsystem erkannt werden. Die Analyse der Proteinstuktur zeigte vier Hauptdomänen: N- und C-terminale Ketten aus α -Helices (D0), eine weitere zentrale Kette aus α -Helices (D1), sowie eine ebenfalls zentral gelegene hypervariable Region aus β -Faltblättern (D2 und D3). TLR5 erkennt Flagellinmonomere und bindet an die konservierte D1-Region, welche gleichzeitig für die Motilität des Polymers nötig ist (Hayashi et al. 2001; Yonekura et al. 2003). Mutationen an den Aminosäuren 89 bis 96 der Domäne 1, wie sie im Flagellin von *H. pylori* auftreten, verhindern eine TLR5-abhängige Nukleärer Faktor-kappa B (NF- κ B) Induktion (Andersen-Nissen et al. 2005).

Bakterielle genomische DNA stimuliert eine TLR9-abhängige Zytokinsekretion z.B. von TNF- α (Hemmi et al. 2000). Auch virale DNA, z.B. von Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV1) wird von TLR9 erkannt und stimuliert die Freisetzung von α -Interferon (Krug et al. 2004; Akira et al. 2006). Das stimulierende Element der DNA ist ein hoher Gehalt an CpG-Dinukleotiden in nicht-methyliertem Zustand, was typisch für bakterielle und virale DNA ist. CpG-Motive sind in Säugetier-DNA seltener und kommen hier außerdem in methyliertem Zustand vor. Dieser Unterschied könnte einen wichtigen Faktor bei der Unterscheidung zwischen körpereigenen Molekülen und PAMP darstellen (Akira et al. 2006). Eine Stimulation von TLR9 durch

körpereigene DNA wird vermutlich auch dadurch vermieden, dass die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors im Inneren der Endosomen liegt (Barton et al. 2006).

1.4.2 NLR stimulierende PAMP

Nukleäre Oligomerisierungs Domäne (NOD) -1 und -2 erkennen spezifische Peptidoglykanstrukturen und aktivieren NF- κ B. Peptidoglykan besteht aus Polysacchariden, die von Peptidkomponenten vernetzt werden und kommt als stabilisierende Struktur in der Zellwand aller Bakterien außer Mycoplasma vor. Die Polysaccharide werden von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) durch β -1,4-glykosidische Bindungen gebildet; die Peptid-cross-links sind in ihrer Zusammensetzung und Position variabel (Boneca 2005).

Als tatsächlicher Ligand von NOD1 wurde die Peptidoglykanstruktur GlcNAc-MurNAc-L-Ala- γ -D-*meso*-DAP(GM-tri_{DAP}) identifiziert, die natürlich in der Zellwand von Gram negativen Bakterien sowie von Listerien vorkommt (Schleifer et al. 1972; Girardin et al. 2003). Das dabei von der NOD1-LRR Bindungsstelle erkannte minimale Motiv ist das natürlich nicht vorkommende Dipeptid D-Glu-*meso*-DAP (Diaminopimelinsäure) (iE-DEP) mit in terminaler Position gelegener *meso*-DAP (Chamaillard et al. 2003; Carneiro et al. 2004).

Der Ligand von NOD2 ist das Peptidoglykanspaltprodukt Muramyl-Dipeptid MurNAc-L-Ala-D-Glc (MDP), welches Zellwandbestandteil sowohl Gram positiver als auch Gram negativer Bakterien ist (Schleifer et al. 1972; Girardin et al. 2003).

Flagellin wird außer von TLR5 auch von verschiedenen zytoplasmatischen NLR erkannt. Eine 35 Aminosäuren umfassende, C-terminale Region von Flagellin löst eine neuronal apoptosis inhibitory protein 5 (NAIP5) vermittelte Inflammasombildung aus, die zur Aktivierung von Caspase-1 führt. In Mäusen konnte bei Verlust von NAIP5 die Stimulation mit Flagellin keine Caspase-1 Aktivierung auslösen (Lightfield et al. 2008). ICE Protease Aktivierender Faktor (IPAF) ist ebenfalls in der Lage, die Anwesenheit von Flagellin im Zytosol zu detektieren und vermittelt via Caspase-1 die Sekretion von Interleukin-1 beta (IL-1 β) (Miao et al. 2006).

1.5. Immunsystem

Das menschliche Immunsystem schützt den Körper vor der Infektion durch pathogene Mikroorganismen wie Pilzen, Viren und Bakterien. In Wirbeltieren gliedert sich das Immunsystem in zwei Einheiten: Die angeborene (unspezifische) Immunität und die erworbene (spezifische, adaptierte) Immunität. Beide sind parallel aktiv, entfalten ihre Hauptwirkung aber sequentiell. Unspezifische und spezifische Abwehr sind miteinander vernetzt und stimulieren

sich gegenseitig, wobei das unspezifische System eine regulierende Funktion einnimmt (Iwasaki et al. 2010).

1.5.1 Unspezifisches Immunsystem

Das angeborene Abwehrsystem erkennt durch eine limitierte Zahl keimbahnkodierter Mustererkennungs-Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors PRR) konservierte, sich nicht verändernde Strukturmerkmale von Mikroorganismen. Zur zellulären Komponente der unspezifischen Immunität gehören Dendritische Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen, sowie Neutrophile, Eosinophile und Basophile. Epithelien gehören ebenfalls zur unspezifischen Immunität und bilden einen mechanischen Schutz. In einigen Organen enthalten sie eine Muzinschicht, die die Adhäsion vor Krankheitserregern erschwert, sowie Sekrete mit niedrigem pH, der ein für die Kolonisierung ungünstiges Milieu bildet. Eine weitere Einheit ist das Komplementsystem (Medzhitov 2007).

Ein PRR kann mit einer breiten Spezifität eine Reihe von Molekülen in verschiedenen Mikroorganismen erkennen, die unveränderlich sind, da sie im betreffenden Mikroorganismus eine essentielle Funktion innehaben. Dazu gehören z.B. bakterielle Zellwandbausteine oder virale Nukleinsäuren. Durch die Aktivierung von PRR kommt es zum einen zu einer schnellen lokalen antimikrobiellen Reaktion, zum anderen zur Einleitung der adaptiven Immunantwort (Schenten et al. 2011).

Im Rahmen der lokalen Entzündungsreaktion aktivieren PRR Makrophagen zur Phagozytose bzw. zur Sekretion von Zytokinen (TNF, IL-1 β , IL-6). Durch Erhöhung der Kapillarpermeabilität wandern vermehrt Immunzellen und Serumproteine in die Entzündungsregion ein. Die Freisetzung von Tissue Factor (Faktor III) aktiviert am lokalen Endothel die Gerinnung und verhindert eine hämatogene Dissemination der Erreger.

Systemisch induzieren diese Zytokine die vermehrte Synthese von Akute Phase Proteinen in der Leber, sowie die Aktivierung des Komplementsystems. Natürliche Killerzellen sind an der Elimination von intrazellulären Pathogenen beteiligt und induzieren in infizierten Zielzellen Apoptose (Medzhitov 2007).

1.5.2 Spezifisches Immunsystem

Das spezifische Immunsystem erkennt Pathogene anhand von spezifischen Antigenen. Die Gene der Rezeptoren für diese Antigene werden durch somatische Rekombination in einer sehr hohen Zahl von Klonen kombiniert. Jeder Klon besitzt eine hohe Spezifität für ein bestimmtes Antigen.

Nach Aktivierung im Falle einer Infektion wird nur der passende Lymphozytenklon selektiert und in einer klonalen Expansion vermehrt (Schatz et al. 1992).

B-Zellen bilden den Hauptteil des humoralen Anteils der erworbenen Immunität. Sie reifen nach Stimulation zu Plasmazellen und synthetisieren spezifische Antikörper gegen ein putatives Pathogen. Nach Opsonierung durch Antikörper können phagozytierende Zellen Pathogene effizienter eliminieren. Im zellulären Anteil der erworbenen Immunität unterstützen CD4 positive T_{H1} -Helferzellen andere Immunzellen wie z.B. Makrophagen in der Zelldifferenzierung. CD8 positive zytotoxische T-Zellen erkennen Major Histocompatibility Complex I (MHC I) Moleküle und induzieren in Zielzellen Apoptose. Nach durchlaufener Infektion persistieren einige Lymphozyten und bilden für ein spezifisches Antigen ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis (Iwasaki et al. 2010).

1.5.3 Das unspezifische Immunsystem reguliert das spezifische Immunsystem

Das angeborene Immunsystem gibt über PRR-induzierbare Signale die Anweisungen zur Spezifität der Antigenerkennung von Lymphozyten. So wird erreicht, dass zwischen den von Lymphozyten erkannten Antigenen und den von PRR erkannten PAMP ein Zusammenhang besteht (Medzhitov 2007).

Bei T-Zellen wird dies durch dendritische Zellen erreicht, welche bei der Überwachung peripherer Gewebe mit PRR PAMP-abhängig Erreger finden, prozessieren und auf MHC Molekülen präsentieren. Der Zusammenhang zwischen unspezifischem PAMP und für die Zellen der erworbenen Immunität präsentierten spezifischem Antigen besteht darin, dass beide als Bestandteil desselben Fremdkörpers erkannt und prozessiert werden. Ebenfalls PRR-abhängig erfolgt die Migration in die Lymphknoten und die hier stattfindende Präsentation der Antigene, bzw. die Stimulation durch Zytokine und Oberflächenproteine. Diese schliesslich führt zur Aktivierung der T-Zellen bzw. zur Differenzierung zu T_H -Zellen (Banchereau et al. 1998).

B-Zellen können durch gleichzeitige Expression eines B-Zell Rezeptors und eines PRR Pathogene synchron anhand von dessen PAMP und dessen Antigen erkennen. Dies ist der Fall bei sogenannten T-Zell unabhängigen Antigenen, welche in einem Molekül PAMP Charakteristika sowie ein spezifisches Antigen aufweisen. Wenn PAMP und spezifisches Antigen nicht in einem Molekül vereinigt vorliegen, werden B-Zellen durch T_H -Zellen aktiviert (Medzhitov 2007).

Die spezifische Immunantwort aktiviert nun wiederum Effektorsysteme der unspezifischen Immunität: T_{H1} stimulieren mit $IFN-\gamma$ Makrophagen zur Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern. T_{H17} stimulieren mit IL-17 Neutrophile, die extrazelluläre Bakterien und

Pilze zerstören. Und T_{H2} stimulieren u.A. mit IL-4 die Abwehr von Helminthen durch Eosinophile, Basophile und Mastzellen (Reinhardt et al. 2006).

Als Produkt der B-Zell Endstrecke stimulieren Antikörper klassen-abhängig die angeborene Immunität. IgG aktivieren das Komplementsystem und opsonieren Erreger zur erleichterten Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen, während IgE Basophile und Mastzellen aktivieren. Die angeborene Immunantwort kann also direkt für eine frühe Reaktion und indirekt über das erworbene Immunsystem für eine verzögerte Reaktion aktiviert werden (Medzhitov 2007).

Obwohl das unspezifische Immunsystem essentiell ist, um eine Infektion in Schach zu halten, kann es alleine häufig keine Elimination des Erregers erreichen (Unanue 1997).

1.5.4 PAMP erkennende Rezeptoren (PRR)

PAMP erkennende Rezeptoren (PRR) sind eine Gruppe von Proteinen, die PAMP binden und als Reaktion eine Immunantwort auslösen. Zwei wichtige Gruppen von PRR sind Toll like Rezeptoren (TLR) und NOD like Rezeptoren (NLR). Diese Rezeptoren liegen entweder membranständig oder zytosolisch vor und leiten über eine intrazelluläre Signaltransduktion zunächst eine unspezifische Immunreaktion ein (Kumar et al. 2009). Zur Gruppe der PRR gehören auch RIG-I-like Rezeptoren (RLR) und sekretorische Proteine wie C reaktives Protein (CRP) und Serum Amyloid Protein (SAP), die an Pathogenopsonierung und Komplementaktivierung beteiligt sind (Janeway et al. 2002).

1.5.5 Toll like Rezeptoren (TLR)

TLR wurden zunächst als regulatorisch wirksames Genprodukt TOLL bei der dorsoventralen Achsenentwicklung in Embryonen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Anderson et al. 1985), bevor dessen antimikrobielle Wirkung erkannt wurde (Lemaitre et al. 1996). Es folgte die Charakterisierung eines analogen humanen Genproduktes zu TOLL (Medzhitov et al. 1997), sowie die Entdeckung von mittlerweile zehn weiteren Proteinen der TOLL Familie (Kawai et al. 2010), die als Toll like Rezeptoren bezeichnet wurden (Chiang et al. 1994). Sie unterscheiden sich in Expressionsmuster, Ligandenspezifität (Janeway et al. 2002) und Geninduktion (Kumar et al. 2009).

TLR werden im Menschen auf professionellen Antigen präsentierenden Zellen exprimiert, sowie auf einigen anderen wie Fibroblasten und Epithelzellen (Akira et al. 2006). Folgende humane Ligand-Rezeptor-Kombinationen konnten bisher identifiziert werden: Peptidoglykan (TLR2) (Dziarski et al. 2005), Doppelstrang-RNA (TLR3) (Alexopoulou et al. 2001), Lipopolysaccharid

(TLR4) (Hoshino et al. 1999), Flagellin (TLR5) (Hayashi et al. 2001), Einzelstrang-RNA (TLR7 und TLR8) (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004) und bakterielle DNA (TLR9) (Hemmi et al. 2000). TLR1 (Takeuchi et al. 2002) und TLR6 (Takeuchi et al. 2001) kooperieren jeweils mit TLR2 bei der Erkennung von Lipoproteinen. Dadurch erkennt TLR2 PAMPs unterschiedlicher Struktur und neben Peptidoglykan auch Hämagglutinin und Lipoteichonsäure (LTA) (Schroder et al. 2003; Kumar et al. 2009). Ein Ligand für TLR10 ist bisher nicht identifiziert worden (Guan et al. 2010). Die zelluläre Verteilung der TLR auf Zelloberfläche oder in Endo-, Lyso- und Endolysosomen entspricht dem Vorkommen ihrer PAMP-Liganden: TLR1, -2, -4, -5, -6 sind membranständig und erkennen mikrobielle Zellwandbestandteile; TLR3, -7, -8, -9 liegen in Endo-, Lyso-, Endolysosomen oder dem endoplasmatischen Retikulum und erkennen Nukleinsäuren infektiöser Krankheitserreger (Kawai et al. 2010).

Strukturell sind TLR Transmembranproteine; der extrazelluläre Teil enthält zur Antigenerkennung ein Wiederholungsmotif von 16 bis 28 Leucin-reichen Aminosäurefolgen (LRR) (Kobe et al. 2001). Die intrazelluläre Toll-/Interleukin-Rezeptor Domäne (TIR) enthält eine stark konservierte Region von etwa 200 Aminosäuren Länge und eine namensgebende 20-30%-Ähnlichkeit mit dem Interleukin-1 Rezeptor (Xu et al. 2000). Nach erfolgter Ligandenbindung aktiviert die TIR-Domäne die intrazelluläre Signaltransduktion (Wesche et al. 1997).

Genpolymorphismen von TLR können zu Funktionsstörungen des Immunsystems führen. Bei Individuen mit einer Mutation im TLR4 Gen konnte ein erhöhtes Risiko, an Sepsis mit Gram negativen Erregern zu erkranken, gezeigt werden (Agnese et al. 2002). Mutationen des TLR2 Gens sind mit erhöhtem Risiko für Sepsis mit Gram-positiven Erregern assoziiert (Abu-Maziad et al. 2010).

1.5.6 NOD like Rezeptoren (NLR)

NLR bilden eine Gruppe von über 20 strukturhomologen Proteinen, die zytosolische PAMP erkennen und eine Abwehrreaktion der Wirtszelle einleiten (Franchi et al. 2009). Zur Gruppe der NLR gehören NOD, NACHT-LRR-PYD-domains-containing protein (NALP), und weitere Proteine wie IPAF, Neuronale-Apoptose-Inhibitor Protein (NAIP), major histocompatibility complex class II transactivator (CIITA). Im Gegensatz zu den TLR ist die Mehrheit der NLR im Zytosol lokalisiert. NOD1 wird ubiquitär exprimiert, für NOD2 wurde die Expression in Makrophagen, Dendritischen Zellen und verschiedenen Epithelien gezeigt (Bertin et al. 1999; Franchi et al. 2009)

NOD Proteine bestehen aus drei Hauptkomponenten: C-terminal liegt die LRR-Domäne mit einer variablen Anzahl an leucin-haltigen Wiederholungsmotiven (LRR), welche bei der PAMP-Erkennung zur Protein-Protein-Interaktion dienen (Kobe et al. 2001). Die zentrale NOD-Domäne entspricht der bei unterschiedlichen Proteinen vorhandenen ATP binding cassette (ABC) und aktiviert die für die Signaltransduktion notwendige Oligomerisierung mit Bindungspartnern (Inohara et al. 2001). Die N-terminale Effektor-domäne ist strukturell variabel und ermöglicht so die Kopplung an unterschiedliche Signalwege (Inohara et al. 2005). Homophile Interaktionen finden unter Anderem mit der Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) (Hofmann et al. 1997) und der Pyrin-Domäne (PYD) (Bertin et al. 2000) der NOD1 und NOD2 Proteine statt. Zu den NOD-LRR Proteinen mit heterophiler Signaltransduktion gehören unter Anderen NAIP (Steimle et al. 1993), CIITA, deren N-terminale Effektor-domäne aus baculovirus-inhibitor-of-apoptosis repeats (BIR) besteht (Roy et al. 1995; Inohara et al. 2005).

Eine mögliche Assoziation zwischen NOD2 und M. Crohn wurde vermutet, nachdem bei an M. Crohn erkrankten Patienten Mutationen von NOD2 auf Chromosom 16 beschrieben wurden, die in der Region des M. Crohn Anfälligkeits-Genortes (susceptibility locus) IBD1 liegen. (Hugot et al. 2001).

1.5.7 Rezeptorprofil von HUVEC

Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen stellen eine wichtige immunologische Barriere dar. Zur Pathogendetektion verfügen sie über ein Profil von Rezeptoren, welche eine Immunantwort einleiten können.

Zur Expression von TLR2 auf HUVEC liegen unterschiedlich Ergebnisse vor. Mittels RT-PCR konnte von Hijjiya et al. in HUVEC kein Nachweis einer TLR2 Transkription erbracht werden (Hijjiya et al. 2002).

Talreja et al. allerdings zeigten die konstitutive Transkription von TLR2 mRNA in HUVEC durch RT-PCR. Auch eine konstitutive Proteinexpression konnte durch Immunfluoreszenz gezeigt werden (Talreja et al. 2004).

Die konstitutive Transkription von TLR3- und TLR4 mRNA in HUVEC wurde mittels RT-PCR beschrieben (Hijjiya et al. 2002; Talreja et al. 2004).

Die Expression von TLR5 auf Endothelzellen wurde mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht. Während Hijjiya et al. durch RT-PCR keinen Nachweis einer TLR5 Transkription erbringen konnten, konnte die konstitutive Transkription von TLR5 mRNA von Maaser et al. mittels RT-PCR gezeigt werden. Auch die Proteinexpression wurde durch Immunoblot und Immunfluoreszenz gezeigt (Hijjiya et al. 2002; Maaser et al. 2004).

Die Transkription und Proteinexpression von TLR9 ist in HUVEC durch RT-PCR, Immunoblot und Immunfluoreszenz gezeigt worden (El Kebir et al. 2009).

Die konstitutive Transkription von NOD1 in HUVEC wurde durch RT-PCR nachgewiesen (Opitz et al. 2005).

1.6. Signaltransduktion von PRR

Um auf Stimuli reagieren zu können, exprimieren Zellen Rezeptoren, die extra- oder intrazelluläre Reize aufnehmen und weiterleiten. Die Weiterleitung erfolgt über in der Regel mehrstufige Signalkaskaden, welche eine adäquate Abstufung und Regulation der zellulären Reaktion ermöglichen.

PRR unterschiedlicher Immunzellen nehmen PAMP wahr und leiten die bereits beschriebenen Vorgänge wie Translation von Zytokinen, Induktion des Zelltodes und intrazelluläre Eliminierung ein (Kawai et al. 2010; Deretic 2011).

1.6.1 TLR induzierte Signaltransduktion

TLR induzieren nach ihrer Aktivierung die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und interferon regulatory factor-3 (IRF-3) sowie den Signalweg der MAP Kinasen und leiten so die Translation von Entzündungsmediatoren und Typ I Interferon ein (Kawai et al. 2010).

Nach der Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung und Dimerisierung der TLR (Akira et al. 2006). Die intrazelluläre TIR Domäne der TLR dient zur homologen Interaktion mit verschiedenen Adaptermolekülen, die ebenfalls eine TIR Domäne enthalten. Es gibt vier Adaptermoleküle, die mit TLR interagieren: myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), TIR associated protein (TIRAP) / MyD88 adaptor like (MAL), TIR domain containing adaptor protein inducing IFN- β (TRIF) / TIR domain containing molecule 1 (TICAM1), und TRIF related adaptor molecule (TRAM). Die meisten TLR konvertieren ihr Signal über den zuerst beschriebenen Adapter MyD88 zu MAPK und NF- κ B (Wesche et al. 1997), bis auf TLR3 und TLR4, die über TRIF einen alternativen, noch nicht gänzlich beschriebenen Signalweg die Ziele IRF-3 und NF- κ B aktivieren. Die beiden anderen, TIRAP und TRAM, dienen zur Orientierung und Sortierung der TLR assoziierten Signaltransduktionsmodule (Kawai et al. 2010). TLR4 nimmt eine Sonderstellung ein, da dieser Rezeptor beide Signalwege aktiviert und dabei alle vier Adaptermoleküle nutzt.

Im MyD88 Signalweg rekrutiert MyD88 zunächst IL-1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), und anschliessend IRAK1 und IRAK2. IRAK4 ist für die Aktivierung von NF- κ B und MAPK unverzichtbar, wie die schlechte Abwehrfähigkeit von Individuen mit einer autosomal-rezessiven

IRAK4 Mutation gegenüber Infektion mit Gram positiven Bakterien zeigt (Picard et al. 2003). Anschliessend erfolgt die Aktivierung von TNFR associated factor 6 (TRAF), der die Polyubiquitinierung von IRAK1 vermittelt. Durch die Ubiquitinierung kommt es zur Bindung von TGF- β activated kinase 1 (TAK1) und der regulatorischen IKK γ – Untereinheit. TAK1 startet durch Phosphorylierung von IKK- β die Transkriptionsaktivität von NF- κ B. Ausserdem phosphoryliert TAK1 MAPKK, die via MAPK die Aktivierung von activator protein-1 (AP-1) und anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt (Kawai et al. 2010).

Im TRIF Signalweg versammelt TRIF ein Multiproteinmodul aus TRAF6 sowie tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein (TRADD), pellino1 und RIP1, welches Ubiquitin abhängig TAK1 aktiviert, das wiederum die Aktivierung von MAPK und NF- κ B ausführt (Kawai et al. 2010).

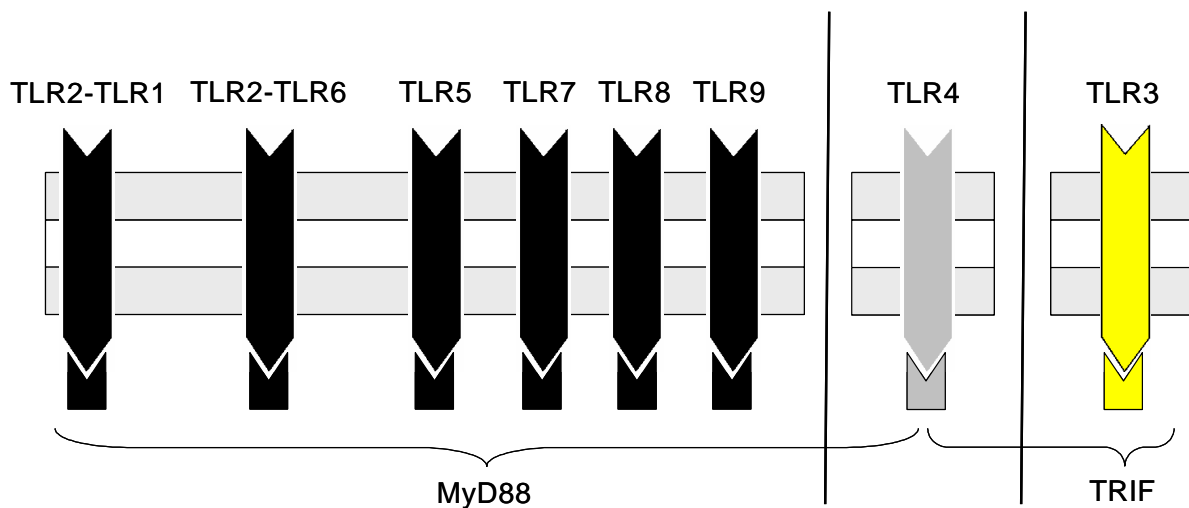


Abbildung 1.5.1 TLR Signale werden über die Adapterproteine MyD88 und TRIF vermittelt. Die Dimere TLR2-TLR1 und TLR2-TLR6, sowie TLR5, TLR7, TLR8 und TLR9 aktivieren nach Bindung eines Agonisten das Adapterprotein MyD88. TLR3 aktiviert nach Bindung eines Agonisten das Adapterprotein TRIF. Die Signaltransduktion von TLR4 wird sowohl von MyD88 als auch von TRIF vermittelt. Modifiziert nach Kawai et al 2010.

1.6.2 NLR induzierte Signaltransduktion

NLR haben unterschiedliche Effektor bindende Domänen (EBD), die homo- oder heterophile Interaktion mit einer Vielzahl von Bindungspartnern ermöglicht (Inohara et al. 2005). Die Bildung variabler Multiproteinkomplexe wird als Signalosom bezeichnet. Für NOD1 und NOD2 wurden intrazelluläre Signalwege mit dem Effektor NF- κ B und der Gruppe der Mitogen

Aktivierten Protein Kinasen (MAPK) beschrieben; diese NLR Module tragen die Bezeichnung NODosom (Ting et al. 2010).

Die C-terminale Ligandenbindung löst über eine Konformationsänderung die Oligomerisierung der NOD-Domäne des Rezeptors aus und vermittelt so die Rekrutierung des Bindungspartners an die N-terminale Region des Rezeptors, wo über eine CARD-Domäne die homophile Aktivierung erfolgt (Yang et al. 1998). Bindungspartner von NOD1 und NOD2 sind die Serin/Threonin Kinase RICK (receptor interacting protein like interacting caspase like apoptosis regulatory protein kinase) und Rezeptor Interagierendes Protein (RIP) (Thome et al. 1998; Inohara et al. 2005; Franchi et al. 2006).

RICK vermittelt die Aktivierung von NF- κ B über den I κ B Kinase Komplex (IKK) (Girardin et al. 2001). In RICK-defizienten Mäusen zeigten Makrophagen eine verminderte NF- κ B Aktivierung nach Infektion mit *L. monozytogenes* oder Stimulation mit LPS. *In vivo* konnte in RICK defizienten Mäusen durch LPS kein Endotoxinschock ausgelöst werden (Chin et al. 2002).

1.6.3 MAP Kinasen abhängige Signaltransduktion

MAPK sind eine Gruppe von Serin/Threonin Kinasen, die einen zentralen Signalweg zur Transkriptionsregulation bei der Antwort auf veränderte Umgebungsbedingungen der Zelle bilden. Sie beeinflussen unter Anderem die Abläufe in Zellproliferation, -differenzierung, Entzündung und Apoptose (Turjanski et al. 2007). Aktivatoren der MAPK Extracellular Signal Regulated Kinases (ERK), p38 und c-Jun N-terminal kinases (JNK) sind neben PAMP verschiedene Mitogene und Umweltstressoren (Davis 1993; Whitmarsh et al. 1996).

Die C-terminale Domäne der MAPK ist an der katalytischen Aktivität des Proteins beteiligt. An der Verbindungsstelle zur N-Terminalen Domäne liegt die Haupt-Katalyse-Region mit der ATP-Bindungsstelle. Spezielle „docking motif binding sites“ stellen die Bindungsstellen für upstream gelegene Regulatoren und downstream gelegene Signalziele dar und sind für die Substratspezifität verantwortlich (Turjanski et al. 2007).

Nach Ligandenbindung der TLR und NLR kommt es über TAK1 durch Phosphorylierung zur Aktivierung der MAPK ERK, JNK und p38 (Kawai et al. 2009). Dabei erfolgt die Feinregulierung jeder MAPK durch eine Tripel-Kinasenkette aus MAPK Kinase Kinase, MAPK Kinase und MAPK (Pearson et al. 2001). Zur vollständigen Aktivierung müssen MAPK zweifach phosphoryliert werden; die Monophosphorylierung führt zu einem intermediären Aktivitätszustand der Kinase (Zhou et al. 2002). Die Phosphorylierung der MAPK führt zu ihrer nukleären Translokation via Diffusion oder aktiven Transport (Adachi et al. 1999). MAPK

binden Transkriptionsfaktoren und regulieren deren Aktivität verstärkend oder reduzierend durch variable Phosphorylierung an unterschiedlichen Stellen (Turjanski et al. 2007).

1.6.4 NF- κ B abhängige Transkription

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B nimmt eine zentrale Funktion in der Regulation der angeborenen und der adaptiven Immunantwort ein, da er die Expression einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren kontrolliert. Die Aktivierung erfolgt durch Pathogendetektion, Stimulation durch Zytokine oder physikalische Stressoren. Die Familie der NF- κ B Proteine besteht aus fünf Mitgliedern: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 (NF- κ B1) und p105/p50 (NF- κ B2).

Alle fünf Proteine besitzen eine N-terminale Rel-homology-domain (RHD), die zur Homo- oder Heterodimerisierung und zur Bindung an die DNA dient. Zusätzlich verfügen P65, RelB und c-Rel über eine C-terminale Transkriptions Aktivierungs Domäne (TAD), die eine Aktivierung von Zielgenen erlaubt. Die Wirkung von p105/p50 und p100/p52 ist vermutlich supprimierend, bis eine Dimerisierung mit einem TAD-kompetenten NF- κ B Partner auftritt (Hayden et al. 2008). Die Expression von p100/p52 ist induzierbar, während p105/p50 konstitutiv exprimiert wird.

Im inaktiven Zustand liegen NF- κ B-Dimere als Komplex gebunden an ein I κ B-Molekül (α , β , oder ϵ) oder an die Vorläuferproteine p100 (p52) und p105 (p50) vor. Diese Dimere stehen in einem Fließgleichgewicht zwischen zytosolischer und nukleärer Lokalisation. Bei der klassischen („canonical“) Aktivierung von NF- κ B kommt es nach der IKK β abhängigen Phosphorylierung und Degradation von I κ B α zur Freisetzung von p65:p50 Heterodimeren und zur Verschiebung des Gleichgewichtes zu Gunsten der nukleären Lokalisation (Ghosh et al. 2002) (Hayden et al. 2008). Beim alternativen („noncanonical“) Weg phosphoryliert IKK α p100, das proteasomal zu p52 abgebaut wird. Dies führt nach der nukleären Translokation der p52 Homodimere zur Transkription anderer Zielgene als bei der klassischen Aktivierung (Hayden et al. 2008).

1.7. Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind phylogenetisch sehr alte Elemente des angeborenen Immunsystems und kommen in einer Vielfalt von Organismen wie Pflanzen, Insekten und Säugetieren vor. Im Menschen sind die wichtigsten AMP die Cathelicidine und die Defensine.

Anhand ihrer Struktur werden die Defensine einer α - und einer β -Gruppe zugeordnet, wobei die Position der Disulfidbrücken innerhalb der β -Faltblattstruktur des Peptides entscheidend ist.

Es sind sechs humane α -Defensine bekannt, welche in Neutrophilen und in Paneth-Zellen konstitutiv synthetisiert und in Vesikeln gespeichert werden. In Neutrophilen verschmelzen diese mit dem Phagosom eines phagozytierten Pathogens, während in Paneth-Zellen eine kontinuierliche Sekretion stattfindet (Menendez et al. 2007). β -Defensine sind in einer Vielzahl von Zellen entdeckt worden, darunter Epithelzellen und Leukozyten. Ihr Expressionsmuster ist individuell unterschiedlich und abhängig vom jeweiligen Gewebe. Eine Induktion kann durch Pathogenerkennung oder inflammatorische Mediatoren ausgelöst werden (Harder et al. 2001). α - und β -Defensine besitzen *in vivo* und *in vitro* eine breit gefächerte antimikrobielle Aktivität gegenüber Bakterien, Viren und Pilzen (Salzman et al. 2003). Neben ihrer antimikrobiellen Aktivität haben sowohl α -, als auch β -Defensine eine aktivierende Wirkung auf Chemotaxis, Wundheilung und Angiogenese (Selsted et al. 2005).

Humanes Beta-Defensin-3 besteht aus 25 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 5 kDa (Harder et al. 2001) und besitzt eine Ladung von +11 (Sahl et al. 2005). Drei Disulfidbrücken bilden die von β -Strängen geprägte Tertiärstruktur aus.

hBD-3 konnte auf unterschiedlichen Epithelien, unter anderem von Epidermis und Tonsillen nachgewiesen werden. Seine Expression ist variabel und konnte durch Entzündungsreize wie Stimulation mit TNF- α oder Infektion mit *P. aeruginosa* induziert werden. In der hBD-3 Promotorregion besteht eine NF- κ B Bindungsstelle, sowie Konsensussequenzen für Activator Protein 1 (AP-1). Die Abhängigkeit der hBD-3 Induktion von NF- κ B wird unterschiedlich bewertet (Harder et al. 2001; Albanesi et al. 2007; Kanda et al. 2010). Die antimikrobielle Aktivität von hBD-3 richtet sich neben Gram negativen und Gram positiven Bakterien auch gegen *Candida* (Harder et al. 2001), sowie gegen behüllte virale Krankheitserreger (Quinones-Mateu et al. 2003). Seine bakterizide Wirkung basiert vermutlich auf unterschiedlichen Mechanismen, die zur Perforation der Zellmembran führen, wobei die starke kationische Ladung des Peptides eine Schlüsselrolle spielt (Sahl et al. 2005).

In Psoriasis-Hautläsionen wurde hBD-3 in bis zu 30fach erhöhter Konzentration nachgewiesen (Harder et al. 2001). Auch bei Patienten mit bakterieller Keratitis und im Bronchialepithel von Patienten mit akuter infektiöser Pneumonie konnte im Vergleich zu gesunden Individuen ein erhöhtes Vorkommen von hBD-3 festgestellt werden (Ishimoto et al. 2006; Otri et al. 2012).

1.8. Aufgabenstellung

Das menschliche Immunsystem besteht aus zwei Hauptteilen, dem angeborenen und dem erworbenen System. Diese sind eng miteinander vernetzt, unterscheiden sich aber grundlegend in der Dynamik und der Spezifität der Abwehrreaktion. Während die erworbene Immunität mit hoher Spezifität und Verzögerung von einigen Tagen greift, erfolgt die angeborene Immunantwort sofort und beinhaltet breit gestreute antimikrobielle Effektorsysteme.

Die Detektion von Pathogenen hängt elementar von PAMP ab, die meist ein unverzichtbarer und nicht variierbarer Bestandteil des Stoffwechsels oder der Zellwand eines Mikroorganismus sind. Sie sind in einer großen Anzahl von Krankheitserregern vorhanden und bilden wegen ihrer geringen Variabilität ein zuverlässiges Merkmal zur Erkennung eines großen Erregerspektrums. Die Erkennung von PAMP wird von PRR vermittelt, einer Rezeptorengruppe, die unter anderen TLR, NLR und RLR umfasst, und die über verschiedene Kompartimente verteilt den extrazellulären Raum, wie auch das endosomale Lumen und das Zytosol überwacht (Medzhitov 2007).

Das angeborene Immunsystem besteht aus mehreren Modulen, zu denen neben z.B. dem zellulären Modul oder dem Komplementsystem die antimikrobiellen Peptide gehören. Antimikrobielle Peptide besitzen eine breite antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Pilze und Viren. Im Menschen sind neben den Cathelicidinen vor Allem die Defensine von Bedeutung (Selsted et al. 2005). HBD-3 besitzt eine ausgeprägte antimikrobielle Wirkung und ist bisher hauptsächlich in Epithelien untersucht worden (Moranta et al. 2010; Scharf et al. 2010). Das Ziel, AMP pharmakologisch nutzbar zu machen, hat dieses Feld zum Gegenstand intensiver Forschung gemacht. Da es sich um körpereigene Substanzen handelt, zeigen sie tendenziell eine geringe Toxizität. Angesichts zunehmender Resistenzentwicklung von Krankheitserregern ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe dringlich; dabei ist die niedrige Tendenz zur Resistenzbildung eine attraktive Eigenschaft von AMP (Zhang et al. 2010).

L. monocytogenes ist ein Gram positives, begeißeltes, fakultativ intrazelluläres Bakterium, das vor Allem über Rohmilchprodukte übertragen wird, und bei prädisponierten Individuen Listeriose verursachen kann. Die Inzidenz ist steigend und betrifft zunehmend über 60 Jährige, sowie Schwangere und immunkompromittierte Personen. Zu den Manifestationsformen der Listeriose gehören Meningitis, Sepsis und intrauterine Infektionen (Mook et al. 2011). Im Zuge der Invasion bildet die Überwindung der endothelialen Barriere einen entscheidenden Schritt, weshalb Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) ein geeignetes Modell darstellen.

Endotheliale Primärzellen verfügen zudem über Stoffwechsel und Rezeptoren, die der physiologischen Realität nahe kommen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Rolle von hBD-3 bei der Infektion von Endothelzellen mit *L. monozytogenes* zu untersuchen. Es soll untersucht werden, ob das Endothel bei Infektion mit *L. monozytogenes* als Immunreaktion hBD-3 exprimiert. Virulenzfaktoren, die für die hBD-3 Induktion entscheidend sind, sollen identifiziert werden. Ein weiteres Ziel ist die Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität von hBD-3 gegen *L. monozytogenes*, sowie die Untersuchung der Signalmoleküle, die an der hBD-3 Expression des Endothels beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1. HUVEC Kultivierung

2.1.1 HUVEC Isolation

Die zur Isolierung der HUVEC verwendeten Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin im Vivantes Humboldt-Klinikum Berlin zur Verfügung gestellt.

Die native Lagerung der Plazenten erfolgte für 1-3 Tage bei 4°C. Nach Abtrennung der Nabelschnüre wurden diese für ca. 1 Stunde zum Transport in Phosphate Buffered Saline (PBS) (-/-) gelagert. Die Isolation der HUVEC erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Jaffé et al. (Jaffe et al. 1987). Die Nabenschnurvene wurde mit 20 ml H/H (+/+) gespült und 20 Minuten mit 0,025% Kollagenase Typ II bei 37°C, 5% CO₂ behandelt. Durch Ausspülen und Massieren mit M199 wurden die Endothelzellen gewonnen und für 10 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Endothelzell-Basal-Medium resuspendiert und in T75 Flaschen überführt.

2.1.2 HUVEC Anzucht

Die Zellen wurden in T75 Flaschen in Wachstumsmedium (Endothel-Basal-Medium) kultiviert und im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ für 4-5 Tage gelagert. Die Experimente erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in 12 well Platten. Zum Splitten wurden die Zellen mit 10 ml PBS (-/-) gewaschen und für 2 Minuten im Brutschrank (s. oben) mit 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in Endothelzell-Basal-Medium aufgenommen und im neuen Gefäß verteilt. Alle eingesetzten Gefäße wurden vor der Verwendung für 30 Minuten bei 37°C mit 0,5 % Gelatine (sterilfiltriert) behandelt.

Tabelle 2.1 Zellkulturmedien, Pufferlösungen

| Kulturmedium | Zusammensetzung | Hersteller |
|----------------|---|--|
| Dulbecco's PBS | 1x, ohne Ca/Mg | PAA, Austria |
| Hank's BSS | 1x, mit Ca/Mg | PAA, Austria |
| M199 | 1x, 2,2 g/l NaHCO ₃ ohne L-Glu | Biochrom, Germany |
| Endothel Basal | 500 ml 10% ECGM 10% FCS (hitzeinaktiviert) 5 ml L-Glu (500 µl/ml) 1 ml Amphotericin B (0,5 µg/ml) | PAA, Austria Promocell, Germany PAA, Austria |

| | | |
|--------------------------------------|--|--|
| ECGM (Endothelzell Wachstums Medium) | 100 µl EGF (5 ng/ml) Penicillin/Streptomycin (1 mg/ml) 500 ml | Promocell, Germany |
| Gelatine | 0,5% | Sigma, MO, USA |
| Carbonatpuffer | 7,5% | PAA, Austria |
| ELISA Waschpuffer | PBS (-/-) 1x 0,05% Tween 20 | PAA, Austria Sigma, MO, USA |
| Tween 20 | | Sigma, MO, USA |
| ELISA Blockpuffer | PBS (-/-) 1x, 10% FCS | PAA, Austria PAA, Austria |
| FCS | Standard | PAA, Austria |
| RLT Puffer | Standard | Qiagen, Hilden, Germany |
| First Strand Buffer | 5x | Invitrogen, CA, USA |
| Red Taq Buffer | 10x | Sigma, MO, USA |
| TAE Puffer pH 8,0 | 4,84 g Tris Base 1,14 ml Eisessig 100% 2,5 ml EDTA 0,5 M Aqua tridest | Sigma, MO, USA Merck, Darmstadt, Germany Roth, Karlsruhe, Germany Fresenius, Bad Homburg, Germany |

Tabelle 2.2 Enzyme, Stimulantien, Inhibitoren

| Agens | Verwendungszweck | Hersteller |
|------------------------------------|-------------------------------|---|
| Kollagenase Typ II 0,025% | Ablösen HUVEC | Worthington, NJ, USA |
| Trypsin/EDTA | Ablösen HUVEC | Gibco, Paisley, UK |
| hBD-3, rekombinant | Time Kill Versuch | Cell Sciences, MA, USA |
| siRNA TLR2, NOD1, MyD88, Kontrolle | Rezeptor/Signalling Knockdown | Ambion, Huntington, UK |
| M-MLV 200 U/µl | PCR | Invitrogen, CA, USA |
| Red Taq Polymerase 1 U/µl | PCR | Sigma, MO, USA |
| Ethidiumbromid | Gelelektrophorese | Invitrogen, CA, USA |
| IKK NBD | NF-κB Hemmung | Merck, Nottingham, UK |
| PDTC | NF-κB Hemmung | Merck, Nottingham, UK |
| UO 126 | MEK1/2 Hemmung | Merck, Nottingham, UK |
| SB 202190 | p38 Hemmung | Merck, Nottingham, UK |
| MALP 2 | Stimulation TLR2 | Enzo Life, Lörrach, Germany |
| Pam3Cys | Stimulation TLR2 | Adipogen, Liestal, Schweiz |
| PolyIC | Stimulation TLR3 | Invivogen, CA, USA |
| Flagellin | Stimulation TLR5 | Enzo Life, Lörrach, Germany |
| RNAsin 40 U/µl | PCR | Promega, WI, USA |
| Listeriolysin O | Stimulation HUVEC | Labor Mikrobiologie, Universität Gießen |

2.2. Bakterien

2.2.1 Bakterienkultur

Die verwendeten Bakterienstämme wurden freundlicherweise von Prof. Dr. T Chakraborty (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen) zur Verfügung gestellt. Es wurden die folgenden Stämme bzw. Deletionsmutanten (d/ Δ) eingesetzt:

Tabelle 2.3 Bakterienstämme und Deletionsmutanten

| Stamm | Serotyp | Genotyp | Abkürzung |
|-------------------------|---------|---------|-----------------|
| <i>L. monozytogenes</i> | | | |
| EGD | 1/2a | Wildtyp | EGD |
| EGD Δ InlB | 1/2a | inlB | Δ InlB |
| EGD Δ InlA/B | 1/2a | inlA/B | Δ InlA/B |

Die Bakterienanzucht erfolgte in flüssigem Brain Heart Infusion (BHI) Medium. In einer Übernachtkultur wurden die Bakterien bei 37°C, 5% CO₂ unter Schütteln (150 rpm) angezogen und am nächsten Tag mit einer Verdünnung von 1:20 in eine frische BHI-Kultur überführt. Diese Bakterienkultur wurde bis zur mittlogarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,8-1,0) inkubiert. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer bestimmt. Durch Kontrollen auf BHI-Agarplatten wurde gezeigt, dass eine optische Dichte von 1,0 einer Bakterienkonzentration von 10⁹ Zellen pro ml entspricht. Bei Erreichen der mittlogarithmischen Wachstumsphase wurde die Kultur bei 3400 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und mit PBS (-/-) zum Waschen resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in dem für den Versuchsaufbau gewünschten Zellkulturmedium resuspendiert und entsprechend verdünnt.

2.2.2 Inaktivierung von *L. monozytogenes*

Sofern nicht anderes angegeben, erfolgte die Lagerung der inaktivierten Bakteriensuspensionen bei -20°C.

Hitzeinaktivierung:

Die Bakterien wurden auf eine Konzentration von 10⁷ pro ml verdünnt und aliquotiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 95°C für 1 Stunde.

Inaktivierung durch Proteinase K:

Nach Zentrifugieren der Bakterien bei 3400 rpm für 10 Minuten wurde das Pellet zunächst 1 Stunde in sterilem Aqua und anschließend für 1 Stunde entsprechend den Angaben des Herstellers zur Entfernung von Proteinstrukturen mit 200µg/ml Proteinase K resuspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Inaktivierung durch Wasserstoffperoxid:

Nach Zentrifugieren der Bakterien bei 3400 rpm für 10 Minuten wurde das Pellet in Wasserstoffperoxid resuspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Inaktivierung durch ultraviolettes Licht:

Die aliquotierten Bakterien wurden in Endothelzellmedium für 1 Stunde mit ultraviolettem Licht beleuchtet, wobei das Gefäß alle 10 Minuten gewendet wurde.

Inaktivierung durch Ethanol:

Nach Zentrifugieren der Bakterien bei 3400 rpm für 10 Minuten wurde das Pellet in Ethanol resuspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Inaktivierung durch Formalin:

Nach Zentrifugieren der Bakterien bei 3400 rpm für 10 Minuten wurde das Pellet in Formalin resuspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Inaktivierung durch Lipase:

Nach Zentrifugieren der Bakterien bei 3400 rpm für 10 Minuten wurde das Pellet in PBS (-/-) resuspendiert auf 10^7 Zellen pro ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100 µl aliquotiert und bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit 50U humaner Pankreaslipase inkubiert.

Tabelle 2.4 Inaktivierungsmedien

| Inaktivierungsmedium | Zusammensetzung | Hersteller |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------|
| Proteinase K | 200µg/ml | Merck, Darmstadt, Germany |
| H ₂ O ₂ | 30% | Otto Fischar, Saarbrücken |
| Ethanol | 96% | J.T.Baker, NJ, USA |
| Formalin | 37% | Sigma, MO, USA |
| Pankreaslipase, human | 50 U | Lee Biosolutions, MO, USA |

2.2.3 Präparation der bakteriellen DNA

EGD wurden aus einer flüssigen BHI-Übernachtskultur in frisches BHI Medium überführt und unter Schütteln bei ca. 200 rpm, 37°C, 5 % CO₂ bis zu einer optischen Dichte von 0,8 (600 nm) inkubiert. Nach Zentrifugation und Waschen mit PBS wurde die bakterielle DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit® nach den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt. Die gewonnene bakterielle DNA wurde mittels Lipofektion in die Zellen eingebracht.

2.2.4 Infektion

Zur Infektion wurde das die Bakterien in der gewünschten Konzentration enthaltende Zellkulturmedium in einer Menge von 500µl je well auf die 12 well Zellkulturplatten verteilt. Die infizierten Zellkulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei Infektionsversuchen mit einer Dauer von 24 Stunden oder länger wurde dem Zellkulturmedium 5 % Fetal Calf Serum (FCS) zugefügt.

2.2.5 Inkubationsversuch

Die antimikrobielle Aktivität von hBD-3 gegen *L. monocytogenes* wurde in einem Inkubationsversuch gezeigt.

Listerien in ihrer mittlogarithmischen Wachstumsphase wurden nach Zentrifugation bei 3400 rpm für 10 Minuten in PBS (-/-) resuspendiert und auf 10⁷ pro ml verdünnt. Nach Zufügen von hBD-3 bzw. Penicillin (1 µg/ml) wurde die Suspension unter Schütteln bei 37°C, 5% CO₂ für 0, 30, 60, 120 Minuten inkubiert. Die Proben wurden nach Verstreichen der jeweiligen Inkubationszeit mit PBS (-/-) auf 10² pro ml verdünnt und auf BHI-Platten ausgestrichen. Diese wurden anschließend bei 37°C, 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert und ausgezählt.

2.3. Lipofektion

Die verwendete siRNA wurde in einer Menge von 70,5 ng pro Ansatz eingesetzt. Hierzu wurde sie in Endothelzell-Basal-Medium ohne Zusätze verdünnt und mit 6 µl Transfektionsreagenz pro Ansatz versetzt. Die Zellen wurden entsprechend dem Experimentenaufbau auf 12 well Platten gesplittet. Im direkten Anschluss an das Splitten wurde den einzelnen wells die siRNA zugesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die HUVEC im Anschluss an die Transfektion für 72 Stunden kultiviert. Das Medium wurde alle 24 Stunden erneuert. Die letzten 24 Stunden vor Stimulation wurden die Zellen mit reinem Endothelzell-Basal-Medium mit 5% FCS behandelt.

Tabelle 2.5 RNA Interferenz Sequenzen

Alle Sequenzen wurden von AMBION/LIFE TECHNOLOGY, Darmstadt, Germany bezogen.

| Genprodukt | Eingesetzte Sequenz |
|------------------------------|--|
| Kontroll-non-silencing-siRNA | sense: 5' UUCUCCGAACGUGUCACGUTT antisense: 5' ACGUGACACGUUCGGAGAATT |
| NOD1-siRNA | sense: 5' GGGUGAGACCAUCUUCAUCTT antisense: 5' GAUGAAGAUGGUCUCACCCTG |
| TLR2-siRNA | sense: 5' GACUUAUCCUAUAAUUACUT antisense: 5' AGUAAUUUAUAGGAUAAGUCTA |
| MyD88-siRNA | sense: 5' GGAGGAUUGCCAAAAGUAUTT antisense: 5' AUACUUUUGGCAAUCCUCCTC |

2.4. Probenanalyse

2.4.1 Humanes Interleukin-8 ELISA

Die IL-8 Proteinbestimmung in den Überständen der stimulierten Zellkulturen wurde mittels Sandwich-ELISA durchgeführt (OptEIA™, BD, NJ, USA).

MaxiSorp™-ELISA-Platten wurden am Vortag mit 100 µl verdünntem IL-8 Antikörper (1:250 mit Carbonatpuffer) beschichtet und bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer die einstündige Inkubation mit 100 µl Blockpuffer. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 100 µl der verdünnten Proben (1:500 mit Blockpuffer) bzw. einer IL-8 Standardreihe aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde zur Detektion mit 100 µl einer gemischten Lösung aus verdünntem IL-8 Antikörper und verdünntem streptavidin-horseradish-peroxidase-Konjugat (Beide 1:250 mit Blockpuffer) bei Raumtemperatur im Dunkeln für 1 Stunde inkubiert. Nach siebenmaligem Waschen wurden 100 µl Substratlösung (OptEIA™, BD, NJ, USA) hinzugefügt und im Dunkeln für 20 Minuten inkubiert, bevor die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 2N Schwefelsäure abgestoppt wurde.

Die jeweilige Extinktion wurde bei 450 nm gemessen und zur Quantifizierung der IL-8 Konzentrationen eine Standardkurve gebildet.

2.4.2 Humanes beta-Defensin-3 ELISA

Die Messung der hBD-3 Proteinkonzentration in den unverdünnten Überständen der HUVEC Zellkulturen erfolgte mit spezifischem ELISA (Phoenix Pharmaceuticals) nach den Angaben des Herstellers.

2.4.3 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

Die mRNA Expression der IL-8 bzw. hBD-3 Gene in den stimulierten HUVEC wurde mittels RT-PCR und Gelelektrophorese analysiert.

mRNA Gewinnung und Konzentrationsbestimmung:

Die HUVEC wurden mit 175 µl RLT Puffer lysiert und mechanisch mit einem Kratzer abgelöst. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der mRNA mit dem Rneasy Mini Kit® entsprechend den Angaben des Herstellers.

Die Reinheit bzw. Proteinverunreinigung der mRNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm Wellenlänge und Bestimmung des OD_{260}/OD_{280} Quotienten bestimmt. Die Lagerung der mRNA Proben erfolgte bei -80°C .

Reverse Transkription:

1 µg RNA wurde in 10 µl Aqua tridest gelöst und mit je 1 µl Hexamer Primer (10 ng/ml) und Desoxynukleotid-Lösung (10mM) in einem ersten Inkubationsschritt bei 65°C für 5 Minuten erhitzt. Nach Abkühlen auf 37°C wurden unter Kühlung auf Eis 8 µl eines RT-PCR Master Mix (4 µl 5x first strand buffer, 2 µl Dithiothreitol, 1 µl RNAsin,) hinzugefügt. Nach Inkubation bei 37°C für 2 Minuten wurde 1 µl Moloney - Murine Leukaemia Virus (M-MLV) Reverse Transkriptase hinzugesetzt. Im nächsten Inkubationsschritt wurden die Proben für 50 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend zum Beenden der reversen Transkription für 15 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Proben wurden mit 80 µl Aqua tridest verdünnt und bei -20°C gelagert.

Polymerase Kettenreaktion:

5 µl cDNA wurden mit 20 µl PCR Master Mix (15,5 µl Aqua tridest, 2,5 µl RedTaq Puffer, 0,5 µl Desoxynukleotid-Lösung (10mM), 0,25 µl Primerlösung „forward“, 0,25 µl Primerlösung „reverse“ (je 6,25 ng/ml), 1 µl RedTaq) gemischt.

Nach Denaturierung bei 94°C für 3 Minuten erfolgte bei primerspezifischer Temperatur 1 Minute Hybridisierung, gefolgt von 1 Minute Elongation bei 72°C , nach erreichter Zykluszahl die Extension bei 72°C für 5 Minuten und Abkühlung auf 4°C .

Tabelle 2.6 Primer PCR Sequenzen

Alle Primer wurden von MOLBIOL, Berlin, Germany bezogen.

| Gen | Sequenz |
|-------|--|
| hBD-3 | sense: 5' TCCCAGAACTAACACACCCTT antisense 5' TTGCCTTGTCAAGAGTCCGA |
| IL-8 | sense: 5' CTAGGACAAGAGCCAGGAAGA antisense: 5' AACCCCTCTGCACCCAGTTTTTC |
| GAPDH | sense: 5' CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA antisense: 5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC |

Gelelektrophorese:

Die Produkte der PCR wurden in einem 1,5 % Agarosegel (TAE Puffer) unter einer Spannung von 120 mV aufgetrennt. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde in der flüssigen Agarose als interkalierendes Agens Ethidiumbromid gelöst. Die Auswertung erfolgte unter ultravioletter Beleuchtung und Fotodokumentation. Als Kontrolle wurde aus denselben Proben die mRNA Expression des „housekeeping gene“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase analysiert.

Tabelle 2.7 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

| Verbrauchsmaterial | Verwendungszweck | Hersteller |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| T 75 Zellkulturflasche | Zellkultur | BD Falcon®, NJ, USA |
| 12 well Zellkulturplatte | Zellkultur | BD Falcon®, NJ, USA |
| QIAamp DNA Mini Kit | DNA Reinigung | Qiagen, Hilden, Germany |
| MaxiSorp 96 ELISA Platte | IL-8 ELISA | Thermo Fisher, MA, USA |
| OptEIA™ IL-8 ELISA Kit | Proteinmessung | BD, CA, USA |
| hBD-3 ELISA Kit | Proteinmessung | Phoenix, CA, USA |
| Cell Scraper | Ablösen/Lyse HUVEC | Sarstedt, NC, USA |
| RNeasy Mini Kit™ | RNA Gewinnung | Qiagen, Hilden, Germany |
| Hexamer Primer | Random Primer PCR | Roche, Mannheim, Germany |
| dNTP | PCR | Promega, WI, USA |
| Aqua tridest | PCR | Fresenius, Bad Homburg, Germany |
| Dithiotreitol | PCR | Invitrogen, CA, USA |
| Thermowell™ Tubes 0,5 ml | PCR | Capitol, TX, USA |
| Quarzglasküvetten | Nukleinsäure Photometrie | Hellma, Müllheim, Germany |
| Agarose | Gelelektrophorese | Promega, WI, USA |
| PTC-200 | PCR Cycler | MJ Research, Quebec, Canada |
| Mastercycler Personal | PCR Cycler | Eppendorf, Hamburg, Germany |

2.5. Statistische Analyse

Alle abgebildeten Versuche wurden mehrfach und unabhängig voneinander durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit der Software Graph Pad Prism 5.0 mittels "One Way ANOVA". Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% (*), bzw unter 1% (**) als signifikant betrachtet.

Die PCR Abbildungen zeigen repräsentative Einzelergebnisse von mindestens dreifach unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit gleichem Ergebnis.

3. Ergebnisse

3.1. hBD-3 besitzt antimikrobielle Aktivität gegen *L. monozytogenes*

Die antimikrobielle Wirkung von hBD-3 gegenüber *L. monozytogenes* wurde untersucht, indem Wildtyp *L. monozytogenes* (EGD) zum einen mit Penicillin und zum anderen mit rekombinantem hBD-3 inkubiert wurden. Nach Ausstreichen und 24 Stunden Inkubation war die Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU) der mit hBD-3, sowie der mit Penicillin behandelten Proben signifikant geringer als die der unbehandelten Proben (Abb. 3.1.1). Die antimikrobielle Wirkung von hBD-3 in diesem Versuch war ähnlich stark wie die von Penicillin in gleicher Dosis. Die Reduktion der CFU durch Inkubation mit hBD-3 war zeitabhängig. Dieses Ergebnis zeigt, dass hBD-3 eine antimikrobielle Wirkung gegenüber *L. monozytogenes* besitzt.

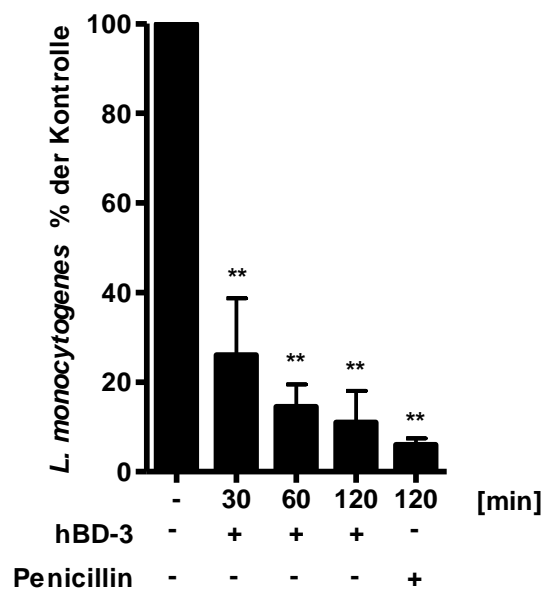


Abbildung 3.1.1 hBD-3 zeigt signifikante antimikrobielle Aktivität gegen *L. monozytogenes*. *L. monozytogenes* wurden für unterschiedliche Zeitintervalle in getrennten Ansätzen mit 1 µg/ml hBD-3 bzw. Penicillin inkubiert und auf BHI-Medium ausgestrichen. Nach 24 h Inkubation wurde die Anzahl der CFU ausgezählt. Die Überlebensrate in Prozent (% der Kontrolle) wurde als (CFU*100)/CFU Kontrolle erfasst.

3.2. *L. monozytogenes* induziert die Expression von hBD-3 in HUVEC

Um zu untersuchen, ob die Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* zur Induktion von hBD-3 führt, wurden Infektionsversuche durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Transkription von hBD-3 mRNA untersucht. Die Infektion von HUVEC mit Wildtyp *L. monozytogenes* erfolgte in Multiples of Infection (MOI) 5; nach Inkubationszeiten von 1, 2, 4 und 6 Stunden

wurden die infizierten HUVEC lysiert und mit RT-PCR der Gehalt an hBD-3 mRNA untersucht. Als Kontrolle für die erfolgreiche Infektion der HUVEC diente die mRNA Bestimmung von Interleukin-8 (IL-8).

In den mit *L. monozytogenes* infizierten HUVEC zeigte sich im Vergleich zu den nicht infizierten HUVEC nach 4 Stunden eine erhöhte Transkription von hBD-3 mRNA. Die mRNA Transkription von IL-8 folgte diesem Muster und bestätigte die erfolgreiche Infektion (Abb. 3.2.1 A).

Die Induktion von hBD-3 wurde in einem weiteren Versuch durch einen spezifischen Proteinnachweis untersucht. Nach Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* in MOI 5 wurden die Überstände des Zellkulturmediums auf die Proteinkonzentration von hBD-3 hin untersucht. Es erfolgte eine Analyse der Konzentration von hBD-3 nach 4, 8 und 24 Stunden mit einem spezifischen Enzym-gekoppelten Immunoassay (ELISA). Diese zeigte einen signifikanten Anstieg der hBD-3 Proteinkonzentration in den Überständen der mit EGD stimulierten HUVEC nach 8 bzw. 24 Stunden, während in den unstimulierten Proben kein Proteinnachweis gelang (Abb. 3.2.1 B).

Zusammengefasst zeigen diese Versuche, dass HUVEC konstitutiv in geringem Maße hBD-3 exprimieren und auf eine *in vitro* Infektion mit *L. monozytogenes* mit der gesteigerten Transkription von hBD-3 reagieren.

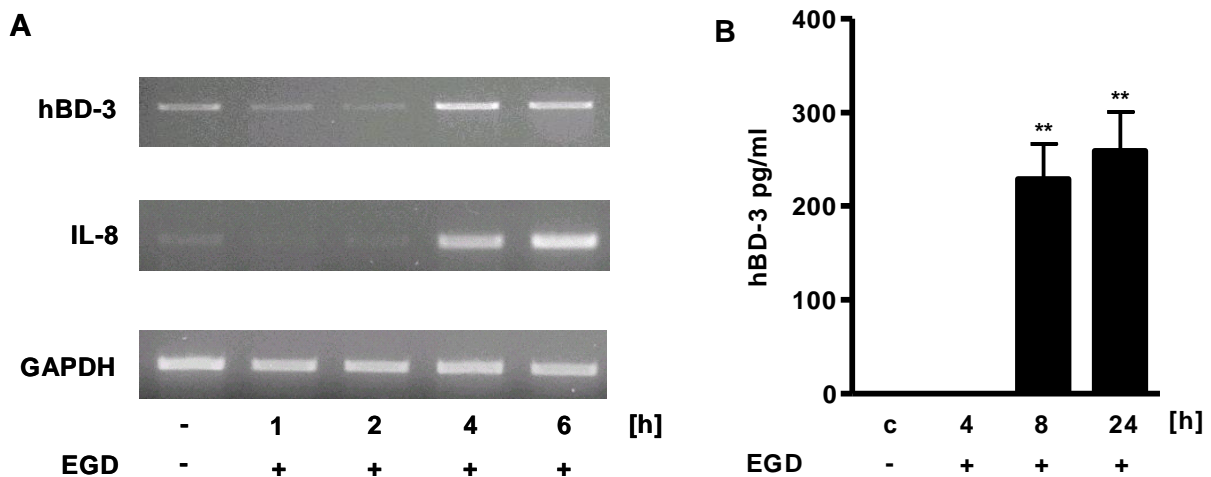


Abbildung 3.2.1 *L. monozytogenes* induziert in HUVEC hBD-3. HUVEC Kulturen wurden mit EGD in MOI 5 infiziert. (A) HUVEC wurden nach 1, 2, 4, 6 h lysiert und ein mRNA Nachweis von hBD-3 und IL-8 mit RT-PCR durchgeführt. IL-8 wurde als Kontrolle der erfolgreichen Infektion eingesetzt. (hBD-3: 28 Zyklen, IL-8: 22 Zyklen). (B) Spezifischer hBD-3 Proteinnachweis: Nach 4, 8, 24 h wurden die Überstände aus den HUVEC-Kulturschalen abgenommen. Der Proteingehalt wurde mittels ELISA analysiert.

3.3. *L. monocytogenes* induziert in HUVEC hBD-3 über einen Internalin-unabhängigen Pathogenitätsfaktor ohne Beteiligung von TLR

Um zu untersuchen, welche Pathogenitätsfaktoren von *L. monocytogenes* bei der Induktion von hBD-3 in HUVEC beteiligt sind, wurden die Zellen einem unterschiedlichen Spektrum von Pathogenitätsfaktoren ausgesetzt und die jeweils induzierte hBD-3 Proteinkonzentration gemessen.

In einem ersten Versuchsaufbau wurde HUVEC zunächst in verschiedenen Ansätzen mit jeweils verschiedenen Listerien-Mutanten infiziert. In weiteren Versuchen wurde eine Infektion mit Wildtyp *L. monocytogenes* durchgeführt, welche vorher durch verschiedene Verfahren deaktiviert wurden. Außerdem wurden HUVEC mit rekombinanten Pathogenitätsfaktoren und Wildtyp *L. monocytogenes* DNA stimuliert. Der Erfolg der Infektion wurde durch einen spezifischen IL-8 Nachweis in den Überständen der jeweiligen Zellkulturen überprüft.

Zunächst wurden HUVEC in getrennten Ansätzen mit *L. monocytogenes* Wildtyp und Mutanten mit Defizienz von Internalin A, sowie von Internalin A und B, jeweils mit MOI 5 infiziert. Nach 24stündiger Infektion wurde mit hBD-3 spezifischem ELISA in den Zellkulturüberständen die Proteinkonzentration gemessen.

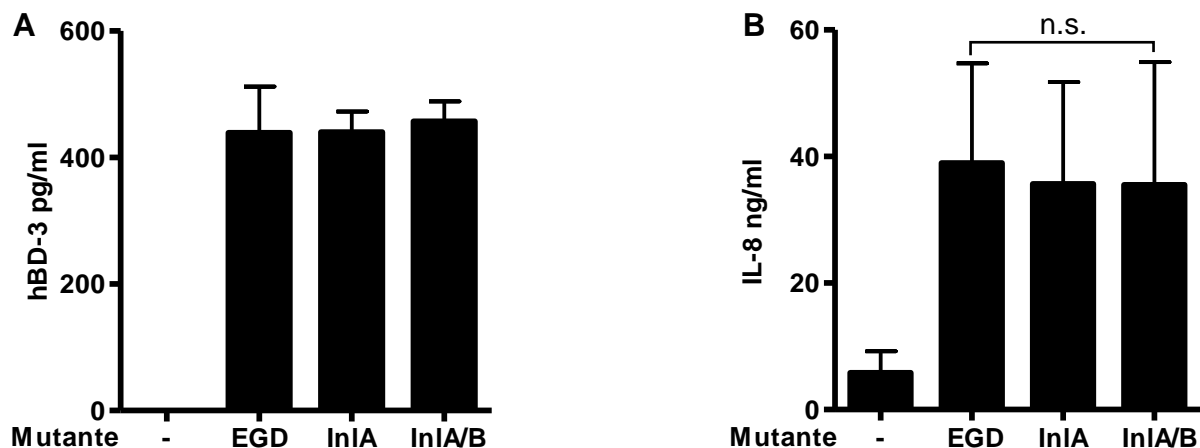


Abbildung 3.3.1 Internalin A und B defiziente *L. monocytogenes* induzieren in HUVEC hBD-3. HUVEC wurden jeweils mit Wildtyp *L. monocytogenes* und Deletionsmutanten für Internalin A (InIA), Internalin A und B (InIA/B) infiziert. Alle Mutanten wurden mit MOI 5 eingesetzt. Nach 24 h erfolgte in den Überständen der Zellkulturen mittels ELISA der Proteinnachweis von hBD-3 und IL-8. (A) Keine signifikant reduzierte Induktion von hBD-3 durch die o.g. Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp. (B) Keine signifikant reduzierte Induktion von IL-8 durch die o.g. Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Es zeigte sich eine deutliche hBD-3 Induktion durch den Wildtyp, sowie die Internalin A-, und die Internalin A und B defiziente Mutante ohne signifikanten Unterschied. (Abb. 3.3.1 A).

Der IL-8 Proteinnachweis mittels spezifischem ELISA in den Überständen der jeweiligen Zellkulturen zeigte ebenfalls eine deutliche Induktion nach Infektion mit *L. monozytogenes*, ohne signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp, Internalin A-, und Internalin A und B Mutanten (Abb. 3.3.1 B).

Um den Pathogenitätsfaktor von *L. monozytogenes*, welcher an der hBD-3-Induktion beteiligt ist, zu charakterisieren, wurden Kulturen von Wildtyp *L. monozytogenes* in getrennten Ansätzen mit unterschiedlichen Verfahren behandelt bzw. inaktiviert bevor sie den HUVEC Kulturen zugesetzt wurden. Beim jeweiligen Infektionsversuch wurden der HUVEC Kultur entsprechend vorbehandelte *L. monozytogenes* und als Positivkontrolle vitale Wildtyp *L. monozytogenes* zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Proteinkonzentration von hBD-3 und IL-8 in den Überständen des Zellkulturmediums durch spezifischen ELISA untersucht.

Dabei zeigte sich, dass außer dem Wildtyp nur die mit Pankreaslipase vorinkubierten Bakterien hBD-3 induzierten. Bakterien, die mit Hitze, Proteinase K, Wasserstoffperoxid, ultraviolettem Licht, Ethanol oder Formaldehyd behandelt wurden, induzierten kein hBD-3 (Abb. 3.3.2 A).

Der IL-8 Proteinnachweis in den Überständen der betreffenden Zellkulturen ergab eine IL-8 Induktion nur durch den Wildtyp und die mit Pankreaslipase vorbehandelten *L. monozytogenes* (Abb. 3.3.2 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der für die hBD-3 Induktion entscheidende Pathogenitätsfaktor von *L. monozytogenes* thermolabil ist, und seine Funktionsfähigkeit nach allgemeiner Lyse des Bakteriums durch Ethanol verliert. Weiterhin kann er durch Oxidierung deaktiviert werden, wie der Versuch mit Wasserstoffperoxid zeigt. Die ausbleibende Induktion von hBD-3 nach Exposition der Bakterien gegenüber ultraviolettem Licht zeigt, dass der verantwortliche Pathogenitätsfaktor nach Deaktivierung des bakteriellen Stoffwechsels seine Aktivität einbüßt. Die fehlende Induktion nach Inkubation der Bakterien mit Formaldehyd könnte durch die Protein-denaturierende Eigenschaft von Formaldehyd entstehen.

Die Fähigkeit von *L. monozytogenes*, hBD-3 zu induzieren blieb nach Inkubation mit humaner Pankreas Lipase intakt. Dies lässt vermuten, dass Lipidanteile für die Funktion des Proteins nicht essentiell sind.

Insbesondere die Hitzelabilität, sowie die ausbleibende Induktion der hBD-3 Induktion nach Proteinase Inkubation deuten darauf hin, dass die verantwortliche Struktur ein Protein sein könnte.

Die Induktion von IL-8 in diesen Versuchen zeigt ein analog verlaufendes Muster, was die Versuche mit hBD-3 bestätigt.

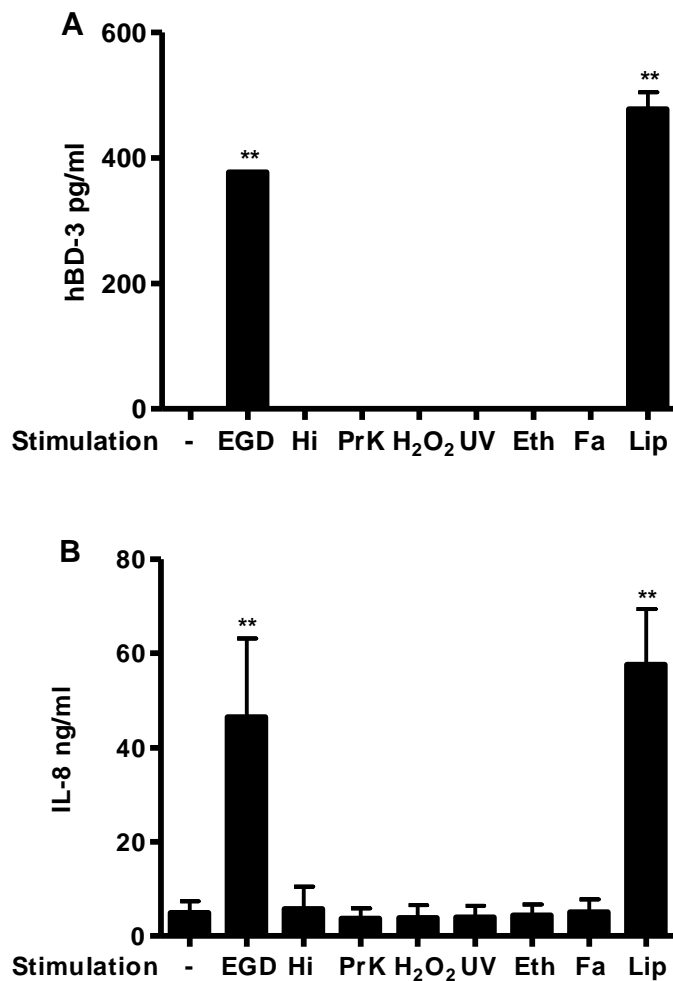


Abbildung 3.3.2 Lipase inkubierte, aber nicht inaktivierte *L. monocytogenes* induzieren in HUVEC hBD-3 und IL-8. EGD wurden vor Inkubation mit HUVEC mit folgenden Verfahren behandelt: Hitzeinaktivierung (Hi), Proteinase K (PrK), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV), Ethanol (Eth), Formaldehyd (Fa), humane Pankreas Lipase (Lip). Die Bakterien wurden in MOI 5 zur Infektion von HUVEC eingesetzt. Nach 24 h erfolgte mittels spezifischem ELISA die Analyse der Konzentration von (A) hBD-3 und (B) IL-8 in den Überständen.

(A) Wildtyp *L. monocytogenes* und mit Lipase inkubierter Wildtyp induzierten hBD-3. Die mit Hitze, Proteinase K, Wasserstoffperoxid, UV Licht, Ethanol und Formaldehyd behandelten Listerien induzierten kein hBD-3.

(B) Wildtyp *L. monocytogenes* und mit Lipase inkubierter Wildtyp induzierten IL-8. Die mit Hitze, Proteinase K, Wasserstoffperoxid, UV Licht, Ethanol und Formaldehyd behandelten Listerien induzierten signifikant weniger IL-8.

Die Bedeutung von Listeriolysin O für die Induktion von hBD-3 wurde untersucht, indem HUVEC mit rekombinantem Listeriolysin O in einer Konzentration von 500 ng/μl stimuliert wurden. Nach Zugabe von Listeriolysin O in das Zellkulturmedium wurden die Zellkulturen 24

Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde mit einem spezifischen ELISA die Konzentration von hBD-3 in den Überständen der Zellkulturen gemessen.

Nach Stimulation mit Listeriolysin O wurde im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben keine erhöhte Konzentration von hBD-3 gefunden, während Wildtyp *L. monocytogenes* eine deutliche Induktion von hBD-3 auslösten (Abb. 3.3.3 A).

Es erfolgte der Nachweis der IL-8 Proteinkonzentration in den Überständen der jeweiligen Proben mittels spezifischem ELISA (Abb. 3.3.3 B). Die Stimulation mit Listeriolysin O löste keine signifikante Induktion von IL-8 aus, während Wildtyp *L. monocytogenes* eine deutliche IL-8 Antwort induzierte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass extrazelluläres Listeriolysin O für HUVEC keinen Stimulus zur Expression von hBD-3, oder von IL-8 darstellt.

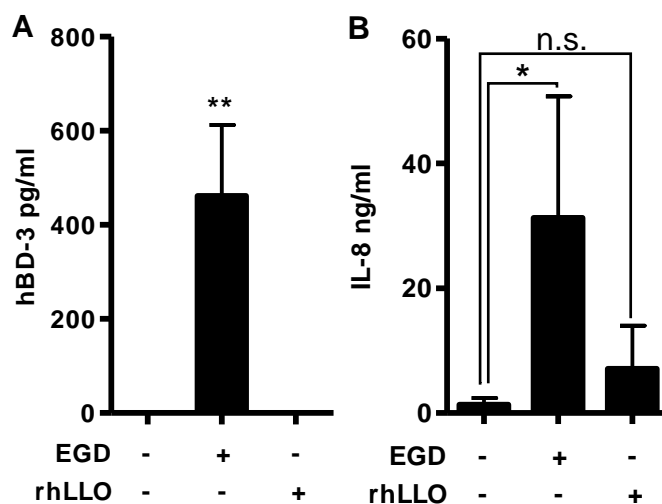


Abbildung 3.3.3 Rekombinantes extrazelluläres Listeriolysin O stimuliert in HUVEC kein hBD-3 oder IL-8. HUVEC wurden mit rekombinantem Listeriolysin O in einer Konzentration von 500 ng/µl stimuliert. Positivkontrolle durch Infektion mit EGD in MOI 5. Nach 24 h erfolgte in den Überständen der Zellkulturen mittels spezifischem ELISA der Proteinnachweis von hBD-3 und IL-8. (A) Induktion von hBD-3 durch Wildtyp *L. monocytogenes*. Keine Induktion von hBD-3 durch rekombinantes Listeriolysin O. (B) Induktion von IL-8 durch Wildtyp *L. monocytogenes*. Keine Induktion von IL-8 durch rekombinantes Listeriolysin O.

Um zu überprüfen, ob intrazelluläre Listerien-DNA ein Signal für die Induktion von hBD-3 darstellt, wurde aus Wildtyp *L. monocytogenes* Kulturen DNA isoliert und in einem Stimulationsversuch in HUVEC transfiziert.

Die gewonnene bakterielle DNA wurde in einer Konzentration von 1 µg/µl durch Lipofektion in die Zellen eingebracht. Es folgte eine 48 stündige Inkubation. Als Kontrolle wurde unspezifische Kontroll siRNA eingesetzt, beziehungsweise Zellen ohne Transfektion belassen. Als Positivkontrolle wurde in nicht transfizierten HUVEC eine Infektion mit vitalen Wildtyp *L. monocytogenes* durchgeführt.

In den Zellkulturüberständen der mit Listerien-DNA transfizierten Proben wurde keine erhöhte Konzentration von hBD-3 gemessen (Abb. 3.3.4 A). Dies zeigt, dass die Anwesenheit von

Listerien-DNA im zytosolischen Raum keinen Stimulus für die Expression von hBD-3 in HUVEC darstellt.

Der IL-8 Proteinnachweis in den Überständen der HUVEC zeigte eine deutliche Induktion von IL-8 nach Transfektion von Listerien-DNA (Abb 3.3.4 B). Bei starker Induktion von IL-8 auch nach Transfektion von unspezifischer Kontroll siRNA kann die Spezifität der IL-8 Induktion durch Listerien-DNA nicht sicher beurteilt werden.

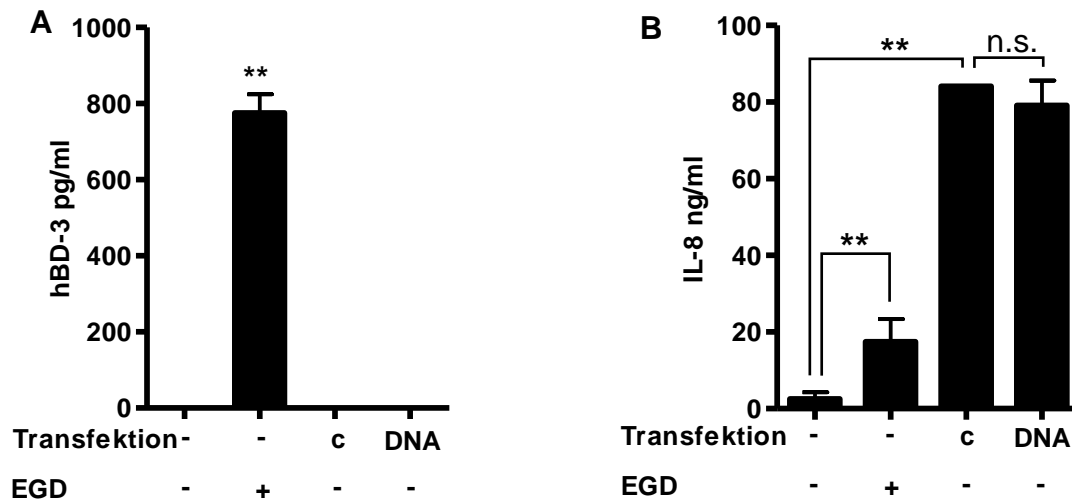


Abbildung 3.3.4 Mit Lipofektion transfizierte EGD DNA vermittelt keine hBD-3 Induktion in HUVEC.

DNA von Wildtyp *L. monocytogenes* wurde mittels Lipofektion in HUVEC transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde in den Überständen mit spezifischem ELISA für hBD-3 und IL-8 die Protein-Konzentration bestimmt. Als Positivkontrolle wurde zum einen eine Infektion mit EGD in MOI 5 ohne Transfektion durchgeführt (-). Zum anderen wurde unspezifische Kontroll siRNA (c) eingesetzt.

(A) Keine Induktion von hBD-3 durch Stimulation mit lipofizierter EGD DNA, aber durch Infektion mit vitalen EGD. (B) Die Stimulation mit lipofizierter DNA von Wildtyp *L. monocytogenes* zeigt im Vergleich zur unspezifischen Kontroll siRNA keine signifikant erhöhte Induktion von IL-8.

Die Beteiligung einzelner TLR bei der Induktion der hBD-3 Expression in HUVEC wurde durch Stimulationsversuche untersucht. Einzelne TLR wurden gezielt durch spezifische PAMP stimuliert und die Induktion von hBD-3 gemessen.

Aufgereinigte bzw. synthetische PAMP wurden dem jeweiligen HUVEC Nährmedium zugesetzt und mit den Zellkulturen für 24 Stunden inkubiert. Es erfolgte die Stimulation von jeweils getrennten HUVEC Kulturen mit Palmitoyl-3-Cystein (Pam3Cys) (TLR2 mit TLR1), Malp2 (TLR2 mit TLR6), PolyIC (TLR3), LPS (TLR4) und Flagellin (TLR5). Zur Kontrolle wurde eine Probe für ebenfalls 24 Stunden mit Wildtyp *L. monocytogenes* infiziert und eine Probe unstimuliert gelassen. Nach 24 Stunden wurden die Überstände der HUVEC Zellkulturen abgenommen und durch spezifischen ELISA auf die Proteinkonzentration von hBD-3 untersucht.

Der Erfolg der Stimulation wurde mit einem IL-8 Nachweis durch spezifischen ELISA überprüft.

Nach spezifischer Stimulation der TLR1-6 mit den o.g. PAMP konnte kein hBD-3 in den HUVEC Zellkulturmedien nachgewiesen werden, während die hBD-3 Konzentration nach Infektion mit Wildtyp *L. monozytogenes* deutlich erhöht war (Abb. 3.3.5 A).

Die IL-8 Konzentration in den Überständen war sowohl nach Infektion mit Wildtyp *L. monozytogenes*, als auch nach spezifischer Stimulation der TLR signifikant erhöht. (Abb. 3.3.5 B). Diese Ergebnisse können als Hinweis darauf gewertet werden, dass die hBD-3 Induktion in HUVEC unabhängig von TLR1-6 ist.

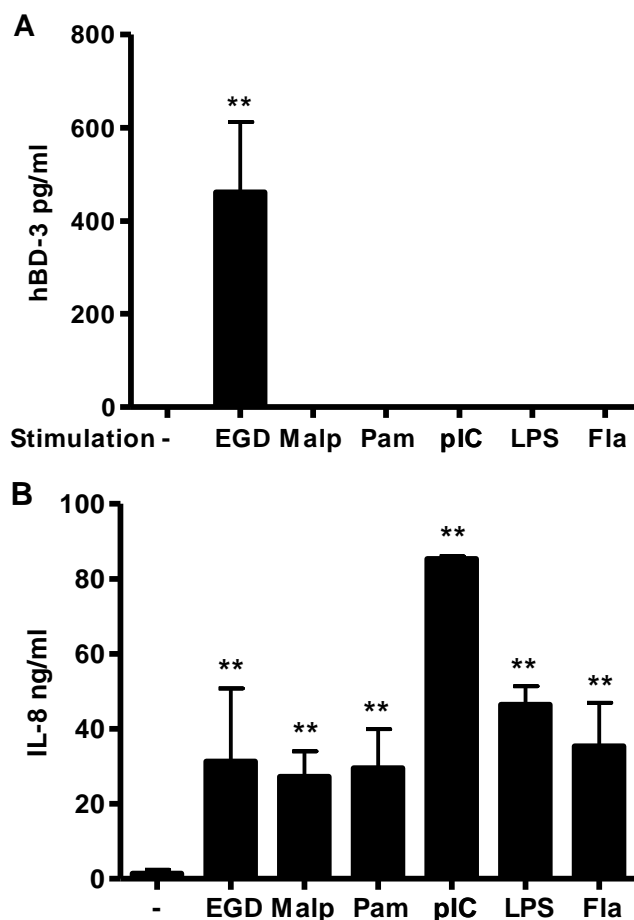


Abbildung 3.3.5 Spezifische PAMP für TLR1-6 vermitteln keine hBD-3 Induktion in HUVEC. HUVEC wurden für 24 h in getrennten Ansätzen mit Agonisten für TLR1-TLR6 stimuliert. Wildtyp *L. monozytogenes* wurden mit MOI 5 eingesetzt. Pam3Cys (Pam), PolyIC (pIC) und LPS wurden in einer Konzentration von 1 µg/µl eingesetzt. Flagellin (Fla) und Malp2 (Malp) wurden in einer Konzentration von 0,1 µg/µl eingesetzt. Auswertung der Protein-Konzentration von hBD-3 (A) und IL-8 (B) in den Überständen nach 24 h mittels spezifischem ELISA. (A) Keine hBD-3 Induktion durch die Stimulation mit o.g. genannten TLR Agonisten, aber durch Infektion mit Wildtyp *L. monozytogenes*. (B) Die o.g. TLR Agonisten sowie Wildtyp *L. monozytogenes* induzieren IL-8.

Da in der Signaltransduktion von TLR das Adapterprotein MyD88 eine zentrale Rolle einnimmt, wurde die Beteiligung von MyD88 untersucht. Nach Transfektion von HUVEC mit spezifischer siRNA gegen MyD88 erfolgte die Infektion mit *L. monozytogenes*. Die Induktion von hBD-3 wurde durch spezifischen Proteinnachweis von hBD-3 in den Überständen der Zellkultur untersucht.

Die siRNA wurde durch Lipofektion in die HUVEC eingebracht, welche daraufhin für 72 Stunden kultiviert wurden. Zur Kontrolle wurde eine Lipofektion mit unspezifischer Kontroll siRNA durchgeführt und eine HUVEC Probe unstimuliert belassen. Danach erfolgte die Infektion mit *L. monozytogenes* in MOI 5 und die Inkubation für 24 Stunden. Die Überstände der Zellkulturen wurden mittels spezifischem ELISA auf die Konzentration von hBD-3 und IL-8 untersucht.

Die Konzentration von hBD-3 war nach Infektion mit *L. monozytogenes* und nach Lipofektion von unspezifischer Kontroll siRNA wie auch nach Lipofektion von spezifischer MyD88 siRNA erhöht. Nach Lipofektion von MyD88 siRNA konnte keine signifikant reduzierte Konzentration von hBD-3 gemessen werden im Vergleich zur unspezifischen Kontroll siRNA (Abb 3.3.6 A).

Die IL-8 Konzentration nach Infektion der mit MyD88 siRNA inkubierten HUVEC war im Vergleich zu den mit unspezifischer siRNA inkubierten HUVEC ebenfalls nicht signifikant reduziert (Abb 3.3.6 B).

Dies könnte darauf hindeuten, dass MyD88 nicht zentral an der Induktion von hBD-3 und IL-8 bei Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* beteiligt ist.

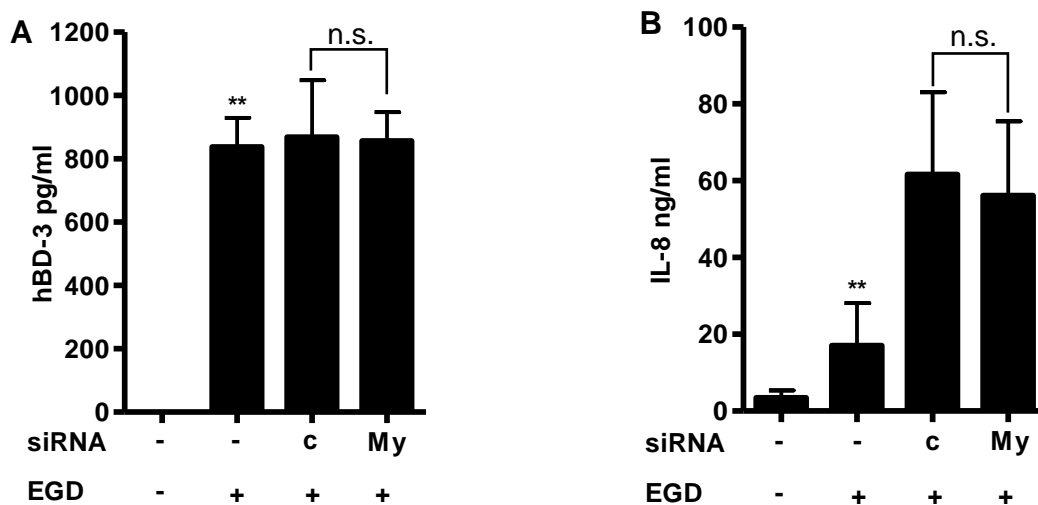


Abbildung 3.3.6 *L. monozytogenes* induzierte hBD-3 Expression wird in HUVEC nicht von MyD88 vermittelt. HUVEC wurden mit spezifischer siRNA (My) lipofiziert, um MyD88 temporär auszuschalten. Nach 72 h Infektion mit EGD in MOI 5. Nach weiteren 24 h Proteinnachweis von hBD-3 in den Überständen mittels ELISA. Kontrolle mit unspezifischer siRNA (c). (A) Keine reduzierte Induktion von hBD-3 nach temporärer Ausschaltung von MyD88. (B) Keine reduzierte Induktion von IL-8 nach temporärer Ausschaltung von MyD88.

Zusammenfassend wurde für die hBD-3 Induktion in HUVEC gezeigt, dass die Pathogenerkennung unabhängig von Internalin A und B verläuft, und dass der Pathogenitätsfaktor wahrscheinlich eine Proteinstruktur ohne wesentliche Lipidanteile ist.

Listeriolysin O und *L. monozytogenes* DNA sind nicht für die Induktion verantwortlich, welche unabhängig von TLR und MyD88 erfolgt.

3.4. Die Expression von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit *L. monozytogenes* ist unabhängig von den MAPK MEK1/2 und p38.

Um zu untersuchen, welche Signaltransduktionswege bei der *L. monozytogenes* induzierten Expression von hBD-3 in HUVEC von Bedeutung sind, wurden MAP Kinasen spezifisch inhibiert. Daraufhin erfolgte die Infektion mit Wildtyp *L. monozytogenes* und die vergleichende Analyse der Konzentration von hBD-3 in den Zellüberständen im Vergleich zur Kontrolle.

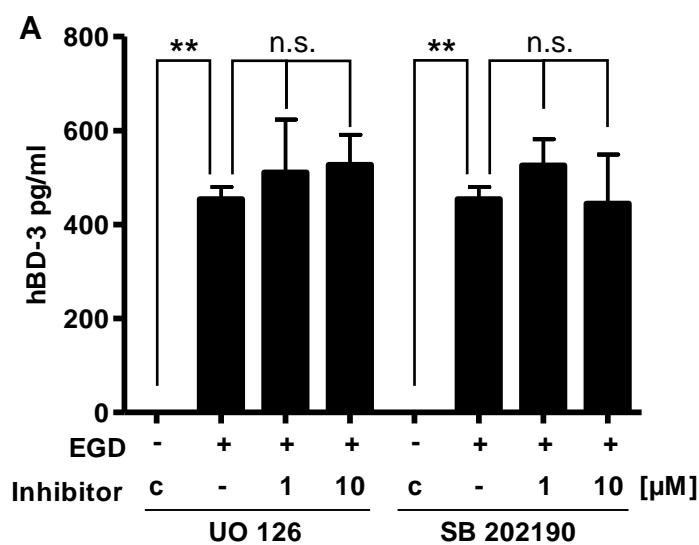
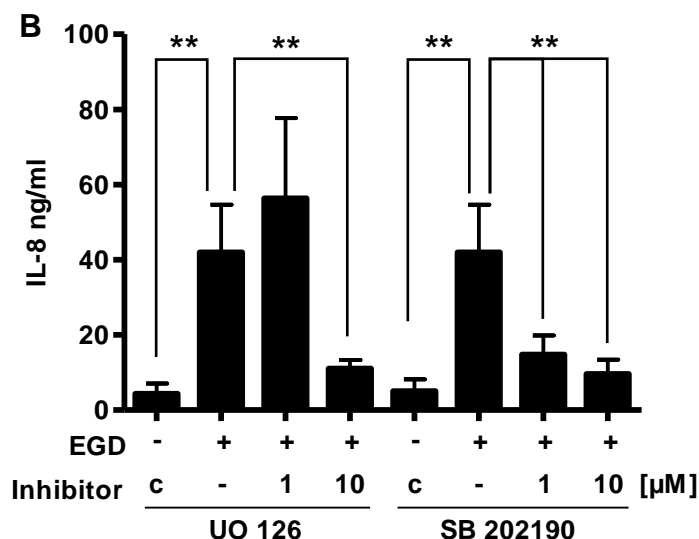


Abbildung 3.4.1 Die *L. monozytogenes* induzierte hBD-3 Synthese in HUVEC ist unabhängig von MEK1/2 und p38. HUVEC wurden 2 h mit den spezifischen Inhibitoren UO 126 (MEK1/2) und SB 202190 (p38) in Konzentrationen von jeweils 1 µM und 10 µM inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit EGD in MOI 5. Kontrollwerte (c) wurden mit dem jeweiligen Inhibitor (10µM) inkubiert. Nach 24 h erfolgte der ELISA Proteinnachweis: (A) keine reduzierte hBD-3 Expression nach Inhibition. (B) Reduzierte Expression von IL-8 nach Inhibition von MEK1/2 und p38.



Hierbei wurden HUVEC Kulturen vor der Infektion 2 Stunden lang mit spezifischen Inhibitoren behandelt. Diese wurden jeweils in Konzentrationen von 1µM und 10 µM eingesetzt, um zu überprüfen, ob ein konzentrationsabhängiger Effekt eintritt. Es wurden Inhibitoren von zwei

typischen inflammations-assoziierten MAP Kinasen Signalwegen eingesetzt: MEK1/2 und p38. Nach 24 stündiger Infektion mit Wildtyp *L. monozytogenes* wurde die Proteinkonzentration von hBD-3 und IL-8 in den Zellkulturüberständen untersucht.

Es zeigte sich keine signifikant verminderte hBD-3 Induktion in den mit Inhibitoren behandelten HUVEC Kulturen im Vergleich zu nicht MAPK-inhibierten HUVEC (Abb. 3.4.1 A).

Die IL-8 Konzentration war nach Inhibition sowohl von MEK1/2 als auch von p38 signifikant reduziert (Abb. 3.4.1 B). Dies weist darauf hin, dass die MAP Kinasen Inhibition erfolgreich war.

Zusammengenommen geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass die MAP Kinasen MEK 1/2 und p38 bei der Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* nicht an der Signaltransduktion für die Induktion von hBD-3 beteiligt sind.

3.5. Die Expression von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit *L. monozytogenes* erfolgt abhängig von NF- κ B

Weiterhin wurde untersucht, welche Transkriptionsfaktoren bei der *L. monozytogenes* induzierten hBD-3 Synthese in HUVEC von Bedeutung sind, indem eine spezifische Inhibition von NF- κ B erfolgte.

HUVEC wurden für 2 Stunden mit den spezifischen NF- κ B Inhibitoren IKK-NBD bzw. PDTC inkubiert, bevor die Infektion mit Wildtyp *L. monozytogenes* erfolgte. Nach 24-stündiger Inkubation wurde durch spezifischen ELISA die Proteinkonzentration von hBD-3 und IL-8 in den Zellkulturüberständen ermittelt. Dabei ergab sich eine signifikant reduzierte hBD-3 Konzentration in den Proben, die mit IKK-NBD oder PDTC inkubiert worden waren (Abb 3.5.1).

Dies deutet darauf hin, dass die Transkription von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit *L. monozytogenes* abhängig von NF- κ B verläuft.

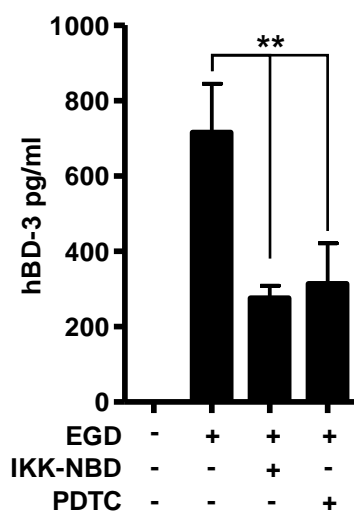


Abbildung 3.5.1 Die *L. monozytogenes* induzierte hBD-3 Synthese in HUVEC ist abhängig von NF- κ B. Nach Inkubation mit den spezifischen NF- κ B Inhibitoren IKK-NBD (10 μ M) und PDTC (100 μ M) für 2 h wurden HUVEC mit EGD in MOI 5 stimuliert. Der hBD-3 Proteinnachweis in den Zellkultur-Überständen mittels ELISA zeigte die signifikant reduzierte Expression von hBD-3 nach Inhibition von NF- κ B durch IKK-NBD und PDTC.

4. Diskussion

4.1. hBD-3 besitzt antimikrobielle Wirkung gegen *L. monozytogenes*

Die zunehmende Ausbildung von Antibiotikaresistenzen durch Krankheitserreger erfordert dringend alternative Therapiestrategien, zu denen auch die Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen zählt.

In unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass hBD-3 in Konzentrationen von 1 µg/ml eine signifikante antibakterielle Aktivität gegenüber *L. monozytogenes* besitzt (Abb 3.1.1). Dies steht in Einklang mit den Resultaten anderer Untersuchungen, die eine antibakterielle Wirkung von hBD-3 gegenüber *L. monozytogenes* und *S. aureus* feststellten (Gottlieb et al. 2008).

Zur Erklärung des speziellen Mechanismus der antibakteriellen Wirkung von hBD-3 werden zwei Modelle postuliert. Ein Mechanismus beschreibt die Oligomerisierung von hBD-3 Monomeren, welche Poren in der Zellmembran von Mikroorganismen bilden und die Zelle so destabilisieren. Weitere Ergebnisse deuten auf einen zweiten antimikrobiell wirksamen Mechanismus hin, bei dem durch Bindung von hBD-3 an Lipidanteile von Membranmolekülen die Zellmembransynthese inhibiert wird (Sahl et al. 2005; Sass et al. 2010).

Die Funktionstüchtigkeit der meisten Defensine ist bei physiologischen Konzentrationen von NaCl aufgehoben. Die Wirksamkeit von hBD-3 bei physiologischen Salzkonzentrationen wird unterschiedlich beurteilt (Harder et al. 2001; Maisetta et al. 2008). Die jüngsten Ergebnisse sprechen für eine erhaltene Wirksamkeit bis 200 mM NaCl (Scudiero et al. 2010).

Hinsichtlich der physiologischen Konzentration von antimikrobiellen Peptiden existieren bisher nur Schätzungen für hBD-2. Diese schätzen die in vivo Konzentration in epidermalen Psoriasisläsionen auf 1,2 mg/ml (Jansen et al. 2009). Vergleichende Untersuchungen für bakteriell infizierte Zellverbände könnten Aufschluss geben über die in vivo Konzentration von hBD-3. Bei Konzentrationen bis zu 500 µg/ml wurden in vitro keine toxischen Effekte, z.B. im Sinne einer Hämolyse beobachtet, was den therapeutischen Einsatz von hBD-3 in hohen Konzentrationen denkbar macht (Harder et al. 2001).

4.2. HUVEC detektieren *L. monozytogenes* und exprimieren hBD-3

L. monozytogenes aktiviert humane Endothelzellen und induziert eine Immunantwort durch die Expression von hBD-3 (Abb. 3.2.1 A-B). Dabei handelt es sich um einen unspezifischen Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität gegen Mikroorganismen, der auch bei

Infektion von Alveolarepithelzellen mit *L. pneumophila*, oder von Ösophagusepithelzellen mit *C. albicans* beobachtet wurde (Steubesand et al. 2009; Scharf et al. 2010).

Diese Immunreaktion ist zum einen im Sinne der breiten antimikrobiellen Wirkung von hBD-3 zu verstehen. Durch die direkte antimikrobielle Aktivität können Bakterien, welche sich am Endothel befinden, abgetötet, und das Eindringen der Krankheitserreger in die Blutbahn kann aufgehalten werden. So kann das Eintreten einer Sepsis verhindert werden. Bei Vorliegen einer Bakteriämie kann die Infektion weiterer Organe verhindert werden, indem die Bakterien beim Versuch, das Gefäßsystem zu verlassen, durch die antimikrobielle Aktivität von hBD-3 lysiert werden. Dies ist ein wichtiger körpereigener Mechanismus, um die typischen Listerien-assoziierten Krankheitsbilder der Sepsis, der Meningitis sowie der intrauterinen Infektion zu verhindern.

Zum anderen hat die hBD-3 Expression von Endothelzellen bei einer Infektion mit *L. monozytogenes* das Ziel, durch Chemotaxis die adaptive Immunreaktion einzuleiten. So können die Bakterien gezielt durch Antikörperbildung und Stimulation von Monozyten und dendritischen Zellen bekämpft werden.

Die stimulierende Funktion von hBD-3 für Mitose und speziell Angiogeneese liegt in der Reparatur eines geschädigten Zellverbandes wie zum Beispiel der Tunica intima von Blutgefäßen. Die Angiogeneese ermöglicht die Hyperperfusion von infiziertem Gewebe und die Granulation beim Wiederaufbau eines geschädigten Gewebeverbandes (Unanue 1997; Selsted et al. 2005).

4.3. Die Expression von hBD-3 in HUVEC durch *L. monozytogenes* erfolgt unabhängig von Internalin und TLR

Nach der Feststellung, dass *L. monozytogenes* in HUVEC hBD-3 induziert, stellt sich die Frage, welche Pathogenitätsfaktoren beteiligt sind, welche zellulären Rezeptoren das Bakterium erkennen und über welche Signalwege die Transkription von hBD-3 aktiviert wird.

4.3.1 Die Rolle von Internalin

Um zu verstehen, ob die an der Zellinvasion von *L. monozytogenes* beteiligten Virulenzfaktoren Internalin A und B bei der Induktion von hBD-3 in Endothelzellen eine Rolle spielen, führten wir Infektionsversuche mit verschiedenen *L. monozytogenes* Mutanten durch.

Dabei zeigte sich, dass die Induktion von hBD-3 durch die Internalin A und die Internalin A/B defizienten Mutanten ebenso stark war wie die Induktion durch den Wildtyp (Abb. 3.3.1 A).

Da die Defizienz von Internalin A bzw. Internalin A und B im Vergleich zum Wildtyp nicht zu einer reduzierten Expression von hBD-3 führt, ist anzunehmen, dass die Induktion von hBD-3 in Endothelzellen von Internalin A und B unabhängig ist. Andere Gruppen konnten zeigen, dass die Invasivität von *L. monozytogenes* mit vorhandenem InlAB Genlokus in Endothelzellen höher ist als ohne diesen Genlokus (Chatterjee et al. 2006). Allerdings konnte auch eine Internalin-unabhängige Invasion von *L. monozytogenes* in HUVEC gezeigt werden (Greiffenberg et al. 1997).

Die induzierte IL-8 Konzentration im Vergleich zum Wildtyp war bei keiner der Deletionsmutanten signifikant vermindert (Abb. 3.3.1 B).

Andere Untersuchungen zeigten für die Infektion von HUVEC mit Internalin B defizienten *L. monozytogenes* Mutanten eine reduzierte IL-8 Expression (Opitz et al. 2006). In Neutrophilen konnte eine vermehrte IL-8 Induktion durch weniger invasive Listerien-Mutanten mit verändertem Listeriolysin O gezeigt werden (Arnold et al. 1998).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine *L. monozytogenes* assoziierte Induktion von hBD-3 und IL-8 in HUVEC möglich ist, die unabhängig von Internalin A und B verläuft.

4.3.2 Nur vitale *L. monozytogenes* induzieren eine endotheliale Immunantwort

Um die Beschaffenheit der Strukturen von *L. monozytogenes*, die in HUVEC für die Induktion von hBD-3 ursächlich sind, zu charakterisieren, wurden verschiedene Verfahren eingesetzt, die Listerien inaktivieren oder ihre Oberflächenstrukturen verändern.

Es konnte gezeigt werden, dass Wildtyp *L. monozytogenes* bei einer Temperatur von 60°C nach 2,5 Minuten nahezu vollständig inaktiviert werden. Neben der Denaturierung der Oberflächenproteine kommt es dabei zu Schäden der Zellmembran (Somolinos et al. 2010). In unseren Versuchen wurden die Bakterien über eine Stunde auf 95°C erhitzt und anschließend 24 Stunden mit den HUVEC Zellkulturen inkubiert.

Die hitzeinaktivierten Wildtyp *L. monozytogenes* induzierten in HUVEC kein hBD-3 (Abb. 3.3.2 A). Dies lässt darauf schließen, dass die für die Induktion verantwortliche Struktur thermolabil ist, oder Stoffwechselprozesse des vitalen Bakteriums erfordert. Dies trifft zum einen auf Proteine zu, deren Struktur durch Hitzeinwirkung verändert wird, zum anderen auf aktive Vorgänge wie z.B. die Translation bei der Proteinsynthese.

Proteinase K stammt aus dem Pilz *Tritirachium album* und kann genutzt werden, um Peptidstrukturen an der Oberfläche von Bakterien zu verdauen. So wird die Fähigkeit von Bakterien zur Induktion bestimmter Signalwege, die von der Erkennung peptidartiger Strukturen

abhängig sind, inhibiert (Scott et al. 2009). Damit kann unterschieden werden, ob die hBD-3 Induktion durch *L. monozytogenes* in HUVEC von Proteinstrukturen des Bakteriums abhängt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von T-Zellen nach Infektion mit Proteinase K behandelten *L. monozytogenes* fast vollständig fehlt (Munk et al. 1996).

Dies steht in Einklang mit unseren Ergebnissen, bei denen Proteinase K inkubierte Wildtyp *L. monozytogenes* in HUVEC keine erhöhte Konzentration von hBD-3 induzierten (Abb. 3.3.2 A).

Durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Wellenlängen 220 - 280 nm wird in Bakterien die Dimerisierung der Thyminbasen in der DNA Doppelhelix induziert, wodurch die Bakterien ihre Fähigkeit zur Replikation verlieren. Durch die Behandlung mit ultraviolettem Licht treten keine elektronenmikroskopisch detektierbaren Veränderungen der Zellmembran auf, allerdings kommt es zu einer deutlichen Reduktion der insgesamt sezernierten Proteinmasse (Cho et al. 2010).

In Listerien konnte nach Behandlung mit gepulstem ultraviolettem Licht eine signifikante Reduktion von CFU beobachtet werden (Ben Said et al. 2010).

In unseren Experimenten konnten durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht inaktivierte Wildtyp *L. monozytogenes* in HUVEC Zellkulturen kein hBD-3 induzieren (Abb. 3.3.2 A). Dies deutet darauf hin, dass die Integrität der Zellmembran für die hBD-3 Induktion nicht entscheidend ist, die ungestörte Proteinsynthese allerdings eine Rolle spielt.

Ethanol zeigt eine breite antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Viren und Pilze. Seine Wirkung ist optimal in Konzentrationen von 60-90% und beruht vor Allem auf der Denaturierung von Proteinen und einer damit einhergehenden Störung der Membranintegrität (McDonnell et al. 1999).

In Listerien wirkt Ethanol bereits ab einer Konzentration von 5% bakteriostatisch und steigert die Sensibilität des Bakteriums gegenüber anderen Noxen wie z.B. Nisin (Brewer et al. 2002).

Mit 96% Ethanol inkubierte Wildtyp *L. monozytogenes* induzierten in HUVEC im Vergleich zu unbehandelten Zellen kein hBD-3 (Abb. 3.3.2 A). Daraus geht hervor, dass ein unveränderter Proteinbesatz für die Induktion der hBD-3 Expression erforderlich ist.

Durch Inkubation mit wässriger Formaldehydlösung (Formalin) kommt es zur Querverbindung von Proteinstrukturen auf der Oberfläche von Bakterien (McDonnell et al. 1999).

Für *L. monozytogenes* wurde eine fehlende Replikation nach 30 minütiger Inkubation mit Formalin gezeigt (Sagripanti et al. 1997).

In unseren Ergebnissen konnten Wildtyp *L. monozytogenes*, die mit Formalin vorbehandelt wurden, in HUVEC kein hBD-3 induzieren (Abb. 3.3.2 A). Auf Grund der vielfältigen Veränderungen, die eine Inkubation mit Formalin in Bakterien verursacht, kann nicht mit

Sicherheit gesagt werden, welcher Effekt der Formalin-Inkubation die Fähigkeit zur Induktion von hBD-3 stört. Sowohl eine fehlende Stoffwechselaktivität, als auch die Alteration der Oberflächenproteine können ursächlich sein.

Lipoproteinlipase spaltet Acylreste durch Hydrolyse. Das Enzym kann eingesetzt werden, um Lipidkomponenten aus Lipoproteinen zu entfernen. In *L. monozytogenes* wurden Lipoproteine als essentiell für die NF- κ B Aktivierung in Epithelzellen beschrieben (Machata et al. 2008).

Dies ließ uns untersuchen, ob durch Behandlung von Wildtyp *L. monozytogenes* mit Lipoproteinlipase die Induktion von hBD-3 in HUVEC reduziert werden kann. Dabei zeigte sich, dass Wildtyp *L. monozytogenes* nach Inkubation mit Lipoproteinlipase eine Expression von hBD-3 induzierten (Abb. 3.3.2 A). Dies scheint der von Machata et al. beobachteten Reduktion der Aktivierung von NF- κ B zu widersprechen. Ursächlich dafür könnte ein Unterschied in der Substratspezifität der von uns eingesetzten humanen Pankreaslipase im Vergleich zur Streptokokken-Lipoproteinlipase sein. Eine unspezifische Ursache für unser Ergebnis kann darin liegen, dass sich während der 24stündigen Infektionsphase im HUVEC Zellkulturmedium eine ausreichend große Fraktion von *L. monozytogenes* mit intaktem Lipoprotein Oberflächenbesatz bildete, um in HUVEC hBD-3 zu induzieren.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass nur vitale Listerien in der Lage sind, in Endothelzellen eine Immunantwort auszulösen.

Die erfolgreiche Induktion einer Immunantwort wurde jeweils durch den Proteinnachweis von IL-8 bestätigt (Abb. 3.3.2 B).

4.3.3 Die Rolle von Listeriolysin O

Um zu verstehen, ob der an der endosomalen Evasion beteiligte Virulenzfaktor Listeriolysin O bei der Induktion von hBD-3 durch *L. monozytogenes* in Endothelzellen eine Rolle spielt, führten wir Stimulationsversuche mit rekombinantem Listeriolysin O durch.

Nach erfolgter Invasion der Zelle entweicht *L. monozytogenes* aus dem Endosom, indem es Listeriolysin O sezerniert, und so die Endosomenmembran zersetzt (Hamon et al. 2006). Es wurde eine durch intravenös injiziertes Listeriolysin O induzierte Aktivierung von NF- κ B in Endothelzellen beschrieben. Daraufhin wurde ein spezifischer membranständiger Listeriolysin O Rezeptor postuliert (Kayal et al. 1999).

Nach Applikation von Listeriolysin O im HUVEC Zellkulturmedium zeigte sich keine Induktion von hBD-3 (Abb. 3.3.3 A). Dies zeigt, dass extrazelluläres Listeriolysin O in HUVEC keinen Stimulus zur hBD-3 Induktion darstellt.

Durch die Stimulation mit extrazellulärem Listeriolysin O konnte auch kein IL-8 induziert werden, so dass wir das Auslösen einer Immunantwort durch extrazelluläres Listeriolysin O nicht bestätigen können.

4.3.4 Die Rolle von *L. monozytogenes* DNA

Um das Erkennungsmerkmal von *L. monozytogenes* zu identifizieren, welches in HUVEC die hBD-3 induziert, erfolgte die Stimulation von HUVEC mit DNA, welche aus Wildtyp *L. monozytogenes* gewonnen wurde.

In Makrophagen konnte gezeigt werden, dass *L. monozytogenes* DNA zur Induktion von Interferon-beta führt (Abdullah et al. 2012). Die Induktion einer NF- κ B vermittelten Transkription von ICAM-1 und E-Selektin in Endothelzellen durch bakterielle DNA ist beschrieben worden (El Kebir et al. 2009).

In unseren Versuchen zeigte sich nach Transfektion von Wildtyp *L. monozytogenes* DNA keine Induktion von hBD-3, während Wildtyp *L. monozytogenes* deutlich hBD-3 induzierten (Abb 3.3.4 A). Der zur Kontrolle durchgeführte spezifische IL-8 Proteinnachweis zeigte eine deutliche Induktion nach Transfektion von *L. monozytogenes* DNA, sowie von unspezifischer Kontroll siRNA, ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsanordnungen (Abb 3.3.4 B).

Wegen des hohen Signals des Kontrollwerts ist hier eine unspezifische Induktion von IL-8 in den HUVEC durch den Lipofektionsvorgang wahrscheinlich.

Die ausbleibende Induktion von hBD-3 könnte als Hinweis dafür gewertet werden, dass die DNA von *L. monozytogenes* keinen Stimulus für eine Immunantwort in HUVEC darstellt.

4.3.5 Die Rolle von TLR

Um den Rezeptor zu identifizieren, welcher an der Induktion von hBD-3 bei der Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* beteiligt ist, wurde zunächst die Gruppe der TLR untersucht.

In Versuchen anderer Gruppen konnte in TLR2 defizienten Mäusen sowie in Überexpressionsexperimenten eine TLR2 abhängige Aktivierung von NF- κ B durch *L. monozytogenes* beobachtet werden (Machata et al. 2008). Des Weiteren konnte eine TLR2 vermittelte Induktion von hBD-3 in Alveolarepithelzellen gezeigt werden (Scharf et al. 2010).

Dementsprechend erschien TLR2 als möglicher Startpunkt der Signaltransduktion für die hBD-3 Induktion in HUVEC.

Durch die direkte Stimulation mit TLR2 Liganden wurde keine hBD-3 Expression induziert, so dass wir die Hypothese einer TLR2 vermittelten Stimulation von hBD-3 bei Listerieninfektion von HUVEC nicht bestätigen können (Abb. 3.3.5 A).

Die Stimulation mit TLR Liganden induzierte in HUVEC IL-8 (Abb. 3.3.5 B). Dies deutet darauf hin, dass die verwendeten HUVEC über TLR2 verfügen, wenn auch andere Gruppen ein Fehlen von TLR2 auf HUVEC beschreiben (Hijiya et al. 2002).

Obwohl eine intakte Erkennung TLR2 spezifischer PAMP durch IL-8 Induktion gezeigt werden konnte, konnte kein hBD-3 induziert werden. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass die hBD-3 Induktion in HUVEC bei Infektion mit *L. monozytogenes* unabhängig von TLR2 ist.

Da Machata et al. und Scharf et al. in ihren Ergebnissen keine Daten zu Endothelzellen vorlegen, wären zellspezifische Unterschiede in der Signaltransduktion der *L. monozytogenes* induzierten hBD-3 Expression eine plausible Erklärung.

Für TLR3 wurde auf HUVEC eine konstitutive Transkription beschrieben (Hijiya et al. 2002). Eine Induktion der hBD-3 Transkription konnte in Bronchialepithelzellen bei Infektion mit Rhinoviren nachgewiesen werden (Duits et al. 2003).

Nach Stimulation von TLR3 mit einem spezifischen Agonisten konnte eine erhöhte Konzentration von IL-8 in den Überständen der Zellkulturen gemessen werden, was die Beobachtung unterstützt, dass HUVEC TLR3 exprimieren (Abb. 3.3.5 B). Eine Induktion von hBD-3 konnte in unseren Experimenten nicht beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Induktion von hBD-3 bei Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* unabhängig von TLR3 ist (Abb. 3.3.5 A).

Auf HUVEC wurde die konstitutive Transkription von TLR4 beschrieben (Hijiya et al. 2002; Talreja et al. 2004).

Die erfolgreiche Induktion von IL-8 durch Stimulation von TLR4 bestätigte die Aktivität von TLR4 auf den von uns eingesetzten HUVEC (Abb. 3.3.5 B). Die Stimulation von TLR4 führte in unseren Ergebnissen nicht zu einer Induktion von hBD-3 (Abb. 3.3.5 A). Dies deutet darauf hin, dass die hBD-3 Induktion bei Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* unabhängig von TLR4 ist.

Diese Ergebnisse sind vereinbar mit Untersuchungen an TLR4 "knock-out" Mäusen, in denen die Erkennung von *L. monozytogenes* unabhängig von TLR4 verlief (Seki et al. 2002). Auch konnte das Vorhandensein des TLR4 Liganden LPS auf dem Gram positiven Bakterium *L. monozytogenes* nicht bestätigt werden (Wexler et al. 1979).

Das Fehlen eines TLR4 Liganden von *L. monozytogenes* zum einen, und die von TLR4 unabhängige Signaltransduktion bei *L. monozytogenes* Infektion in HUVEC zum anderen sind Erklärungen für das Ausbleiben einer Induktion von hBD-3 in diesem Versuch.

In Alveolarepithelien konnte bereits die Beteiligung von TLR5 an der Induktion von hBD-3 gezeigt werden (Scharf et al. 2010). Die Expression von TLR5 auf Endothelzellen wurde mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht (Hijiya et al. 2002; Maaser et al. 2004). Das Vorhandensein von Flagellen auf *L. monozytogenes* bei 20°C ist beschrieben worden (Peel et al. 1988).

In unseren Experimenten führte die Stimulation von HUVEC mit dem TLR5 Agonisten Flagellin zur Induktion von IL-8, was darauf hindeutet, dass die eingesetzten Zellen über TLR5 verfügen (Abb. 3.3.5 B). Die Stimulation mit Flagellin führte nicht zu einer Induktion von hBD-3 (Abb. 3.3.5 A). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die hBD-3 Induktion in HUVEC bei Infektion mit *L. monozytogenes* unabhängig von TLR5 stattfindet.

4.3.6 Die Rolle von MyD88

Die Signaltransduktion aller TLR außer TLR3 und bedingt TLR4 wird über MyD88 vermittelt (Akira et al. 2006). Um die Beteiligung des TLR-Adapterproteins MyD88 bei der *L. monozytogenes* assoziierten hBD-3 Induktion in HUVEC zu untersuchen, wurde MyD88 durch RNA Interferenz temporär deaktiviert und eine Infektion mit *L. monozytogenes* durchgeführt.

In diesem Versuchsaufbau konnte ebenfalls keine Reduktion der hBD-3 Expression erreicht werden, was darauf hindeutet, dass MyD88 und die Gruppe der TLR nicht wesentlich an der *L. monozytogenes* induzierten hBD-3 Expression in HUVEC beteiligt sind (Abb. 3.3.6 A). Eine Ausnahme könnten hier TLR3 und TLR4 bilden, für die ein zweiter MyD88 unabhängiger Signaltransduktionsweg über TRIF besteht.

Die Ergebnisse sind vereinbar mit der Beobachtung, dass die *L. monozytogenes* induzierte Aktivierung von NF-κB in Epithelzellen unabhängig von MyD88 verläuft (Kayal et al. 1999; Kayal et al. 2002). Allerdings konnte in unseren Experimenten durch Stimulation mit Listeriolysin O keine IL-8- oder hBD-3 Induktion nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten dass, die von Kayal et al. beschriebene MyD88 unabhängige Aktivierung von NF-κB durch einen Listeriolysin O Rezeptor nicht entscheidend ist für die in unseren Experimenten beobachtete hBD-3 Induktion durch Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes*.

Die von uns beobachtete hBD-3 Induktion könnte auch über den MyD88 unabhängigen TRIF Signalweg vermittelt werden. Dies würde allerdings die Beteiligung von TLR3 und TLR4 voraussetzen, welche wir nicht beobachten konnten (Abb. 3.3.5 A) (Kawai et al. 2010).

4.4. Die Expression von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit *L. monozytogenes* erfolgt unabhängig von den MAPK MEK1/2 und p38

MAPK sind an der Signalübertragung einer Vielzahl von Vorgängen wie Wachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Entzündung beteiligt.

Bisherige Veröffentlichungen haben in unterschiedlichen Zelllinien die Induktion von hBD-3 in Abhängigkeit von MAPK beschrieben (Menzies et al. 2006). Dies ließ uns untersuchen, ob auch bei der Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* die Induktion von hBD-3 über MAPK vermittelt wird.

Nach der Inkubation von HUVEC mit spezifischen Inhibitoren für MEK 1/2 und p38 zeigte sich bei Infektion mit *L. monozytogenes* keine reduzierte Konzentration von hBD-3 in den Überständen der Zellkulturen (Abb 3.4.1 A). Bei der Analyse der IL-8 Konzentration dagegen konnten wir eine signifikante Reduktion der IL-8 Synthese feststellen, so dass wir von einer erfolgreichen Unterdrückung der MEK 1/2 und p38 MAPK ausgehen (Abb. 3.4.1 B).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die MAPK MEK1/2 und p38 in HUVEC nicht an der Signaltransduktion der *L. monozytogenes* induzierten hBD-3 Expression beteiligt sind. Dies ist überraschend angesichts der Ergebnisse vorangegangener Veröffentlichungen, die in verschiedenen Zelllinien eine von MAPK und AP-1 vermittelte Induktion von hBD-3 beschrieben haben (Scharf et al. 2010; Steubesand et al. 2009). In Keratinozyten wurde eine TLR2 getriggerte und MAPK vermittelte Induktion von hBD-3 beschrieben (Menzies et al. 2006).

In der Immunantwort bildet TLR2 mit MyD88 und den MAP Kinasen MEK 1/2 und p38 eine Signalkaskade (Dong et al. 2002). Unsere Ergebnisse sind schlüssig darin, dass nach der fehlenden Beteiligung von TLR auch eine Beteiligung von MyD88 und von MAPK nicht nachgewiesen werden konnte. Dies weist auf einen Unterschied zwischen Endothelzellen und epithelialen Zellen in der Signaltransduktion bei der Induktion von hBD-3 hin.

In Epithelzellen wurde bei Infektion mit *C. albicans* eine EGFR vermittelte Aktivierung von AP-1 und Induktion von hBD-3 beschrieben (Steubesand et al. 2009). Allerdings wurde hier eine Abhängigkeit der Signaltransduktion von den MAPK p38, MEK und JNK gezeigt, was wir bei der *L. monozytogenes* induzierten hBD-3 Expression in HUVEC nicht beobachten konnten.

Auch wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass die EGFR vermittelte Signaltransduktion einer antiviralen Immunantwort in Assoziation mit TLR3 verläuft (Yamashita et al. 2012). Die EGFR vermittelte Zellinvasion von *L. monozytogenes* konnte für Kolon Karzinom Zellen gezeigt werden (Oliveira et al. 2005).

Da in unseren Ergebnissen weder die Beteiligung von TLR3 noch von den MAPK MEK 1/2 und p38 gezeigt werden konnte, ist eine Signalvermittlung über EGFR unwahrscheinlich.

Eine MAPK unabhängige Aktivierung von NF- κ B mit Signalvermittlung über TRIF wäre denkbar, allerdings verläuft hier die Pathogenerkennung über TLR3 oder TLR4 (Kawai et al. 2010). Eine Beteiligung dieser Rezeptoren konnten wir nicht nachweisen, so dass auch dieser Signaltransduktionsweg unwahrscheinlich erscheint (Abb. 3.3.5 A).

4.5. Die Expression von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit *L. monozytogenes* erfolgt abhängig von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist beteiligt an der Regulation von Zelldifferenzierung, Apoptose sowie Reaktionen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems. Eine Aktivierung kann durch Pathogendetektion, Zytokinstimulation oder physikalische Stressoren erfolgen.

In der unspezifischen Immunität ist die NF- κ B Aktivierung verantwortlich für die verstärkte Transkription von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Zytokinen, sowie von antimikrobiellen Peptiden (Caamano et al. 2002; Moranta et al. 2010). NF- κ B ist für die Immunreaktion gegen virale, bakterielle und parasitäre Krankheitserreger notwendig. Die NF- κ B Familie besteht aus fünf Mitgliedern: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 (NF- κ B1) und p105/p50 (NF- κ B2) (Kawai et al. 2010).

NF- κ B 1 defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit den Gram positiven Pathogenen *L. monozytogenes* und *S. pneumoniae*, wobei die Abwehrreaktion gegen die Gram negativen Bakterien *E. coli* und *H. influenzae* nicht beeinträchtigt ist. Eine verstärkte Sensibilität für Infektionen mit Listerien zeigte sich auch bei NF- κ B 2 defizienten Mäusen, sowie bei Defizienz für den NF- κ B Regulator Bcl-3 und RelB (Franzoso et al. 1998; Caamano et al. 2002). Mäuse mit inaktivem NF- κ B zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für Infektion mit *L. monozytogenes* und eine geringere Fähigkeit, die Bakterien zu phagozytieren (Lavon et al. 2000). Die zentrale Rolle von NF- κ B in der Abwehrreaktion gegenüber *L. monozytogenes* ließ uns untersuchen, ob die Induktion von hBD-3 in HUVEC über diesen Faktor vermittelt wird.

In unseren Versuchen wurden HUVEC jeweils mit den NF- κ B Inhibitoren IKK-NBD oder PDTC vorinkubiert und anschließend mit Wildtyp *L. monozytogenes* infiziert. Bei der ELISA Proteinanalyse in den Überständen der NF- κ B inhibierten Endothelzellen zeigte sich eine signifikant reduzierte Konzentration von hBD-3. Dies lässt auf eine zentrale Beteiligung von NF- κ B bei der Transkription von hBD-3 in unserem Modell schließen (Abb. 3.5.1).

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der von Kayal et al. beschriebenen NF- κ B Aktivierung nach Listerien-Infektion von Endothelzellen (Kayal et al. 2002). Ergebnisse von Versuchen in anderen Zelllinien, die eine NF- κ B unabhängige Transkription von hBD-3 beschreiben, könnten durch zellspezifische Unterschiede in der Signaltransduktion bedingt sein. Auch eine multifaktorielle Transkription von hBD-3 in HUVEC unter Beteiligung von NF- κ B und z.B. AP-1 wäre mit der in unseren Ergebnissen beobachteten Restaktivität nach Inhibition von NF- κ B zu vereinbaren (Kanda et al. 2010; Scharf et al. 2010).

Von Opitz et al. wurde die NOD1 vermittelte Induktion von IL-8 bei Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes* beschrieben. Dabei wurde eine p38 assoziierte Aktivierung von NF- κ B gezeigt (Opitz et al. 2006). Obwohl wir eine Beteiligung von p38 nicht nachweisen konnten, könnte dieser Signaltransduktionsweg auch bei der hBD-3 Induktion in HUVEC durch Infektion mit *L. monozytogenes* beteiligt sein. Eine Signalvermittlung über andere MAPK wie zum Beispiel JNK wäre eine mögliche Erklärung (Abb. 4.5.1).

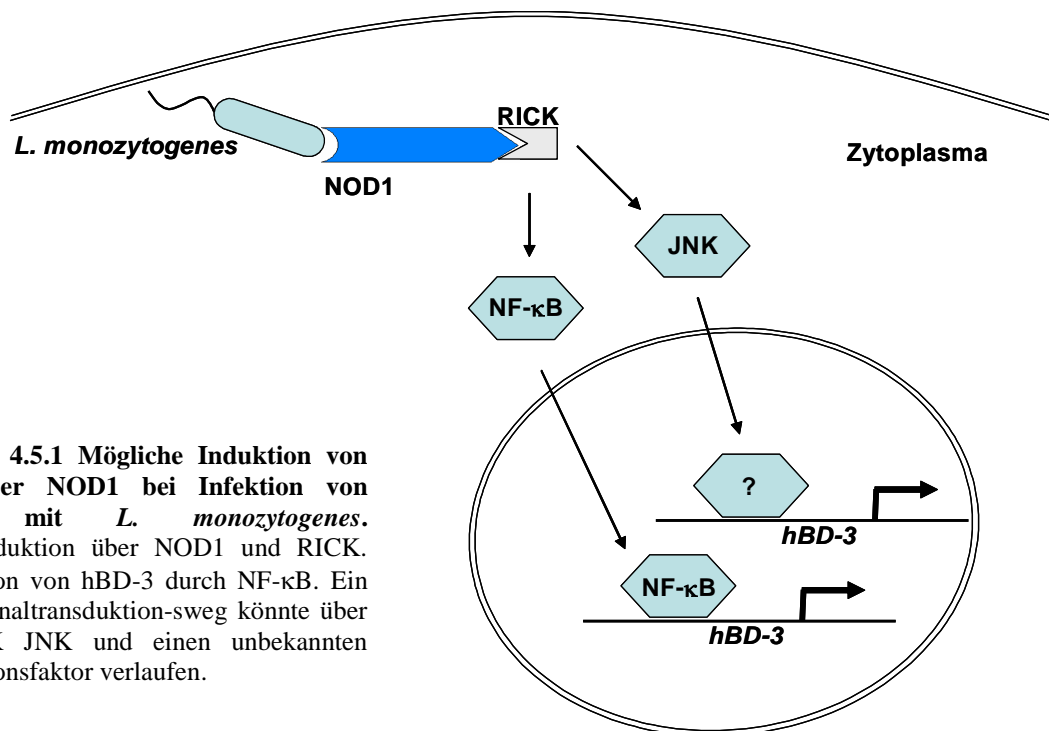


Abbildung 4.5.1 Mögliche Induktion von hBD-3 über NOD1 bei Infektion von HUVEC mit *L. monozytogenes*. Signaltransduktion über NOD1 und RICK. Transkription von hBD-3 durch NF- κ B. Ein zweiter Signaltransduktion-sweg könnte über die MAPK JNK und einen unbekanntem Transkriptionsfaktor verlaufen.

5. Zusammenfassung

Listeriose ist eine durch das Gram positive, fakultativ intrazelluläre Stäbchen *L. monocytogenes* ausgelöste Erkrankung mit dem klinischen Bild einer intrauterinen Infektion, Meningitis, Sepsis oder Gastroenteritis. Die insgesamt seltene Erkrankung zeigt eine steigende Inzidenz mit zunehmender Betroffenheit von über 60jährigen. Während im Menschen die antibiotische Chemotherapie gut wirksam ist, sind in aus Nahrungsmitteln isolierten *L. monocytogenes* Resistenzen gegen viele Antibiotika inklusive Vancomycin nachgewiesen.

Antimikrobielle Peptide sind konservierte Strukturen mit breiter antimikrobieller Wirkung gegen Bakterien, Viren und Pilze. Für die humanen α - und β -Defensine ist sowohl eine antimikrobielle Wirkung gegenüber Pathogenen, als auch ein erhöhtes Vorkommen bei immunologischen und infektiösen Erkrankungen beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob humanes Beta-Defensin-3 (hBD-3) antimikrobielle Aktivität gegenüber *L. monocytogenes* besitzt. Weiter sollte untersucht werden, ob Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen bei Infektion mit diesem intravasal vorkommenden Erreger als Abwehrreaktion hBD-3 exprimieren, und welche Oberflächenstrukturen von *L. monocytogenes* an der Induktion beteiligt sind. Darüber hinaus wurde untersucht, welche Rezeptoren der Endothelzellen an der Pathogenerkennung beteiligt sind. Ein weiterer Teil der Arbeit war, wichtige, an der Signaltransduktion beteiligte Moleküle zu identifizieren.

In einem Inkubationsversuch wurde gezeigt, dass hBD-3 eine mit Penicillin vergleichbare antimikrobielle Aktivität gegen *L. monocytogenes* erreicht. Bei Infektion von Humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen mit *L. monocytogenes* konnte mit RT-PCR und ELISA eine Induktion von hBD-3 gezeigt werden. Die Stimulation mit verschiedenen Mutanten von *L. monocytogenes* zeigte, dass die hBD-3 Induktion unabhängig von den Pathogenitätsfaktoren Internalin A und B verläuft. In Versuchen mit RNA Interferenz zeigten wir, dass diese Induktion unabhängig von dem TLR-Adapterprotein MyD88 verläuft. Die Inkubation mit spezifischen Inhibitoren ergab, dass die hBD-3 Induktion durch *L. monocytogenes* unabhängig von den MAP Kinasen MEK1/2 und p38 verläuft. Es konnte gezeigt werden, dass diese hBD-3 Induktion von dem Transkriptionsfaktor NF- κ B abhängig ist.

Die Expression von hBD-3 in Endothelzellen zeigt, dass Endothelzellen Pathogene erkennen und an der Immunreaktion aktiv beteiligt sind. Die fehlende Beteiligung von TLR und MyD88 an der Induktion von hBD-3 deutet auf einen von TLR unabhängigen Mechanismus der Pathogenerkennung von *L. monocytogenes* in Endothelzellen hin. Die Abhängigkeit der hBD-3

Induktion von NF- κ B ist vereinbar mit der von Opitz et al. beschriebenen NOD1 vermittelten IL-8 Induktion durch *L. monozytogenes* in HUVEC.

Gegenstand weiterer Untersuchungen könnte sein, über welche Mechanismen *L. monozytogenes* eine Internalin unabhängige Zellinvasion erreicht. Auch die Beteiligung von NOD1 bei der Induktion von hBD-3 in HUVEC bei Infektion mit *L. monozytogenes* könnte untersucht werden. Es bleibt offen, ob neben NF- κ B eine Signaltransduktion über MAPK stattfindet und welche Transkriptionsfaktoren daran beteiligt sind.

6. Literaturverzeichnis

- Abdullah Z, Schlee M, Roth S, et al. RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids. *EMBO J* 2012; 31: 4153-4164.
- Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, et al. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 2010; 68: 323-329.
- Adachi M, Fukuda M and Nishida E Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J* 1999; 18: 5347-5358.
- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186: 1522-1525.
- Akira S, Uematsu S and Takeuchi O Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
- Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, et al. IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* 2007; 179: 984-992.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R and Flavell RA Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9247-9252.
- Anderson KV, Jurgens G and Nusslein-Volhard C Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 779-789.
- Arnold R and Konig W Interleukin-8 release from human neutrophils after phagocytosis of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *J Med Microbiol* 1998; 47: 55-62.
- Banchereau J and Steinman RM Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
- Barton GM, Kagan JC and Medzhitov R Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006; 7: 49-56.
- Ben Said N, Federighi M, Bakhrouf A and Orange N Effectiveness of pulsed ultraviolet-light treatment for bacterial inactivation on agar surface and liquid medium. *Foodborne pathogens and disease* 2010;
- Bertin J and DiStefano PS The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1273-1274.
- Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, et al. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 1999; 274: 12955-12958.
- Boneca IG The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 46-53.
- Brewer R, Adams M and Park S Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Letters in applied microbiology* 2002;
- Caamano J and Hunter CA NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 414-429.
- Carneiro LA, Travassos LH and Philpott DJ Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes Infect* 2004; 6: 609-616.
- Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003; 4: 702-707.
- Chatterjee SS, Otten S, Hain T, et al. Invasiveness is a variable and heterogeneous phenotype in *Listeria monocytogenes* serotype strains. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 277-286.

- Chiang C and Beachy PA Expression of a novel Toll-like gene spans the parasegment boundary and contributes to hedgehog function in the adult eye of *Drosophila*. *Mech Dev* 1994; 47: 225-239.
- Chin AI, Dempsey PW, Bruhn K, et al. Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature* 2002; 416: 190-194.
- Cho M, Kim J, Kim J, Yoon J and Kim J Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water research* 2010;
- Cossart P *Listeria* (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect* 2007; 9: 1143-1146.
- Davis RJ The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 14553-14556.
- Deretic V Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* 2011; 240: 92-104.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S and Reis e Sousa C Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303: 1529-1531.
- Dong C, Davis RJ and Flavell RA MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 55-72.
- Drevets DA, Sawyer RT, Potter TA and Campbell PA *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* 1995; 63: 4268-4276.
- Duits LA, Nibbering PH, van Strijen E, et al. Rhinovirus increases human beta-defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38: 59-64.
- Dziarski R and Gupta D *Staphylococcus aureus* peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect Immun* 2005; 73: 5212-5216.
- El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Wang L and Filep JG Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling. *J Immunol* 2009; 182: 4386-4394.
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 2006; 7: 576-582.
- Franchi L, Warner N, Viani K and Nunez G Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009; 227: 106-128.
- Franzoso G, Carlson L, Poljak L, et al. Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med* 1998; 187: 147-159.
- Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG and Portnoy DA Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2000; 68: 999-1003.
- Ghosh S and Karin M Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl: S81-96.
- Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003; 300: 1584-1587.
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278: 8869-8872.
- Girardin SE, Tournibize R, Mavris M, et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2001; 2: 736-742.
- Gottlieb CT, Thomsen LE, Ingmer H, et al. Antimicrobial peptides effectively kill a broad spectrum of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* strains independently of origin, sub-type, or virulence factor expression. *BMC Microbiol* 2008; 8: 205.

- Greiffenberg L, Sokolovic Z, Schnittler HJ, et al. *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 157: 163-170.
- Guan Y, Ranoa DR, Jiang S, et al. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* 2010; 184: 5094-5103.
- Hamon M, Bierne H and Cossart P *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 423-434.
- Harder J, Bartels J, Christophers E and Schroder JM Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-5713.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-1103.
- Hayden MS and Ghosh S Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132: 344-362.
- Haziot A, Chen S, Ferrero E, et al. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 1988; 141: 547-552.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-1529.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745.
- Hijiya N, Miyake K, Akashi S, et al. Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology* 2002; 70: 18-25.
- Hoelzer K, Pouillot R and Dennis S Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. *Vet Res* 2012; 43: 18.
- Hofmann K, Bucher P and Tschopp J The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 155-156.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749-3752.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
- Inohara, Chamaillard, McDonald C and Nunez G NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 355-383.
- Inohara N and Nunez G The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001; 20: 6473-6481.
- Ishimoto H, Mukae H, Date Y, et al. Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur Respir J* 2006; 27: 253-260.
- Iwasaki A and Medzhitov R Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327: 291-295.
- Jaffe EA, Grulich J, Weksler BB, Hampel G and Watanabe K Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 8557-8565.
- Janeway CA, Jr. and Medzhitov R Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
- Jansen PA, Rodijk-Olthuis D, Hollox EJ, et al. Beta-defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin. *PLoS One* 2009; 4: e4725.
- Kanda N, Ishikawa T and Watanabe S Prostaglandin D2 induces the production of human beta-defensin-3 in human keratinocytes. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 982-989.

- Kawai T and Akira S The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009; 21: 317-337.
- Kawai T and Akira S The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-384.
- Kayal S, Lilienbaum A, Join-Lambert O, et al. Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF-kappaB signalling by activating the IkappaB kinase complex. *Mol Microbiol* 2002; 44: 1407-1419.
- Kayal S, Lilienbaum A, Poyart C, et al. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* 1999; 31: 1709-1722.
- Kobe B and Kajava AV The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 725-732.
- Kreft J and Vazquez-Boland JA Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* 2001; 291: 145-157.
- Krug A, Luker GD, Barchet W, et al. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004; 103: 1433-1437.
- Kumar H, Kawai T and Akira S Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 2009; 420: 1-16.
- Lavon I, Goldberg I, Amit S, et al. High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat Med* 2000; 6: 573-577.
- Le Roy D, Di Padova F, Adachi Y, et al. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria. *J Immunol* 2001; 167: 2759-2765.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM and Hoffmann JA The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983.
- Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, et al. Critical function for *Naip5* in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* 2008; 9: 1171-1178.
- Lungu B, O'Bryan CA, Muthaiyan A, et al. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8: 569-578.
- Maaser C, Heidemann J, von Eiff C, et al. Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol* 2004; 172: 5056-5062.
- Machata S, Tchatalbachev S, Mohamed W, et al. Lipoproteins of *Listeria monocytogenes* are critical for virulence and TLR2-mediated immune activation. *J Immunol* 2008; 181: 2028-2035.
- Maisetta G, Di Luca M, Esin S, et al. Evaluation of the inhibitory effects of human serum components on bactericidal activity of human beta defensin 3. *Peptides* 2008; 29: 1-6.
- McDonnell G and Russell A Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews* 1999;
- Medzhitov R Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449: 819-826.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397.
- Menendez A and Brett Finlay B Defensins in the immunology of bacterial infections. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 385-391.

- Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM and Cossart P E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996; 84: 923-932.
- Menzies BE and Kenoyer A Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect Immun* 2006; 74: 6847-6854.
- Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 2006; 7: 569-575.
- Mook P, O'Brien SJ and Gillespie IA Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999-2009. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 38-43.
- Moranta D, Regueiro V, March C, et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun* 2010; 78: 1135-1146.
- Muller-Anstett MA, Muller P, Albrecht T, et al. Staphylococcal peptidoglycan co-localizes with Nod2 and TLR2 and activates innate immune response via both receptors in primary murine keratinocytes. *PLoS One* 2010; 5: e13153.
- Munk M, Elser C and Kaufmann S Human gamma/delta T-cell response to *Listeria monocytogenes* protein components in vitro. *Immunology* 1996;
- Oliveira MJ, Lauwaet T, De Bruyne G, Mareel M and Leroy A *Listeria monocytogenes* produces a pro-invasive factor that signals via ErbB2/ErbB3 heterodimers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 49-59.
- Opitz B, Forster S, Hocke AC, et al. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomonas pneumoniae*. *Circ Res* 2005; 96: 319-326.
- Opitz B, Puschel A, Beermann W, et al. *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol* 2006; 176: 484-490.
- Otri AM, Mohammed I, Al-Aqaba MA, et al. Variable expression of human Beta defensins 3 and 9 at the human ocular surface in infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 757-761.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22: 153-183.
- Peel M, Donachie W and Shaw A Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* 1988; 134: 2171-2178.
- Picard C, Puel A, Bonnet M, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003; 299: 2076-2079.
- Quinones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, et al. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 2003; 17: F39-48.
- Reinhardt RL, Kang SJ, Liang HE and Locksley RM T helper cell effector fates--who, how and where? *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 271-277.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; 80: 167-178.
- Sagripanti J, Eklund C, Trost P, et al. Comparative sensitivity of 13 species of pathogenic bacteria to seven chemical germicides. *American journal of infection control* 1997;
- Sahl HG, Pag U, Bonness S, et al. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 466-475.
- Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y and Bevins CL Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003; 422: 522-526.

- Sass V, Schneider T, Wilmes M, et al. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. *Infect Immun* 2010; 78: 2793-2800.
- Scharf S, Vardarova K, Lang F, et al. Legionella pneumophila induces human beta defensin-3 in pulmonary cells. *Respir Res* 2010; 11: 93.
- Schatz DG, Oettinger MA and Schliessel MS V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 359-383.
- Schenten D and Medzhitov R The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Adv Immunol* 2011; 109: 87-124.
- Schleifer KH and Kandler O Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 1972; 36: 407-477.
- Schroder NW, Morath S, Alexander C, et al. Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003; 278: 15587-15594.
- Schuerch DW, Wilson-Kubalek EM and Tweten RK Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 12537-12542.
- Scott NE, Bogema DR, Connolly AM, et al. Mass spectrometric characterization of the surface-associated 42 kDa lipoprotein JlpA as a glycosylated antigen in strains of Campylobacter jejuni. *J Proteome Res* 2009; 8: 4654-4664.
- Scudiero O, Galdiero S, Cantisani M, et al. Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2312-2322.
- Seki E, Tsutsui H, Tsuji NM, et al. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of Listeria monocytogenes in mice. *J Immunol* 2002; 169: 3863-3868.
- Selsted ME and Ouellette AJ Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005; 6: 551-557.
- Shen Y, Naujokas M, Park M and Ireton K InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 2000; 103: 501-510.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782.
- Somolinos M, Espina L, Pagan R and Garcia D sigB absence decreased Listeria monocytogenes EGD-e heat resistance but not its Pulsed Electric Fields resistance. *International journal of food microbiology* 2010;
- Steimle V, Otten LA, Zufferey M and Mach B Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 1993; 75: 135-146.
- Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, et al. The expression of the beta-defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF-kappaB and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of Candida esophagitis. *BMC Immunol* 2009; 10: 36.
- Swaminathan B and Gerner-Smidt P The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 2007; 9: 1236-1243.
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13: 933-940.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-14.
- Talreja J, Kabir MH, M BF, Stechschulte DJ and Dileepan KN Histamine induces Toll-like receptor 2 and 4 expression in endothelial cells and enhances sensitivity to Gram-positive and Gram-negative bacterial cell wall components. *Immunology* 2004; 113: 224-233.

- Thome M, Hofmann K, Burns K, et al. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 1998; 8: 885-888.
- Tilney LG and Portnoy DA Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 1989; 109: 1597-1608.
- Ting JP, Duncan JA and Lei Y How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science* 2010; 327: 286-290.
- Turjanski AG, Vaque JP and Gutkind JS MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 2007; 26: 3240-3253.
- Unanue ER Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev* 1997; 158: 11-25.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S and Cao Z MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7: 837-847.
- Wexler H and Oppenheim JD Isolation, characterization, and biological properties of an endotoxin-like material from the gram-positive organism *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1979; 23: 845-857.
- Whitmarsh AJ and Davis RJ Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996; 74: 589-607.
- Wright S CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433.
- Xu Y, Tao X, Shen B, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 2000; 408: 111-115.
- Yamashita M, Chattopadhyay S, Fensterl V, et al. Epidermal growth factor receptor is essential for Toll-like receptor 3 signaling. *Sci Signal* 2012; 5: ra50.
- Yang X, Chang HY and Baltimore D Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1355-1357.
- Yonekura K, Maki-Yonekura S and Namba K Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 2003; 424: 643-650.
- Zhang L and Falla TJ Potential therapeutic application of host defense peptides. *Methods Mol Biol* 2010; 618: 303-327.
- Zhou B and Zhang ZY The activity of the extracellular signal-regulated kinase 2 is regulated by differential phosphorylation in the activation loop. *J Biol Chem* 2002; 277: 13889-13899.

6.1. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 2.1 Zellkulturmedien, Pufferlösungen | 22 |
| Tabelle 2.2 Enzyme, Stimulantien, Inhibitoren | 23 |
| Tabelle 2.3 Bakterienstämme und Deletionsmutanten | 24 |
| Tabelle 2.4 Inaktivierungsmedien | 25 |
| Tabelle 2.5 RNA Interferenz Sequenzen | 27 |
| Tabelle 2.6 Primer PCR Sequenzen..... | 29 |
| Tabelle 2.7 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte..... | 29 |

6.2. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1.5.1 TLR Signale werden über die Adapterproteine MyD88 und TRIF vermittelt. . | 16 |
| Abbildung 3.1.1 hBD-3 zeigt signifikante antimikrobielle Aktivität gegen <i>L. monozytogenes</i> ... | 31 |
| Abbildung 3.2.1 <i>L. monozytogenes</i> induziert in HUVEC hBD-3..... | 32 |
| Abbildung 3.3.1 Internalin A und B defiziente <i>L. monozytogenes</i> induzieren in HUVEC hBD-3. | 33 |
| Abbildung 3.3.2 Lipase inkubierte, aber nicht inaktivierte <i>L. monozytogenes</i> induzieren in HUVEC hBD-3 und IL-8. | 35 |
| Abbildung 3.3.3 Rekombinantes extrazelluläres Listeriolysin O stimuliert in HUVEC kein hBD-3 oder IL-8..... | 36 |
| Abbildung 3.3.4 Mit Lipofektion transfizierte EGD DNA vermittelt keine hBD-3 Induktion in HUVEC. | 37 |
| Abbildung 3.3.5 Spezifische PAMP für TLR1-6 vermitteln keine hBD-3 Induktion in HUVEC. | 38 |
| Abbildung 3.3.6 <i>L. monozytogenes</i> induzierte hBD-3 Expression wird in HUVEC nicht von MyD88 vermittelt. | 39 |
| Abbildung 3.4.1 Die <i>L. monozytogenes</i> induzierte hBD-3 Synthese in HUVEC ist unabhängig von MEK1/2 und p38..... | 40 |
| Abbildung 3.5.1 Die <i>L. monozytogenes</i> induzierte hBD-3 Synthese in HUVEC ist abhängig von NF-KB..... | 41 |
| Abbildung 4.5.1 Mögliche Induktion von hBD-3 über NOD1 bei Infektion von HUVEC mit <i>L. monozytogenes</i> | 52 |

6.3. Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|------|---------------------------------|-------|---|
| ActA | Actin assembly inducing protein | CIITA | class II major histocompatibility complex |
| ABC | antigen binding cassette | | transactivator |
| AMP | Antimikrobielle Peptide | CFU | colony forming units |
| AP-1 | Aktivator Protein-1 | CPG | Cytosin Phosphat Guanin |
| APC | antigen presenting cells | DNA | deoxyribonucleic acid |
| ATP | Adenosintriphosphat | dNTP | Desoxyribonukleintriphosphat |
| CARD | Caspase Rekrutierungs Domäne | ECGM | endothelial cell growth medium |
| CD | cluster of differentiation | EDTA | ethylen diamin tetra acetate |

| | | | |
|------------------|--|----------------|--|
| ELISA | enzyme linked immuno sorbent assay | LLO | Listeriolysin |
| EBD | Effektor Bindene Domäne | LP | Lipoprotein |
| ERK | extracellular signal related kinase | LPS | Lipopolysaccharid |
| Eth | Ethanol | LTA | lipoteichoc acid |
| Fa | Formaldehyd | LRR | leucine rich repeats |
| FCS | fetal calf serum | MAL | MyD88 adaptor like |
| GPI | glycophosphatidylinositol | MALP | Makrophagen Aktivierendes Lipopeptid |
| hBD | humanes Beta Defensin | MAPK | Mitogen Aktivierte Protein Kinase |
| Hi | Hitzeinaktiviert | MDP | Muramyl Dipeptid |
| HSV | Herpes Simplex Virus | MHC | major histocompatibility complex |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cells | M-MLV | moloney-murine leukaemia virus |
| I κ B | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor | MOI | multiples of infection |
| I κ K | inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase | mRNA | messenger RNA |
| I κ K-NBD | I κ K-NEMO Bindende Domäne | MyD88 | myeloid differentiation primary response gene 88 |
| Inl | Internalin | NaCl | Natrium Chlorid |
| ICE | interleukin-1-beta converting enzyme | NAIP | neuronal apoptosis inhibitory protein |
| IL | Interleukin | NALP | NACHT, LRR and PYD domains-containing protein |
| IPAF | ICE Protease Aktivierender Faktor | NF- κ B | nuclear factor kappa B |
| IRAK | IL-1 receptor associated kinase | NLR | NOD like receptor |
| IRF | Interferon Regulierender Faktor | NOD | Nukleäre Oligomerisierungs Domäne |
| JNK | c-jun N-terminale Kinase | PAMP | pathogen associated molecular pattern |
| LBP | LPS Bindendes Protein | PBS | phosphate buffered saline |
| Lip | Lipase | PCR | polymerase chain reaction |
| | | PDTC | pyrrolidine dithiocarbamate |
| | | PG | Peptidoglykan |

| | | | |
|--------|--|------|---|
| PoliIC | Polyinosinic : polycytidylic acid | TRAM | TRIF related adaptor molecule |
| prfA | Protein Release Factor A | TRIF | TIR domain containing adaptor protein inducing IFN- β |
| PRK | Proteinkinase K | | |
| PRR | pathogen recognition receptor | UV | ultraviolett |
| PYD | Pyridin Domäne | UTR | untranslated region |
| RICK | receptor interacting protein like interacting caspase like apoptosis regulatory protein kinase | | |
| RIG-I | retinoic acid inducible gene I | | |
| RIP | Rezeptor Interagierendes Protein | | |
| RHD | Rel homology domain | | |
| RLR | RIG-I like receptor | | |
| RLT | RNeasy™ lysis buffer | | |
| RNA | ribonucleic acid | | |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase PCR | | |
| siRNA | small interfering RNA | | |
| TAD | Transkriptions Aktivierungs Domäne | | |
| TAE | Tris Acetat EDTA | | |
| TAK1 | TGF- β activated kinase 1 | | |
| TICAM | TIR domain containing molecule 1 | | |
| TIR | toll / interleukin receptor | | |
| TIRAP | TIR associated protein | | |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor | | |
| TLR | Toll like receptor | | |
| TRADD | tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein | | |
| TRAF | TNFR associated factor 6 | | |

7. Anhang

7.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Florian Pröscholdt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Humanes Beta-Defensin 3 bei der Infektion von Humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen mit *Listeria monozytogenes* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7.2. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version
Meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.3. Publikationsliste

Pröscholdt F, Heining S, Powerski M et al. Traumatic dissection of four brain supplying arteries. *Global Spine J* 2014. DOI: 10.1055/s-0034-1366972

Pröscholdt F, Markart M and Ertel W Postoperative radiotherapy in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: prophyllaxis of recurrence after resection of osteophytes from c3 to c5 in a case of dysphagia. *J Surg Case Rep* 2014. DOI: 10.1093/jscr/rjt124

7.4. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. N. Suttorp für die Möglichkeit, meine Arbeit im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Pneumologie und Infektiologie durchzuführen.

Ich bedanke mich besonders bei PD Dr. med. Philippe Dje N'Guessan für die hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung der Arbeit in allen Stadien.

Dem Team der technischen Assistentinnen gilt mein großer Dank für Ihr Engagement bei der technischen und organisatorischen Abwicklung des Laboralltages.

Bei allen Mitgliedern der Forschungsgruppe bedanke ich mich sehr herzlich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit.