

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

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von humanem β 2-Defensin in Darmepithelien - Untersuchungen im Modell mit der epithelialen Zelllinie HT-29

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annekatriin Coordes

aus Oranienburg

Gutachter:

1. PD. Dr. A.-J. Kroesen
2. Prof. Dr. J.C. Kalff
3. PD. Dr. A. Sturm

Datum der Promotion:

29.01.2010

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Coomassie	Coomassie Brilliant Blue R-250
C _T	Crossing Point
Da	Dalton
DAT/DAT.S	Überstand/Sediment nach Bearbeitung von Darmgewebe mit Azetonitril und Trifluoressigsäure
DL	Proteingeesamtlysat des humanen Kolons
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	<i>Dots per Inch</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV-B	Epstein-Barr-Virus transformierte B-Lymphozyten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FCS	Fötales Rinderserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GST	Gluthation-S-Transferase
HBD-2	Humanes β -Defensin
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1Ra	IL-1-Rezeptorantagonist
M _r	Molekulargewicht
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PI	Propidiumiodid
PR	Page Ruler™ Prestained Protein Ladder 11-170 kDa
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-Acetat-NaCl-Puffer
TBST	Tris-Acetat-NaCl-Puffer mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TH	T Helfer
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der enzymatischen Aktivität
ULR	Color Marker Ultra-Low Range, 1.060-26.600 Da

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das intestinale Immunsystem und die epitheliale Barriere.....	1
1.2	Antimikrobielle Proteine und Peptide als lösliche Faktoren der intestinalen Immunität.....	2
1.3	Zytokine und Entzündung im Darm.....	5
1.3.1	Das intestinale Zytokinegleichgewicht	5
1.3.2	Der Tumornekrosefaktor (TNF)- α	7
1.3.3	Das Interleukin (IL)-1	8
1.3.4	Das IL-6	9
1.3.5	Das IL-17	10
1.4	Epitheliale HT-29-Zellen und humanes β -Defensin-2 (HBD-2) als <i>in vitro</i> -Modell für die Untersuchung von Interaktionen im Darm	11
1.5	Fragestellung und Ziele	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	13
2.2	Materialien und Kits.....	14
2.3	Geräte	16
2.4	Rekombinante humane Zytokine und Proteine	18
2.5	Oligonukleotide.....	18
2.6	Plasmide und Bakterien.....	20
2.7	Antikörper	20
2.8	Zelllinien und Patientengewebe.....	21
2.9	Kultur eukaryontischer Zellen	22
2.9.1	Bedingungen, Puffer und Medien	22
2.9.2	Standardzellkultur.....	23
2.9.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
2.9.4	Inkubation von HT-29-Zellen mit Zytokinen	24
2.9.5	Transfektion von Zellen durch Elektroporation.....	25
2.9.6	Durchflusszytometrie.....	25
2.10	Bakterienkultur	26
2.10.1	Medien	26
2.10.2	Transformation und Screening von <i>E. coli</i> TOP10	27
2.11	Molekularbiologie	27
2.11.1	Extraktion der Gesamt-RNA und chromosomaler DNA eukaryontischer Zellen .	27
2.11.2	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	29
2.11.3	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	30

2.11.4	Abbau von DNA bzw. RNA in Nukleinsäurepräparationen.....	30
2.11.5	Synthese komplementärer DNA (cDNA).....	31
2.11.6	Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.11.7	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	33
2.11.8	Quantifizierung von PCR-Produkten im Agarosegel	35
2.11.9	Quantitative TaqMan-PCR	35
2.11.10	Restriktion von DNA	36
2.11.11	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
2.11.12	Ligation von DNA	38
2.12	Proteinbiochemie.....	39
2.12.1	Gesamtzelllysate aus der Kultur	39
2.12.2	Proteinisolierung aus Zellen der Darmmukosa	39
2.12.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure	41
2.12.4	Immunpräzipitation	41
2.12.5	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.12.6	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	44
2.12.7	Western-blot.....	45
2.12.8	Proteinnachweis im Western-blot mit Chemilumineszenz.....	46
2.13	Statistische Auswertung	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Etablierung der Bedingungen für eine HBD-2-spezifische semiquantitative RT-PCR	48
3.1.1	Anzahl von PCR-Zyklen und <i>Annealing</i> -Temperatur	48
3.1.2	Spezifität des Nachweises für HBD-2-mRNA	49
3.1.3	Einfluss des Serumgehalts im Medium auf die Basalexpression von HBD-2	51
3.2	Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine auf die Transkription von HBD-2 durch HT-29-Zellen.....	52
3.2.1	Kinetik der Wirkung von IL-1 β	52
3.2.2	Konzentrationsabhängigkeit der IL-1 β -Wirkung	55
3.2.3	Wirkung von TNF α auf die Transkription von HBD-2 in HT-29-Zellen.....	57
3.2.4	Einfluss von TNF α auf den IL-1 β -Effekt in HT-29-Zellen.....	59
3.2.5	Wirkung von IL-6 auf die Transkription von HBD-2 in HT-29-Zellen.....	60
3.2.6	Wirkung von IL-17 auf die Transkription von HBD-2 in HT-29-Zellen.....	61
3.3	Etablierung einer HBD-2-spezifischen quantitativen TaqMan-PCR und Klonierung für die Expression von HBD-2-EGFP-Fusionsproteinen	63
3.3.1	Strategie.....	63
3.3.2	Klonierung von HBD-2-EGFP-Fusionsproteinen.....	64
3.3.3	Etablierung der Standards für die quantitative TaqMan-PCR.....	66

3.3.4	Korrelation von Gesamt-RNA zur Ausgangszellzahl.....	70
3.3.5	Quantitative TaqMan-PCR zum Nachweis der HBD-2-Expression durch HT-29-Zellen	71
3.4	Etablierung der Bedingungen für den Nachweis von HBD-2 im Western-blot ...	73
3.4.1	Bedingungen für die Proteindarstellung durch SDS-PAGE	73
3.4.2	Titration von Primär- und Sekundärantikörpern im Dot-blot	75
3.4.3	Einfluss der Blockierung der Membran auf die Sensitivität des Western-blots ...	76
3.4.4	Etablierung eines Antikörpers für den Vergleich der Probenmengen	77
3.4.5	Vergleich der HBD-2-spezifischen Antikörper anti-HBD-2/ab und anti-HBD-2/sc79	
3.4.6	Einfluss von Zellproteinen auf die Darstellung von HBD-2 im Western-blot	82
3.5	Nachweis konstitutiv exprimierter und sezernierter HBD-2-EGFP-Fusionsproteine im Western-blot.....	83
3.5.1	Optimierung der Bedingungen für die Transfektion von Zellen mit pEGFP-N2 ..	83
3.5.2	Expression von HBD-2-EGFP durch transfizierte HT-29-Zellen	85
3.5.3	Expression von HBD-2-EGFP durch transfizierte primäre Zellen	86
3.6	HBD-2-spezifische Immunpräzipitation	88
4	Diskussion	91
5	Zusammenfassung	109
6	Literaturverzeichnis.....	111
	Danksagung	125
	Erklärung	126
	Lebenslauf	127

1 Einleitung

1.1 Das intestinale Immunsystem und die epitheliale Barriere

Das zylinderförmige Epithel des Darmtraktes trennt die Bestandteile des Darmlumens vom Körperinneren und stellt mit 200 m² die größte Oberfläche des Menschen dar. Ein komplexes darmassoziiertes immunologisches Geschehen gestattet einerseits die Resorption der Nahrungsbestandteile ins Gefäßsystem, trägt aber andererseits auch zu einer funktionstüchtigen Barriere für Mikroorganismen und Toxine bei. Unter physiologischen Bedingungen werden Pathogene selektiv eliminiert, während apathogene Strukturen wie die Nahrung und die intestinale Mikroflora toleriert werden [Niess, 2008]. Die Darmschleimhaut besteht aus resorptiven Enterozyten, schleimbildenden Becherzellen, enteroendokrinen Zellen und intraepithelialen Lymphozyten. Die darunter liegende Lamina propria ist eine Bindegewebsschicht, in der sich lymphoide Strukturen und Immunzellen wie immunkompetente T-Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophile Granulozyten oder auch antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen befinden [Guseinov, 2008]. Welche dieser Zellen über welche genauen Mechanismen insbesondere an den Funktionen des Darms als Teil des Immunsystems beteiligt sind, ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Untersuchungen.

Unter physiologischen Bedingungen werden luminale Antigene über die mukosale Barriere endozytotisch durch epitheliale Microfold-Zellen, sogenannte M-Zellen, oder dendritische Zellen aufgenommen und gelangen transzytotisch zu den in der Lamina propria befindlichen Lymphfollikeln [Corr, 2008]. In der Lamina propria werden T- und B-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert [Gunzer, 2007]. Aktivierte Lymphozyten gelangen in den Blutkreislauf und können nach Erkennung spezifischer Adhäsionsmoleküle, wie dem Leukozytenfunktions-assoziierten Antigen-1 und dem β 2-Integrin oder den interzellulären Adhäsionsmolekülen-1, -2 und -3, wieder in die Darmwand einwandern [Kellersch, 2006]. Antigene der Nahrung und der intestinalen Flora rekrutieren spezifische, immunkompetente Zellen in die gastrointestinale Schleimhaut. Treten pathogene Mikroorganismen durch das Schleimhautepithel in die Lamina propria ein, wird eine spezifische humorale Immunantwort initiiert. Während B-Lymphozyten in nicht mukosaassoziierten Bereichen des Körpers vorwiegend Antikörper der Subtypen Immunglobulin (Ig)G und IgM produzieren, sezernieren Plasmazellen in der Mukosa IgA, das die empfindliche Schleimhautstruktur des Darmes schützt [Brandtzaeg, 2005].

Physiologisch ist das intestinale Immunsystem balanciert und immunregulatorische Schutzmechanismen verhindern eine überschießende Immunantwort. So findet sich im Vergleich zu Makrophagen des peripheren Blutes auf der Oberfläche intestinaler Makrophagen eine geringere Anzahl für die T-Zellaktivierung notwendiger

kostimulatorischer Moleküle [Rogler, 1998; Platt, 2008]. Ferner zeigen intestinale T-Lymphozyten nach Stimulation des T-Zellrezeptors eine im Vergleich zu peripheren T-Zellen verminderte Proliferationsfähigkeit [Schwarz, 2004]. Ein sensibles Zytokingleichgewicht im Intestinaltrakt wird durch die gleichzeitige Bildung von Interferon (IFN)- γ und Tumor-Nekrosefaktor (TNF)- α durch TH1-Zellen sowie von Interleukin (IL)-4 und IL-5 durch TH2-Zellen aufgebaut [Onoé, 2007]. Eine protektive antiinflammatorische Wirkung wird den von regulatorischen T-Zellen sezernierten IL-10, transformierendem Wachstumsfaktor (TGF)- β und zytotoxischem T-Lymphozyten Antigen-4 zugeschrieben [Izcue, 2006]. Auch dieses sensible Gleichgewicht der Zytokine ist bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gestört [Mankertz, 2007].

Obwohl im Darm eine Vielzahl von Bakterien vorkommt, sind Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen selten. Die Ursachen für diese natürliche Toleranz sind bisher noch nicht vollständig verstanden. In der epithelialen Abwehr pathogener Mikroorganismen kommt einer intakten physikalischen Barriere eine wichtige Rolle zu. Gleichzeitig wirkt die Barriere an der Steuerung z.B. von Immunzellen mit. An der Kommunikation zwischen luminalen Antigenen und mukosalen Entzündungs- und Abwehrzellen sind die Epithelzellen aktiv beteiligt. Sie exprimieren konstitutiv oder induziert membranständige und lösliche Faktoren, die in der mukosalen Immunantwort eine Rolle spielen. Hierzu gehören Zytokinrezeptoren [Pitman, 2000], Chemokinrezeptoren [Dwinell, 1999], Rezeptoren für spezifische bakterielle Produkte wie Toll-like-Rezeptoren [Cario, 2000; Shibolet, 2007], sowie Moleküle der klassischen und nicht-klassischen Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexe [Kagnoff, 1997]. Humane intestinale Epithelzellen sezernieren als Entzündungsantwort chemotaktische Mediatoren für neutrophile Granulozyten und für Monozyten [Reinecker, 1995]. Neben der physikalischen Barriere stellen Epithelien auch eine chemische Barriere dar. Die natürliche Integrität wird u.a. durch antimikrobiell wirksame Proteine und Peptide, zu denen auch die Defensine gehören, erhalten. Diese Moleküle werden auch von Epithelzellen konstitutiv oder reguliert ins Darmlumen sezerniert [O'Neil, 1999].

1.2 Antimikrobielle Proteine und Peptide als lösliche Faktoren der intestinalen Immunität

Antimikrobielle Proteine als Teil einer Immunabwehr wurden erstmals in der Haut des südamerikanischen Krallenfrosches nachgewiesen [Zasloff, 1987] und wurden seither in vielen Spezies und in verschiedenen Organen gefunden. Beim Menschen wurden Lysozym [Chen, 1986], Phospholipase A2 [Qu, 1998] sowie der Proteaseinhibitor

Einleitung

Antileukoprotease [Wingens, 1998; Wiedow, 1998] als antimikrobielle Proteine beschrieben. Ein erstes induzierbares antimikrobielles Peptid aus Säugetieren wurde aus Rindern isoliert und später den sogenannten β -Defensinen zugeordnet [Diamond, 1991; Lehrer, 1993].

Vergleichbare antimikrobielle Peptide wurden auch an inneren und äußeren Oberflächen des Menschen als humane neutrophile Peptide gefunden [Rehaume, 2008]. Sie sind zentrale Bestandteile der angeborenen Abwehr des Menschen und kommen vor allem in Organsystemen wie Lunge, Haut, Auge, Uro- und Gastrointestinaltrakt vor, die als innere oder äußere Oberfläche direkt mit externen Noxen und Antigenen Kontakt haben [Fellermann, 2001]. Die antimikrobiellen Peptide befinden sich in phagozytosefähigen Zellen oder werden auf Schleimhautoberflächen freigesetzt und verhindern dort das Eindringen der Mikroorganismen [Hecht, 1999]. Defensine sind eine große Gruppe kationischer Moleküle, mit Molekulargewichten (M_r) von 3,5-5 kDa. Sie bestehen aus 28-44 Aminosäuren und weisen eine typische Tertiärstruktur mit drei Disulfidbrücken auf. An Hand der Position der Disulfidbrücken unterscheidet man zwischen α -Defensinen (Cysteinreste 1-6, 2-4 und 3-5) und β -Defensinen (Cysteinreste 1-5, 2-4 und 3-6) [Clarke, 2006]. Die humanen Defensine unterscheiden sich bezüglich ihres Vorkommens, ihrer Regulation und der Zielorganismen, bei denen sie ihre antimikrobielle Wirkung entfalten (Tabelle 1).

Der molekulare Mechanismus ihrer antimikrobiellen Wirkung ist noch nicht vollständig verstanden. Man geht davon aus, dass die Defensine aufgrund ihrer polaren Molekülstruktur in Phospholipidmembranen eindringen können und in Komplexen ggf. unter Einbeziehung mikrobieller Membranmoleküle Poren bilden [Wimley, 1994; Ganz 1999; Morgera, 2008; Krishnakumari, 2008]. Induzierbare Defensine sind in entzündeten Epithelien in erhöhter Konzentration vorhanden und werden von gesunden Epithelien kaum produziert [Gallo, 1998]. Neben einem unmittelbaren antimikrobiellen Effekt wirken Defensine chemotaktisch für Immunzellen in subepithelialen Geweben und haben so einen immunmodulatorischen Effekt [Yang D, 1999; Nagaoka, 2008].

Intestinale Epithelzellen bilden die Grenzschicht zum Darmlumen und übernehmen eine wichtige Funktion in der Erhaltung einer funktionstüchtigen Barriere. Das humane β -Defensin (HBD)-1 wird konstitutiv exprimiert und nicht durch inflammatorische Stimuli induziert [Bensch, 1995; Zhao, 1996]. HBD-2 ist im gesunden Darm nicht nachweisbar und seine Bildung wird im Gegensatz zu HBD-1 durch inflammatorische Stimuli induziert [O'Neil, 1999].

Tabelle 1: **Klassifizierung antimikrobieller Peptide des Menschen.** Humanes β -Defensin (HBD).

<i>Defensin</i>	<i>Expression</i>	<i>Zielorganismen</i>	<i>Referenzen</i>
α 1- α 4	Granulozyten		[Selsted, 1985, Wilde, 1989]
α 5	Panethzellen, induzierbar	<i>Escherichia coli (E. coli),</i> <i>Candida albicans,</i> <i>Listeria monozytogenes,</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	[Jones, 1992]
α 6	Panethzellen		[Bevins, 1996]
HBD-1	Epithelzellen, konstitutiv	Gram ⁻ Bakterien	[Bensch, 1995; O'Neil, 1999; Zhao, 1996; Wehkamp, 2002]
HBD-2	Epithelzellen, induzierbar	Gram ^(+/-) Bakterien <i>Candida spec.</i>	[O'Neil, 1999; Harder, 1997; Wehkamp, 2003]
HBD-3	Epithelzellen, induzierbar	Gram ^{+/-} Bakterien, <i>Candida spec.</i>	[Harder, 2001 ; Schibli, 2002; Wehkamp, 2003]
HBD-4	Epithelzellen	Gram ^{+/-} Bakterien, <i>Staphylococcus carnosus,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[Garcia, 2001]

Bei Patienten mit Morbus Crohn bei denen insbesondere das terminale Ileum von der chronischen Entzündung betroffen ist, scheint die Expression von α 5- und α 6-Defensin vermindert sowie beim Befall des Kolons die HBD-2 und HBD-3-Antwort im Vergleich zur Colitis ulcerosa reduziert [Schmid, 2004]. Dies führte zu der Hypothese, dass aufgrund des geringeren Defensin-Anstieges bei Morbus Crohn ein Defekt in der HBD-2-Expression vorliegt und so die epitheliale Abwehr gegenüber kommensalen Mikroorganismen und Pathogenen gestört ist [Wehkamp, 2003]. In Epithelzellen wird das transkriptionell regulierte HBD-2 nach Kontakt mit Gram-negativen Bakterien oder proinflammatorischen Stimuli gebildet. Bei CED sind solche Regelkreise außer Kraft. Zytokine können indirekt über die Rekrutierung Zytokin-sezernierender Entzündungszellen zur Induktion des antimikrobiellen und chemotaktischen HBD-2 durch Darmepithelzellen beitragen (Abbildung 1). Defensine werden zur Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere konstitutiv durch Epithelzellen gebildet und ins Darmlumen sezerniert. Die chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen führt zur Zytokinfreisetzung z.B. durch Makrophagen. Diese Zytokine wiederum induzieren die Expression weiterer, regulierter Defensine und reduzieren so die Anzahl luminaler Bakterien.

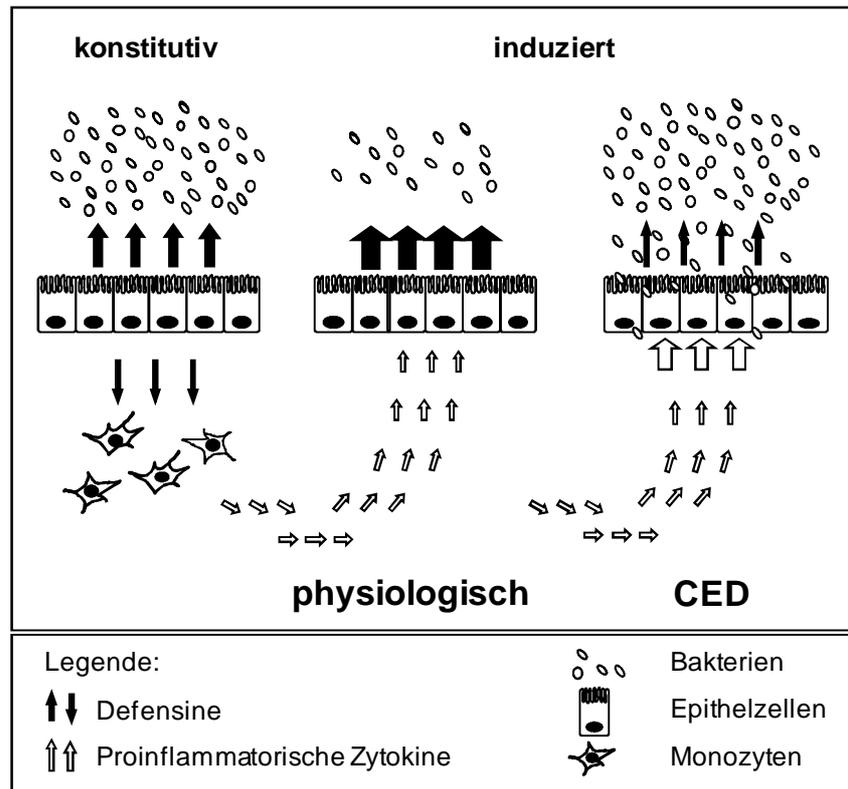


Abbildung 1: **Regulation der Defensine unter physiologischen Bedingungen und bei CED.**

Die Expression der HBD-2-mRNA wurde in kultivierten Epithelzellen der Haut sowie des Respirations- und Gastrointestinaltraktes untersucht. Der genaue Induktionsmechanismus ist bisher unbekannt. Die Inkubation humaner Keratinozyten mit Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien induziert eine HBD-2-mRNA [Schroder, 1999]. Bemerkenswert ist, dass in der Lungenepithelzelllinie A549 Gram-positive Erreger wie *Staphylococcus aureus* erst bei hohen Bakteriendichten von $>10^8/\text{mL}$ zu einer HBD-2-mRNA führen, während *Pseudomonas aeruginosa* dagegen bereits bei geringen Bakteriendichten um $10^3/\text{mL}$ wirksam ist [Harder, 2000].

1.3 Zytokine und Entzündung im Darm

1.3.1 Das intestinale Zytokingleichgewicht

Als Zytokine bezeichnet man eine Gruppe von Proteinen oder Glykoproteinen, die die Proliferation und Differenzierung von Zellen modulieren. Typischerweise haben sie M_r von 8-40 kDa und werden vorwiegend von Zellen des retikuloendothelialen Systems wie z.B. Monozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten zur Immunmodulation und zur Regulierung entzündlicher Prozesse sowie als Antwort auf eine lokale Schädigung gebildet. Sie können aber auch systemisch wirken. Zytokine sind äußerst potent und

Einleitung

erzielen ihre Effekte bei Konzentration von weniger als 10^9 mol/L [Loppnow, 2001]. Die Produktion der Zytokine wird auf transkriptioneller und translationaler Ebene reguliert. Über die Sekretion, die asynchrone Expression membranständiger Zytokinrezeptoren oder die Inaktivierung durch lösliche Rezeptoren und andere Inhibitoren, kann die Zytokinwirkung auch post-translational reguliert werden [Mantovani, 1997].

Generell unterscheidet man proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 α/β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, TNF α und IFN γ von den anti-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. dem IL-1-Rezeptorantagonisten, IL-4, IL-10, IL-11 und TGF β . Im Darm regulieren TH-Zellen über ihre Differenzierung in Subgruppen die Zytokinantwort. Eine durch IL-12 und IL-18 initiierte TH1-betonte Immunantwort hat eine vermehrte Produktion von IFN γ , IL-2 und TNF α zur Folge und begünstigt die zellvermittelte Immunität. TH2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Sie unterstützen die humorale Immunantwort sowie die Hypersensitivitätsreaktionen [Papadarkis, 2000; MacDonald, 2000]. Sowohl TH1- als auch TH2-vermittelte Immunantworten werden durch Antigene induziert und können Entzündungsprozesse auslösen. Das lokale Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokineffekten entscheidet letztlich mit, ob eine Entzündung chronifiziert oder der Patient gesundet. Stabilisierend wirken auf dieses Gleichgewicht die TH17-Zellen [Wang, 2009] und die Treg-Zellen [Mills, 2008]. Bei Patienten mit CED sind die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, TNF α [Fiocchi, 1998], IL-17 [Nielson, 2003] in der entzündeten Darmmukosa deutlich gesteigert, die sowohl an der Initiation als auch an der Chronifizierung der intestinalen Entzündung beteiligt sein können. Die ursprünglich für die Pathogenese angenommene dysregulierte Zytokinantwort durch eine gesteigerte CD4 $^{+}$ -T-Zellaktivierung von TH1-Zellen bei Morbus Crohn und von TH2-Zellen bei Colitis ulcerosa ist inzwischen widerlegt. TH-Subgruppen wie die TH17-Zellen [Schmechel, 2008] und die Treg-Zellen [Saruta, 2007] scheinen an der Chronifizierung der CED beteiligt. So können die unter physiologischen Bedingungen wirksamen protektiven Mechanismen vermittelt durch IL-10 und TGF β in der CED die dysregulierte Zytokinantwort der T-Zellen nicht kontrollieren [Neurath, 2002].

Die genauen Mechanismen, die zu dem komplexen Krankheitsbild der CED beitragen, werden gegenwärtig intensiv untersucht. Eine immunologische Dysregulation, bei der Immunzellen ursächlich an der Pathogenese beteiligt sind, ist die Rationale für den Einsatz von Immunmodulatoren in der Therapie der CED [van Deventer, 1997]. Diese immunmodulatorischen Medikamente greifen in das Zytokinegleichgewicht ein. Neutralisierende Antikörper gegen das zentrale Zytokin TNF α (Infliximab [Behm, 2008] oder Adalimumab [Hanauer, 2006]) oder gegen die p40-Protein-Untereinheit der freien IL-12 und IL-23 (Ustekinumab [Sandborn, 2008]) werden bei Morbus Crohn bereits klinisch eingesetzt, um die die Entzündung unterhaltende Zytokinkaskade zu unterbrechen.

Nachfolgend werden TNF α , IL-1, IL-6 und IL-17 näher vorgestellt, für die ein Zusammenhang an der Regulation humaner intestinaler Immunantworten an der epithelialen Barriere u.a. durch die Induktion antimikrobieller Peptide wie den Defensinen beschrieben wird. Diese Zytokine werden im Zusammenhang mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung der CED diskutiert.

1.3.2 Der Tumornekrosefaktor (TNF)- α

Der TNF α wurde als ein durch Leukozyten produzierter Faktor mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben: Inhibition des *in vitro*-Wachstums von Tumorzellen, Induktion von Nekrosen in transplantierten Tumoren bei Versuchstieren [Carswell, 1975] sowie Hemmung der Expression der Lipoproteinlipase bei chronischen Infektionen und eine damit reduzierte Aufnahme und Speicherung von Triglyceriden durch das Fettgewebe [Kawakami, 1981]. Damit war TNF α eines der ersten überhaupt bekannten Zytokine. Beim Menschen liegt das Gen für TNF α auf Chromosom 6 (6p23-6q12) [Hehlgans, 2005]. Jede Untereinheit des biologisch aktiven Homotrimeren von TNF α hat ein M_r von etwa 17 kDa. Das proinflammatorische TNF α wird überwiegend durch ubiquitär vorkommende Makrophagen produziert [Beutler, 1985]. T-Zellen aus der Lamina propria des Kolons von Patienten mit Morbus Crohn bilden nach Inkubation mit TNF α vermehrt die TH1-Zytokine IL-2, IFN γ und TNF α . Ebenso werden IL-1, ein Plättchen-aktivierender Faktor, Eicosanoide und oxidative Radikale gebildet [Plevy, 1997]. Die Stimulation der TNF α -Sekretion durch TNF α selbst deutet auf den positiven Rückkopplungsmechanismus hin, der zur Chronifizierung der Entzündung beitragen könnte. Ein weiterer Pathomechanismus ist, dass TNF α endogene Matrix-Metalloproteinasen aktiviert, die direkt zur Matrixdestruktion des Darmepithels führen [Wang, 2007]. Eine immunhistochemische Studie zeigte eine erhöhte Dichte von TNF-exprimierenden Makrophagen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [Kanai, 2003]. Beim Morbus Crohn aggregieren TNF-exprimierende Makrophagen in der Submukosa entlang der Arteriolen und Venolen und infiltrieren das Gefäßendothel. Der bekannte prothrombotische Effekt von TNF α auf Endothelzellen kann auch pathomechanistische Bedeutung bei Morbus Crohn haben [Murch, 1993]. Gemeinsam mit INF γ beeinflusst TNF α direkt die Funktion und Struktur der *Tight Junctions* in der epithelialen Barriere [Li, 2008]. Außerdem führt TNF α zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen des Gefäßendothels wie dem interzellulären und vaskulären Adhäsionsmolekül und von E-Selektin, wodurch Leukozyten rekrutiert und entzündliche Infiltrationen unterstützt werden [Wolf, 2001]. TNF α vermittelt seine Wirkung auf zellulärer Ebene durch zwei spezifische Oberflächenrezeptoren, die unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden ansteuern. TNF-Rezeptor 1 wird hauptsächlich durch das

lösliche TNF α aktiviert und führt zur Apoptoseinduktion [Waetzig, 2005], während der TNF-Rezeptor 2 bevorzugt durch das membranständige TNF α aktiviert wird und zur Unterdrückung der Apoptose führt [Shu, 1996]. Im akuten Schub beim Morbus Crohn ist der TNF-Rezeptor 2 auf T-Zellen der Lamina propria und im peripheren Blut hochreguliert. Im Mausmodell geht eine Überexpression des TNF-Rezeptor 2 auf T-Zellen mit einer starken Zunahme der Kolitiszeichen einher. Bei Patienten mit Morbus Crohn stärker als bei Colitis ulcerosa konnte in Darmproben [Raddatz, 2005] und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes erhöhte TNF α -Werte detektiert werden [Sventoraityte, 2008]. Die Therapie mit anti-TNF α -Strategien gehört inzwischen zu den etablierten klinischen Verfahren für Morbus Crohn [Hoffmann, 2006] und Colitis ulcerosa [Stange, 2008, Cottone, 2006]. Der TNF-Antikörper Infliximab bindet membranständiges TNF und induziert Apoptose der aktivierten Lamina propria T-Zellen bei Patienten mit CED [Van den Brande, 2007]. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Wirkung von TNF α und der Expression einer HBD-2-mRNA wurde bisher mit einer Zelllinie aus dem respiratorischen Epithel gezeigt [Harder, 2000]. Zu seiner Wirkung auf Zellen des Darmepithels ist noch nichts bekannt.

1.3.3 Das Interleukin (IL)-1

Das IL-1 gilt als zentraler Mediator im Zytokinnetzwerk und spielt in vielen physiologischen und pathologischen Vorgängen eine wesentliche Rolle. Die Kernmitglieder der IL-1-Familie schließen u.a. zwei Isoformen des Zytokins, IL-1 α und IL-1 β , den IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-Ra), die IL-1-Rezeptoren I und II [Dinarello, 1994] und IL-18 [Dinarello, 1999] ein. Die wesentlichen Funktionen des IL-1 werden durch das membrangebundene IL-1 α und das lösliche IL-1 β vermittelt [Kilian, 1986]. Der IL-1Ra bindet denselben Rezeptor ohne ein Signal zu induzieren [Hannum, 1990]. Diese drei Proteine werden durch Gene kodiert, die auf Chromosom 2 lokalisiert sind [Steinkasserer, 1992]. Die Signalkaskaden über den IL-1-Rezeptor I werden über den *Nuclear Factor- κ B* und das sogenannte *Activating Protein-1* vermittelt. Nach Bindung an den IL-1-Rezeptor II wird keine Signalkaskade aktiviert [Colotta, 1993]. Beide Rezeptorvarianten existieren auch als lösliche Proteine, die membrangebundenes IL-1 α binden können [Wu, 2006]. Überexpression des löslichen IL-1-Rezeptors II induziert Änderungen der Zellmorphologie und fördert die Zellmigration [Chang, 2008]. IL-1 α/β werden als inaktive Proformen von Makrophagen, dendritischen Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten und einigen anderen Zellen konstitutiv exprimiert. Die Caspase-1 ist eine der Proteasen, die IL-1 β aktiviert, indem es das 18 kDa große, reife Protein freisetzt [Ghayur, 1997]. Beide, IL-1 α und IL-1 β spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Erregern. IL-1 induziert die Expression von

Adhäsionsfaktoren wie dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 auf Endothelien für die Migration von Leukozyten, ist an der Entstehung von Schmerz im Gewebe beteiligt und führt als endogenes Pyrogen durch eine Temperaturverstellung im Hypothalamus zu Fieber [Dinarello, 1986]. IL-1 ist auch in die Regulation der Hämatopoese involviert [Dinarello, 1994; Morgan, 2004]. Das proinflammatorische IL-1 und sein Gegenspieler IL-1Ra spielen Hauptrollen in der Regulation von Entzündungen, IL-1Ra beeinflusst den Krankheitsverlauf. Mäuse, die kein IL-1Ra exprimieren, entwickelten spontan Rheumatoide Arthritis [Horai, 2000] und letal-verlaufende Arteritis [Nicklin, 2000]. Die Gabe des IL-1Ra reduzierte den Schweregrad der Erkrankung in verschiedenen Modellen [Dinarello, 1996], auch in Immunkomplex-induzierter Colitis bei Kaninchen [Cominelli, 1992]. Adsorptionsapherese von Granulozyten und Monozyten führte bei Colitis ulcerosa zur vermehrten Expression des IL-1Ra und war mit der Induktion der klinischen Besserung assoziiert [Takeda, 2008]. Mehrere Studien konnten die Abnahme des Verhältnisses zwischen IL-1Ra und IL-1 im Darmgewebe bei zunehmender Krankheitsaktivität bei CED nachweisen [Casini-Raggi, 1995]. Die Inhibition der Translation von IL-1 durch Caspase-1 stellte eine Möglichkeit zur Unterdrückung einer intestinalen Entzündung dar [Siegmond, 2001], der sich in der Klinik bisher nicht durchsetzen konnte. Vorherige Studien haben auf transkriptioneller Ebene einen unmittelbaren induzierenden Effekt von IL-1 β auf die HBD-2-mRNA-Expression in Epithelzellen des Respirationstraktes [Jang, 2004], der Haut [Premratanachai, 2004], des Urogenitaltraktes [King, 2002] und des Intestinums gezeigt [O'Neil, 1999].

1.3.4 Das IL-6

IL-6 ist ein Monomer mit einem M_r von ~25 kDa. Der Genort liegt beim Menschen auf Chromosom 7. Als proinflammatorisches Zytokin wird IL-6 durch eine Vielzahl von Zellen wie aktivierte T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert und hat gleichfalls eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. IL-6 fördert die Reifung von Leukozyten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, reguliert die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen, ist Wachstumsfaktor für Keratinozyten und Mesangiumzellen, oder induziert die Synthese von Proteinen der akuten Phase in der Leber [Heinrich, 2003; Jones, 2005; Fischer, 2006]. Im Kolonepithel ist sowohl beim TH1-regulierten Morbus Crohn als auch bei der eher TH2-regulierten Colitis ulcerosa die IL-6-Expression im Vergleich zu einer darmgesunden Kontrollgruppe erhöht [Atraya, 2000]. IL-6 kann aber auch sporadisch ohne Bezug zum Entzündungsgeschehen vorkommen [Kasugami, 1995]. Durch die Sekretion von IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor sind Makrophagen an der IL-6-vermittelten Apoptoseresistenz

und an der Akkumulation von T-Zellen in der Lamina propria beteiligt. Nach Bindung an seinen membranständigen Rezeptor aktiviert IL-6 den Signaltransduktionsfaktors STAT-3, welcher wiederum die antiapoptotischen Gene bcl-2 und bcl-xl aktiviert. Für Patienten mit Morbus Crohn wurde in T-Zellen aus der Lamina propria die Hochregulation dieser Gene gezeigt, die zur Apoptoseresistenz der Zellen und zur T-Zellakkumulation führen. Dieser Kreislauf ist Bestandteil der chronischen Entzündung. Durch Blockade der IL-6-Signaltransduktion mit Hilfe eines Antikörpers gegen den IL-6-Rezeptor wird die Apoptoseresistenz aufgehoben [Mudter, 2007] und konnte in experimentellen Kolitismodellen bestätigt werden. Die Wirkung des IL-6-Rezeptor-spezifischen Antikörpers ist mit der von TNF-spezifischen Antikörpern vergleichbar. Erhöhte Serumwerte des agonistisch wirkenden löslichen IL-6-Rezeptors wurden bei aktivem Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zur inaktiven Erkrankung nachgewiesen [Mitsuyama, 1995]. Anders als für IL-1 β , wurde in Epithelzelllinien des Darm- und Respirationstraktes kein direkter Einfluss von IL-6 auf die HBD-2-mRNA-Expression gefunden [O'Neil, 1999; Harder, 2000].

1.3.5 Das IL-17

Die IL-17-Familie besteht aus Zytokinen IL-17A-F, wobei man unter IL-17 im engeren Sinne nur IL-17A [Rouvier, 1993] sowie IL-17F versteht. IL-17A ist ein 35 kDa großes Protein. In einem vom TH1/TH2-Schema unabhängigen Differenzierungsprogramm exprimieren erst kürzlich beschriebene TH17-Zellen IL-17, TNF α , Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor und IL-6 [Park, 2005; Harrington, 2005]. Differenzierungssignale für TH17-Zellen sind IL-6 [Mudter, 2007] und TGF β [Veldhoen, 2006; Zhou, 2007]. Der IL-17-Rezeptor wird von myeloiden Zellen, von B- und T-Lymphozyten, von Epithel- und Endothelzellen sowie von Fibroblasten exprimiert. IL-17 induziert in den Zielzellen die Expression von Granulozyten-koloniestimulierendem Faktor, IL-8 und IL-6. Außerdem verstärkt IL-17 die Expression proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1, IL-6, Prostaglandin E2, Cyclooxygenase-2 und Matrixmetalloproteinasen. IL-17 fördert die Granulopoese, unterstützt das Entzündungsgeschehen durch Rekrutierung von Neutrophilen ins Gewebe und stimuliert den Knochen- und Gewebeabbau. In Mausmodellen wird IL-17 mit diversen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Bei den CED wird das proinflammatorische Zytokin IL-17 vermehrt in der intestinalen Mukosa nachgewiesen [Nielson, 2003]. Ob IL-17, wie für eine Zelllinie des respiratorischen Epithels beschrieben, auch im Darmepithel zur unmittelbaren Erhöhung der HBD-2-mRNA führt, ist bisher nicht bekannt [Kao, 2004].

1.4 Epitheliale HT-29-Zellen und humanes β -Defensin-2 (HBD-2) als *in vitro*-Modell für die Untersuchung von Interaktionen im Darm

Die Mukosa des Kolons ist ein aus Krypten bestehendes Epithel, das von der Lamina propria umgeben ist. Sie enthält sowohl ortsständige als auch freie Bindegewebszellen wie Makrophagen und Lymphozyten, welche zur interzellulären Kommunikation bzw. Induktion von Entzündungsprozessen eine Vielzahl an unterschiedlichen Zytokinen und Mediatoren sezernieren können. In den Krypten der Mukosa sitzen Stammzellen, die sich in Abhängigkeit von der Art des Stimulationsreizes zu Enterozyten, Panethzellen oder neuroendokrinen Zellen entwickeln. Das Epithel ist funktionell polarisiert. Die Zelllinie HT-29 stammt aus einem intestinalen Adenokarzinom des Kolons einer 44-jährigen Frau kaukasischer Abstammung und wurde im Jahre 1964 etabliert. Der Tumor hatte den Differenzierungsgrad I [von Kleist, 1975]. HT-29 ist eine adhärenz, als Monolayer, in großen Kolonien wachsende Epithelzelllinie, die eine Verdopplungszeit von 40-60 h hat und keine Depolarisation aufweist [von Kleist, 1975]. Mit diesen Zellen kann ein direkter Einfluss einzelner rekombinanter und hochgereinigter proinflammatorischer Zytokine unter klar definierten experimentellen Bedingungen untersucht werden. Weitere im Epithel vorhandene Zellen, Mediatoren, Bakterien und andere Einflüsse können in diesem System ausgeschlossen werden. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α werden in der Lamina propria insbesondere von Makrophagen, und IL-17 von den TH17-Zellen gebildet. Diese Zytokine bewirken pleiotrope Effekte. Das transkriptionell regulierte HBD-2 gehört zur Gruppe der antimikrobiell und chemotaktisch wirkenden Defensine und wird nach Induktion von den Epithelzellen sezerniert.

1.5 Fragestellung und Ziele

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten im Modell mit der humanen Adenokarzinomzelllinie HT-29 Methoden für den reproduzierbaren Nachweis des direkten Einflusses proinflammatorischer Zytokine auf die HBD-2-Expression in Epithelzellen etabliert und evaluiert werden (Abbildung 2).

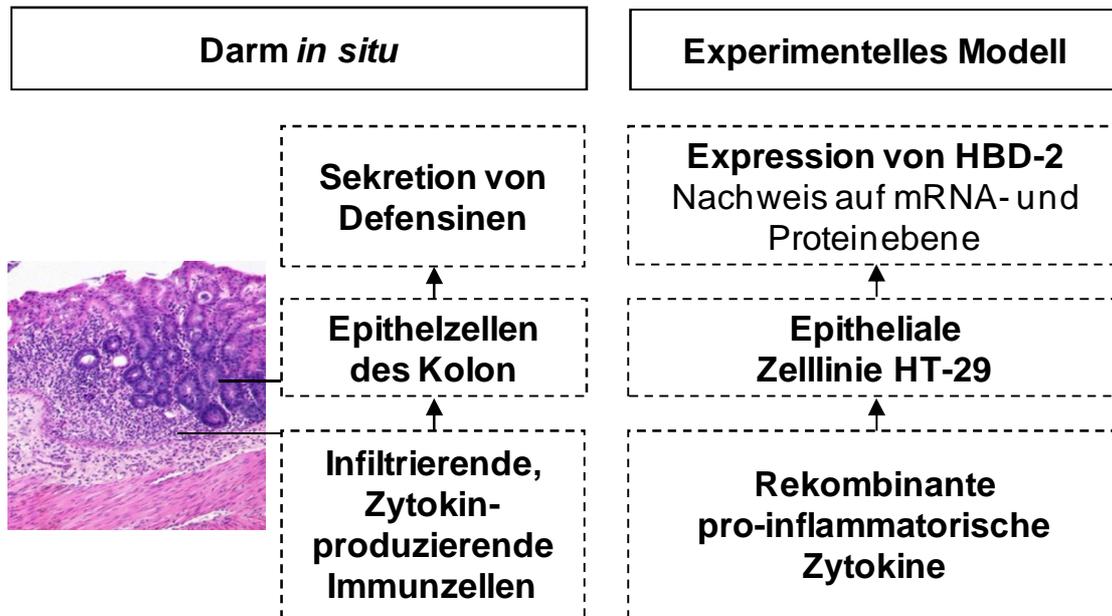


Abbildung 2: **Ableitung des Modells für die Untersuchung des Einflusses einer Entzündung im Darm auf die lokale Expression von HBD-2 durch Epithelzellen.**

Aus den Befunden mit der Zelllinie HT-29 sollte ein konkretes Prozedere für die Untersuchung der HBD-2-Expression in primären Darmepithelzellen auf mRNA- und Proteinebene abgeleitet werden. Dazu wurden folgende Fragen untersucht und die notwendigen Methoden etabliert:

- Unter welchen Bedingungen wird eine HBD-2-Expression durch semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen?
- Ist eine mögliche Wirkung von IL-1 β , IL-6, IL-17 und TNF α auf die Expression der HBD-2-mRNA durch HT-29-Zellen konzentrations- und zeitabhängig?
- Wie kann der quantitative Nachweis der HBD-2-mRNA in kleinen Proben durch TaqMan-PCR standardisiert werden?
- Unter welchen Bedingungen kann ein HBD-2-Protein im Western-blot nachgewiesen werden?
- Aus welchen zellulären und extrazellulären Kompartimenten kann HBD-2 im Western-blot dargestellt werden?
- Kann HBD-2 durch HBD-2-spezifische Immunpräzipitation für die Darstellung des Proteins angereichert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien Reagenzien und Lösungen hatten den höchsten verfügbaren Reinheitsgrad. Für alle Arbeiten mit RNA oder DNA wurde Diethylpyrocarbonat-behandeltes [Fedorcsak, 1966], autoklaviertes voll entsalztes Wasser verwendet, das mit *A. dest.* bezeichnet wird.

2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, DE
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung; 37,5:1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose, Standard für die Molekularbiologie	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Aktivkohle	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, DE
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen, DE
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, DE
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Coomassie)	Merck, Darmstadt, DE
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen, DE
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen, DE
Dithiothreitol (DTT)-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Eisessig	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol; absolut	Merck, Darmstadt, DE
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, DE
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt, DE
Glukose	Merck, Darmstadt, DE
Glycerol	Merck, Darmstadt, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycogenlösung	Roche, Mannheim, DE
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Leupeptin	Fluka, Buchs, CH
L-Glutaminlösung, steril	Biochrom, Berlin, DE
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Merck, Darmstadt, DE
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen, DE
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka Chemie, Buchs, CH
NaN ₃	Merck, Darmstadt, DE

Material und Methoden

Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, DE
Natriumpyruvatlösung, steril	Biochrom, Berlin, DE
OrangeG	Sigma, Deisenhofen, DE
Pefabloc	Roche, Mannheim, DE
Penicillin/Streptomycin-Lösung, steril	Biochrom, Berlin, DE
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4, einfach konzentriert oder als 10-faches Konzentrat (10x PBS)	PAA, Pasching, AT
Phosphatpuffer, pH 7,2	Sigma, Deisenhofen, DE
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen, DE
Propidiumiodid (PI)	MP Biomedicals, Ilkirch, FR
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, DE
Salzsäure	Merck, Darmstadt, DE
Tricin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Base (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, DE
Trypanblaulösung, steril	Biochrom, Berlin, DE
Trypsin/EDTA-Lösung, steril	Biochrom, Berlin, DE
Xylencyanol/Acid blue 147	Sigma, Deisenhofen, DE

2.2 Materialien und Kits

<i>Antarctic Phosphatase</i> mit 10x Phosphatasepuffer	New England Biolabs, Frankfurt/Main, DE
<i>Blotting</i> -Papier, dick	BioRad, München, DE
DNA-Längenstandard; <i>Extended</i> 100 bp (DNA)-Leiter	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DNase I mit 10x Reaktionspuffer und Stopplösung	Promega, Mannheim; DE
Elektroporationsküvette, Weite 2 mm	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Entwicklungsreagenz für Chemilumineszenz; Lumi-LightPLUSLuminol und <i>Enhancer Solution</i>	Roche, Mannheim, DE
Extraktionsreagenz für RNA und DNA peqGOLDTriFast™	Peqlab, Erlangen DE
Faltenfilter Zellulose, mittelschnell filtrierend	Whatman Schleicher & Schüll, Dassel, DE
<i>Fast Optical 96-well Reaction Plate</i> für StepOne Plus, 100 µL	Applied Biosystems, Foster City, US
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, DE

Material und Methoden

Frischhaltetüten	Kofur, Hamburg, DE
Kit für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit Bicinchoninsäure (BCA) einschließlich BSA-Standard	Pierce, Bonn, DE
Kit für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen PureLink Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Kit für die Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> , Nucleobond	Macherey-Nagel, Düren, DE
Kit für die Polymerasekettenreaktion (PCR) Enzym-Reaktionsmix Light CyclerFastStart mit MgCl ₂ -Lösung	Roche, Mannheim, DE
Kit für die reverse Transkription (RT) mit Reverser Transkriptase IM-Prom-II™, 5x RT-Puffer, RNasin Plus RNase-Inhibitor und MgCl ₂ -Lösung	Promega, Mannheim; DE
LB-Agar nach Lennox	Carl Roth, Karlsruhe, DE
LB-Medium nach Lennox	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven, DE
Membran für den Dot-blot; Nitrozellulose	Millipore, Bedford, US
Membran für den Western-blot; Polyvinylidendifluorid (PVDF) WestranS	Whatman Schleicher & Schüll, Dassel, DE
Mikrotiterplatte, 96-Loch, Flachboden, klar	Nunc, Roskilde, DK
Parafilm	American National Can, Greenwich, US
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe, Winsen/Luhe, DE
Polaroid-Filme	Polaroid, Minnetonka, US
Primer/Sonden-Gemisch für quantitative TaqMan® PCR von GAPDH (#4326317E)	Applied Biosystems, Foster City, US
Primer/Sonden-Gemisch für quantitative TaqMan® PCR von HBD-2 (#Hs00823638_m1)	Applied Biosystems, Foster City, US
Protein M _r -Standard; Color Marker Ultra-Low Range (ULR)	Sigma, Deisenhofen, DE
Protein M _r -Standard; Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (PR)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia, Freiburg, DE
Protein G-Sepharose 4B Fast Flow, vorgequollen	Sigma, Deisenhofen, DE
Proteinfreies Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim, DE
Quarzglasküvetten	Hellma, Mülheim, DE
Reaktionsgefäße für RT-PCR; ThermoTube™ PCR Tube 0,2 mL und 0,5 mL	Peqlab, Erlangen, DE
Restriktionsendonukleasen (Restriktasen) <i>Bgl</i> I, <i>Eco</i> RI, und <i>Xho</i> I mit 10x Restriktasepuffer	New England Biolabs, Frankfurt/Main, DE
RNAse A	Qiagen, Hilden, DE
Scraper zum Ablösen adhärenter Zellen von Zellkulturflächen	Nunc, Roskilde, DK
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, DE

Material und Methoden

Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm	Whatman Schleicher & Schüll, Dassel, DE
Stammlösungen von Desoxyribonukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP (dNTP)	Peqlab, Erlangen, DE
T4 DNA-Ligase mit 10x Ligasepuffer	New England Biolabs, Frankfurt/M., DE
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, US
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim, DE
Zellkulturmedien: Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) und RPMI 1640	Cambrex, New Jersey, US
Zellkulturplatten, 6-Loch, Flachboden, Nunclon™Surface	Nunc, Roskilde, DK

2.3 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, DE
Anlage zur Herstellung von VE-Wasser	Millipore, Bedford, US
Autoklav; Varioklav 500E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
Begasungsbrutschrank; BB16	Heraeus, Hanau, DE
Bunsenbrenner; Typ 1040, Erdgas	Usbeck Laborgeräte über Roth, Karlsruhe, DE
Durchflußzytometer; FACScan mit Programm CellQuest™	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Eisbereiter, AF100	Scotsman, Bettolino di Poliano, IT
Elektroporator; Elporator 1.000	Eigenbau Thorsten Stroh
Flachbettscanner; OpticPro 64+ mit Plustek Software OpticTwain	Plustek, Norderstedt, DE
Folienschweißgerät	LKB Wallac, Uppsala, SE
Gefriertrocknungsanlage; Typ Beta 1-8K	Christ, Osterode, DE
Gerät für die Detektion der Chemilumineszenz; LAS 1000 Detektion mit Programm Image Reader	Fujifilm Life Sciences, Düsseldorf, DE;
Gradientenmischer für Polyacrylamidgele	BioRad, München, DE
Horizontal-Schüttler; Typ 3017	GFL, Burgwedel, DE
Inkubator; 400H4	Bachofer, Reutlingen, DE
Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast; Motic AE20	Ricoh, Frankfurt/M., DE
Kammer für vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE); Mini-Protean II mit Gelgießeinrichtung	BioRad, München, DE
Kammern für die horizontale Agarose-Gel-elektrophorese; Model B2	Owl Separation Systems, Portsmouth, US

Material und Methoden

Kühlschrank 4°C	Liebherr, Biberach, DE
Kühlzentrifuge; Biofuge fresco	Heraeus/Kendro, Hanau, DE
Kühlzentrifuge; Megafuge 2.0R	Heraeus/Kendro, Hanau, DE
Magnetrührer; Ikamag RH	IKA, Staufen, DE
Membransaugpumpe	KNF Neuberger, Balterswil, CH
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart, DE
Mixer; Ultraturrax	IKA, Staufen, DE
Mixer, Vortex Reax 2000	Heidolph, München, DE
Multipette mit Combitips	Eppendorf, Hamburg, DE
Oberschalenwaage	Kern, Balingen-Frommern, DE
Peristaltikpumpe; Minipuls 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
pH-Meter; 766 Calimatic mit Einstab-Meßelektrode	Knick, Berlin, DE
Photometer für Mikrotiterplatten mit Auswerte-Programm EasyWinFitting	Tecan Deutschland, Crailsheim, DE
Programm; Adobe PhotoShop 7.0	Adobe Systems, München, DE
Programm; ImageJ, http://rsb.info.nih.gov/nih-image/	National Institutes of Health, Bethesda, US
Real-Time PCR System StepOnePLUS	Applied Biosystems, Foster City, US
Reibschale und Pistill	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Schüttelinkubator; TH25 mit Temperierhaube	Edmund Bühler, Hechingen, DE
Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom; Herasafe 1.8	Kendro, Langenselbold, DE
Spektrophotometer Nanodrop® ND-1000	Agilent Technologies, Böblingen, DE
Spektrophotometer; Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Stromversorger; 2301 Macrodrive 1	LKB, Bromma, SE
Tank-Transfer-Einheit; Hoefer TE 22	Amersham Biosciences
Thermocycler; PTC100	MJ Research, Waltham, US
Thermostatischer Zirkulator; 2219 Multitemp II	LKB Wallac, Uppsala, SE
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr, Biberach, DE
Tiefkühlschrank -80°C	Forma Scientific, Karlsruhe, DE
Transilluminator mit Dunkelschacht und Polaroid-Aufsatzkamera	Kurt Migge Labortechnik, Heidelberg, DE
Schutzschild für ultraviolettes Licht	VWR, Darmstadt, DE
Wasserbad	VWR, Darmstadt, DE
Werkbank für Nukleinsäurearbeiten; Captair bio	Erlab, Köln, DE

2.4 Rekombinante humane Zytokine und Proteine

<i>Protein</i>	<i>Spezifische Aktivität [U/mg]</i>	<i>Stammkonzentration [µg/mL]</i>	<i>Gelöst in</i>
IL-1β	>3x10 ⁷	10	1% BSA in PBS
IL-6	>2x10 ⁷	1.000	PBS
IL-17	k.A.	1.000	PBS
TNFα	>7,2x10 ⁷	100	0,1% BSA in PBS
HBD-2	k.A.	100	10 mmol/L Essigsäure

k.A. - keine Angabe

Die rekombinanten Zytokine und das HBD-2 aus *E. coli* von der Firma Strathmann (Hamburg, DE) lagen als ultragereinigte Lyophilisate vor. Freie Glutathion-S-Transferase (GST) und ein HBD-2-GST Fusionsprotein wurden freundlicherweise durch Andreas Andreou (Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt. Beide Proteine lagen entweder im Lysat transformierter *E. coli* BL21 oder als rekombinante affinitätsgereinigte Proteine mit Konzentrationen von 2,5 mg/mL vor.

Gelöste Proteine wurden in *Aliquots* bei -20°C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Gebrauchslösungen in der gewünschten Endkonzentration des entsprechenden Proteins steril filtriert. Getaute *Aliquots* wurden nur einmal verwendet.

2.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden durch: Promega (Mannheim; DE; #), MWG Biotech (Ebersberg, DE; §), TIB Molbiol (Berlin, DE; ¶) oder Invitrogen (Karlsruhe, DE; †) hergestellt und hatten eine für die RT-PCR geeignete Reinheit. N steht für eine beliebige Base (A, C, G oder T; ‡), GAPDH steht für Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (§§). Die Stammlösungen der Oligonukleotide mit 500 µg/mL für die RT und 10 µmol/L für die PCR wurden bis zur Verwendung in *Aliquots* bei -20°C aufbewahrt. Getaute *Aliquots* wurden nur einmal verwendet.

Material und Methoden

In den Vektor pCR2.1-TOPO klonierten DNA-Fragmente wurden durch die Firma Seqlab (Göttingen, DE) unter Verwendung der M13 reverse oder M13 forward Primer sequenziert.

Template	Name	Sequenz (5' -> 3')/Hersteller
mRNA	Oligo-dT ₁₅ [#]	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	Random Hexamer [#]	NNNNNN [†]
GAPDH ^{††}	sense [§]	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
	antisense [§]	GAAGATGGTGATGGGATTC
HBD-2	sense [¶]	GATCCCATGAGGGTCTTGTATCTC
	antisense [¶]	GGCCTTCTTGGCCTCCTCATGGC
	sense <i>Bgl</i> [†]	CCTCTTCCAGGAGATCTTATGGGTATAGGCG
	sense <i>Xho</i> [†]	GCTCCCAGCCTCGAGCCATGAGGGTC
	antisense <i>Eco</i> [†]	GCAAAAAGCCAGAATTCGGCCAAGAAGC
pCR2.1-TOPO	M13 forward [†]	GTA AACGACGGCCAG
	M13 reverse [†]	CAGGAAACAGCTATGAC

Spezifische Primer/Sonden-Gemische für humane GAPDH und HBD-2 zur Verwendung in der quantitativen TaqMan-PCR mit dem StepOne Plus Thermocycler wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, US) bezogen (Abbildung 3).



Abbildung 3: Lage der Bindungsstellen von Primern und Sonden für HBD-2 und GAPDH bezogen auf die spezifische mRNA und die entsprechenden chromosomalen Abschnitte. Die Linien stehen für nicht kodierende Bereiche und die Rechtecke für die Exons.

2.6 Plasmide und Bakterien

<i>Plasmid</i>		<i>pCR2.1-TOPO (pCR2.1)</i>	<i>pEGFP-N2 (pEGFP)</i>
Eigenschaften	Replikationsursprung	ColE1, f1	ColE1, f1, SV40
	Resistenzen	Ampicillin, Kanamycin	Ampicillin, Neomycin
	Promotor	P _{lac}	P _{CMV}
Anwendung		Sequenzierung klonierter cDNA	Konstitutive Expression in eukaryontischen Zellen
Hersteller		Invitrogen, Karlsruhe, DE	BD Biosciences, Heidelberg, DE

Für die Vermehrung von Plasmiden wurden Transformations-kompetente *E. coli* TOP10 (Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ) der Firma Invitrogen (Karlsruhe, DE) verwendet. Alle Arbeiten in der Sicherheitsstufe 1 nach Gentechnik-Gesetz/-Sicherheitsverordnung wurden in der gentechnischen Anlage der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie am Campus Benjamin Franklin (Aktenzeichen: VC II2-21/91) durchgeführt.

2.7 Antikörper

Primäre Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Herkunft, Subtyp Klon</i>	<i>Hersteller; Bestellnummer</i>	<i>Bezeichnung</i>
HBD-2	Ziege, IgG polyklonal	Abcam, Cambridge, UK; ab9871	anti-HBD-2/ab
	Ziege, IgG polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US; sc10584	anti-HBD-2/sc
Zytokeratin	Maus, IgG1 Klon KL-1	Beckman Coulter, Marseille, FR; IM1077	anti-Zytokeratin
β-Aktin	Kaninchen, IgG polyklonal	BioVision, MountainView, US; 3597-100	anti-Aktin/bv
	Maus, IgG1 Klon AC-15	Sigma-Aldrich, St Louis, US; A-5441	anti-Aktin/AC

Sekundäre Antikörper

Alle Antikörper waren polyklonal und mit Meerrettich-Peroxidase (POD) konjugiert.

<i>Antigen</i>	<i>Herkunft Subtyp</i>	<i>Hersteller; Bestellnummer</i>	<i>Bezeichnung</i>
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege F(ab') ₂ -Fragmente	Jackson ImmunoResearch West Grove, US; 111-036-045	anti-Kanin
Maus IgG	Kaninchen IgG	Dako, Hamburg, DE; P0161	anti-Maus
Ziege IgG (H+L)	Esel IgG	Jackson ImmunoResearch West Grove, US; 705-035-003	anti-Ziege

Alle primären und sekundären Antikörper waren affinitätsgereinigt und wurden bis zur Verwendung in *Aliquots* bei -20°C aufbewahrt. Sekundäre Antikörper waren polyklonal und mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert.

2.8 Zelllinien und Patientengewebe

<i>Zellen/Zelllinien</i>	<i>Spezies</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Referenz</i>
U937 ATCC CRL-1593.2	Mensch	Histiozytisches Lymphom	[Sundstrom, 1976]
HT-29 ATCC HTB-38	Mensch	Kolorektales Adenokarzinom	[von Kleist, 1975]
EBV-B	Mensch	Epstein-Barr-Virus transformierte B-Lymphozyten	[Oh, 2003]
Prädipozyten aus dem mesenterialen Fett	Maus	Frisch isoliert aus weiblichen C57BL/10 Mäusen	[Batra, 2007]
3T3-L1 ATCC CL-173	Maus	Embryonale Fibroblasten	[Green, 1974]
CFSC	Ratte	Hepatische Sternzellen aus zirrhotischer Leber	[Greenwel, 1991]

ATCC - American Type Culture Collection;

Primäre Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett und Epstein-Barr-Virus -transformierte B-Lymphozyten (EBV-B) wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppen von PD Dr. Britta Siegmund (Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Rheumatologie und Infektiologie, Campus Benjamin Franklin, Charité) und Prof. Dr. Christoph Loddenkemper (Institut für Pathologie/Research Center ImmunoSciences, Campus Benjamin Franklin, Charité) zur Verfügung gestellt. Nicht-maligne Epithelzellen aus dem Kolon einer Patientin mit akutem Abdomen nach Hybrid-Bildung wurden aus einem aus therapeutischen Gründen resektierten Darmabschnitt isoliert der nicht eigens zum Zweck dieser Untersuchung entnommen wurde. Ein entsprechendes Votum der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin lag vor. Darmresektate eines Schweins standen aus einem Versuch zum Zweck der *in-situ*-Ablation und operativen Therapie von Leber- und Lungenmetastasen mit dem Aktenzeichen des Tierversuchsvorhabens L 0122/06 zur Verfügung.

2.9 Kultur eukaryontischer Zellen

2.9.1 Bedingungen, Puffer und Medien

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter keimarmen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgten die Zentrifugationsschritte für 5 min bei 350 g und 4°C.

Bei 37°C aufgetautes FCS wurde zur Inaktivierung des Komplements mit Hitze für 30 min bei 56°C behandelt und bei -20°C aufbewahrt.

PBS, pH 7,2:	137 mmol/L NaCl 2,7 mmol/L KCl 10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 1,8 mmol/L KH ₂ PO ₄
Trypanblaulösung:	0,05% Trypanblau in PBS
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,5% Trypsin 0,2% EDTA in PBS
Penicillin/Streptomycin-Lösung	10 ⁵ U/mL Penicillin 10 mg/mL Streptomycin in PBS
L-Glutaminlösung:	200 mmol/L L-Glutamin in PBS
Natriumpyruvatlösung	100 mmol/L Natriumpyruvat in PBS
Einfriermedium:	80% FCS 20% Dimethylsulfoxid steril filtriert durch Spritzenvorsatzfilter

Material und Methoden

Grundmedium:	DMEM mit 4,5 g/L Glukose und 25 mmol/L 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure 2 mmo/L L-Glutamin 1 mmo/L Natriumpyruvat 10 ³ U/mL Penicillin 10 ³ µg/mL Streptomycin
Standardmedium:	Grundmedium 10% FCS
Reduktionsmedium:	Grundmedium 0,2% FCS
Standardmedium RPMI:	RPMI 1640 mit 1,8 g/L Glukose und 25 mmol/L 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure 10% FCS 2 mmo/L L-Glutamin 1 mmo/L Natriumpyruvat

2.9.2 Standardzellkultur

Adhärente Zellen wachsen *in vitro* als einschichtige Zellschicht, die u.a. über Integrine, Mg²⁺-abhängige Adhäsionsmoleküle, fest an die Plastikoberfläche der Kulturgefäße angeheftet sind. Optimale Bedingungen für die Zellteilung herrschen, wenn die Zellen abgelöst und mit geringerer Dichte in neue Zellkulturgefäße überführt werden, bevor der Zellrasen lückenlos, d.h. konfluent, erscheint. Der Ablöseprozess wird durch Serumentzug, Chelatbildung zweiwertiger Metallionen mit EDTA und selektive Proteinspaltung mit Trypsin erleichtert. Für die Herstellung nicht-limitierender Kulturbedingungen wird periodisch das Medium erneuert und die Zellkonzentration neu eingestellt. Wie die meisten Vitalitätstests basiert auch die Färbung mit Trypanblau auf der veränderten Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen. Der kolloidale Farbstoff lagert sich in das Zytoplasma toter Zellen und färbt diese blau. Vitale, weiß erscheinende Zellen können lichtmikroskopisch in einer Zählkammer nach Neubauer gezählt werden [Lindl, 2000].

Die Zellkulturen wurden alle drei bis vier Tage passagiert. Die adhärent wachsenden Zellen der Zelllinien HT-29, 3T3-L1 und CFSC waren nach dieser Zeit präkonfluent. Das Kulturmedium wurde abgenommen, der Zellrasen einmal mit 10 mL PBS gespült und mit 2,5 mL Trypsin/EDTA-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ablöseprozess wurde mikroskopisch verfolgt und durch die Zugabe von 7,5 mL Standardmedium unterbrochen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und neue Kulturen mit 1,5x10⁶ Zellen/15 mL frischem Standardmedium in Zellkulturflaschen eingesetzt.

Bei Kulturen der Suspensionszelllinien U937 und EBV-B wurden das verbrauchte Kulturmedium abzentrifugiert, dekantiert und die Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/mL in Zellkulturflaschen mit frischem Standardmedium RPMI überführt und aufrecht stehend inkubiert. Alle Zellen wurden bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ und 37°C in einem Brutschrank kultiviert.

Für die Zellzählung wurden 50 µL Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung gemischt. Das Gemisch wurde in eine Zählkammer nach Neubauer übertragen und die Zellen wurden innerhalb von 10 min im Phasenkontrastmikroskop gezählt. In der Standardzellkultur und bei den in den Experimenten verwendeten Zellen betrug die Vitalität der Zellen immer >95%.

2.9.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Beim Einfrieren der Zellen unterstützt Dimethylsulfoxid enthaltendes Medium das langsame, schrittweise Abkühlen und minimiert die Bildung von Eiskristallen innerhalb und außerhalb der Zellen sowie die damit verbundene Schädigung der Zellen [Lindl, 2000].

Abgelöste Zellen der Standardkultur oder Suspensionszellen (4×10^6) in 750 µL eiskaltem Standardmedium wurden mit 750 µL Einfriermedium in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt und diese sofort bei -80°C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte über flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen zunächst bei 37°C im Wasserbad so weit getaut, dass ein gefrorener Kern sichtbar war. Die Zellsuspension wurde mit 7 mL eiskaltem Standardmedium gemischt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 mL des entsprechenden Standardmediums resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen für die Kultur in Zellkulturflaschen angesetzt.

2.9.4 Inkubation von HT-29-Zellen mit Zytokinen

Kurzzeitige Serumreduktion bis maximal 72 h erhöht signifikant den Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase, begrenzt die mitotische Aktivität der Zellen und synchronisiert so den Zellzyklus [Kues, 2000; Cooper, 2003].

Für die Inkubation mit Zytokinen wurden $1,5 \times 10^5$ HT-29-Zellen mit 3 mL Standardmedium in jede Vertiefung von 6-Loch-Platten gegeben. Nach 72 h waren ungefähr 60% der Zellkulturfläche bedeckt. Der Zellrasen wurde mit Grundmedium gewaschen und mit 3 mL Reduktionsmedium über Nacht inkubiert. Bei Untersuchungen mit Reduktionsmedium wurde am Folgetag 1 mL Medium abgenommen und 1 mL Reduktionsmedium mit

Zytokinen in doppelter Konzentration der gewünschten Endkonzentration dazugegeben. Bei Untersuchungen mit Standardmedium wurde das Medium vollständig abgenommen und 2 mL Standardmedium mit Zytokinen in der gewünschten Endkonzentration hinzugegeben. Entsprechend der Versuchsanordnung wurden die Kulturen inkubiert. Der Überstand der Ansätze wurde abgenommen, nach dem Überführen in ein Reaktionsgefäß bei 16.000 g zellfrei zentrifugiert und in *Aliquots* bei -80°C aufbewahrt. Für Expressionsuntersuchungen wurde aus den abgelösten Zellen die Gesamt-RNA/DNA isoliert oder Gesamtlysate der Zellen für den Proteinnachweis hergestellt.

2.9.5 Transfektion von Zellen durch Elektroporation

Elektrische Gleichstromimpulse mit hoher Feldstärke machen die Zellmembran durchlässig für Makromoleküle, wie z.B. Plasmid-DNA, die so unspezifisch in die Zelle aufgenommen werden kann [Potter 1988].

Elektroporationspuffer: 90 mmol/L Phosphatpuffer, pH 7,2
10 mmol/L MgCl₂
50 mmol/L Glukose

Jeweils 1×10^6 Zellen in Suspension wurden in 1 mL Elektroporationspuffer aufgenommen, mit 1 µg Plasmid-DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette mit einer Lücke von 2 mm in einen Elektroporator überführt. Nach der Poration mit einfachen oder doppelten Rechteckimpulsen unterschiedlicher Stärke und Dauer wurden die Zellen 1 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden sie mit weiteren 2 mL Standardmedium in eine 6-Loch-Platte überführt und diese 48 h inkubiert. Überstände wurden abgenommen, zellfrei zentrifugiert und in *Aliquots* bei -80°C aufbewahrt. Abgelöste Zellen wurden direkt für die durchflusszytometrische Bestimmung der EGFP-Expression verwendet oder für die Darstellung der Proteine lysiert.

2.9.6 Durchflusszytometrie

Zellen aus einer Suspension werden hydrodynamisch durch eine Kapillare einzeln, an einer Laserquelle vorbeigeführt. Der einfallende Lichtstrahl wird durch die Zellen abgelenkt, gestreut und bildet so Granulierung bzw. Größe untersuchter Zellen ab. Zellgebundene fluoreszierende Farbstoffe geben nach der Anregung Licht ab, dessen Intensität proportional zur Menge des fluoreszierenden Stoffes ist. PI diffundiert durch nicht mehr intakte Membranen, lagert sich in die chromosomale DNA ein und gibt so Aufschluss über die Vitalität von Zellen aus Kulturen [Raffael, 1982].

Material und Methoden

FACS-Puffer:	0,5% BSA 0,01% NaN ₃ in PBS, pH 7,4
PI-Lösung:	50 µg/mL PI in FACS-Puffer

Für einen Ansatz wurden 1×10^5 Zellen mit 2 mL kaltem FACS-Puffer gewaschen. Die Waschlösung wurde durch Zentrifugation entfernt. Das Zellsediment wurde mit 50 µL PI-Lösung resuspendiert und bei Dunkelheit 10 min auf Eis inkubiert. Für die durchflusszytometrische Messung wurde die Zellsuspension mit 500 µL FACS-Puffer aufgefüllt. In die Auswertung der EGFP-Expression wurden nur die Zellen betrachtet, die kein PI aufgenommen hatten. Die bei hoher Expression in den zweiten Fluoreszenzkanal einfallende Strahlung wurde bei allen Ansätzen in die Auswertung mit einbezogen.

2.10 Bakterienkultur

2.10.1 Medien

LB-Medium:	5 g/L Hefeextrakt 5 g/L Trypton 5 g/L NaCl
LB-Agar:	5 g/L Hefeextrakt 5 g/L Trypton 5 g/L NaCl 15 g/L Agar
Ampicillinlösung:	100 mg/mL Ampicillin in <i>A. dest.</i>
Kanamycinlösung:	10 mg/mL Kanamycin in <i>A. dest.</i>
Selektionsagar:	LB-Agar 100 µg/mL Ampicillin oder 30 µg/mL Kanamycin
Selektionsmedium :	LB-Medium 100 µg/mL Ampicillin oder 30 µg/mL Kanamycin
SOC-Medium:	20 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 mmol/L NaCl 2,5 mmol/L KCl 10 mmol/L MgCl ₂ 10 mmol/L MgSO ₄ 20 mmol/L Glukose

LB-Medium und LB-Agar wurden 25 min bei 121°C und 1 atm Überdruck autoklaviert. Danach lagen die pH-Werte zwischen 7,2 und 7,6. Antibiotika-Stammlösungen wurden durch einen Membranfilter steril filtriert und in *Aliquots* bei -20°C aufbewahrt. Zur Herstellung der Platten mit LB-Agar wurden 15 mL auf ca. 65°C vortemperiertes

Agarmedium in Petrischalen (\varnothing 10 cm) pipettiert. Für die Selektionsmedien wurden die Antibiotika in den flüssigen, vortemperierten LB-Agar gegeben.

2.10.2 Transformation und Screening von *E. coli* TOP10

Ringförmig geschlossene Plasmid-DNA tritt in einem Hitzeschritt durch die veränderte Membran chemisch vorbehandelter, kompetenter *E. coli* in die Zelle über [Hanahan, 1983]. Auf antibiotikahaltigen Kulturmedien wachsen nur solche Bakterienzellen zu Kolonien aus, die mit dem Plasmid auch eine Antibiotikaresistenz aufgenommen haben [Cohen, 1975].

Kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis getaut und zu 25 μ L Bakteriensuspension wurde maximal 1 μ g zu transformierende DNA pipettiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis, dann exakt 90 sec in ein Wasserbad bei 42°C und sofort wieder für 60 sec auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 μ L SOC-Medium wurden die Ansätze bei 37°C unter Schütteln 1 h bei 220 rpm inkubiert. Aus den Transformationsansätzen wurden 20 oder 100 μ L Bakteriensuspension auf Selektionsagar mit Ampicillin oder Kanamycin und auf LB-Agar ausgestrichen und die Petrischalen über Nacht bei 37°C inkubiert.

Antibiotikaresistente Einzelkolonien wurden auf Selektionsagar und in Kulturen mit 2 mL Selektionsmedium überführt. Beides wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkulturen, aus denen anschließend die Plasmid-DNA präpariert wurde, wurden mit 230 rpm geschüttelt.

2.11 Molekularbiologie

2.11.1 Extraktion der Gesamt-RNA und chromosomaler DNA eukaryontischer Zellen

Wegen der allgegenwärtigen RNasen und der Labilität einzelsträngiger RNA werden (i) alle Arbeitsschritte auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, (ii) Diethylpyrocarbonat-behandeltes *A. dest.* und (iii) RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet, (iv) Reaktionsgefäße vor dem Öffnen kurz anzentrifugiert und (v) nach der Zellyse starke Scherkräfte vermieden. Alle Reagenzien waren durch den Hersteller auf Endonukleasefreiheit getestet. Flächen und Geräte wurden vor Beginn der Arbeit mit Methylethylketon-vergälltem Ethanol (70%) dekontaminiert. Wenn nicht anders vermerkt wurden alle Zentrifugationsschritte jeweils bei 16.000 g und 4°C durchgeführt.

Mit einer phenolhaltigen Lösung und Chloroform werden in einem Schritt Zellmembranen lysiert und die Proteine denaturiert. Ein Drei-Phasengemisch entsteht. In der oberen wässrigen Lösung liegt die RNA gelöst vor. Die Interphase und die untere organische

Material und Methoden

Phase enthalten die DNA und die Proteine der Zellen. Mit dem hier verwendeten Extraktionsreagenz kann aus dem gleichen Untersuchungsmaterial die chromosomale DNA präpariert werden. Die Gesamt-RNA, einschließlich der mRNA, verbleibt in einem Komplex mit dem chaotropen Salz Guanidin-Thiocyanat in der oberen Phase. Die RNA der wässrigen Phase werden z.B. mit Ethanol präzipitiert [Chomczynski, 1987]. Die Effizienz der RNA-Präzipitation kann insbesondere bei geringen Nukleinsäurekonzentrationen (<10 µg/mL) durch definierte Zugabe von Transfer-RNA, Glykogen oder linearem Polyacrylamid verbessert werden [Lottspeich, 1998].

Extraktionsreagenz:	enthält Guanidinisothiocyanat und Phenol (firmeneigene Rezeptur)
75% Ethanol:	75% Ethanol absolut mit <i>A. dest.</i>
Glycogenlösung:	35 mg/mL Glycogen in <i>A. dest.</i>
Waschlösung:	100 mmol/L Natriumcitrat in 10% Ethanol
NaOH-Lösung:	8 mmol/L NaOH

Aus den Zellkulturansätzen in 6-Loch-Platten wurde das Medium mit einer Pipette abgenommen und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. In jede Vertiefung wurde 1 mL des Extraktionsreagenz gegeben und die Lyse der Zellen durch Pipettieren unterstützt. Die Zelllysate wurden in Reaktionsgefäße überführt. Bei Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit von Zytokinwirkungen wurden alle Proben an dieser Stelle zunächst bei -80°C eingefroren und gemeinsam weiter verarbeitet.

Nach der Zugabe von 200 µL Chloroform, kurzem Schütteln von Hand (15 sec) und 5 min Inkubation wurden die Proben zentrifugiert. Von der farblosen wässrige Oberphase wurden vorsichtig ca. 400 µL abgenommen und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit 2 µL Glycogenlösung und 500 µL Isopropanol überführt. Nach einer Inkubation bei -20°C über Nacht wurden die Ansätze 15 min zentrifugiert und der Überstand bis auf einen Rest von ungefähr 100 µL abgesaugt. Das Pellet wurde zweimal mit 1 mL 75% Ethanol gewaschen und dazu jeweils 10 min zentrifugiert. Die Waschlösung wurde vollständig abgesaugt und das Pellet in 50 µL *A. dest.* 30 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen gelöst. Für die weiteren Untersuchungen wurde die RNA-Konzentration bestimmt, ein Teil mit *A. dest.* auf 150 µg/mL eingestellt und in *Aliquots* verteilt. Jeweils ein *Aliquot* wurde sofort in cDNA umgeschrieben und der Rest der Präparation bei -20°C aufbewahrt.

Nach Entfernung der farblosen wässrigen Oberphase wurden auf Interphase und organische Phase 150 µL Ethanol gegeben. Nach kurzem Schütteln wurden sie 15 min bei 2.000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 1 mL 100 mmol/L Waschlösung gewaschen, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min bei

2.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde es einmal mit 2 mL 75% Ethanol bei Raumtemperatur 15 min inkubiert und zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurde das DNA-Pellet unter der Werkbank 10 min im Luftstrom getrocknet, in 300 µL NaOH-Lösung aufgenommen und die DNA-Lösungen bei -20°C aufbewahrt.

2.11.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmide sind extrachromosomale, zirkuläre DNA-Moleküle, die u.a. als Vektoren für die Klonierung verwendet werden. Für die Vermehrung in Bakterien enthalten sie neben einem Resistenzgen eine Sequenz, die eine autonome Replikation des Plasmids in Bakterienzellen ermöglicht. Werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen kann die kleine, verknäulte Plasmid-DNA durch sukzessive Fällungsschritte und Bindung auf eine modifizierte Silicagel-Matrix von anderen Zellbestandteilen selektiv abgetrennt werden [Birnboim, 1979].

Resuspensionspuffer	50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0 10 mmol/L EDTA 100 µg/mL RNase A
Lysepuffer:	200 mmol/L NaOH 1% SDS
Neutralisierungspuffer:	2,8 mol/L Kaliumacetat, pH 5,1
Waschpuffer AW:	Waschpuffer (firmeneigene Rezeptur)
Waschpuffer A4:	Ethanolhaltiger Waschpuffer (firmeneigene Rezeptur)
Elutionspuffer:	10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,5 10 mmol/L EDTA

Alle Puffer stammten aus einem Kit für die Plasmid-Präparation. Zwei Milliliter einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden 1 min zentrifugiert und das Sediment in 250 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Unter Vermeidung von Scherkräften wurden die Zellsuspension mit 250 µL Lysepuffer gemischt, bis eine durchsichtige, visköse Lösung entstand und anschließend 300 µL Neutralisierungspuffer hinzugegeben. Die Ansätze wurden 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine Säule mit DNA-bindender Silicagel-Matrix pipettiert, 1 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die Säule wurde erst mit 500 µL Waschpuffer AW, dann einmal mit 600 µl Waschpuffer A4 gewaschen und zwischendurch jeweils 1 min zentrifugiert. Die nahezu trockene Säule wurde nochmals 1 min zentrifugiert. Danach wurden 50 µL Elutionspuffer auf die Säule pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Plasmid-DNA durch 1 min Zentrifugation eluiert. Diese

Material und Methoden

Reaktionspuffer (10x):	400 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0 100 mmol/L MgSO ₄ 10 mmol/L CaCl ₂ .
Stopplösung:	20 mmol/L EGTA, pH 8,0
RNAse A:	100 mg/mL RNAse A in PBS

Jeweils 5 µg RNA in Lösung wurden mit 2 µL Reaktionspuffer und 2 µL DNase I bzw. 4 µL RNase A gemischt. Das Volumen der Reaktionsansätze wurde mit *A. dest.* auf 20 µL aufgefüllt. Die Ansätze wurden 60 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 2 µL Stopplösung 10 min bei 65°C inkubiert. Der Erfolg des DNA- bzw. RNA-Verdaus wurde mit Hilfe einer HBD-2-spezifischen RT-PCR geprüft.

2.11.5 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Als Matritze für DNA-abhängige DNA-Polymerasen muss die mRNA zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben werden. Der dabei entstehende Doppelstrang erhöht gleichzeitig die Stabilität der aus den Zellen gewonnenen mRNA [Dina, 1973]. DNA-Polymerasen benötigen für den Start der Synthese eines komplementären Stranges kurze doppelsträngige Abschnitte, die man durch die Zugabe Matritzen-spezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer erhält. Oligo(dT)₁₅ binden an eine für eukaryontische mRNA charakteristische Sequenz aus 50 bis 200 Adenosin-Nukleotiden am 3'-Ende [Dina, 1974]. Random-Hexamer ist ein Gemisch aus Hexanukleotiden unterschiedlicher Sequenz, die zufällig an RNA-Abschnitte binden und so zu einem Pool unterschiedlich langer cDNA führen.

Um bei den eingesetzten geringen Volumina der einzelnen Ansätze eine Gleichverteilung in allen Reaktionsansätzen zu sichern, wurden alle konstanten Reaktionsbestandteile vorgemischt und diese Gemische auf die Ansätze verteilt. Insgesamt 1,25 µg Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 8,6 µL in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Alle Ansätze erhielten 1 µL Primer-Mix, wurden 10 min bei 70°C im Thermocycler denaturiert und dann auf 4°C abgekühlt. Auf jeden Ansatz wurden 10,4 µL RT-Mix pipettiert und die Reaktionen 10 min bei 25°C zur Anlagerung der Primer an den RNA-Strang und 60 min bei 42°C zur cDNA-Synthese inkubiert. Die RT wurde abschließend durch Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 70°C gestoppt. Die Reaktionsansätze wurden unmittelbar nach der RT in die PCR überführt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Bezeichnung	Stammlösung	Volumen für eine Reaktion (μL)
Primer-Mix	Random Hexamer	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	Oligo(dT) ₁₅	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	A. dest.	0,3
RT-Mix	RT-Puffer (5x)	250 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3 375 mmol/L KCl 50 mmol/L DTT
	MgCl ₂ -Lösung	25 mmol/L
	dNTP-Mix	jeweils 10 mmol/L dATP, dCTP, dGTP und dTTP
	RNase-Inhibitor	4x10 ⁴ U/mL RNasin
	DTT-Lösung	100 mmol/L
	Reverse Transkriptase	(1 μL für Ansatz von 20 μL)

2.11.6 Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR vervielfältigt *in vitro* definierte DNA-Abschnitten mit Hilfe einer temperaturbeständigen DNA-Polymerase, die ursprünglich aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) gewonnen wurde. Aus einer bekannten DNA-Sequenz leitet man zwei Oligonucleotide ab, die mit jeweils einem der beiden komplementären Stränge hybridisieren, den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt am 5'- und 3'-Ende begrenzen und der DNA-Polymerase als Startpunkt dienen. Jeder PCR-Zyklus wiederholt sequentiell die folgenden Schritte: (i) Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die beide DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen und einzelsträngige DNA entsteht als Matritze. (ii) Anlagerung der Primer (*Annealing*) entscheidet über die Spezifität der Reaktion. Die hierfür optimale Temperatur hängt von Länge und Passgenauigkeit der Primer ab. (iii) Neusynthese des komplementären Stanges erfolgt durch die hitzestabile DNA-Polymerase (Elongation). In jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Anzahl der gewünschten Moleküle. Nach Beendigung der Kettenreaktion stabilisieren sich die DNA-Doppelstränge bei 72°C. Die *Taq*-Polymerase synthetisiert an den 3'-Strangenden überhängende Adenosin-Reste (*Final Extension*) [Saiki, 1985]. Die Kombination von RT und PCR weist spezifische mRNA-Moleküle, die in geringer Konzentration vorliegen nach und ermöglicht so Untersuchungen zur Genexpression auf transkriptioneller Ebene [Rappolee, 1989].

Material und Methoden

<i>Bezeichnung</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>Volumen für eine Reaktion (µL)</i>
Enzym-Reaktionsmix	firmeneigene Rezeptur, enthält modifizierte <i>Taq</i> -Polymerase und optimierten Puffer mit dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)	1
MgCl ₂ -Lösung	25 mmol/L	1,2
Primer sense	jeweils 10 mmol/L GAPDH sense, HBD-2 sense, HBD-2 sense Xho oder HBD-2 sense Bgl	0,15
Primer antisense	jeweils 10 mmol/L GAPDH antisense, HBD-2 antisense oder HBD-2 antisense Eco	0,15
<i>A. dest.</i>		6,5

Die Komponenten wurden als Aliquots bei -20°C gelagert. Einmal getaute Aliquots wurden nicht wieder eingefroren. Konstante Reaktionsbestandteile wurden wie auch für die RT vorgemischt und diese Gemische auf die Ansätze verteilt.

<i>Prozess</i>		<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Haltezeit (sec)</i>	<i>Zyklenzahl</i>
Initiale Denaturierung		95	600	1
Amplifikation	Denaturierung	95	30	
	<i>Annealing</i>	60	30	30
	Extension	72	30	
<i>Final Extension</i>		72	420	1

Alle PCR-Reaktionsansätze für HBD-2 wurden einer zweiten PCR zugeführt. Es wurden 1 µL der DNA aus dem Ansatz der ersten PCR und 9 µL frischer PCR-Mix für weitere 30 Zyklen im Thermocycler inkubiert. Alle Reaktionsansätze wurden bis zur Agarose-Gelelektrophorese bei -20°C gelagert. GAPDH und HBD-2 aus einer Probe wurden immer auf demselben Gel aufgetragen.

2.11.7 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Bei neutralem pH sind Nukleinsäuren negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Große Moleküle werden in einer netzartigen Agarosematrix stärker aufgehalten als kleine oder stark verknäulte Moleküle. Die Konzentration der Agarose wird so gewählt, dass die Poren größer als die Fragmente sind, so dass die Wanderung entsprechend der

Material und Methoden

Ogston-Theorie nicht vom Trägermaterial behindert wird. Der optimale Trennbereich linearer doppelsträngiger DNA-Fragmente der Größe 0,2-3 kb liegt bei einer Agarose-Konzentration von 1,5% [Maniatis, 1989]. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA ist proportional zur angelegten Spannung. Bei geringer Pufferkapazität liefert Tris-Acetat (TAE)-Laufpuffer scharfe DNA-Banden, die durch spezifische Einlagerung von Ethidiumbromid in den Nukleinsäurestrang nach Anregung mit ultraviolettem Licht (Wellenlängen zwischen 254 und 366 nm) sichtbar gemacht werden können [Helling, 1974].

Ethidiumbromidlösung: 10 mg/mL Ethidiumbromid in *A. dest.*

DNA-Ladepuffer: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7,6
60% Glycerol
60 mmol/L EDTA
0,03% Bromphenolblau
0,15% OrangeG
0,03% Xylencyanol/Acid blue 147

50x TAE-Puffer: 2 mol/L Tris-Acetat, pH 8,0-8,5
64 mmol/L EDTA

TAE-Laufpuffer: 50x TAE-Puffer in *A. dest.*

Färbelösung: 1 µg/mL Ethidiumbromid in TAE-Laufpuffer

DNA-Längenstandard: 1 µg 100 bp-Leiter/extended (Größen der Einzelbanden in bp: 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500/500, 400, 300, 200, 150, 100)

Für jedes Gel wurden 1 bzw. 1,5 g Agarose eingewogen und mit 100 mL TAE-Laufpuffer in der in der Mikrowelle bei 180 W so lange gekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die Agaroselösung wurde auf etwa 65°C abgekühlt und 75 mL auf den vorbereiteten Gelträger in der Elektrophoresekammer gefüllt. Nach dem Erstarren des Geles wurde der Probenkamm gezogen und das Gel mit TAE-Laufpuffer vollständig überschichtet. Jeweils 10 µL PCR-Ansatz wurden mit 6 µL DNA-Ladepuffer gemischt und 15 µL des Gemisches in eine Tasche aufgetragen. Als Kontrolle diente der DNA-Längenstandard. Die Fragmente wurden bei einer Spannung von 6-8 V/cm Gesamtlaufstrecke aufgetrennt bis die Bromphenolblaufront zwei Drittel der Gesamtlaufstrecke erreicht hatte. Danach wurde das Gel 30 min in 200 mL frisch angesetzte Färbelösung unter Schütteln bei 80-95 rpm inkubiert. Die Banden wurden auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 320 nm sichtbar gemacht und fotografiert.

2.11.8 Quantifizierung von PCR-Produkten im Agarosegel

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel wurden aus den Polaroidbildern die Signalintensitäten spezifischer Banden von GAPDH und HBD-2 jeweils einer Probe im Vergleich zueinander bewertet. Dazu wurden alle Bilder mit einem Flachbettscanner bei maximalem Scanbereich in mit einer Auflösung von 600 dpi eingelesen. Aus Dateien im JPEG-Format wurden Bildausschnitte mit Hilfe des Programms PhotoShop 7.0 bei automatisiertem Kontrast bearbeitet. Die Leuchtkraft jeder einzelnen Bande wurde nach der Inversion densitometrisch mit der Programm ImageJ ermittelt. Die Analyse erfolgte standardisiert mit folgenden Parametern und Einstellungen: *Set Measurement (Area, Mean Density, Integrated Density)*; *Set Scale (Pixel)*, *Calibrate (Function Uncalibrated OD, gleiche Größe des Meßkörpers)*. Der Quotient der so ermittelten *Mean Densities* HBD-2- und GAPDH-spezifischer Banden aus einer Probe steht für den relativen Gehalt der HBD-2-mRNA in den bearbeiteten Zellen.

2.11.9 Quantitative TaqMan-PCR

Im Vergleich zur Standard-PCR erlaubt die TaqMan-PCR höhere Sensitivität bei geringen Probenvolumina und die Bestimmung verschiedener cDNA-Spezies aus einem Reaktionsansatz innerhalb kurzer Zeit. Mit einem so vereinfachten, reproduzierbaren Procedere wird ein *Screening* erleichtert. Die TaqMan-PCR nutzt neben den spezifischen Primern eine so genannte Sonde, ein Oligonukleotid, das am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff markiert ist und das am 3'-Ende einen Quencher trägt. In der intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs nach Anregung aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. In der *Extension* während der PCR trifft die *Taq*-Polymerase auf die Sonde, die 5'-Exonuklease Aktivität der Polymerase baut die Sonde ab und hebt so die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher auf. Akkumulieren die PCR-Produkte verstärkt sich die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus und wird als sequenzspezifisches Signal detektiert [Lee, 1993]. Als Maß für die Startmenge wird der sogenannte *Crossing Point* (C_T) ermittelt, der der Anzahl PCR-Zyklen entspricht, bei der ein definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird. Bei der exponentiellen Untersuchung entspricht der C_T -Wert der Steigung der Regression im Wendepunkt und in allen Reaktionsgefäßen befindet sich die gleiche Menge neu synthetisierter DNA [Tichopad, 2003].

Die Molare Konzentration der Plasmidpräparationen errechnete sich aus dem Quotient aus der Konzentration linearisierter Plasmid-DNA in $\mu\text{g/mL}$ und der molaren Masse des Plasmids. Die molare Masse des Plasmids wurde aus der bekannten Nukleinsäurefolge

Material und Methoden

nach Sequenzierung nach der folgenden Formel errechnet: $M_r \text{ Plasmid} = (\text{Anzahl Basenpaare} * M_r \text{ Basenpaar}) / \text{Avogadro'sche Zahl}$

Die Ansätze für die quantitative TaqMan-PCR setzten zusammen aus:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Volumen für eine Reaktion</i>
DNA (cDNA aus RT-Ansatz oder Plasmidstandard)	1 µL
TaqMan® Universal PCR Master Mix (firmeneigene Rezeptur enthält Taq-Polymerase, optimierten Puffer und dNTP)	5 µL
Primer/Sonden-Gemisch	0,2-0,5 µL
<i>A. dest.</i>	3,8-3,5 µL

Alle Komponenten wurden als *Aliquots* bei -20°C gelagert und nur einmal verwendet. Für die erste Verdünnungsstufe der Plasmid-Standards wurde ein frisch getautes *Aliquot* aufgefüllt und log 10 in *A. dest* weiter verdünnt. Konstante Reaktionsbestandteile wurden vorgemischt und auf die Ansätze verteilt. Die Standardprozedur der quantitativen TaqMan-PCR wurde mit dem StepOnePlus Thermocycler durchgeführt.

<i>Prozess</i>		<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Haltezeit (sec)</i>	<i>Zyklenzahl</i>
Initiale Denaturierung		50	120	1
		95	600	1
Amplifikation	Denaturierung	95	15	
	<i>Annealing</i>	60	30	40
	Extension	60	30	

2.11.10 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen, auch Restriktasen genannt, erkennen spezifische Sequenzen von mindestens vier Nukleotiden einer doppelsträngigen DNA und spalten dort hydrolytisch Phosphodiesterbindungen. Da jede dieser Sequenzen nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in einer längeren Basenfolge vorkommt, wird DNA nach einem charakteristischen Muster fragmentiert [Nathans, 1975].

Material und Methoden

Restriktionspuffer (10x): 500 mmol/L Tris-HCl, pH 7,9
1 mol/L NaCl
100 mmol/L MgCl₂
10 mmol/L DTT

Restriktasen: *Bgl*I und *Eco*RI (jeweils 2x10⁴ U/mL)
*Xho*I (1x10⁴ U/mL)

In Kontrollansätzen wurden 1-5 µg DNA mit 2 µL Restriktionspuffer, 1 µL der entsprechenden Restriktase(n) und *A. dest.* auf Gesamtvolumina von 20 µL aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Hinzupipettieren von 5 µL DNA-Ladepuffer beendet. In präparativen Ansätzen wurden 200 µg Plasmid-DNA mit 30 µL Restriktionspuffer und 20 µL der entsprechenden Restriktase(n) und *A. dest.* auf Gesamtvolumina von 300 µL aufgefüllt. Nach 2 h bei 37°C wurden diese Proben zur Inaktivierung des Enzyms 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend mit 60 µL frischem DNA-Ladepuffer gemischt. Alle Proben wurden direkt in der Agarose-Gelelektrophorese dargestellt

Für Plasmid-Standards in der quantitativen TaqMan-PCR wurden 50 µg der entsprechenden Plasmid-DNA in einem Volumen von 300 µL über 2 h mit 200 U *Bgl*I bei 37°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch Agarosegelelektrophorese bestätigt. Nach dem Inaktivieren der Restriktase bei 65°C über 10 min wurde die DNA-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und *Aliquots* à 10 µL bei -20°C aufbewahrt.

2.11.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Natriumperchlorat verringert die Schmelztemperatur von Agarose. Die jetzt aus der Matrix freigesetzte anionische DNA bindet an eine modifizierte Silicagel-Matrix und kann mit Puffer oder *A. dest.* davon abgelöst werden [Vogelstein, 1979].

Agarosegel: 1% Agarose in TAE-Puffer

Puffer GS1: Natriumperchlorat (firmeneigene Rezeptur)

Waschpuffer W9: (firmeneigene Rezeptur)

TE-Puffer: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8,0)
100 µmol/L EDTA

Mit entsprechenden Restriktasen gespaltene Plasmid-DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel in 15 min in einer frischen Färbelösung gefärbt. Unter ultraviolettem Licht wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel der gewünschte Gelbereich als möglichst schmaler Streifen ausgeschnitten, in eingewogene Reaktionsgefäße überführt und durch erneutes Wiegen des Gefäßes die Gelmenge bestimmt. Jedes Milligramm Gel wurde mit 3 µL Puffer GS1 versetzt und das

Reaktionsgefäß im Wasserbad 15 min bei 50°C inkubiert bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Diese Lösung wurde sukzessive auf vier Säulen mit Silicagel-Matrix übertragen. Die Säulen wurden jeweils mit 500 µL Puffer GS1 und mit 700 µL Waschpuffer W9 gewaschen. Bei jedem Schritt wurden die Säulen 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, 1 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der nahezu trockene Filter nochmals 1 min zentrifugiert und abschließend die DNA mit 50 µL warmen TE-Puffer durch Zentrifugation für 1 min eluiert. Die vier Eluate wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt, die Konzentration bestimmt und in *Aliquots* à 200 ng DNA bei -20°C eingefroren.

2.11.12 Ligation von DNA

Bei der Ligation werden das freie 3'-Hydroxyl- und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure unter ATP-Verbrauch mit Hilfe einer Ligase verbunden. Es entsteht transformierbare, ringförmig geschlossene Plasmid-DNA. Damit es nicht zur Religation gleichartiger DNA kommt, werden die freien Enden eines Ligationspartners dephosphoryliert [Gumport, 1981]. An einen linearisierten Vektor gebundene Topoisomerase I verbindet einzelsträngige A-Überhänge von PCR-Produkten mit komplementären T-Überhängen des Vektors und schließt so ebenfalls einen DNA-Ring [Shuman, 1991; Shuman, 1994].

Phosphatasepuffer (10x): 500 mmol/L Bis-Tris-Propan, pH 6,0
10 mmol/L MgCl₂
1 mmol/L ZnCl₂

Phosphatase: 5.000 U/mL *Antarctic Phosphatase*

Ligasepuffer (10x): 500 mmol/L Tris-HCl, pH 7,5
100 mmol/L MgCl₂
10 mmol/L ATP
100 mmol/L DTT

DNA-Ligase 1x10⁵ U/mL T4 DNA-Ligase

pCR2.1: 10 ng/µL linearisierte Plasmid-DNA mit Topoisomerase I

Salzlösung: 1,2 mol/L NaCl
60 mmol/L MgCl₂

Linearisierter Vektor (5 µg) wurde mit 1 µL Phosphatasepuffer, 2 µL Phosphatase und *A. dest.* in einem Gesamtvolumen von 10 µL 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min wurde der Ansatz mit *A. dest.* auf 50 µL aufgefüllt. Für die Ligation wurden 100 ng dephosphorylierter Vektor, isoliertes Fragment in zehnfachem molarem Überschuss, 2 µL Ligasepuffer, 1 µL DNA-Ligase in einem

Gesamtvolumen von 20 μL bei Raumtemperatur 60 min inkubiert und das Enzym wie oben durch Hitze inaktiviert. Der Erfolg der Ligation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

Für die direkte Klonierung amplifizierter cDNA in pCR2.1 wurden 2 μL frisches PCR-Produkt mit 1 μL Salzlösung und 1 μL *A. dest.* gemischt. Nach Zugabe von 1 μL linearisierter Plasmid-DNA mit Topoisomerase I wurden die Ansätze 30 min bei Raumtemperatur stengelassen.

Jeweils 2 μL jedes Ligationsansatzes wurden in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 transformiert.

2.12 Proteinbiochemie

2.12.1 Gesamtzelllysate aus der Kultur

Das Detergenz SDS löst Lipide und Proteine der Zellmembran und setzt den Zellinhalt frei. Zelltrümmer und nicht lysierte Organellen werden durch Zentrifugation abgetrennt. Neben zytoplasmatischen und membranständigen Molekülen werden degradierende Enzyme in die Lösung freigesetzt. Denaturierung inhibiert die proteolytische Aktivität der Enzyme [Djaballah, 1993].

Lysepuffer:	3% SDS
	30 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0
	3 mmol/L EDTA
	10% Glycerol
	0,06% Bromphenolblau
	430 mmol/L 2-Mercaptoethanol

Der Zellrasen in der Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurde mit 1 mL PBS gewaschen, 500 μL Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert und das Ablösen der Zellen mit einem *Scraper* unterstützt. Die Zellen wurden in Standardmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Nach Zentrifugation bei 350 g und 4°C über 5 min wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert, in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen 1×10^6 Zellen in 40 μL Lysepuffer lysiert und bei -80°C eingefroren.

2.12.2 Proteinisolierung aus Zellen der Darmmukosa

Für die Proteinisolierung aus Darmpräparaten stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Mit dem ersten beschriebenen denaturierenden Verfahren erfolgt die Proteinisolierung aus der gesamten Mukosa. Degradierende proteolytische Enzyme der Lösung wie zytoplasmatische Serinproteasen, Metalloproteasen und Nukleasen können

Material und Methoden

zusätzlich mittels spezifischer Hemmstoffe inhibiert werden [Nelson, 1994]. Proteinextraktionen von Molekülen mit geringem M_r können unter denaturierenden Bedingungen mit Azetonitril und Trifluoressigsäure erfolgen. Ein hoher Säure- und Ionengehalt des Extraktionspuffers löst Peptide, präzipitiert Proteine höheren Molekulargewichtes und inaktiviert proteolytische Enzyme [Bateman, 1996].

Protease-Inhibitoren:	200 mmol/L EDTA 100 mmol/L Pefabloc 10 mmol/L Leupeptin 100 mmol/L EGTA 1 U/mL Aprotinin
Lösung 1:	60% Azetonitril
Lösung 2:	1% Trifluoressigsäure
Mischlösung:	60% Lösung 1 und 40% Lösung 2
Suspensionspuffer:	50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0

Die Mukosa des humanen Kolonpräparates wurde auf einem mit silikonbeschichteten Brett so aufgespannt, dass die Mukosa auf der Silikonoberfläche auflag. Mit Pinzette und Skalpell wurde die Mukosa abgetrennt und für die Extraktion kleiner Proteine stückchenweise in einem Kryoröhrchen mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Gewebe wurde in eine Reibeschale überführt, mit einem Pistill zu Pulver zerkleinert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5-10 mL Mischlösung aufgefüllt. Die Ansätze wurden 20 min in ein Ultraschall-Bad mit Eiswasser gehängt. Die Suspension wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt und bei 16.000 g und 4°C über 20 min zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden möglichst vollständig in frische Reaktionsgefäße überführt. Die so getrennten Sedimente wurden bei -20°C gelagert (DAT.S). Die Überstände wurden bei -80°C tiefgefroren und anschließend bei einer Kondensatortemperatur von -50°C und einem Vakuum $\sim 0,003$ mbar innerhalb von maximal 48 h gefriertrocknet. Lyophilisierte Überstände wurden in einem geringeren Volumen als das Ausgangsvolumen in Suspensionspuffer aufgenommen. Nicht gelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C über 15 min sedimentiert und diese Überstände bei -20°C gelagert (DAT).

Zur Isolierung der gesamten Mukosaproteine wurde die oben beschriebene, präparierte Mukosa der Kolonpräparate des Menschen (DL) und des Schweins (Schwein) stückchenweise in Reaktionsgefäße mit 500 μ L PBS überführt und Lösungen folgender Protease-Inhibitoren zugegeben: 50 μ L EDTA, 10 μ L Pefabloc, 10 μ L Leupeptin, 10 μ L EGTA und 10 μ L Aprotinin. Ansätze wurden mit einem Mixer zerkleinert und 20 μ L

Aliquots dieser Suspension mit Lysepuffer im Volumenverhältnis 1:2 gemeinsam mit der Probe bei -80°C eingefroren.

2.12.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure

Die Proteinbestimmung mit BCA basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ unter alkalischen Bedingungen durch Peptidbindungen sowie durch die Aminosäurereste Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan. Cu^+ bildet mit BCA einen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm. Seine Konzentration ist proportional der Intensität des entstehenden Farbstoffs und wird spektrophotometrisch im Vergleich zu einer Eichreihe bekannter Proteinkonzentration bestimmt. Mit dem Lambert-Beer-Gesetz wird aus der Absorption die Proteinkonzentration berechnet [Smith, 1985].

Probenpuffer:	3% SDS 30 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0 3 mM EDTA 10% Glycerol
Reagenz A:	firmeneigene Rezeptur, enthält: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , BCA und Natriumtartrat in 100 mmol/L NaOH
Reagenz B:	4% CuSO_4
BCA-Lösung:	50 Teile Reagenz A 1 Teil Reagenz B
BSA-Standard:	Konzentrationen des Standards für BSA (gelöst in PBS): 0 $\mu\text{g/mL}$; 200 $\mu\text{g/mL}$, 800 $\mu\text{g/mL}$ und 1,2 mg/mL

Alle Proben wurden im Wasserbad 6 min bei 100°C gekocht, bei 16.000 g und 4°C über 2 min zentrifugiert und die Überstände gesammelt. Überstände und Probenpuffer wurden für die Bestimmung im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt. Eine Eichreihe bestand aus je 10 μL BSA-Standardlösungen und Probenpuffer. Von allen Ansätzen wurden Doppelbestimmungen mit jeweils 10 μL in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und 190 μL BCA-Lösung hinzupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und die Absorption spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Konzentrationen in den Proben wurden aus der Gleichung der Regression der Standardkurve mit BSA ermittelt.

2.12.4 Immunpräzipitation

Protein A/G binden die Fc-Region verschiedener Immunglobuline. Koppelt man diese Proteine an Sepharose-Kügelchen und bindet darüber spezifische Antikörper, kann man

auf diesen Kügelchen ein gewünschtes Protein aus einem Gemisch anreichern [Forsgren, 1966, Eliasson, 1988].

Protein A-Sepharose: in *A. dest.* vorgequollen

Protein G-Sepharose: in *A. dest.* vorgequollen

10x PBS
1,37 mol/L NaCl
27 mmol/L KCl
100 mmol/L Na₂HPO₄
18 mmol/L KH₂PO₄

Tris-Puffer 7,6: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7,6

Tris-Puffer 8,0: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0

In jeweils 1 mL Zellkulturüberstand wurde mit dem entsprechenden Puffer der pH-Wert eingestellt und mit 30 µL Protein A- bzw. Protein G-Sepharose unter ständigem Mischen 2 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation über 1 min bei 350 g und 4°C wurden die klaren Überstände abgenommen, mit 1 µg anti-HBD-2/sc für 2 h und mit 30 µL Protein G/ A-Sepharose über Nacht bei jeweils 4°C inkubiert.

In anderen Ansätzen wurde 30 µL Protein G-Sepharose für 2 h mit 500-1000 ng anti-HBD-2/sc präinkubiert, gewaschen und daraus 30 µL in 1 ml pH-adjustiertem Zellkulturüberstand über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Sepharose-Partikel wurden zweimal mit 1 mL PBS gewaschen und durch Zentrifugation über 1 min bei 350 g und 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde in 20 µL Lysepuffer aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

2.12.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das starke anionische Detergenz SDS oder Hitze heben nicht-kovalente Wechselwirkungen der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen auf. Die Proteine denaturieren und SDS überdeckt deren Eigenladung. So haben alle SDS/Protein-Komplexe vergleichbare Ladungsdichten und unterscheiden sich nur in ihrer Größe. Kovalente inter- und intramolekulare Bindungen über Disulfidbrücken werden durch DTT oder 2-Mercaptoethanol reduziert. Eine Polyacrylamidmatrix entsteht durch Radikalkettenpolymerisation in Gegenwart von APS und TEMED. Im elektrischen Feld bewegen sich die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe zur Anode. Die diskontinuierliche SDS-PAGE trennt ein Proteingemisch in einem grobporigen Sammelgel bei einem pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes von Glycinat. Durch das nach außen ungeladene Glycinat ist die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS/Protein-Komplexe höher als des Glycinates, aber geringer als der Chloridionen. Unter basischen

Material und Methoden

Bedingungen im Trenngel ist Glycinat negativ geladen und läuft aufgrund seiner geringen Masse vor den Proteinen aus dem Gel [Laemmli, 1970]. Das kleinporigere Gel wirkt wie ein Sieb und führt zu einer größenabhängigen Trennung der Proteine [Walker, 1996]. Trenngele mit einem Gradienten der Polyacrylamidkonzentration erlauben bei einer kurzen Gesamtlaufstrecke eine gleichmäßige Trennung von Proteinen in einem weiten Größenbereich von <10 kDa bis zu 250 kDa [Schrimpf, 2002]. Die Verwendung eines Puffersystems mit Glycin an Stelle von Tricin erlaubt eine schärfere Trennung von Proteinen und Peptiden im Größenordnungsbereich von 1-100 kDa ohne Zusatz von Harnstoff bei geringen Polyacrylamidkonzentrationen [Schägger, 1987].

4x Lower Tris:	1,5 mol/L Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS
Trenngellösungen:	4x Lower Tris Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung zu Endkonzentrationen von 10%, 16,5%, 20% oder 22,5% Acrylamid
4x Upper Tris:	500 mmol/L Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
Sammelgellösung:	4x Upper Tris Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung zur Endkonzentration von 4%
APS-Lösung:	10% APS in <i>A. dest.</i>
4x Tris/Glycin-Puffer:	100 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3 750 mmol/L L-Glycin, pH 8,3
Glycin-Reservoirpuffer:	4x Tris/Glycin-Puffer 0,5% SDS
Tricin-Reservoirpuffer (untere Kammer)	200 mmol/L Tris-HCl, pH 8,9
Tricin-Reservoirpuffer (obere Kammer)	100 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3 100 mmol/L Tricin 0,1% SDS
M _r -Standard PR:	11-170 kDa
M _r -Standard ULR:	1.060-26.600 Da

In den Kammern eines Gradientenmischers wurden bei geschlossener Verbindung zwischen den Kammern je 2,6 mL der entsprechenden Trenngellösung mit jeweils 6 µL APS-Lösung und 1,5 µL TEMED gemischt. Die Verbindung zwischen den Kammern wurde geöffnet und die Lösungen über eine Kanüle zwischen die Glasscheiben für das Gel gepumpt. Für homogene Gele wurden 5 mL Trenngellösung mit 20 µL APS-Lösung und 4 µL TEMED direkt zwischen die Glasscheiben pipettiert. Gradientengele hatten eine Dicke von 1 mm, homogene Gele von 0,75 mm. Während der Polymerisation waren die

Lösungen mit *A. dest.* überschichtet. Nach 30 min wurde das Wasser abgenommen, 2 mL Sammelgellösung mit 15 µL APS-Lösung und 4 µL TEMED gemischt, auf das Trenngel pipettiert und der Kamm für die Auftragesaschen eingeschoben. Nach weiteren 30 min wurde das fertige Gel in die Elektrophoresekammer gehängt. Die innere und äußere Pufferkammer wurden mit den frischen Glycin- bzw. Tricin-Reservoirpuffer befüllt.

Die im Lysepuffer aufgenommenen Proben wurden getaut, 6 min im siedenden Wasser gekocht und 2 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. In die Auftragesache wurden 10-100 µg Protein in maximal 30 µL Volumen und 5 µL PR und/oder 10 µL ULR als gefärbte M_r -Standards aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für ca. 2 h bis die Bromphenolblau-Front zwei Drittel der Gesamtlaufstrecke des Gels erreicht hatte. Die Proteine wurden entweder mit Coomassie gefärbt oder in spezifischen Western-blots nachgewiesen.

2.12.6 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Der anionische Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant Blue R-250 bildet unter sauren Bedingungen Komplexe mit Proteinen. Unspezifisch in die Gelmatrix eingelagerter Farbstoff wird in mehreren Schritten ausgewaschen. Nimmt man eine Nachweisgrenze von 500 ng/cm² an, lassen sich erst 100 pmol eines Peptids mit einer Größe von ca. 5 kDa, in diesem System als gefärbte Bande darstellen [Bennett, 1971]. Das entspricht einer Nachweisempfindlichkeit dieser Färbemethode von 100 ng bis 1 µg Protein in einer Bande [Syrový, 1991].

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

Färbelösung: 0,1% Coomassie in Waschlösung

Von der Färbelösung wurden 50 mL unmittelbar vor der Verwendung durch einen Faltenfilter filtriert. Das Polyacrylamidgel wurde nach der Auftrennung der Proteine von den Glasplatten in die Färbelösung überführt und 20 min auf einem Horizontal-Schüttler bei 50 rpm inkubiert. Die Färbelösung wurde verworfen, das Gel zweimal mit 50 mL Waschlösung abgespült und anschließend drei- bis viermal in jeweils 100 ml Waschlösung so lange inkubiert bis die blauen Proteinbanden vor dem durchsichtigen Hintergrund deutlich hervortraten. Die Waschlösungen wurden mehrfach verwendet und nach den Waschschrinen über einen Aktivkohlefilter entfärbt. In Frischhaltefolie eingeschlagene Gele wurden mit einem Flachbettscanner im Farbmodus bei einer Auflösung von 600 dpi gescannt.

2.12.7 Western-blot

Die Immobilisierung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf einer Membran wird durch die Proteinbindungskapazität der Membran, Temperatur sowie Ionenkonzentration und pH-Wert des Puffersystems beeinflusst [Görg, 1988]. Beim Transfer im elektrischen Feld bleibt die Schärfe der Banden durch geringe laterale Diffusion erhalten und die hohe Pufferkapazität beim *Tank-blotting* verbessert die Effizienz durch verlängerte Transferzeiten gegenüber dem sogenannten *Semi-dry*-Verfahren. Wegen seiner Bindungskapazität, Gleichförmigkeit der Porenverteilung und -größe sowie seiner physikalischen und chemischen Beständigkeit ist PVDF das bevorzugte Membranmaterial in dieser Anwendung [Mansfield, 1994].

Transferpuffer: 25 mmol/L Tris-Base
 192 mmol/L Glycin
 20% Methanol
 0,1% SDS

TBS, pH 7,6: 50 mmol/L Tris-Base
 150 mmol/L NaCl

TBST: 0,1% Tween in TBS

Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese von den Glasplatten in eine offene Plastikschale mit Transferpuffer überführt. Zuschnitte (6,8 x 8,5 cm) der PVDF-Membran wurden 5 min auf einem Horizontal-Schüttler bei 100 rpm und Raumtemperatur mit Methanol benetzt und ebenfalls zugeschnittenes *Blotting*-Papier (7 x 9 cm) mit Transferpuffer durchfeuchtet. Ein Sandwich mit der Reihenfolge: Schwamm - *Blotting*-Papier - Gel - Membran - *Blotting*-Papier - Schwamm wurde zusammengebaut und in die Tank-Transfer-Einheit gehängt. Die Proteine wurden 1 h mit 300 mA aus dem Gel auf die Membran transferiert. Nach dem Auseinanderbauen des Sandwiches wurde die Membran auf dem Schüttler je 5 min bei 100 rpm mit frischem Transferpuffer und TBS inkubiert und anschließend mindestens eine Stunde oder über Nacht an der Luft getrocknet.

2.12.8 Proteinnachweis im Western-blot mit Chemilumineszenz

Chemilumineszenz entsteht bei chemischen Reaktionen als Folge des Elektronenübergangs aus einem angeregten in einen energetisch stabileren Zustand. Die Emission von Licht durch Umsetzung von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Peroxidase-konjugierten Antikörpern wird für den Nachweis im Western-blot verwendet. Die Nachweisgrenze für ein spezifisches Antigen liegt im pikomolaren Bereich [Leong, 1990; Whitehead, 1979].

Maleinsäure-Puffer: 100 mmol/L Maleinsäure, pH 7,5
150 mmol/L NaCl

Stammlösung zur Blockierung: 10% Blockierungsreagenz in Maleinsäure-Puffer

Blockierungspuffer: 10x Blockierungspuffer in TBST

Detektionsreagenz 1: *Luminol/Enhancer Solution*
(firmeneigene Rezeptur)

Detektionsreagenz 2: *Stable Peroxide Solution*
(firmeneigene Rezeptur)

Entwickler: 1 Teil Detektionsreagenz 1
1 Teil Detektionsreagenz 2

Das Blockierungsreagenz wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle bei 160 W innerhalb von 20 min gelöst und diese Stammlösung in *Aliquots* bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wurde daraus der Blockierungspuffer hergestellt. Die trockene Membran wurde in einem Folienbeutel mit 10 mL Blockierungspuffer möglichst luftarm eingeschweißt und unter Schütteln über Nacht bei 600 rpm und 4°C inkubiert. Die Membran wurde 2x20 min in jeweils 20 mL TBST (100 rpm, Raumtemperatur) gewaschen, danach mit 3 mL Lösung des Erstantikörpers in Blockierungspuffer in einem neuen Folienbeutel unter Schütteln (2 h, 300 rpm, Raumtemperatur) inkubiert und 3x10 min mit TBST gewaschen. Die Antikörperlösung (5-10 mL) des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers in Blockierungspuffer wurde mit der Membran inkubiert (1,5 h, 300 rpm, Raumtemperatur) und wie oben 3x10 min mit TBST gewaschen. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Detektionsreagenzien 1 und 2 im Verhältnis 1:2 durch Pipettieren gemischt. 1,5 mL der Entwicklerlösung wurden auf die Membran pipettiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Lösung mit Zellstofflagen vollständig abgesaugt. Die Chemilumineszenz wurde in der dunklen Kammer des Detektionsgerätes aufgezeichnet und die mit Farbstoff gekoppelten Proteine des Markers bei gleicher Vergrößerung im Tageslicht bei einer Belichtungszeit von 1/15 sec aufgenommen.

2.13 Statistische Auswertung

Die relative Expression von HBD-2 wurde nach folgender Formel im Vergleich zur konstitutiv exprimierten GAPDH ermittelt:

$$\text{Relative Transkription} = [\text{Mean Density (HBD-2)}] / [\text{Mean Density (GAPDH)}].$$

Bei mehr als einem Messwert in einer Gruppe wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung (S) nach folgender Formel ermittelt:

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

(s: Standardabweichung, n: Anzahl der Messwerte einer Gruppe,
Xi: Messwert, X: Mittelwert)

Die statistische Auswertung aller Versuche, die aus mehreren parallelen Meßreihen bestanden, erfolgte durch Ermittlung der p-Werte aus der Varianzanalyse (Anova) nicht-parametrisch mit nachfolgendem Rangsummentest nach Kruskal-Wallis (<http://udel.edu/~mcdonald/statkruskalwallis.html>, Stand: 21.12.2008).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Bedingungen für eine HBD-2-spezifische semiquantitative RT-PCR

3.1.1 Anzahl von PCR-Zyklen und *Annealing*-Temperatur

Für die semiquantitative PCR, bei der sich die Menge spezifischer mRNA in der Leuchtkraft der entsprechenden Bande im Agarosegel widerspiegelt, wurden die Amplifikationsbedingungen optimiert. Dazu wurde zunächst die Anzahl notwendiger PCR-Zyklen für HBD-2 und GAPDH mit definierten cDNA-Präparationen aus HT-29-Zellen ermittelt (Abbildung 4).

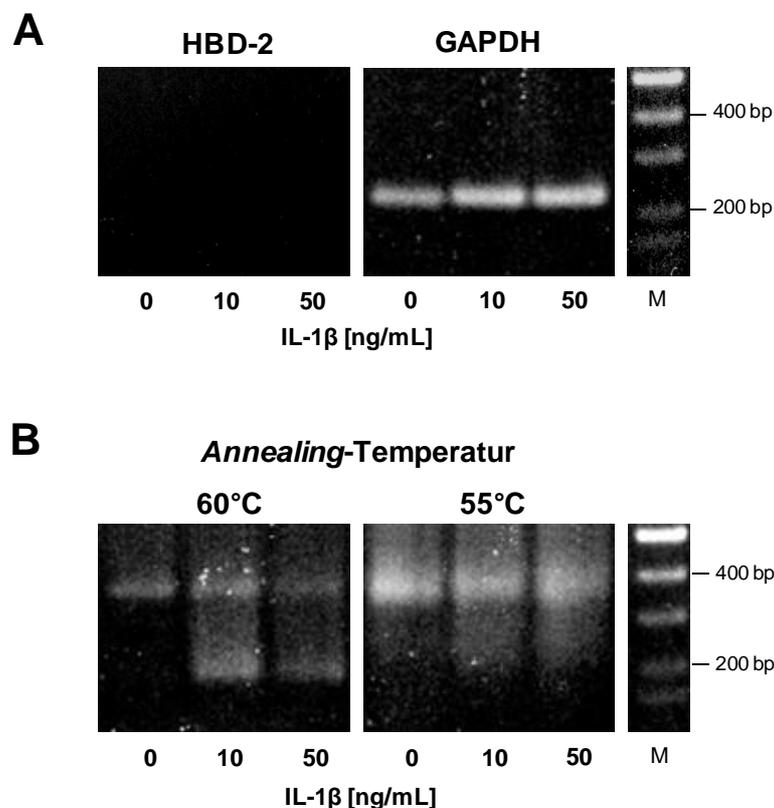


Abbildung 4: **Etablierung der Reaktionsbedingungen für HBD-2- und GAPDH-spezifische PCR.** HT-29-Zellen wurden 6 h in Standardmedium ohne bzw. mit IL-1 β inkubiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. (A) Bei einer *Annealing*-Temperatur von 60°C wurden PCR mit 30 Zyklen und Primern spezifisch für HBD-2 (HBD-2 sense/antisense) bzw. GAPDH durchgeführt. (B) Jeweils 1 μ L aus einer HBD-2-spezifischen PCR bei *Annealing*-Temperaturen von 60°C (A) bzw. 55°C wurde als Template in neuen PCR-Ansätzen für HBD-2 eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte über 30 Zyklen bei gleicher *Annealing*-Temperatur. Alle Bilder zeigen repräsentative Experimente für HBD-2 bzw. GAPDH nach elektrophoretischer Auftrennung.

Mit dem GAPDH-spezifischen Primern war in allen Ansätzen bereits nach 30 Zyklen eine deutliche Bande bei 244 bp sichtbar, die der Größe der erwarteten GAPDH-mRNA aus den HT-29-Zellen entsprach (Abbildung 4A).

Ergebnisse

Im Gegensatz dazu war unabhängig von der Vorbehandlung der HT-29-Zellen nach 30 Zyklen mit den HBD-2-spezifischen Primern bei einheitlicher *Annealing*-Temperatur kein Amplifikat aus den HT-29-Zellen darstellbar (Abbildung 4B). Es wurde angenommen, dass die Menge des Templates bzw. die Sensitivität des Nachweises zu gering war. Ein weiterer PCR-Ansatz mit den HBD-2-spezifischen Primern und allen anderen Komponenten stellte sicher, dass die Reaktionsbedingungen im folgenden Schritt nicht limitierend waren. Nach der zweiten PCR-Runde mit 30 weiteren Zyklen bei einer *Annealing*-Temperatur von 60°C war sowohl mit 10 ng/mL als auch 50 ng/mL IL-1 β eine Bande von ca. 195 bp detektierbar, die ohne Zytokinbehandlung aus den HT-29-Zellen nicht nachweisbar war. Diese Bande entsprach in der Größe der erwarteten HBD-2-mRNA.

In allen Ansätzen war unabhängig von der Behandlung mit IL-1 β und von der *Annealing*-Temperatur eine Bande von 366 bp vorhanden, deren Ursprung im Weiteren untersucht wurde. Als Standardbedingungen für die semiquantitative RT-PCR wurden eine *Annealing*-Temperatur von 60°C sowie 2x30 Zyklen mit HBD-2-spezifischen Primern bzw. 30 Zyklen mit den GAPDH-spezifischen Primern definiert.

3.1.2 Spezifität des Nachweises für HBD-2-mRNA

Aus der Amplifikation von HBD-2-mRNA nach RT wurde mit dem Primerpaar HBD-2 sense/antisense ein Fragment von 195 bp erwartet. Ein HBD-2-spezifisches Amplifikat mit einer Größe von 366 bp, das unabhängig von der Vorbehandlung der HT-29-Zellen auftrat (Abbildung 4B), wies möglicherweise auf Verunreinigung der cDNA-Präparation mit chromosomaler DNA hin. Zur Prüfung der Spezifität der Primer für das mRNA-Template wurden Gesamt-RNA-Präparationen vor der RT-PCR mit DNase I oder RNase A behandelt sowie chromosomale DNA direkt in einer HBD-2-spezifischen PCR eingesetzt (Abbildung 5).

Wie in den Vorversuchen lagen nach 2x30 PCR-Zyklen im Ansatz mit der unbehandelten cDNA aus HT-29-Zellen zwei HBD-2-spezifische Amplifikate mit Größen von 195 bp und 366 bp vor. Nach Einwirkung von DNase I auf die RNA-Präparation war nur das 195 bp Fragment erhalten. Aus der chromosomalen DNA erschien nur die HBD-2-spezifische Bande bei 366 bp, die auf gleicher Höhe wie die obere Bande des unbehandelten RNA-Isolates lag. Das bedeutete, dass die Unterscheidung zwischen Amplifikaten aus genomischer Information und aus HBD-2-spezifischer mRNA als Maß für die Expression über die Größe der zu beurteilenden Banden erfolgen konnte und so die Ergebnisse unabhängig von möglichen Verunreinigungen der RNA-Präparationen durch chromosomale DNA waren.

Ergebnisse

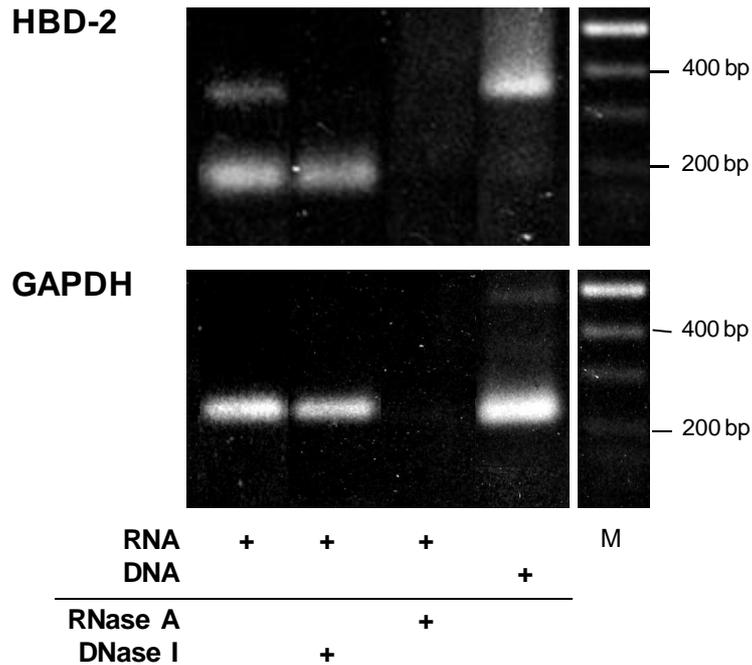


Abbildung 5: **Prüfung der Spezifität der PCR für mRNA-Templates.** HT-29-Zellen wurden 6 h mit 10 ng/mL IL-1 β in Standardmedium inkubiert. Gesamt-RNA und chromosomale DNA wurden isoliert. Jeweils 1,25 μ g RNA wurden mit 0,1 U/ μ L DNase I oder 20 μ g/mL RNase A inkubiert bzw. blieben unbehandelt und wurden in cDNA umgeschrieben. Isolierte chromosomale DNA (62,5 ng) wurde direkt verwendet. PCR der Nukleinsäurepräparationen wurden mit spezifischen Primern für GAPDH bzw. HBD-2 durchgeführt und die Amplifikate elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Behandlung mit RNase A waren weder für HBD-2 noch für GAPDH Amplifikate nachweisbar. Das war möglicherweise auf verunreinigende DNasen in der RNase A-Präparation zurückzuführen, durch die letztlich alle Templates abgebaut wurden.

Die PCR für GAPDH ergab nach 30 Zyklen unabhängig von Template und Vorbehandlung eine Bande bei 244 bp. Die Intensitäten aus den Ansätzen mit unbehandelter sowie mit DNase I inkubierter RNA-Präparation waren vergleichbar. Die Amplifikate aus chromosomaler DNA und mRNA-Template waren gleich groß. Wegen der insgesamt hohen konstitutiven Expression von GAPDH wurde der Anteil chromosomaler Verunreinigungen aus den RNA-Präparationen in den weiteren Versuchen vernachlässigt.

Mit der Technik der Auftrennung der Amplifikate im Agarosegel konnte mit dem verwendeten HBD-2-spezifischen Primerpaar die Expression von HBD-2 gut von der kontaminierenden chromosomalen Information unterschieden werden. Daher wurden in allen folgenden Experimenten die Intensitäten der HBD-2-spezifischen Banden mit einer Größe von 195 bp im Vergleich zur GAPDH-Expression der entsprechenden Proben bewertet.

3.1.3 Einfluss des Serumgehalts im Medium auf die Basalexpression von HBD-2

Eine weitere wesentliche Bedingung für die zytokinabhängige Regulation der Expression von HBD-2 ist eine konstant geringe Basalexpression in der Zelllinie HT-29. Es wurde untersucht, ob die Serumkonzentration im Inkubationsmedium darauf Einfluss hat (Abbildung 6).

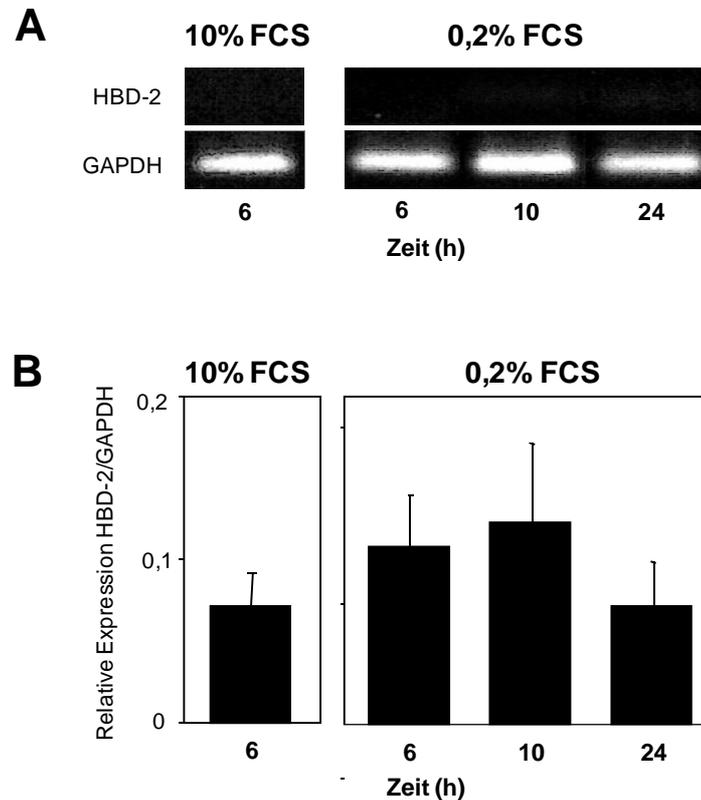


Abbildung 6: **Basalexpression von HBD-2 in HT-29-Zellen bei unterschiedlichem Serumgehalt des Inkubationsmediums.** HT-29-Zellen erhielten über Nacht mit Reduktionsmedium, das Medium wurde anschließend gegen frisches Reduktionsmedium mit 0,2% FCS bzw. Standardmedium mit 10% FCS ausgetauscht und die Zellen weitere 6, 10 bzw. 24 h inkubiert. Die RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. (A) Die Amplifikate nach spezifischen PCR für GAPDH bzw. HBD-2 wurden elektrophoretisch aufgetrennt. (B) Aus der Densitometrie der Banden in (A) wurde die relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH ermittelt. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Eine Expression der GAPDH war gleichmäßig in allen Ansätzen nachweisbar. Unabhängig vom Zeitpunkt und vom Serumgehalt im Medium wurde eine relative Basalexpression von HBD-2 mit einem Quotienten von HBD-2/GAPDH zwischen 0,05 und 0,15 gefunden und dieser Bereich als Vergleichsgröße definiert. Lag die basale Expression bei den in folgenden Experimenten verwendeten HT-29-Zellen darüber, wurden die Zellen verworfen und in die Auswertung nicht mit einbezogen. Insgesamt wurde bestätigt, dass der Serumgehalt des Inkubationsmediums die Basalexpression von HBD-2 nicht beeinflusst.

3.2 Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine auf die Transkription von HBD-2 durch HT-29-Zellen

3.2.1 Kinetik der Wirkung von IL-1 β

Während der Etablierung der Bedingungen für die PCR wurde gezeigt, dass nach 6 h Inkubation mit 10 ng/mL IL-1 β in den HT-29-Zellen eine HBD-2-spezifische mRNA gebildet wird. Die Untersuchung der Kinetik der Wirkung von IL-1 β über 72 h in Standardmedium sollte Aufschluss über die Zeit bis zum Nachweis der mRNA und über ihre Stabilität geben (Abbildung 7).

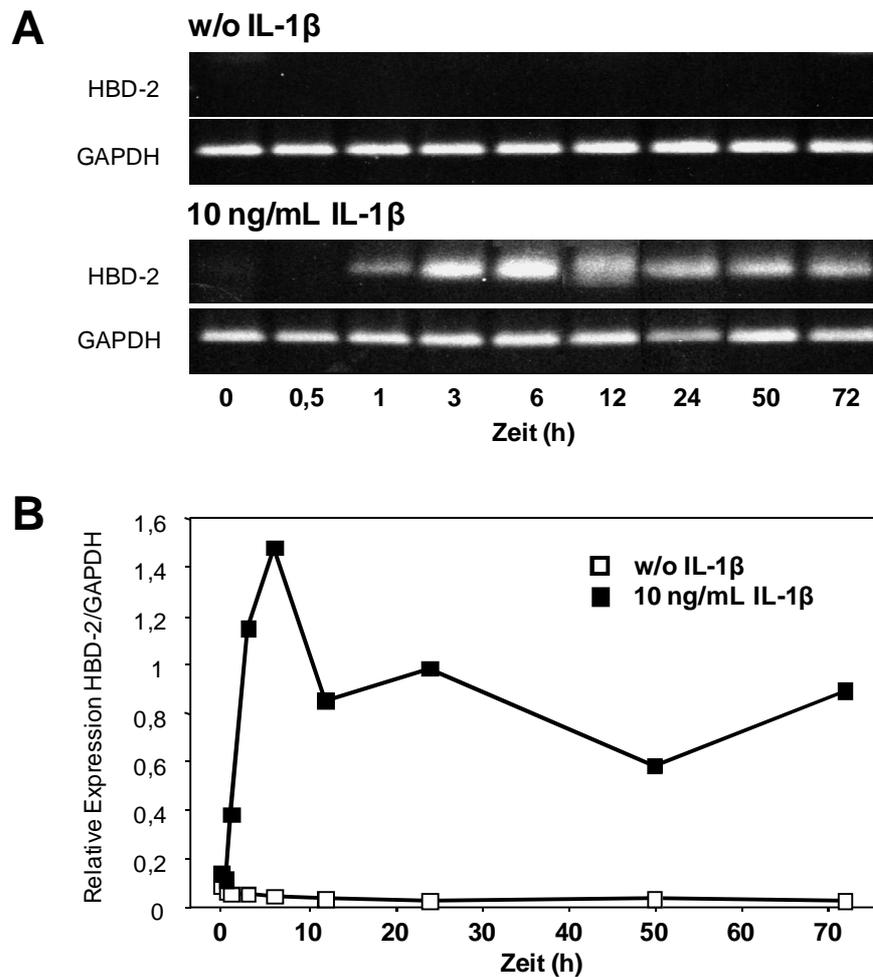


Abbildung 7: **Langzeitkinetik der Induktion HBD-2-spezifischer mRNA in HT-29-Zellen durch IL-1 β in Standardmedium.** HT-29-Zellen wurden mit 10 ng/mL IL-1 β in Standardmedium inkubiert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach spezifischen PCR für GAPDH bzw. HBD-2 wurden die Amplifikate elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel für jeden Untersuchungszeitpunkt. (B) Aus der Densitometrie der Banden aus (A) wurde die relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH ermittelt.

Ergebnisse

Ohne IL-1 β war aus den HT-29-Zellen keine HBD-2-Bande sichtbar, d.h. unter diesen Bedingungen wurde HBD-2 nicht exprimiert. In Gegenwart von 10 ng/mL wurde HBD-2-mRNA bereits nach 1 h gefunden. Das Maximum von etwa 1,5 war nach 6 h erreicht. Danach stellte sich bei einem Quotienten um 0,8 ein Plateau ein, das bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt nach 72 h konstant nachweisbar war.

In diesem Zusammenhang war interessant, ob die Sensitivität der Methode durch Serumreduktion im Medium während der Inkubation mit IL-1 β verändert ist (Abbildung 8).

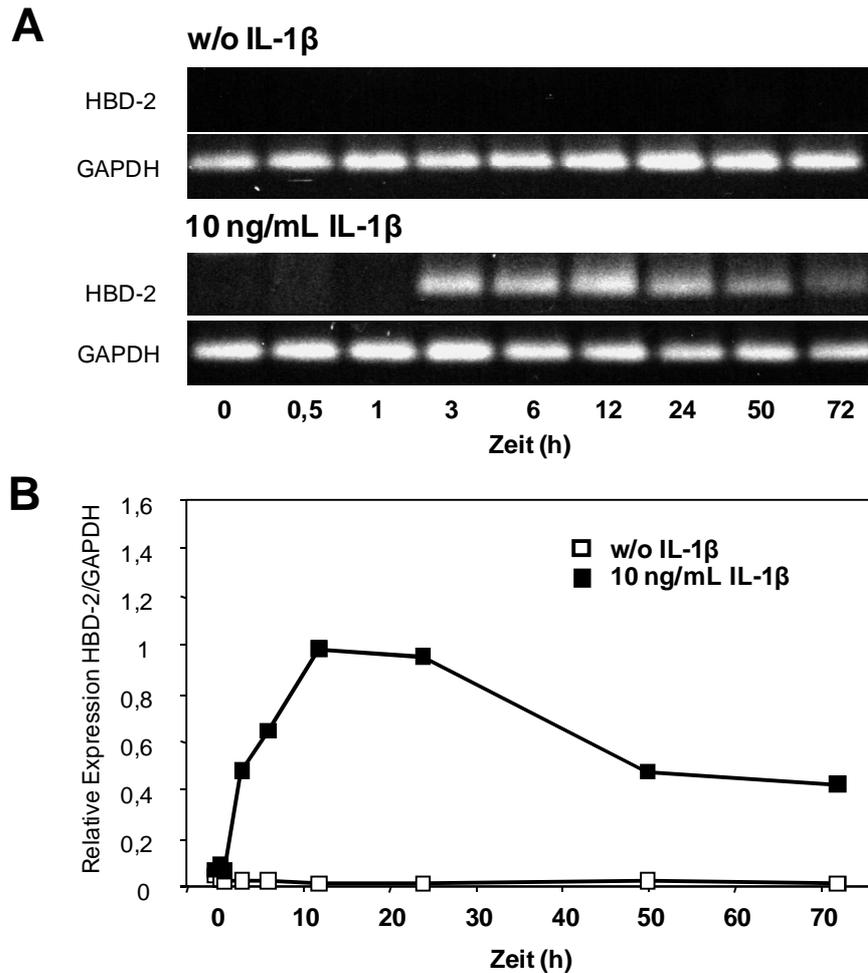


Abbildung 8: **Langzeitkinetik der Induktion HBD-2-spezifischer mRNA in HT-29-Zellen durch IL-1 β in Reduktionsmedium.** HT-29-Zellen wurden mit 10 ng/mL IL-1 β in Reduktionsmedium inkubiert und die Expression von HBD-2 wurde wie für Abbildung 7 beschrieben im Vergleich zu GAPDH bestimmt. (A) Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel für jeden Untersuchungszeitpunkt. (B) Relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH aus einer Probe.

In der Langzeitkinetik mit reduziertem Serumanteil im Inkubationsmedium waren ohne IL-1 β keine HBD-2-spezifischen PCR-Banden darstellbar. Mit 10 ng/mL IL-1 β wurde nach 3 h, etwas später als im Standardmedium, eine HBD-2-Expression gefunden. Die Expressionshöhe war ab 6 h bis zum Ende des Versuches nach 72 h stabil. Der

Ergebnisse

Serumgehalt des Inkubationsmediums spielte also keine Rolle in der IL-1 β -vermittelten Induktion der HBD-2-Expression.

Mit einer IL-1 β -Konzentration von 10 ng/mL wurde zunächst die Frage nach dem genauen Beginn der HBD-2-Expression in einer Kurzzzeitkinetik über 10 h näher untersucht (Abbildung 9).

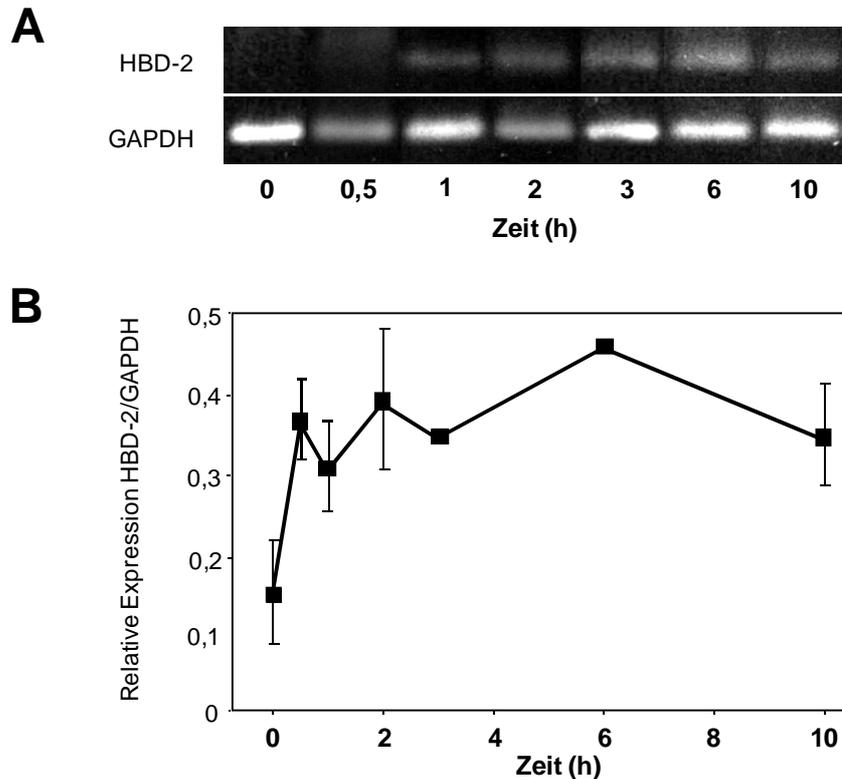


Abbildung 9: **Kurzzzeitkinetik der Induktion HBD-2-spezifischer mRNA in HT-29-Zellen durch IL-1 β in Standardmedium.** HT-29-Zellen wurden mit 10 ng/mL IL-1 β in Standardmedium inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach spezifischen PCR für GAPDH bzw. HBD-2 wurden die Amplifikate elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel für jeden Untersuchungszeitpunkt. (B) Aus der Densitometrie der Banden aus (A) wurde die relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH ermittelt. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Bereits nach 30 min war ein Plateau der Menge HBD-2-spezifischer mRNA erreicht, das bei permanenter Anwesenheit von IL-1 β über den gesamten untersuchten Zeitraum von hier 10 h unverändert war.

Zusammenfassend wurde bei einer Konzentration von 10 ng/mL IL-1 β bereits nach 30 min HBD-2-spezifische mRNA gefunden. Auf transkriptioneller Ebene bleibt in den HT-29-Zellen ein Plateau der mRNA-Menge von HBD-2 bei permanenter Anwesenheit von IL-1 β bis zu 72 h. Die Kinetik der IL-1 β -induzierten Expression von HBD-2 in HT-29-Zellen wurde durch den Serumgehalt der *in-vitro*-Kultur nicht signifikant beeinflusst.

3.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der IL-1 β -Wirkung

Während der Etablierung der Bedingungen für die PCR und in den Versuchen zur zeitabhängigen Wirkung von 10 ng/mL IL-1 β wurde nach 6 h Inkubation ein Expressionsmaximum für die HBD-2-mRNA erreicht. Untersucht wurde der Einfluss des Serumgehaltes im Kulturmedium auf die konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β (Abbildung 10).

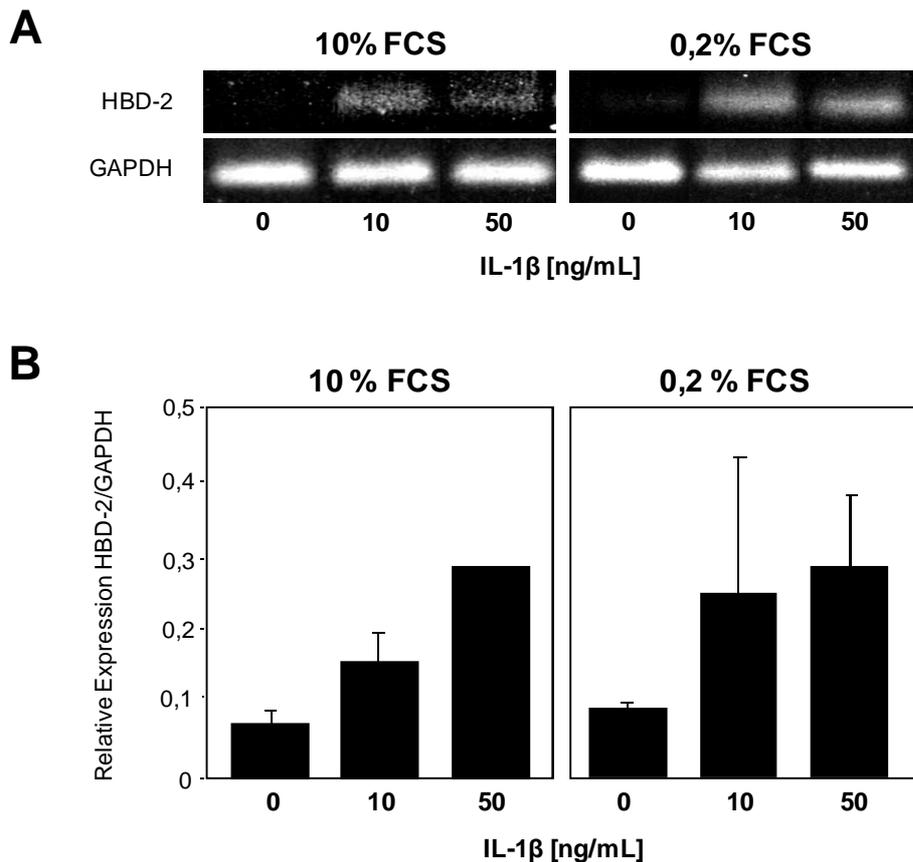


Abbildung 10: **Vergleich der konzentrationsabhängigen Wirkung von IL-1 β in Kulturmedien mit 0,2% FCS und 10% FCS.** HT-29-Zellen wurden in Standard- oder Reduktionsmedium mit oder ohne IL-1 β über 6 h inkubiert. RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Amplifikate nach spezifischen PCR für GAPDH bzw. HBD-2 elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel für jede untersuchte Konzentration von IL-1 β . (B) Aus der Densitometrie der Banden aus (A) wurde die relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH ermittelt. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Unabhängig vom Serumgehalt waren die GAPDH-spezifischen Banden bei allen Ansätzen gleichmäßig. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Zytokinzusatz induzierte IL-1 β in beiden untersuchten Serum- bzw. Zytokinkonzentrationen eine deutliche HBD-2-Expression. Bei geringerem Serumgehalt im Reduktionsmedium war die Schwankung der Einzelwerte aus den HT-29-Kulturen größer als in den Ansätzen mit 10% FCS im Medium. Unabhängig vom Serumgehalt waren die Unterschiede zwischen 10 und 50 ng/mL IL-1 β nicht

Ergebnisse

signifikant. Um auszuschließen, dass das allein Folge geringer Probenzahlen war, wurden die Experimente wiederholt und dabei gleichzeitig weitere Konzentrationen von IL-1 β einbezogen (Abbildungen 11, 12).

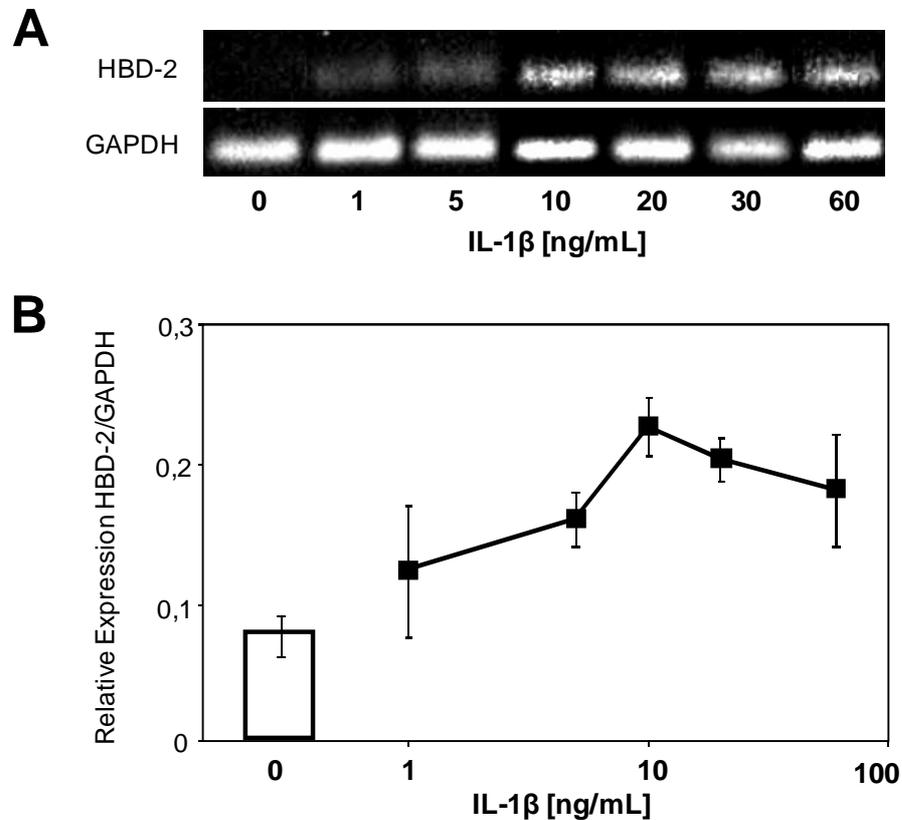


Abbildung 11: **Konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β in Standardmedium.** HT-29-Zellen wurden in Standardmedium mit und ohne IL-1 β inkubiert und nach 6 h wie für Abbildung 6 beschrieben die Expression von HBD-2 im Vergleich zu GAPDH bestimmt. (A) Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel für jede Konzentration. (B) Aus der Densitometrie der Banden aus (A) wurde die relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH einer Probe ermittelt. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Das Maximum der Expression lag bei einem Quotienten um 0,2. Unter Berücksichtigung der relativen Dichte HBD-2/GAPDH waren mindestens 5 ng/mL IL-1 β für die Induktion der HBD-2-Expression notwendig. Es bestätigte sich, dass mit der in den Versuchen zur Kinetik der HBD-2-Expression verwendeten Konzentration von 10 ng/mL IL-1 β ein Maximum der HBD-2-Expression erreicht wurde. Eine weitere Erhöhung der IL-1 β -Konzentration auf 50 bzw. 100 ng/mL steigerte die nachweisbare Menge HBD-2-spezifischer mRNA nicht signifikant.

Ergebnisse

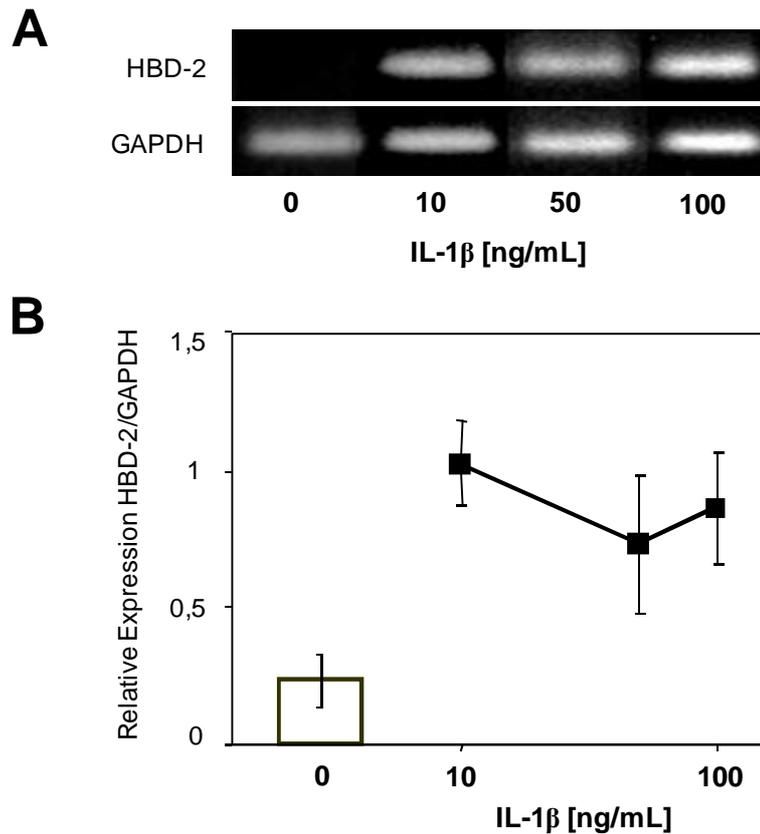


Abbildung 12: **Konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β in Reduktionsmedium.** HT-29-Zellen wurden mit oder ohne IL-1 β in Reduktionsmedium inkubiert und nach 6 h, wie für Abbildung 6 beschrieben, die Expression von HBD-2 im Vergleich zu GAPDH bestimmt. (A) Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel für jede Konzentration. (B) Aus der Densitometrie der Banden aus (A) wurde die relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH einer Probe ermittelt. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Das IL-1 β induzierte in den untersuchten Konzentrationen von 10, 50 und 100 ng/mL auch unter Bedingungen reduzierten Serumgehaltes im Medium eine gleichmäßig hohe HBD-2-mRNA-Expression. In diesem Versuch war das Gesamtniveau mit einem Quotienten \sim 0,8 höher als in dem vergleichbaren Versuch in Standardmedium. Diese experimentell bedingten Unterschiede lagen im normalen Bereich der Schwankungen der semiquantitativen Bestimmungen.

3.2.3 Wirkung von TNF α auf die Transkription von HBD-2 in HT-29-Zellen

Das proinflammatorische Zytokin TNF α wird bei Entzündungsprozessen vermehrt gebildet. Untersucht wurde, ob TNF α auch in Zellen der epithelialen Zelllinie HT-29 zu einer direkten Erhöhung der HBD-2-mRNA führt (Abbildung 13, Tabelle 2).

Ergebnisse

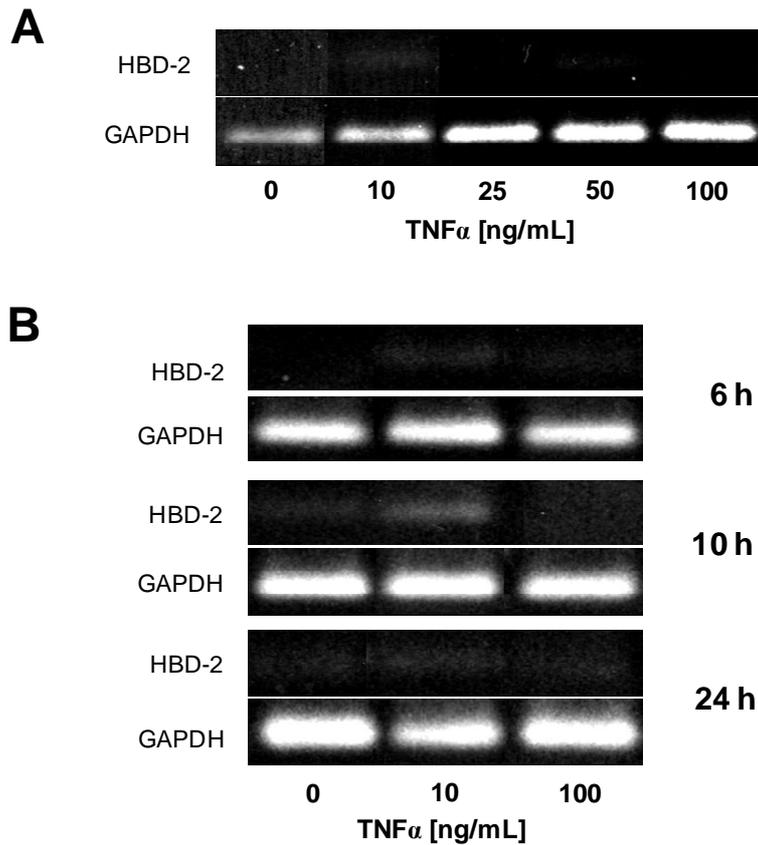


Abbildung 13: **Wirkung von TNF α auf die HBD-2-Expression.** HT-29-Zellen wurden mit TNF α inkubiert und die Expression von HBD-2 im Vergleich zu GAPDH bestimmt. Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel nach Inkubation mit verschiedenen TNF α -Konzentrationen für 12 h in Standardmedium (A) und zu verschiedenen Zeitpunkten in Reduktionsmedium (B).

Tabelle 2: **Effekt von TNF α auf HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Zytokinkonzentration.** HT-29-Zellen wurden wie für Abbildung 13 beschrieben mit TNF α in Reduktionsmedium inkubiert. Relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH einer Probe. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Zeit (h)	Expression von HBD-2 im Vergleich zu GAPDH		
	ohne TNF α	10 ng/mL TNF α	100 ng/mL TNF α
6	0,11 \pm 0,03	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02
10	0,12 \pm 0,05	0,12 \pm 0,04	0,12 \pm 0,04
24	0,07 \pm 0,03	0,14 \pm 0,05	0,12 \pm 0,03

Unabhängig der TNF α -Konzentration waren aus der PCR keine HBD-2-spezifischen Banden nachweisbar. Die relative Dichte HBD-2/GAPDH der HBD-2-Basalexpression ohne Zugabe von TNF α lag bei 0,12. Die Zugabe von 10-100 ng/mL TNF α veränderte die

Ergebnisse

HBD-2-mRNA-Expression nicht. Das gleiche Bild ergab sich auch nach Inkubation mit TNF α bei reduziertem Serumgehalt im Medium, so dass durch TNF α in den hier untersuchten Konzentrationen in HT-29-Zellen keine Expression des Defensins induziert wurde.

3.2.4 Einfluss von TNF α auf den IL-1 β -Effekt in HT-29-Zellen

In den vorangegangenen Versuchen steigerte IL-1 β die HBD-2-mRNA-Expression in HT-29-Zellen, während TNF α keinen Effekt hatte. Ob TNF α möglicherweise synergistisch wirkt und die Wirkung von IL-1 β verstärken kann, sollte hier untersucht werden (Abbildung 14).

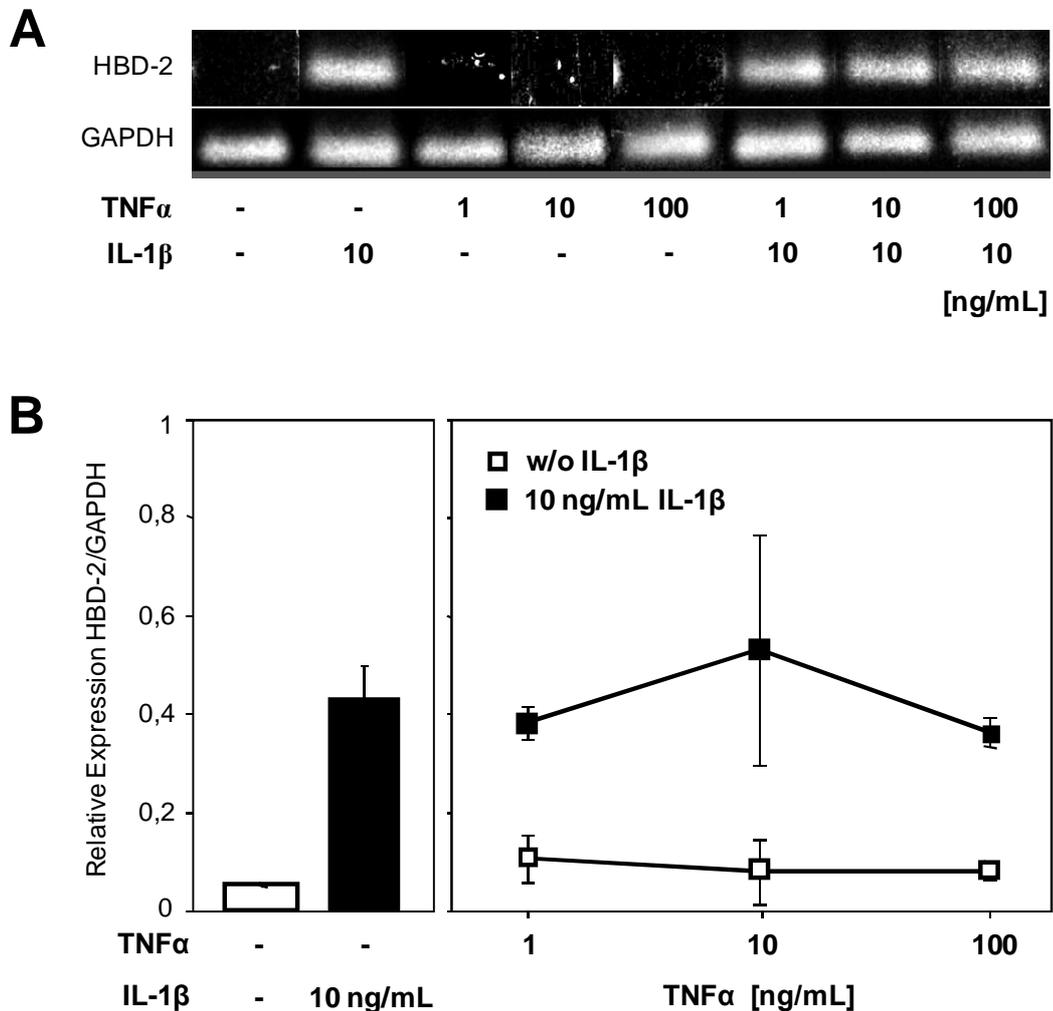


Abbildung 14: **Einfluss von TNF α auf die HBD-2-Expression in Gegenwart von IL-1 β .** HT-29-Zellen wurden mit verschiedenen TNF α -Konzentrationen allein oder in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β in Reduktionsmedium 24 h inkubiert. Die Expression von HBD-2 wurde im Vergleich zu GAPDH bestimmt. (A) Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel. (B) Relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH einer Probe. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Ergebnisse

Wieder hatte TNF α allein keinen Effekt auf die HBD-2-Expression der HT-29-Zellen noch veränderte es die Basalexpression, die durch einen Quotienten $<0,1$ definiert war. In Gegenwart von 10 ng/mL IL-1 β war dieser Quotient um den Faktor 8 gesteigert, der aber in allen eingesetzten Konzentrationen von IL-1 β bei gleichzeitiger Inkubation mit TNF α unverändert war. TNF α verstärkte also die IL-1 β -Wirkung auf die HBD-2-mRNA-Expression nicht.

3.2.5 Wirkung von IL-6 auf die Transkription von HBD-2 in HT-29-Zellen

Bei Entzündungen wird neben IL-1 und TNF α auch das proinflammatorische Zytokin IL-6 vermehrt exprimiert, das neben lokalen auch viele systemische Effekte hervorrufen kann. Untersucht wurde hier, ob IL-6 in epithelialen HT-29-Zellen zu einer direkten Erhöhung der HBD-2-mRNA führt (Abbildung 15, Tabelle 3).

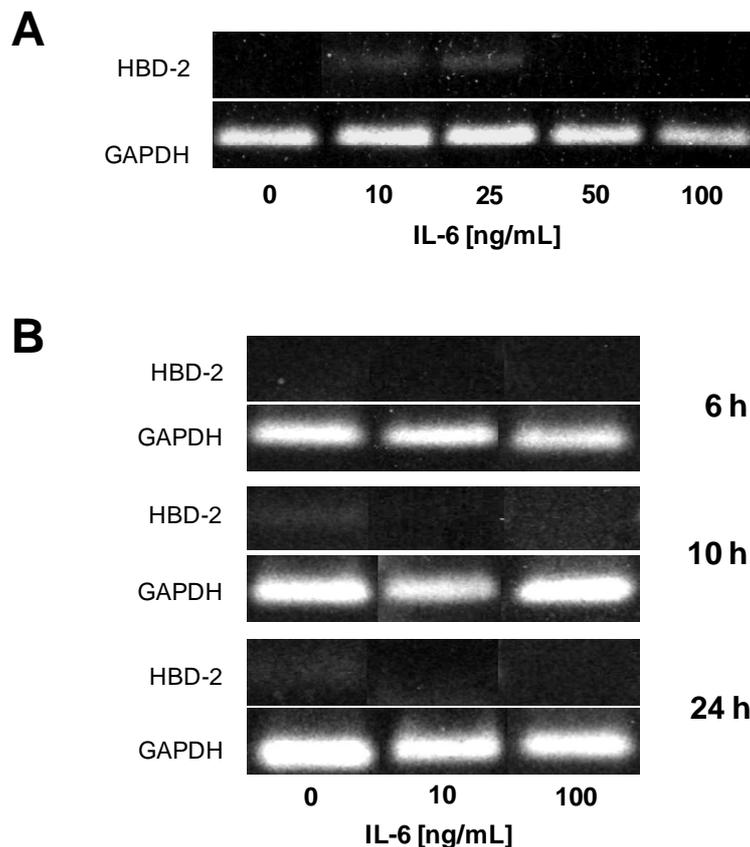


Abbildung 15: **Wirkung von IL-6 auf die HBD-2-mRNA-Expression.** HT-29-Zellen wurden mit IL-6 inkubiert und die Expression von HBD-2 im Vergleich zu GAPDH bestimmt. Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel nach Inkubation mit oder ohne IL-6 für 12 h in Standardmedium (A) und zu verschiedenen Zeitpunkten in Reduktionsmedium (B).

Es waren unabhängig der IL-6-Konzentration keine HBD-2-Banden nachweisbar. Ohne Zugabe von IL-6 lag die relative Dichte HBD-2/GAPDH der HBD-2-mRNA-Basalexpression

Ergebnisse

bei 0,05. Die Zugabe von bis zu 100 ng/mL IL-6 veränderte die HBD-2-mRNA-Expression nicht. Auch nach Inkubation mit IL-6 bei reduziertem Serumgehalt im Medium zeigte sich das gleiche Bild. Wie TNF α hatte auch das IL-6 im untersuchten Zeitraum keine Wirkung auf die Expression des induzierbaren HBD-2 durch HT-29-Zellen.

Tabelle 3: Effekt von IL-6 auf HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Zytokinkonzentration. HT-29-Zellen wurden wie für Abbildung 15 beschrieben mit IL-6 in Reduktionsmedium inkubiert. Relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH einer Probe. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Zeit (h)	Expression von HBD-2 im Vergleich zu GAPDH		
	ohne IL-6	10 ng/mL IL-6	100 ng/mL IL-6
6	0,11 \pm 0,03	0,07 \pm 0,02	0,17 \pm 0,06
10	0,12 \pm 0,05	0,15 \pm 0,06	0,10 \pm 0,05
24	0,07 \pm 0,03	0,14 \pm 0,05	0,12 \pm 0,09

3.2.6 Wirkung von IL-17 auf die Transkription von HBD-2 in HT-29-Zellen

Das von TH17-Zellen gebildete Zytokin IL-17 zählt zu den proinflammatorischen Mediatoren und ist im entzündeten Gewebe vermehrt nachweisbar. Ob IL-17 in den epithelialen HT-29-Zellen zu einer unmittelbaren Erhöhung der HBD-2-mRNA führt, wurde hier untersucht (Abbildung 16, Tabelle 4).

Die HBD-2-Basalexpression lag bei einer relativen Dichte HBD-2/GAPDH um 0,10. Die Zugabe von maximal 100 ng/mL IL-17 veränderte die HBD-2-Expression weder im Standardmedium noch in Medium mit reduziertem Serumgehalt. Unabhängig der IL-17-Konzentration in den Kulturen waren in der PCR keine HBD-2-spezifischen Amplifikate nachweisbar. Damit wurde auch kein Effekt des TH-17-typischen Zytokins IL-17 auf die HBD-2-Induktion in HT-29-Zellen gefunden.

Ergebnisse

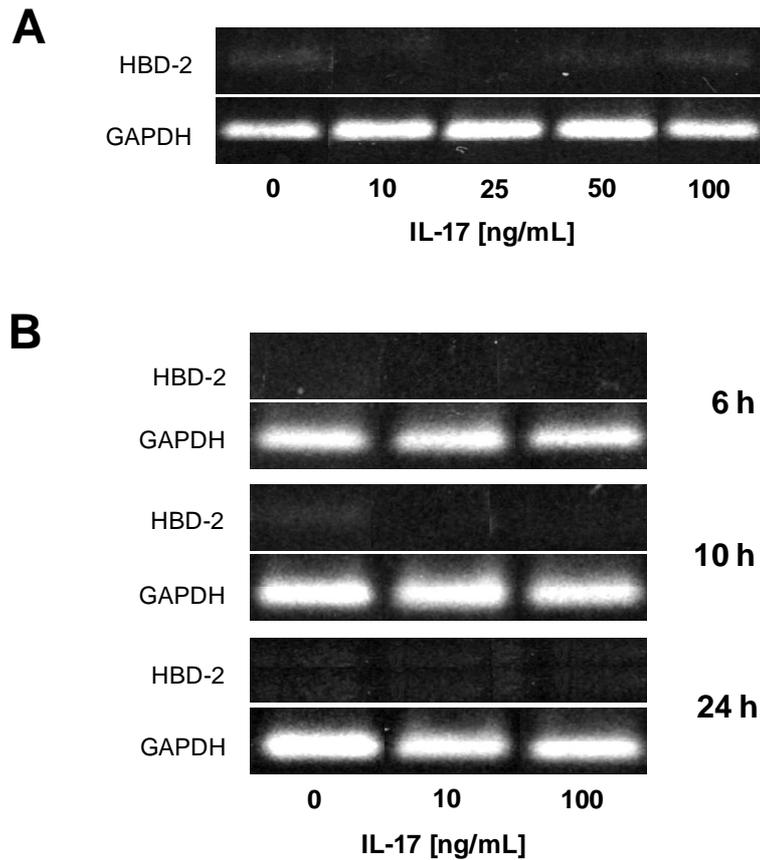


Abbildung 16: **Wirkung von IL-17 auf die HBD-2-mRNA-Expression.** HT-29-Zellen wurden mit IL-17 inkubiert und die Expression von HBD-2 im Vergleich zu GAPDH bestimmt. Exemplarische Darstellung der Amplifikate für HBD-2 und GAPDH im Agarosegel nach Inkubation mit oder ohne IL-17 für 12 h in Standardmedium (A) und zu verschiedenen Zeitpunkten in Reduktionsmedium (B).

Tabelle 4: **Effekt von IL-17 auf HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Zytokinkonzentration.** HT-29-Zellen wurden wie für Abbildung 16 beschrieben mit IL-17 in Reduktionsmedium inkubiert. Relative Expression von HBD-2 als Quotient aus HBD-2 und GAPDH einer Probe. Mittelwert \pm SD aus Dreifachansätzen von HT-29-Kulturen.

Zeit (h)	Expression von HBD-2 im Vergleich zu GAPDH		
	ohne IL-17	10 ng/mL IL-17	100 ng/mL IL-17
6	0,11 \pm 0,03	0,09 \pm 0,04	0,12 \pm 0,07
10	0,12 \pm 0,05	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,03
24	0,07 \pm 0,03	0,10 \pm 0,03	0,09 \pm 0,02

3.3 Etablierung einer HBD-2-spezifischen quantitativen TaqMan-PCR und Klonierung für die Expression von HBD-2-EGFP-Fusionsproteinen

3.3.1 Strategie

Für den Nachweis eines HBD-2-Proteins aus Zellen fehlte eine experimentelle Kontrolle dafür, aus welchem Kompartment sekretorisches Defensin reproduzierbar dargestellt werden kann. Dazu wurden zwei verschiedene HBD-2-spezifische cDNA im Leseraster vor die Sequenz des EGFP kloniert. Ein in der mehrstufigen Klonierung dieser Fusionsproteine entstandenes Zwischenkonstrukt war mit einem ebenfalls klonierten Fragment aus der cDNA der GAPDH gleichzeitig als Standard für die quantitative TaqMan-PCR konzipiert (Abbildung 17).

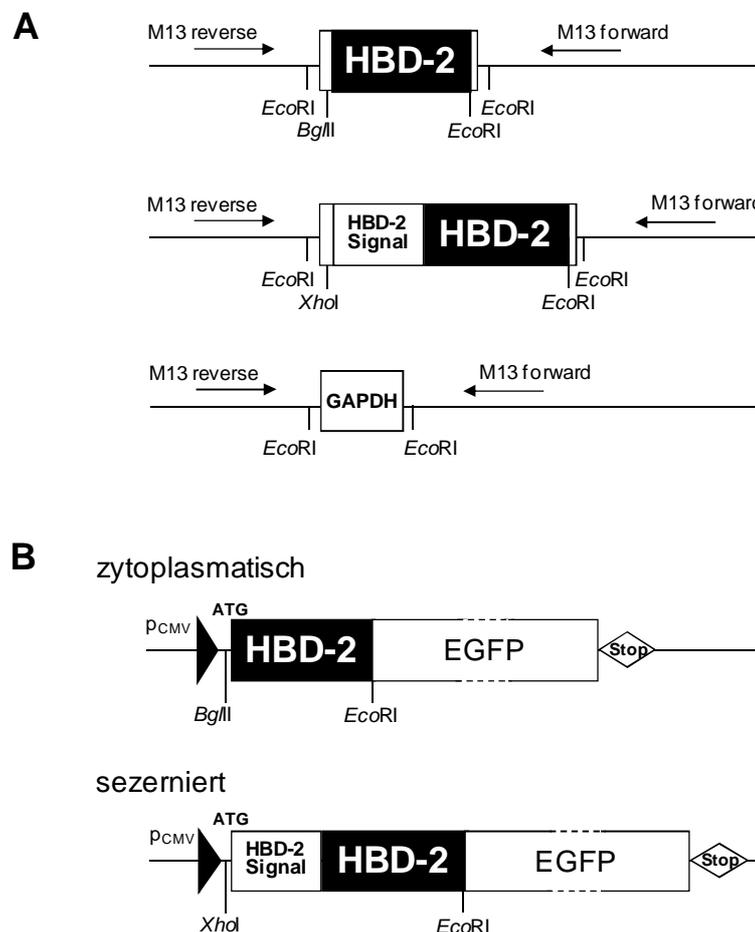


Abbildung 17: Konstrukte von HBD-2 und GAPDH als Standard in quantitativer TaqMan-PCR und für die rekombinante eukaryontische Expression von HBD-2-EGFP-Fusionsproteinen. Für die Klonierung und Charakterisierung notwendige Spaltorte für die Restriktasen *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI und *Xho*I sind den Schemata angezeigt. (A) Lage der PCR-Produkte von HBD-2 und GAPDH im Plasmid pCR2.1-TOPO. Die Pfeile markieren die Ansatzstellen der für die Sequenzierung genutzten Primer M13 reverse und M13 forward. (B) Lage der beiden HBD-2-cDNA im Expressionsvektor pEGFP-N2 für die eukaryontische Expression von HBD-2-EGFP Fusionsproteinen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (P_{CMV}). HBD-2-EGFP wurde als zytoplasmatisches oder überwiegend sezerniertes Protein geplant.

Ergebnisse

Im ersten Schritt wurden Produkte aus der Standard-PCR mit den verschiedenen HBD-2-spezifischen bzw. dem Primer/Sonden-Gemisch für GAPDH in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert (Abbildung 17A). Aus diesen Konstrukten wurden die Richtigkeit der klonierten Sequenzen geprüft und daraus entstandene Plasmide als Standards für die quantitative TaqMan-PCR etabliert. Im Expressionsvektor pEGFP-N2 sollte ein Promoter aus dem Cytomegalievirus für die konstitutive eukaryontische Expression des HBD-2-EGFP sorgen (Abbildung 17B). Für das sezernierte Fusionskonstrukt wurde das natürliche ATG von HBD-2 als Start verwendet; für das intrazelluläre Konstrukt wurde der erste Aminosäurerest des reifen HBD-2 durch einen Methioninrest als Translationsstart ersetzt. In beiden Konstrukten wurde das Stopkodon nach dem HBD-2 durch Mutagenese inaktiviert und das Leseraster des EGFP bis zum Stopcodon aufgenommen. Der fluoreszierende Anteil des Fusionsproteins sollte eine schnelle durchflusszytometrische Identifizierung transfizierter HT-29-Zellen erlauben und das HBD-2-EGFP durch seine Größe von ~36 kDa im SDS-PAGE sicher aus Zellen und Zellkulturüberständen darstellbar sein.

3.3.2 Klonierung von HBD-2-EGFP-Fusionsproteinen

Die Ergebnisse der einzelnen Schritte aus der Klonierung der zwei cDNA von HBD-2 und des GAPDH-Standards sind in der Abbildung 18 zusammengefasst.

Die PCR-Produkte von HBD-2 hatten die erwarteten Größen von ~130 bp für das Konstrukt mit zytoplasmatischem HBD-2-EGFP bzw. ~200 bp für ein sezerniertes Fusionsprotein. Vergleichbar große Produkte entstanden nach der entsprechenden Doppelspaltung der Plasmid-DNA von pBA1 mit den Enzymen *Bam*HI/*Eco*RI bzw. von pXA2 mit *Xho*I/*Eco*RI (Abbildung 18A). Die klonierten HBD-2 Sequenzen wurden mit der veröffentlichten Sequenz (XM_0011228061) verglichen (Abbildung 18B). Beide Basenfolgen für das reife HBD-2 entsprachen der aus der Literatur bekannten Sequenz. Alle Restriktionsorte waren wie geplant eingeführt. In der Signalsequenz von HBD-2 im Klon pXA2 gab es einen Basenaustausch in der Position 45 (T->C). Das daraus resultierende Kodon TTC stand wie das Kodon TTT in der Originalsequenz für einen Phenylalaninrest. Dieser Austausch auf DNA-Ebene hatte also keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. Deswegen wurde mit dem Klon pXA2 weiter gearbeitet.

Die sequenzierten Fragmente aus pBA1 und pXA2 ergaben nach der Umklonierung in pEGFP-N2 die Klone pBA1.2 und pXA2.6 (Abbildung 18A), die zur Expression und im Falle von pXA2.6 auch zur Sekretion eines HBD-2-EGFP-Fusionsproteins in eukaryontischen Zellen geeignet sein sollten.

Das PCR-Produkt aus der cDNA von HT-29-Zellen mit dem GAPDH-spezifischen Primer/Sonden-Gemisch wurde ebenfalls in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert. Ein daraus resultierender Klon, pHGAP2, wurde sequenziert und der Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz (NM_002046.3) ergab einen Abschnitt von 123 bp aus humaner GAPDH (Abbildung 18C).

Mit diesen erfolgreichen Klonierungen waren alle Voraussetzungen für die Etablierung von HBD-2 und GAPDH als Standard in quantitativer TaqMan-PCR, sowie für die für rekombinante eukaryontische Expression von HBD-2-EGFP geschaffen.

3.3.3 Etablierung der Standards für die quantitative TaqMan-PCR

Um die Standards für die Quantifizierung der Expression durch TaqMan-PCR experimentell zu etablieren, wurden sowohl für das HBD-2 als auch für das GAPDH-spezifische Primer/Sonden-Gemisch folgende Parameter geprüft: (i) die Mengen der entsprechenden Primer/Sonden-Gemische, (ii) der Einfluss anderer Primer/Sonden-Gemische auf einen spezifischen Nachweis in Multiplex-Ansätzen, (iii) die Sensitivität des Nachweises mit definierten Template-Mengen und (iv) mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Templates (Abbildungen 19, 20; Tabelle 5).

Unabhängig der eingesetzten Menge des HBD-2-spezifischen Primer/Sonden-Gemisches waren die mittleren C_T -Werte bei gleicher Anzahl von Molekülen pXA2 vergleichbar (Abbildung 19A). Primer und Sonden lagen also bei allen getesteten Konzentrationen im Überschuss vor, so dass für folgende Versuche 360 nM des HBD-2-spezifischen Primer/Sonden-Gemisches ausreichend waren. Das GAPDH-spezifische Primer/Sonden-Gemisch beeinflusste in Multiplex-Ansätzen die HBD-2-spezifische TaqMan-PCR nicht. Dies konnte bei unterschiedlichen Molekülanzahlen der Ansätze gezeigt werden (Abbildung 19B).

Anhand einer Titration von 10^2 - 10^9 Molekülen/Ansatz pXA2/*Bgl*II wurde der logarithmische Zusammenhang dieser TaqMan-PCR gezeigt (Abbildung 19C). Der HBD-2-spezifische Nachweis war selbst für 10^2 Templates sensitiv, wobei der C_T -Wert um 32 lag. Bei bekanntem C_T -Wert war diese Regressionsgleichung geeignet die Anzahl der Ausgangsmoleküle einer HBD-2-spezifischen mRNA in einer Probe sicher zu bestimmen.

Ergebnisse

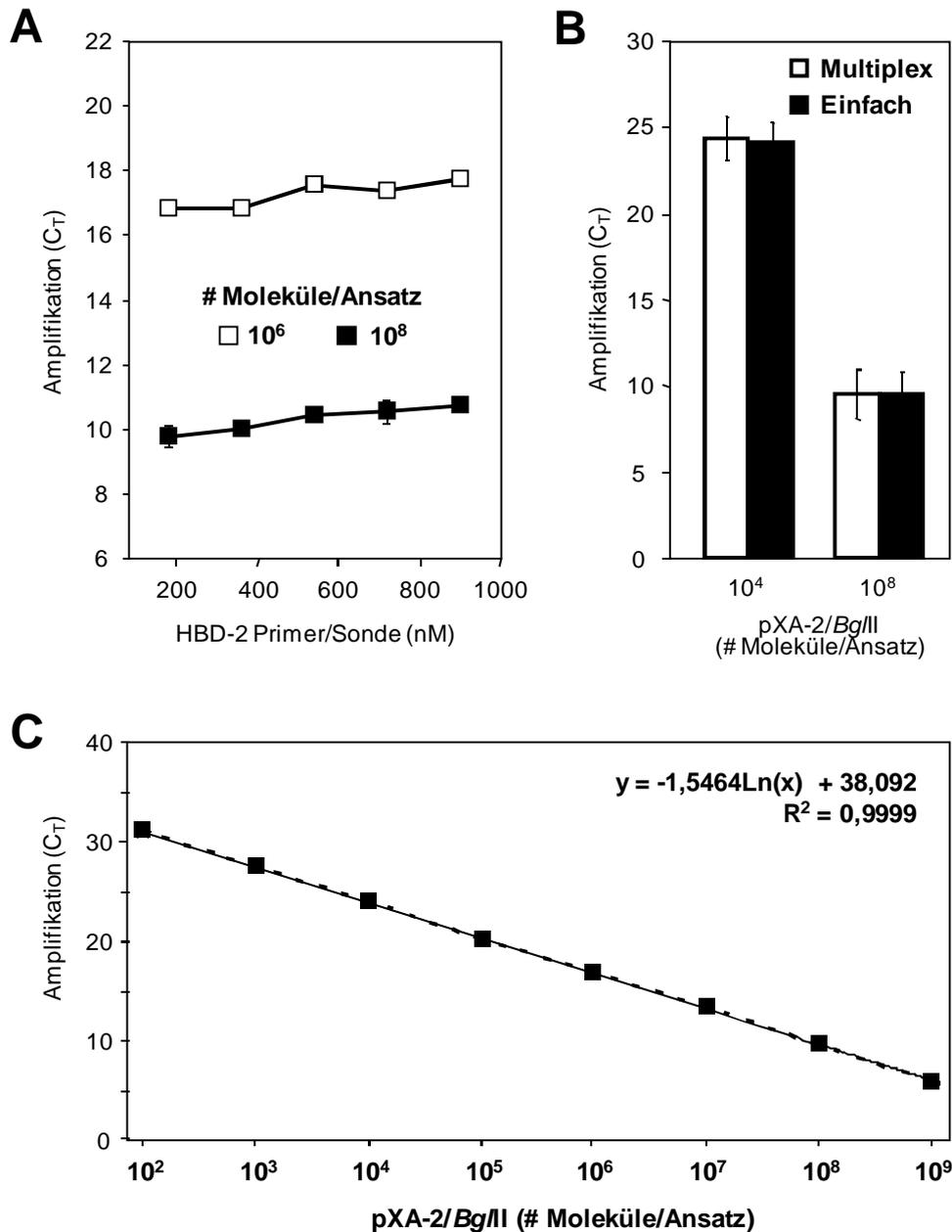


Abbildung 19: **Etablierung des Standards für eine HBD-2-spezifische quantitative TaqMan-PCR.** Definierte Molekülmengen *Bgl*II-gespaltener Plasmid-DNA pXA2 wurden als Template für die TaqMan-PCR eingesetzt. Gezeigt sind die mittleren C_T-Werte aus PCR-Ansätzen in Duplikaten. (A) Variation der Konzentration des HBD-2-spezifischen Primer/Sonden-Gemisches mit 10⁶ bzw. 10⁸ Template-Molekülen/Ansatz. (B) Nachweis von HBD-2 aus Einfachansätzen mit 360 nM HBD-2-spezifischem Primer/Sonden-Gemisch bzw. aus Multiplex-Ansätzen mit HBD-2- und GAPDH-spezifischem Primer/Sonden-Gemisch (beide 360 nM). (C) Titration des Templates pXA2/*Bgl*II in PCR mit 360 nM HBD-2-spezifischem Primer/Sonden-Gemisch. Die Formel für die Regression und das Bestimmtheitsmaß (R²) im Bereich zwischen 10² und 10⁹ Molekülen/Ansatz sind angegeben.

Ergebnisse

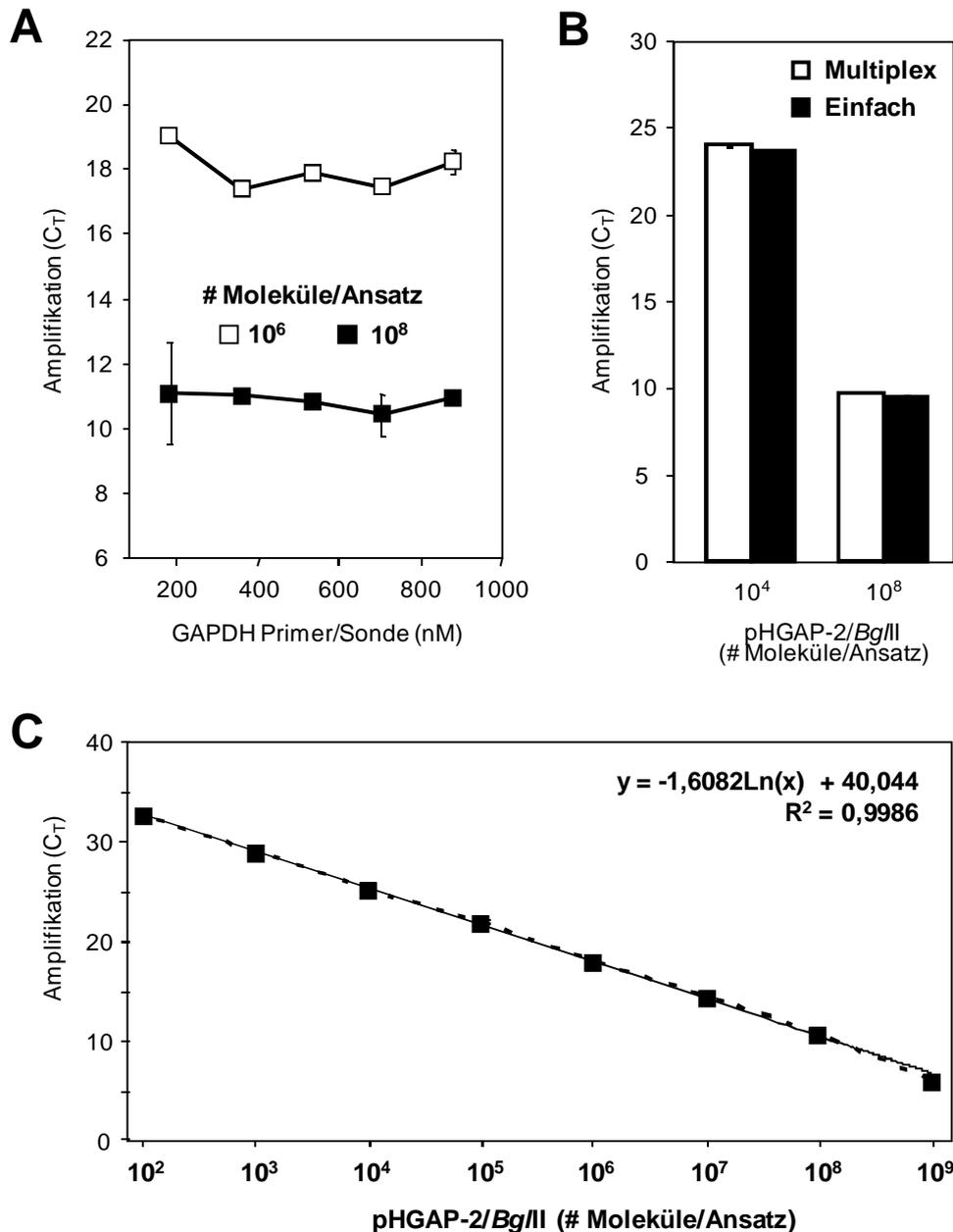


Abbildung 20: **Etablierung des Standards für eine GAPDH-spezifische quantitative TaqMan-PCR.** Definierte Molekülmengen *BgIII*-gespaltener Plasmid-DNA pHGAP2 wurden als Template für die TaqMan-PCR eingesetzt. Gezeigt sind die mittleren C_T-Werte aus PCR-Ansätzen in Duplikaten. (A) Variation der Konzentration des GAPDH-spezifischem Primer/Sonden-Gemischs mit 10⁶ bzw. 10⁸ Template-Molekülen/Ansatz. (B) Nachweis von GAPDH aus Einfachansätzen mit 360 nM GAPDH-spezifischem Primer/Sonden-Gemisch bzw. aus Multiplex-Ansätzen mit GAPDH- und HBD-2-spezifischem Primer/Sonden-Gemisch (beide 360 nM). (C) Titration des Templates pHGAP2/*BgIII* in PCR mit 360 nM GAPDH-spezifischem Primer/Sonden-Gemisch. Die Formel für die Regression und das Bestimmtheitsmaß (R²) im Bereich zwischen 10² und 10⁹ Molekülen/Ansatz sind angegeben.

Wie auch für HBD-2 war für das GAPDH-spezifische Primer/Sonden-Gemisch eine Konzentration von 360 nM ausreichend für den spezifischen GAPDH-Nachweis mit der quantitativen TaqMan-PCR (Abbildung 20A). Eine geringere Konzentration führte

Ergebnisse

allerdings zu einem Anstieg des C_T -Wertes und deutete darauf hin, dass hier die Komponenten nicht mehr im Sättigungsbereich lagen. In der Multiplex-Analyse beeinflusste das HBD-2-spezifische Primer/Sonden-Gemisch die GAPDH-spezifische TaqMan-PCR nicht (Abbildung 20B). Auch für GAPDH war der Zusammenhang der Titration für 10^2 - 10^9 Moleküle/Ansatz pHGAP logarithmisch und der GAPDH-spezifische Nachweis war auch für 10^2 Templatemoleküle sensitiv (Abbildung 20C). Mit Hilfe der Regressionsgleichung konnte bei bekanntem C_T -Wert von GAPDH die Anzahl der Ausgangsmoleküle berechnet werden.

Anschließend wurde die Kreuzreaktivität der Primer/Sonden-Gemische in Einzel- und Multiplex-Ansätzen mit dem jeweils anderen klonierten Template untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kreuzreaktivität der Primer/Sonden-Gemische für HBD-2 und GAPDH mit dem jeweils anderen Template in der quantitativen TaqMan-PCR. Definierte Molekülmengen mit *Bgl*I linearisierter Plasmid-DNA als Template sowie 360 nM HBD-2- bzw. GAPDH-spezifische Primer/Sonden-Gemische wurden in Einzel- und Multiplex-Ansätzen in der quantitativen TaqMan-PCR eingesetzt. In den Kontrollansätzen wurde die DNA durch *A. dest.* ersetzt. Mittelwert \pm SD aus zwei Experimenten in Duplikaten.

Primer/ Sonden-Gemisch	Template		Amplifikation (C_T)
	Art	Moleküle/Ansatz	
GAPDH (Einzel)	ohne		36,04
	pXA2/ <i>Bgl</i> I	1×10^8	$36,61 \pm 0,38$
		1×10^4	35,88
GAPDH (Multiplex mit DEFB4)	ohne		n.b.
	pXA2/ <i>Bgl</i> I	1×10^8	n.b.
		1×10^4	n.b.
HBD-2 (Einzel)	ohne		$32,83 \pm 3,57$
	pHGAP2/ <i>Bgl</i> I	1×10^8	$30,49 \pm 1,47$
		1×10^4	$33,03 \pm 3,76$
HBD-2 (Multiplex mit GAPDH)	ohne		$33,01 \pm 3,29$
	pHGAP2/ <i>Bgl</i> I	1×10^8	$32,10 \pm 1,17$
		1×10^4	$31,76 \pm 2,68$

n.b. = nicht bestimmbar, C_T -Wert >37

Die TaqMan-PCR für HBD-2 erzielte insgesamt niedrigere C_T -Werte in den Ansätzen im Vergleich zu GAPDH. Der Hintergrund in Ansätzen mit *A. dest.* oder pHGAP2/*Bgl*I-Template in mittleren (10^4) und hohen Konzentrationen (10^8) war für das HBD-2-spezifische Primer/Sonden-Gemisch deutlich. C_T -Werte >34 wurden daher nicht in die Auswertung mit einbezogen. Die TaqMan-PCR für GAPDH führte dagegen zu einem sehr geringen Hintergrund in den Ansätzen mit *A. dest.* oder mit HBD-2-Template pXA2/*Bgl*I in mittleren (10^4) und hohen Konzentrationen (10^8). Hier wurden erst C_T -Werte >37 nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Mit den hier etablierten Standards sind z.B. bei begrenztem Ausgangsmaterial Multiplex-Untersuchungen zur Expression von HBD-2 und GAPDH auf transkriptioneller Ebene möglich und vereinfachen so *Screening*-Verfahren in primärem menschlichem Untersuchungsmaterial.

3.3.4 Korrelation von Gesamt-RNA zur Ausgangszellzahl

Nicht unter allen Bedingungen und insbesondere in Probenmaterial aus soliden Organen kann die Zellzahl nicht direkt ermittelt werden. Hier ist ein Korrelation über die cDNA-Menge eines oder mehrerer *Housekeeping*-Proteine möglich. Eine Standardisierung der quantitativen TaqMan-PCR gestattet es dann die Anzahl nachweisbarer mRNA-Moleküle in einzelnen Zellen zu bestimmen. Experimentelle Voraussetzungen waren hier die Reproduzierbarkeit der Wiederfindung von GAPDH und eine exemplarische Korrelation der Gesamt-RNA-Menge zur Ausgangszellzahl vor der Präparation (Abbildung 21).

Im Bereich zwischen 1×10^5 und 1×10^6 HT-29-Zellen in der Präparation korrelierte die gewinnbare Menge der Gesamt-RNA mit der eingesetzten Zellzahl. Bei bekannter Gesamt-RNA konnte mit Hilfe der Regressionsgleichung die Ausgangszellmenge bestimmt werden (Abbildung 21A). Amplifikation von GAPDH aus gleichen eingesetzten Mengen cDNA führte zu den gleichen C_T -Werten unabhängig von der Ausgangszahl der HT-29-Zellen in der Präparation. Dies bewies die Reproduzierbarkeit der Bestimmung und war die Grundlage für die absolute Quantifizierung von HBD-2 (Abbildung 21B).

Ergebnisse

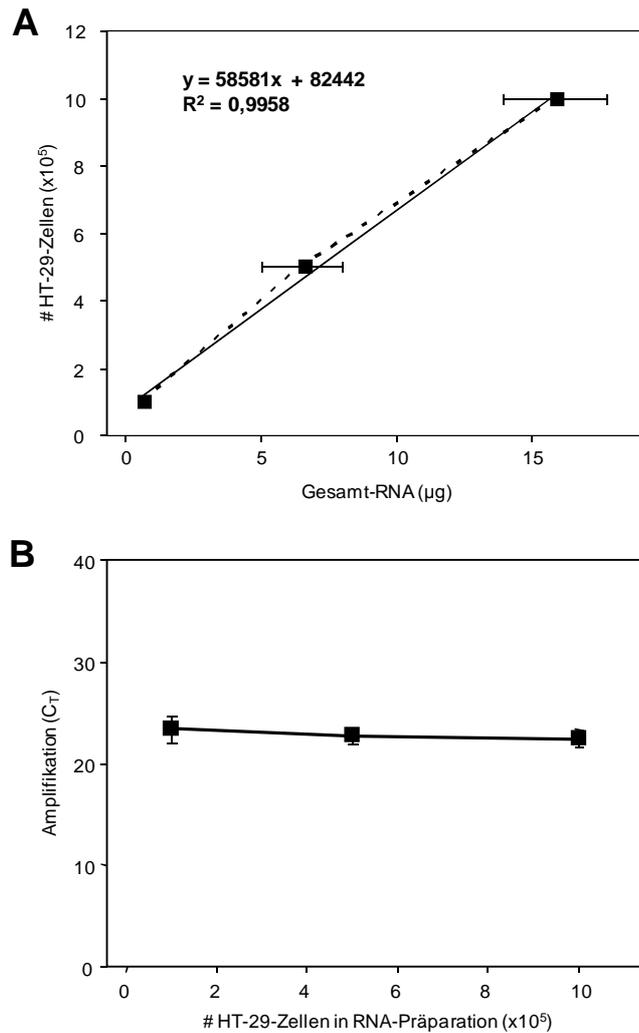


Abbildung 21: **Reproduzierbarkeit der RNA-Präparation und der quantitativen TaqMan-PCR für GAPDH.** (A) HT-29-Zellen aus Standardkultur wurden abgelöst, gezählt und aus definierten Zellzahlen die Gesamt-RNA präpariert. Aus allen Proben wurden die RNA-Mengen spektrophotometrisch bestimmt. Mittelwert \pm SD aus Präparationen in Triplikaten und anschließender Konzentrationsbestimmung in Duplikaten. Regressionsgleichung und Korrelationskoeffizient sind angegeben. (B) Gleiche Volumina aus cDNA-Ansätzen mit 1,25 μg Gesamt RNA wurden in GAPDH-spezifischer quantitativer TaqMan-PCR eingesetzt und die entsprechenden C_T -Werte ermittelt. Mittelwert \pm SD aus Präparationen in Triplikaten und anschließender quantitativer TaqMan-PCR in Duplikaten.

3.3.5 Quantitative TaqMan-PCR zum Nachweis der HBD-2-Expression durch HT-29-Zellen

Die vorher mit semiquantitiver PCR bewertete cDNA aus den Experimenten zur Behandlung von HT-29-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF α , IL-6, bzw. IL-17 (vgl. Abbildungen 12-16, Tabelle 6) wurden punktuell mit der etablierten quantitativen TaqMan-PCR erneut untersucht und die Ergebnisse mit denen aus der semiquantitativen Bestimmung verglichen (Abbildung 22).

Ergebnisse

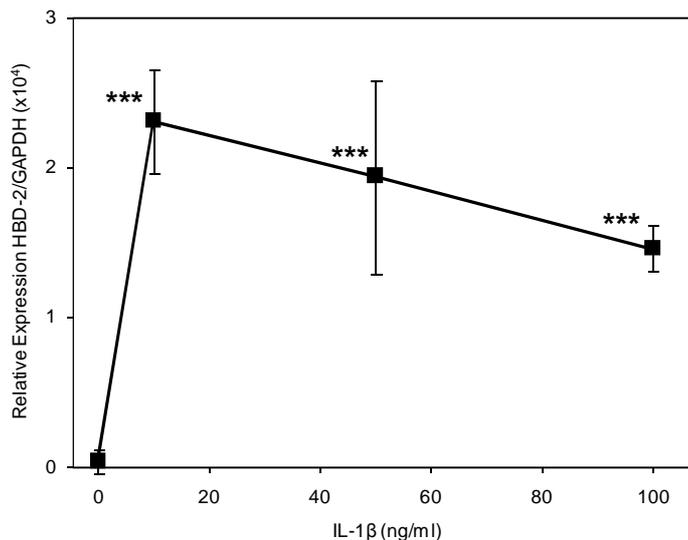


Abbildung 22: **Effekt von IL-1 β auf die Expression von HBD-2 durch HT-29-Zellen.** Die für die Abbildungen 10 und 12 beschriebene cDNA aus HT-29-Zellen nach Inkubation in Reduktionsmedium wurde in HBD-2- bzw. GAPDH-spezifischen quantitativen TaqMan-PCR eingesetzt. Als Standard wurden definierte Molekülmengen der entsprechenden Plasmid-DNA pXA2/*Bgl*II bzw. pHGAP2/*Bgl*II mitgeführt und daraus die Anzahl HBD-2- bzw. GAPDH-spezifischer cDNA-Moleküle in den Ansätzen ermittelt. Die relative Expression von HBD-2 ist als Quotient von HBD-2- und GAPDH-Molekülen gezeigt. Mittelwert \pm SD aus Kulturansätzen in Triplikaten und anschließender quantitativer TaqMan-PCR in Duplikaten. *** $p < 0,001$ mit Anova und nachfolgenden t-Tests nach Kruskal-Wallis im Vergleich zur Kontrolle ohne IL-1 β .

Tabelle 6: **Effekt von IL-6, IL-17 bzw. TNF α auf die Expression von HBD-2 durch HT-29-Zellen.** Die für die Abbildungen 13, 15 und 16 beschriebene cDNA aus HT-29-Zellen wurde in HBD-2- bzw. GAPDH-spezifischen quantitativen TaqMan-PCR eingesetzt. Als Standard wurden definierte Molekülmengen der entsprechenden Plasmid-DNA pXA-2/*Bgl*II bzw. pHGAP-2/*Bgl*II mitgeführt und daraus die Anzahl HBD-2- bzw. GAPDH-spezifischer cDNA-Moleküle in den Ansätzen ermittelt. Die relative Expression von HBD-2 ist als Quotient von HBD-2- und GAPDH-Molekülen gezeigt. Mittelwert \pm SD aus Kulturansätzen in Triplikaten und anschließender quantitativer TaqMan-PCR in Duplikaten.

Zytokin		Relative Expression HBD-2/GAPDH (x10 ⁴)
ohne		0,075 \pm 0,049
TNF α	10 ng/ml	0,014 \pm 0,005
	100 ng/ml	0,035 \pm 0,012
IL-6	10 ng/ml	0,030 \pm 0,012
	100 ng/ml	0,120 \pm 0,075
IL-17	10 ng/ml	0,017 \pm 0,008
	100 ng/ml	0,222 \pm 0,253

Ohne Zytokinzusatz war aus HT-29-Zellen auch durch die quantitative TaqMan-PCR nur eine geringe Basalexpression von HBD-2 nachweisbar. In Gegenwart von 10 ng/mL IL-1 β war der Quotient aus HBD-2- und GAPDH-Molekülen signifikant um den Faktor 10-20 gesteigert. Höhere Konzentrationen von IL-1 β verstärkten die Wirkung auf die HBD-2-Expression nicht. Die Unterschiede der relativen Expression zwischen 10 und 100 ng/mL waren nicht signifikant.

Wie auch für IL-1 β bestätigte die quantitative TaqMan-PCR die mit semiquantitativer PCR erhobenen Befunde für IL-6, IL-17 und TNF α . Die drei letztgenannten Zytokine beeinflussten die Expression von HBD-2 in HT-29-Zellen nicht.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte HBD-2-spezifische quantitative TaqMan-PCR war damit als neue Hochdurchsatz-Methode geeignet und gestattet künftige *Screening*-Ansätze für die HBD-2-Expression in Zelllinien und primären Zellen. Mit der hier vorgestellten Methodik kann dieser Nachweis auf andere humane Defensine erweitert werden.

3.4 Etablierung der Bedingungen für den Nachweis von HBD-2 im Western-blot

3.4.1 Bedingungen für die Proteindarstellung durch SDS-PAGE

Defensine sind mit einer Größe von 5-10 kDa kleine Proteine, fast schon Peptide. Es ist nicht bekannt, ob auch Defensine natürlicherweise Aggregate mit anderen, größeren Proteinen bilden, die die analytische Darstellung beeinflussen, aber in eine Auswertung mit einbezogen werden müssten. Deswegen sollten in einem Elektrophoresesystem mit einer maximalen Laufstrecke von 5,5 cm zunächst Bedingungen für die optimale Proteinauftrennung für einen Größenbereich von 5-100 kDa etabliert werden. Dazu wurden diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schrägger und Laemmli durchgeführt (Abbildung 23).

Ergebnisse

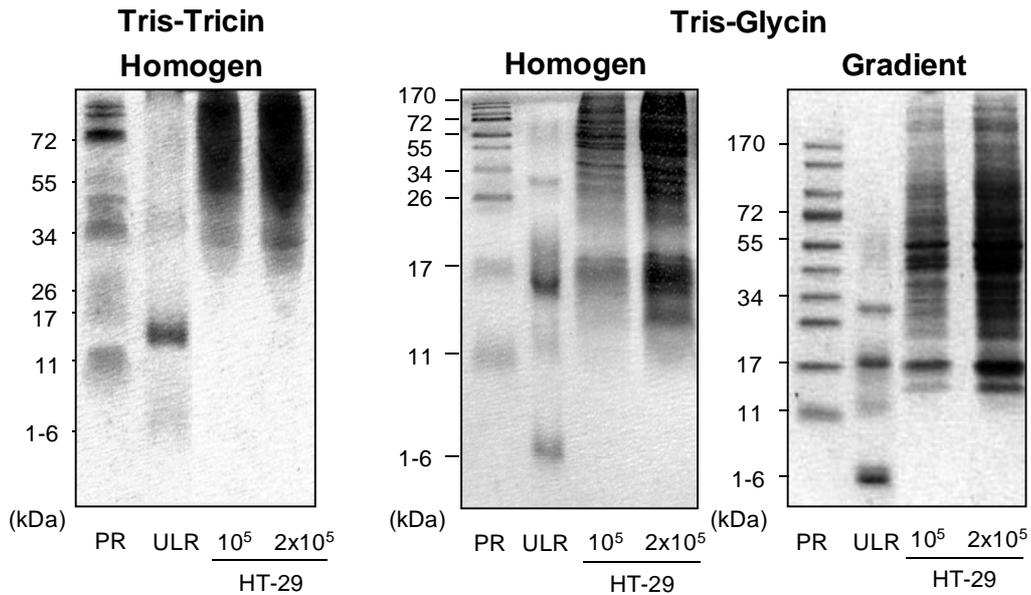


Abbildung 23: **Auftrennung von Gesamtlysaten von HT-29-Zellen durch SDS-PAGE in verschiedenen Puffersystemen.** HT-29-Zellen (1×10^5 bzw. 2×10^5) wurden in $20 \mu\text{L}$ reduzierendem Ladepuffer 6 min, bei 100°C lysiert und die Proteine der Zellysate mit SDS-PAGE aufgetrennt. Dazu wurde ein Tris-Tricine-Puffersystem nach Schägger mit homogenem Trenngel/16,5% Polyacrylamid verwendet (links). Zum Vergleich wurden diese Proben in einem Tris-Glycin-Puffersystem nach Lämmli mit homogenem Trenngel/20% Polyacrylamid (Mitte) bzw. mit einem Gradientengel/10-22,5% Polyacrylamid (rechts) aufgetrennt. Als Kontrolle wurden zwei gefärbte M_r -Standards im Größenbereich 1-170 kDa mitgeführt. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt.

In allen untersuchten Puffer- und Gelvarianten war die Coomassie-Färbung nicht empfindlich genug, aus den Proben Proteine mit einer Größe $<15 \text{ kDa}$ darzustellen. Die Auftrennung in diesem Bereich wurde daher nur anhand der vorgefärbten Markerbanden bewertet. Im Tris-Tricin-Puffersystem führte die geringe Trennschärfe in den Gesamtlysaten und den Markerproteinen zu ungleichmäßigen, schlecht getrennten Banden bei großen Proteinen. Ein hoher Salzgehalt und die insgesamt große Proteinmenge ($\sim 100 \mu\text{g}$) der Probe, die wegen der erwarteten geringen Mengen der kleinen Defensine gewählte wurden, verhinderten eine gleichmäßige Separation. Das homogene SDS-PAGE im Tris-Glycin-Puffersystem lieferte distinkte Banden größerer Proteine. Die Trennschärfe bei Proteinen $<20 \text{ kDa}$ war aber gering. Eine gleichmäßige Auftrennung wurde im Gradientengel erreicht. Die Proteine der Zellysate und die Marker waren in einem weiten Größenbereich von 170 bis 10 kDa deutlich dargestellt. Peptide $<10 \text{ kDa}$ aus dem Marker waren hinreichend von den anderen Proteinen unterschieden.

Damit war das Gradientengel mit Polyacrylamidkonzentrationen von 10-22,5% im SDS-PAGE nach Laemmli für die Proteinauftrennung aus Zellysaten am besten geeignet. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle folgenden Western-blots mit solchen SDS-PAGE durchgeführt.

3.4.2 Titration von Primär- und Sekundärantikörpern im Dot-blot

Die Antikörperkonzentrationen im Western-blot sollten geeignet sein, Proteine so zu detektieren, dass spezifische Banden nicht überstrahlt erscheinen oder unspezifische Bindungen entstehen. Daher wurden die wichtigsten verwandten Primär- und Sekundärantikörper für HBD-2 und β -Aktin gemeinsam auf definierten Proben im Dot-blot titriert (Abbildung 24).

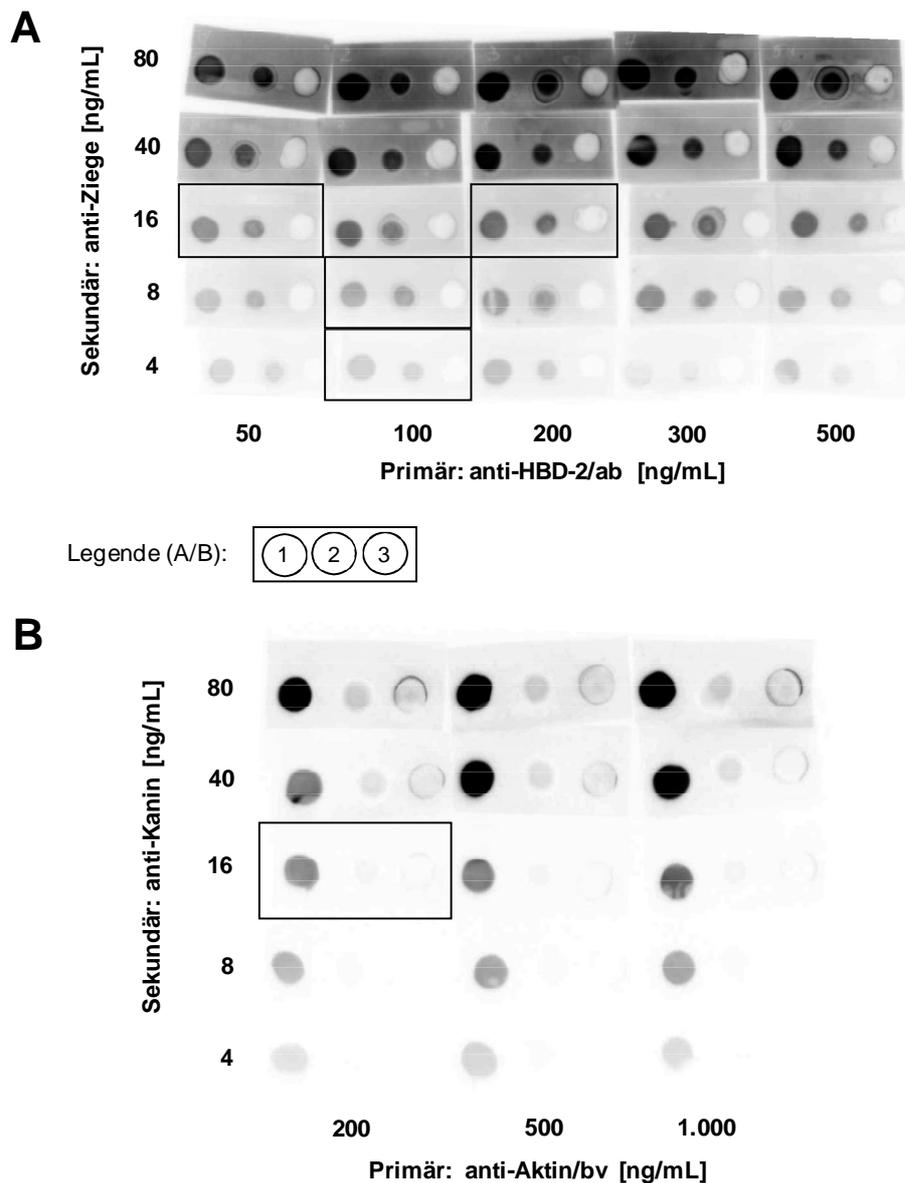


Abbildung 24: **Titration der Antikörperkombinationen im HBD-2- bzw. β -Aktin-spezifischen Dot-blot.** Auf Nitrozellulosemembranen wurden repetitiv folgende Proben aufgetropft: (1) 18 μ g DAT, (2) 6 μ l Standardmedium und (3) Gesamtlysate aus 4×10^4 unbehandelten HT-29-Zellen. Die Membranen wurden mit Milchpulver blockiert und anschließend mit den beiden Antikörperlösungen inkubiert. Ein schwarzer Rahmen hebt bevorzugte Kombinationen der Antikörper für den Western-blot hervor. (A) Nachweis von HBD-2 mit anti-HBD-2/ab als primärem und anti-Ziege als sekundärem Antikörper. (B) Nachweis von β -Aktin mit anti-Aktin/bv als primärem und anti-Kanin als sekundärem Antikörper.

Ergebnisse

Alle Kombinationen aus primären und sekundären Antikörpern für HBD-2 erkannten im Zelllysate der HT-29-Zellen kein Antigen (Abbildung 24A). Das entsprach der Erwartung, da wie in der quantitativen PCR gezeigt (vgl. Abbildung 6) ohne Induktion die HBD-2-Basalexpression gering war. In dem Proteinextrakt aus der Darmprobe wurde ein Antigen gezeigt. Überraschenderweise war mit der hier genutzten Antikörperkombination auch aus dem serumhaltigen Standardmedium allein ein deutlicher Nachweis möglich. Bei den vier ausgewählten Kombinationen war der Hintergrund im Vergleich zu den Proben gering. Beim primären anti-HBD-2/ab betrug die Konzentrationen 100-200 ng/mL und beim sekundären anti-Ziege 8-16 ng/mL.

Alle Antikörperkombinationen für β -Aktin markierten Antigene der Darmprobe, nicht des Standardmediums (Abbildung 24B). Die geringe Gesamtproteinmenge des Zelllysates der HT-29-Zellen verhinderte hier möglicherweise, dass das β -Aktin-Antigen erkannt wurde. Die ausgewählten Antikörperkonzentrationen waren 200 ng/mL anti-Aktin/bv und 16 ng/mL anti-Kanin. Die Kombinationen der Antikörperkonzentrationen für HBD-2 und β -Aktin wurden in weiteren Versuchen mit Western-blots verwendet.

3.4.3 Einfluss der Blockierung der Membran auf die Sensitivität des Western-blots

Die hohe Bindungskapazität der Membranen für Proteine sollte durch verschiedene Blockierungsstrategien so aufgehoben werden, dass eine spezifische Antigen/Antikörper-Bindung vor geringem Hintergrund gut dargestellt war. Dazu wurden proteinhaltige und proteinfreie Blockierungslösungen im Western-blot mit den im Dot-blot ermittelten Antikörperkonzentrationen verglichen (Abbildung 25).

Bei gleichen Antikörperkonzentrationen und Belichtungszeiten führte die Präinkubation mit Milchpulver zu einem stärkeren Hintergrund als das Pferdeserum oder das proteinfreie Reagenz (Abbildung 25A). Bei Verwendung des proteinfreien Reagenz trat die als spezifisch angenommene Bande am deutlichsten vor dem Hintergrund hervor.

Aus dem Proteinextrakt der Darmprobe wurde mit dem HBD-2-spezifischen anti-HBD-2/ab mit Ausnahme des Ansatzes, bei dem die Membran mit Pferdeserum vorbehandelt wurde, ausschließlich eine Bande um 30 kDa dargestellt. Im erwarteten Größenbereich von <10 kDa für freies HBD-2 war hingegen kein Protein spezifisch nachweisbar (Abbildung 25B).

In allen folgenden Western-blots wurden die Membranen mit dem proteinfreien Reagenz vorinkubiert und für den Nachweis von HBD-2 wurde 50 ng/mL anti-HBD-2/ab als primärer und 16 ng/mL anti-Ziege als sekundären Antikörper für HBD-2 ausgewählt.

Ergebnisse

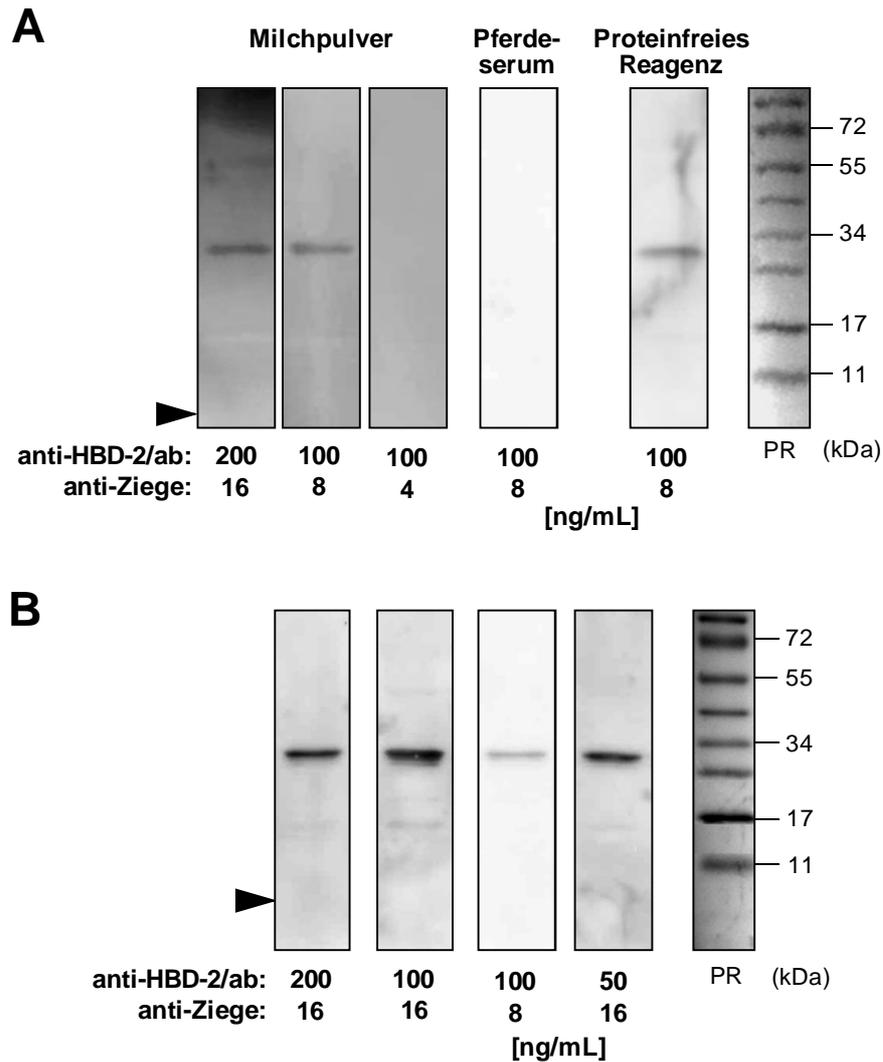


Abbildung 25: **Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Membran und Auswahl der Antikörperkonzentrationen für den spezifischen Nachweis von HBD-2.** Proteinextrakt der Darmprobe (40 µg) und M_r -Standard (PR) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit verschiedenen Blockierungslösungen inkubiert bevor sie sukzessive mit anti-HBD-2/ab und anti-Ziege in der entsprechenden Blockierungslösung behandelt wurden. Schwarze Pfeile markieren die erwartete Größe von HBD-2. (A) Membranstücke wurden mit 5% Milchpulver, 5% Pferdeserum bzw. proteinfreiem Reagenz inkubiert. (B) Verschiedene Konzentrationen von Primär- und Sekundärantikörper wurden nach Inkubation mit proteinfreiem Reagenz im Western-blot titriert.

3.4.4 Etablierung eines Antikörpers für den Vergleich der Probenmengen

Für den Nachweis der Gleichbeladung der Gele wurden das 42 kDa große β -Aktin, ein ubiquitär vorkommendes Protein des Zytoskeletts, und das 45-52,5 kDa große Zytokeratin, ein spezifisches Protein von Epithelzellen, verglichen (Abbildung 26).

Ergebnisse

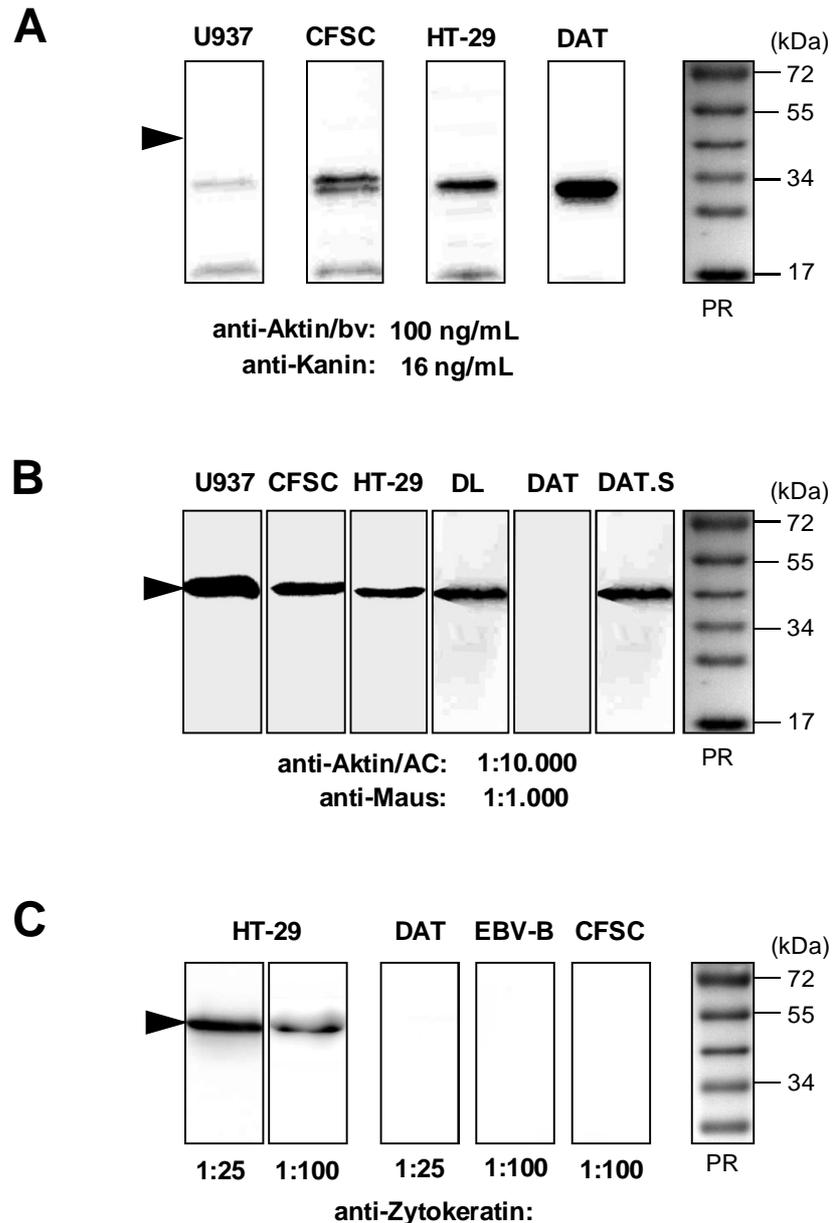


Abbildung 26: **Etablierung eines Kontroll-Antikörpers für die Gleichbeladung der Proteine im Western-blot.** Durch Proteinauftrennung mit SDS-PAGE und Transfer wurden Membranen mit Zelllysaten aus 1×10^6 Zellen der Zelllinien HT-29, U937, CFSC und EBV-B, sowie aus der humanen Darmprobe 40 μ g Proteinextrakt (DAT), Sediment (DAT.S) und 20 μ l Proteingesamtlysat (DL) und M_r -Standard (PR) hergestellt. Die Membranstreifen wurden mit folgenden Antikörperlösungen inkubiert: (A) für β -Aktin mit anti-Aktin/bv und anti-Kanin; (B) für β -Aktin mit anti-Aktin/AC und anti-Maus und (C) für Zytokeratin mit anti-Zytokeratin und anti-Maus. Schwarze Pfeile markieren die erwartete Größe von β -Aktin oder Zytokeratin.

Nach Inkubation mit den im Dot-blot ermittelten Antikörperkonzentrationen für anti-Aktin/bv und den entsprechenden anti-Kanin Sekundärantikörper waren bei der epithelialen Zelllinie HT-29, dem Proteinextrakt der Darmprobe, der Leukämiezelllinie U937 und der CFSC-Zelllinie der Ratte bei 30 kDa eine Bande erkennbar, nicht aber in der erwarteten Größe um ~42 kDa (Abbildung 26A). Dieses gleichförmige Muster war umso überraschender, da

Ergebnisse

die Proteinlösungen aus verschiedenen Spezies stammten und eine Kreuzreaktion mit β -Aktin aus der Ratte für den anti-Aktin/bv nicht beschrieben war.

Ein anderer Antikörper für β -Aktin, anti-Aktin/AC, detektierte mit dem entsprechenden anti-Maus Sekundärantikörper bei den gleichen Proben spezifisch die erwartete Bande von ~42 kDa (Abbildung 26B). Diese war bei allen untersuchten Zelllinien und dem Proteingesamtlysat des humanen Kolons nachweisbar. In der mit Azetonitril und Trifluoressigsäure behandelten Darmprobe wurde β -Aktin nur im Sediment und nicht im lyophilisierten Überstand gefunden. β -Aktin war also nur bedingt geeignet die Gleichbeladung zu verifizieren, wenn Proteinextrakte geprüft werden, in denen überwiegend kleine Proteine enthalten waren.

Anti-Zytokeratin detektierte die erwartete Bande bei 52 kDa ausschließlich in den HT-29-Zellen und nicht in den mesenchymalen Zelllinien des Menschen und der Ratte, sowie nicht im Proteinextrakt der Darmprobe. Die epitheliale Natur der Zelllinie HT-29 wurde bestätigt. Zum Vergleich der Probenmengen epithelialer Zellen konnte der Zytokeratin-spezifische Antikörper ebenso wie der β -Aktin-spezifische Antikörper verwendet werden. In Gewebeproben, die neben epithelialen auch mesenchymale Zellen enthalten, konnte die Gesamtproteinmenge über Zytokeratin nicht repräsentativ dargestellt werden. Bei allen weiteren Versuchen wurde daher das ubiquitäre Antigen β -Aktin herangezogen.

3.4.5 Vergleich der HBD-2-spezifischen Antikörper anti-HBD-2/ab und anti-HBD-2/sc

Der HBD-2-spezifische Antikörper anti-HBD-2/ab detektierte in den bisher verwendeten Proben keine Bande, die einem $M_r < 10$ kDa entsprach. Um auszuschließen, dass das auf ein Fehlen von HBD-2 in den Proben zurückzuführen war, wurden weitere Zellen mit herangezogen. Wie in den vorangegangenen Versuchen (vgl. Abbildung 25) detektierte der HBD-2-Antikörper anti-HBD-2/ab im Proteinextrakt der Darmprobe eine Bande bei 30 kDa (Abbildung 27A). Alle Zelllysate unabhängig von ihrem Ursprung aus Epithel oder Mesenchym wiesen das gleiche Bandenmuster mit zwei typischen Banden bei 30 und 17 kDa auf. Auch im Lysat der hepatischen Sternzelllinie der Ratte war das Muster ähnlich, nur dass um 30 kDa Doppelbanden auftraten.

Die Inkubation von HT-29-Zellen mit 10 ng/mL IL-1 β in Reduktionsmedium, bei der auf mRNA-Ebene HBD-2 induziert wurde (vgl. u.a. Abbildung 8) hatte keinen Einfluss auf die im Western-blot mit anti-HBD-2/ab dargestellten Banden (Abbildung 27A). Auch nach Inkubation von IL-1 β in Standardmedium wurden keine HBD-2-spezifischen Banden <10 kDa gefunden (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Für die Bestätigung der Spezifität des polyklonalen anti-HBD-2/ab wurde ein rekombinantes HBD-2-GST im Western-blot eingesetzt (Abbildung 27B). Etwa 100 ng dieses ~30 kDa großen Fusionsproteins wurden durch den Antikörper erkannt, während der freie Fusionspartner GST nicht mit dem Antikörper reagierte. Im Proteinextrakt der Darmprobe wurde wieder die bereits bekannte Bande dargestellt.

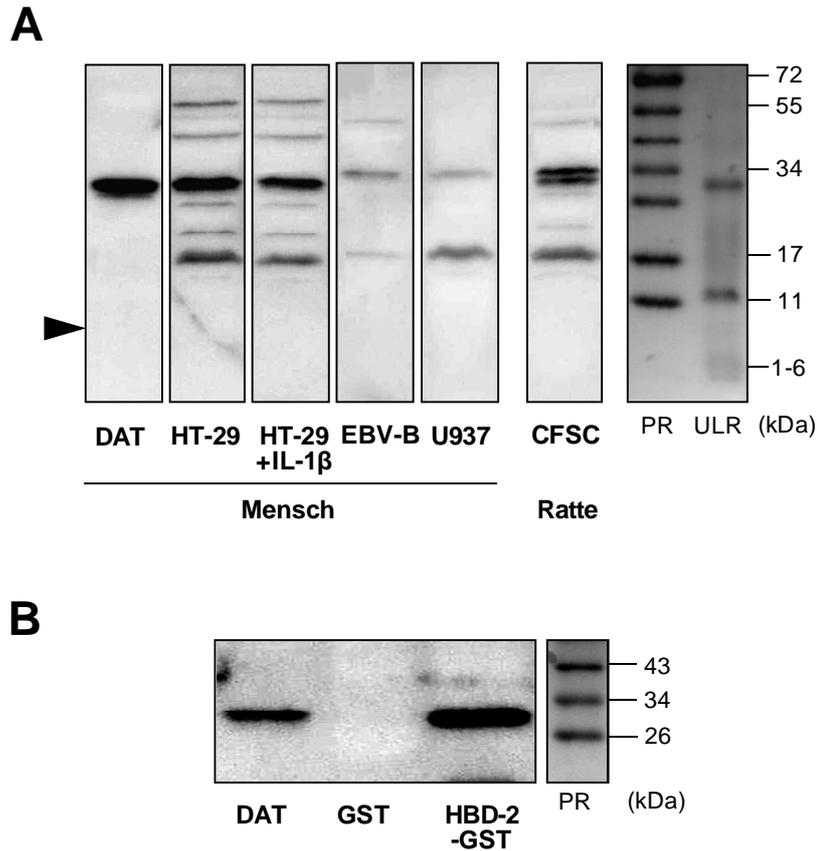


Abbildung 27: **Spezifität des HBD-2-Antikörpers anti-HBD-2/ab im Western-blot.** (A) Humane epitheliale HT-29-Zellen wurden ohne und mit 10 ng/mL IL-1 β in Reduktionsmedium für 72 h inkubiert. Jeweils 1×10^6 HT-29-Zellen, EBV-B-Zellen, U937-Zellen und CFSC-Zellen, sowie 30 μ g Proteinextrakt der Darmprobe wurden elektrophoretisch aufgetrennt. M_r -Standards (PR, ULR) dienen dem Größenvergleich. (B) Lysate von GST und HBD-2-GST exprimierenden Bakterien wurden im Vergleich zum Proteinextrakt der Darmprobe (DAT) elektrophoretisch aufgetrennt. Für den Nachweis von HBD-2 wurden alle Membranen mit 200 ng/mL anti-HBD-2/ab und 16 ng/mL anti-Ziege inkubiert.

Unter den Bedingungen des Western-blots mit anti HBD-2/ab konnte anti-HBD-2/ab nur dann spezifisch HBD-2 markieren, wenn eine definiert große Menge, wie mit dem HBD-2-GST vorlag. Aus Zellen erkannte der Antikörper auch ubiquitäre Zellproteine, die keine Verbindung zu den Defensinen hatten. Deswegen wurde ein weiterer polyklonaler HBD-2-spezifischer Antikörper, anti-HBD-2/sc, mit dem bis dahin genutzten anti-HBD-2/ab verglichen (Abbildung 28).

Ergebnisse

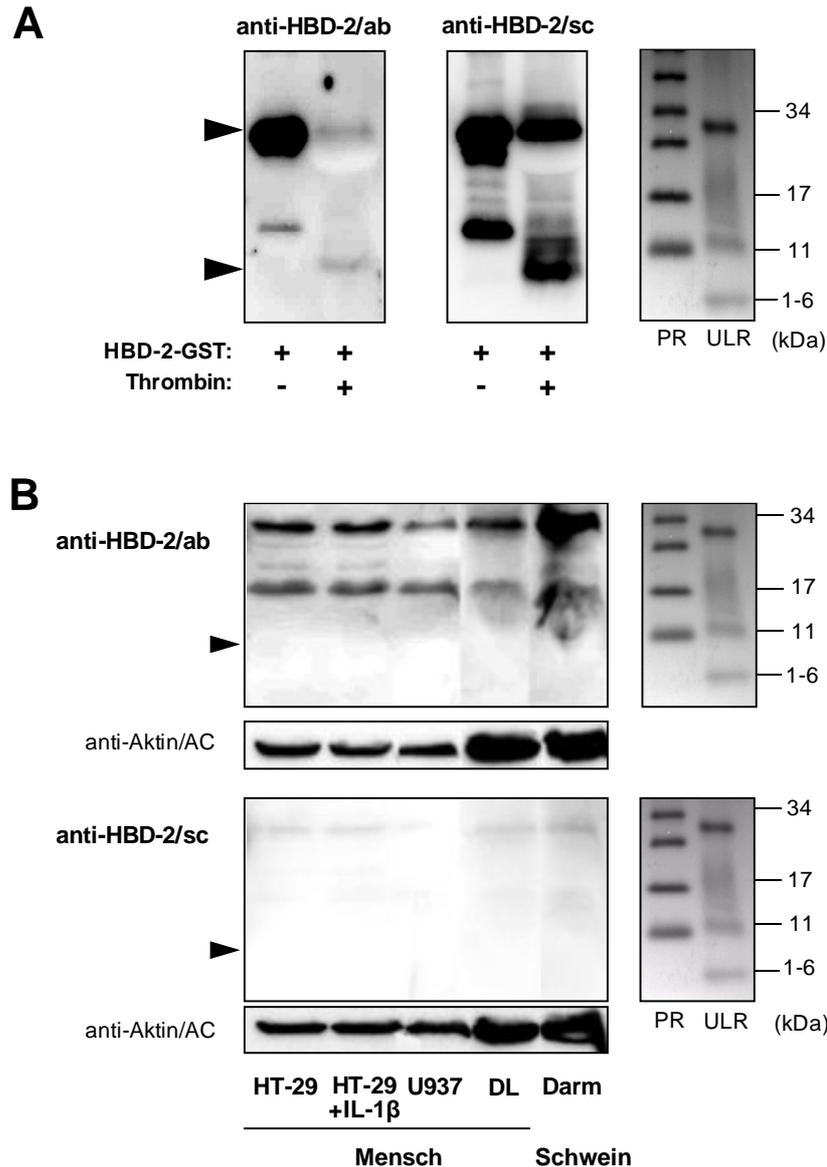


Abbildung 28: **Vergleich der Spezifität und Sensitivität der Antikörper anti-HBD-2/ab und anti-HBD-2/sc.** (A) Für die Freisetzung von HBD-2 aus dem HBD-2-GST Fusionsprotein wurden 50 µg gereinigtes HBD-2-GST mit 5 U Thrombin bei 37°C für 1 h inkubiert. Diese Probe und unbehandeltes HBD-2-GST wurden in Lysepuffer aufgenommen. (B) Zellysate aus 1×10^6 HT-29- und U937-Zellen, 20 µL Gesamtylate des Menschen (DL) und Schweins wurden in Lysepuffer aufgenommen. Die Inkubation mit IL-1 β erfolgte wie für Abbildung 27 beschrieben. Alle Proben sowie die M_r -Standards (PR, ULR) wurden in parallelen Ansätzen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit 4 µg/mL anti-HBD-2/ab oder anti-HBD-2/sc sowie mit 16 ng/mL anti-Ziege inkubiert. Die Kontrolle der Proteinbeladung erfolgte mit β -Aktin.

Beide HBD-2-Antikörper detektierten im direkten Vergleich das ~30 kDa große HBD-2-GST-Fusionsprotein und das 8 kDa große HBD-2 nach einer unvollständigen Spaltung von HBD-2-GST mit Thrombin (Abbildung 28A). Die Kontrolle GST wurde nicht detektiert (Daten nicht gezeigt). Der anti-HBD-2/sc erwies sich insbesondere beim freien HBD-2 nach Abspaltung aus HBD-2-GST sensitiver als anti-HBD-2/ab. Eine Affinität von

Ergebnisse

anti-HBD-2/sc zu anderen Proteinen aus *E. coli* BL21 konnte angesichts der großen Gesamtmenge auftragender Proteine vernachlässigt werden. In den Zelllysaten wies anti-HBD-2/sc im Vergleich zu anti-HBD-2/ab geringere Empfindlichkeit für ubiquitäre Proteine auf (Abbildung 28B). Mit beiden Antikörpern wurde aus den untersuchten primären Zellen und Zelllinien im Größenbereich von 5-10 kDa, in dem HBD-2 erwartet wurde, keine eindeutige Bande nachgewiesen.

Unter Berücksichtigung der größeren Sensitivität für das aus dem HBD-2-GST Fusionsprotein freigesetzte HBD-2 und das schwächere unspezifische Bandenmuster aus Zellproteinen wurde anti-HBD-2/sc für alle folgenden Versuche verwendet.

3.4.6 Einfluss von Zellproteinen auf die Darstellung von HBD-2 im Western-blot

Der HBD-2-Antikörper anti-HBD-2/sc konnte gereinigtes HBD-2-GST-Fusionsprotein und daraus mit Thrombin abgespaltenes HBD-2 detektieren. Inwieweit andere Proteine als HBD-2 aus Gesamtlysaten von HT-29-Zellen die Sensitivität und Spezifität von der Bindung von anti-HBD-2/sc an sein Antigen beeinflusst, wurde im nächsten Schritt geprüft (Abbildung 29).

Wurden 200 ng/mL anti-HBD-2/sc oder anti-HBD-2/ab für die Darstellung von 200 ng HBD-2-GST-Fusionsproteins im Western-blot eingesetzt, zeigte nur der anti-HBD-2/sc eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von ~30 kDa (Abbildung 29A). Der anti-HBD-2/ab war nicht sensitiv genug das Protein zu detektieren und das Färbeergebnis entsprach der Kontrolle ohne Erstantikörper. Mit Konzentrationen bis zu 2 µg/mL anti-HBD-2/sc wurden neben HBD-2-GST die angedeuteten Banden mit Größen von ~15 kDa und ~50 kDa, die möglicherweise Proteine aus *E. coli* repräsentieren, verstärkt. Als standardisierte Konzentration wurden 200 ng/mL anti-HBD-2/sc bei allen weiteren Untersuchungen von HBD-2 im Western-blot verwendet.

Das rekombinante HBD-2 stellte sich im etablierten Western-blot in einer Höhe von ~8 kDa dar, wobei bereits 1,5 pMol HBD-2 reproduzierbar gefunden wurden (Abbildung 29B). Wurde rekombinantes HBD-2 gleicher Menge in Proteinlösungen unmittelbar aus den Lysaten von 1×10^5 HT-29-Zellen aufgetragen, ergaben erst 70 pMol HBD-2 eine Bande, die in ihrer Intensität der von 1,5 pMol HBD-2 unter nativen Bedingungen entsprach. Die Sensitivität des HBD-2-spezifischen Western-blots reduzierte sich vor dem Hintergrund anderer, zellulärer Proteine aus den HT-29-Zellen etwa um den Faktor 50. Im Umkehrschluss bedeutete das, dass für den sicheren Nachweis von HBD-2 aus frisch präparierten Zellen 50fach mehr Protein als mit isoliertem HBD-2 für die Darstellung im Western-blot notwendig war. Solche hohen Konzentrationen von HBD-2 konnten durch

Ergebnisse

spezifische Anreicherung des Proteins oder eine höhere, konstitutive Expression erzielt werden.

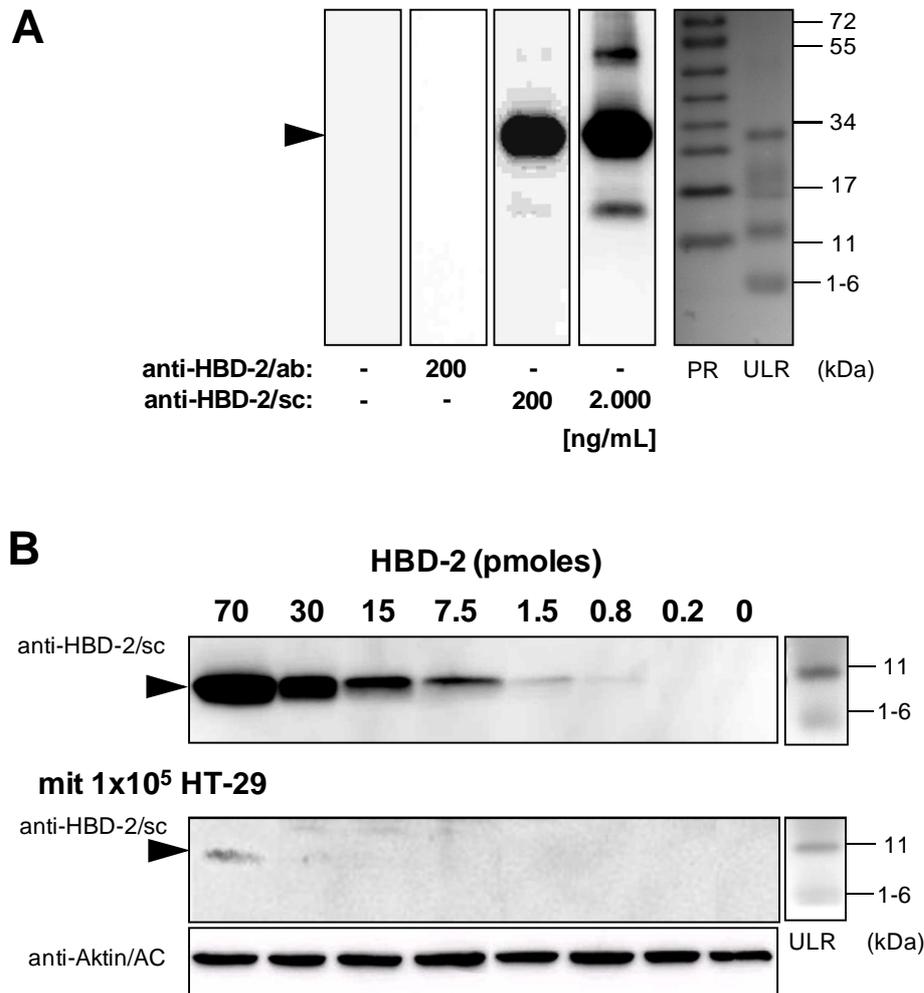


Abbildung 29: **Effekt von Zellproteinen auf die Sensitivität des Nachweises von HBD-2 im Western-blot.** Bakterienysate mit ca. 200 ng HBD-2-GST-Fusionsprotein (A), sowie definierte Konzentrationen des rekombinanten HBD-2 allein (B; obere Reihe) oder gemeinsam mit 1×10^5 Zellen (B; untere Reihe) in je 20 μ L Ladepuffer wurden elektrophoretisch aufgetrennt. M_r -Standards (PR, ULR) wurden mitgeführt. Nach Transfer auf Membranen wurde das Fusionsprotein über seinen HBD-2-Anteil mit anti-HBD-2/sc bzw. anti-HBD-2/ab wie angegeben und 16 ng/mL anti-Ziege als Zweitantikörper im Western-blot detektiert. In den Proben mit Totallysaten aus HT-29-Zellen wurde die Proteinbeladung mit anti-Aktin/AC kontrolliert.

3.5 Nachweis konstitutiv exprimierter und sezernierter HBD-2-EGFP-Fusionsproteine im Western-blot

3.5.1 Optimierung der Bedingungen für die Transfektion von Zellen mit pEGFP-N2

Für die Etablierung der für den Nachweis eines konstitutiv hochexprimierten HBD-2-Proteins aus Zellen wurden auf der Basis des Expressionsvektors pEGFP Fusionsproteine

Ergebnisse

von HBD-2 und EGFP hergestellt (vgl. Abbildung 17B). Ausgehend von elektrischen Parametern, die sich für vergleichbare Zellen im Labor bewährt hatten, wurden zunächst die Bedingungen für eine effiziente Transfektion der Zelllinien HT-29- und 3T3-L1 durch Elektroporation mit dem Grundvektor pEGFP optimiert. Die Effizienz der Plasmidaufnahme wurde über das grün fluoreszierende EGFP durchflusszytometrisch kontrolliert und die Vitalität der Zellen berücksichtigt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Transfektion adhärenter Zelllinien mit pEGFP durch Elektroporation. Jeweils 1×10^6 der entsprechenden Zellen mit und ohne pEGFP wurden in einer Elektroporationsküvette verschiedenen Feldbedingungen ausgesetzt. Nach 48 h Kultur wurden die adhärenenten Zellen abtrypsiniert und mit PI gefärbt. Die EGFP-Expression vitaler Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Mittelwert \pm SD aus Ansätzen in Triplikaten.

Zellen	Porationsbedingungen		DNA (μ g)	Vitalität (% PI-)	EGFP+ (% aus PI-)
	1. Puls (V/ μ sec)	2. Puls (V/msec)			
3T3-L1	600/600	100/20	0	89,5 \pm 4,2	1,5 \pm 0,05
	600/600	100/20	4	52,9 \pm 28,5	92,1 \pm 1,19
HT-29	600/300	100/15	0	91,5 \pm 4,8	0,2 \pm 0,03
	600/300	100/15	4	57,4 \pm 31,5	77,4 \pm 2,84
	600/600	100/15	4	71,4 \pm 36,4	83,0 \pm 1,80

Bei beiden Zelllinien wurden nach der Elektroporation ohne Plasmid keine grün-fluoreszierenden Zellen gefunden. Unter diesen Bedingungen waren mit ~90% PI-negativer Zellen deutlich mehr Zellen vital als in Gegenwart des Plasmids (50-60%). Für die Transfektion der 3T3-L1-Zellen erwies sich eine Kombination aus zwei Pulsen mit 600 V für 600 μ sec und 100 V für 20 msec als geeignet. Zwar reduzierte sich deren Vitalität deutlich um über 40%, doch das EGFP wurde von 92% der Zellen exprimiert. Auch bei den transfizierten HT-29-Zellen verminderte sich mit den zunächst getesteten Parametern die Vitalität um 35%. Von den Zellen hatten 77% das Plasmid aufgenommen und exprimierten intarzelluläres EGFP. Die Kombination aus gleichem ersten Puls mit 600 V für 600 μ sec wie für die 3T3-L1-Zellen und einem um 5 msec verkürzten zweiten Puls ergaben bei den HT-29-Zellen eine gute Vitalität. Mit maximal 85% EGFP-positiven Zellen war der Anteil der intarzellulär EGFP exprimierenden Zellen nur etwas geringer als für die 3T3-L1-Zellen. In den folgenden Untersuchungen wurden diese Parameter verwendet.

3.5.2 Expression von HBD-2-EGFP durch transfizierte HT-29-Zellen

Nach Transfektion von HT-29-Zellen mit einem entsprechenden Expressionsvektor wurde die Bildung von EGFP gezeigt. Mit den Plasmiden pBA1.2 und pXA2.6 für die konstitutive Expression von intrazellulärem bzw. sezerniertem HBD-2-EGFP-Fusionsprotein wurden entsprechende Zellen transfiziert (Abbildung 30).

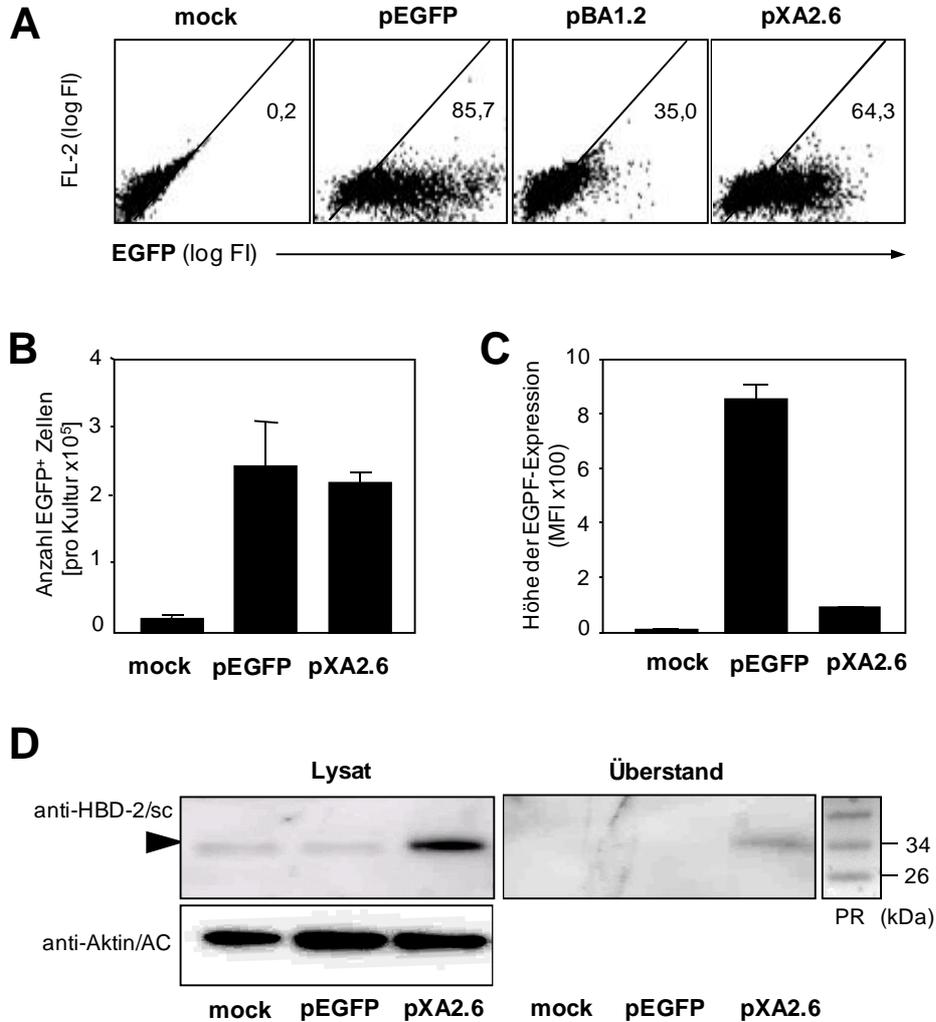


Abbildung 30: **Expression und Sekretion von HBD-2-EGFP durch transfizierte HT-29-Zellen.** Jeweils 1×10^6 HT-29-Zellen wurden ohne Plasmid (mock) und mit $4 \mu\text{g}$ pEGFP, pBA1.2 oder pXA2.6 in einer Elektroporationsküvette zwei Pulsen mit $600 \text{ V}/600 \mu\text{sec}$ und $100 \text{ V}/15 \text{ msec}$ ausgesetzt. Nach 48 h Kultur wurden die adhären Zellen abtrypsiniert und die Überstände gesammelt. (A) Die EGFP-Expression vitaler Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Färbung mit PI bestimmt und ist in repräsentativen Dot Plots gezeigt. (B) Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Gesamtzellzahl aus der Kultur bestimmt. Daraus und dem Anteil EGFP-positiver Zellen aus der Analyse von (A) wurde die Zahl EGFP- bzw. HBD-2-EGFP-exprimierender HT-29-Zellen aus den Kulturen bestimmt. Mittelwert \pm SD aus Ansätzen in Triplikaten. (C) Die Expressionshöhe von intrazellulärem (HBD-2-)EGFP individueller Zellen wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Mittelwert \pm SD aus Ansätzen in Triplikaten. (D) Totallysate von 1×10^5 Zellen und Kulturüberstände transfizierter HT-29-Zellen wurden im Western-blot mit anti-HBD-2/sc untersucht. Die Proteinbeladung aus den Lysaten von HT-29-Zellen wurde mit anti-Aktin/AC verifiziert und ein M_r -Standard (PR) mitgeführt.

Ergebnisse

In der Kontrolle nach der Elektroporation ohne Plasmid war EGFP, wie erwartet, nicht nachweisbar (Abbildung 30A). In der Kontrolle mit pEGFP lag die Transfektionseffizienz der HT-29-Zellen um 85%. Der Anteil der Zellen, die pBA1.2, das Konstrukt für intrazelluläres HBD-2-EGFP, aufgenommen hatten, betrug nur ~35,0%. Nach Transfektion mit pXA2.6 waren etwa 65% aller Zellen EGFP-positiv. Nicht nur wegen der im Vergleich zu pXA2.6 geringeren Effizienz, sondern auch wegen geringer Gesamtzellzahlen aus den Kulturen nach Transfektion mit pBA1.2 (Daten nicht gezeigt) wurde dieses Konstrukt in weiteren Versuchen nicht mehr verwendet.

Aufgrund der insgesamt höheren Zellzahlen aus den Kulturen nach Transfektion mit pXA2.6 im Vergleich zur Kontrolle mit dem Ausgangsplasmid pEGFP war die Gesamtzahl EGFP-positiver Zellen mit $\sim 2 \times 10^5$ in beiden Ansätzen vergleichbar (Abbildung 30B). Das Plasmid pXA2.6 wurde für ein sezerniertes HBD-2-EGFP konstruiert, so dass es schlüssig war, dass hier die individuelle Fluoreszenzintensität transfizierter HT-29-Zellen etwa um den Faktor 10 geringer ausfiel als nach Transfektion von pEGFP für ausschließlich intrazelluläres EGFP (Abbildung 30C). Im spezifischen Western-blot für HBD-2 wurde aus den beiden Kontrollen nach Transfektion mit pEGFP oder ohne Plasmid weder aus den Zellen noch aus dem Zellkulturüberstand ein Protein erkannt. Im Unterschied dazu wurde sowohl im Zelllysat als auch im Überstand der pXA2.6 transfizierten HT-29-Zellen eine ~ 36 kDa große Bande detektiert, die dem erwarteten M_r für das HBD-2-EGFP entsprach (Abbildung 30D). Damit war das sekretorische Fusionsprotein sowohl direkt aus den produzierenden Zellen als auch aus dem umgebenden Medium darstellbar.

Nach Transfektion mit pXA2.6 waren für die Optimierung der Bedingungen für die Wiederfindung von konstitutiv exprimiertem HBD-2-Protein ausreichend Zellen für die Prüfung in Zelllysaten vorhanden. Gleichzeitig lag ein sezerniertes HBD-2-EGFP-Fusionsprotein vor, das Untersuchungen in Überständen gestattete.

3.5.3 Expression von HBD-2-EGFP durch transfizierte primäre Zellen

Wegen der Oligoklonalität von Zelllinien die sich aus der Segregation über viele Passagen *in vitro* einstellt, waren Aussagen über polyklonale primäre Zellen nur bedingt abzuleiten. Um das Potential primärer Zellen zur Expression und Sekretion eines HBD-2-EGFP-Fusionsproteins zu testen, wurden Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett von C57/BL10-Mäusen mit dem Vektor pXA2.6 transfiziert (Abbildung 31).

Ergebnisse

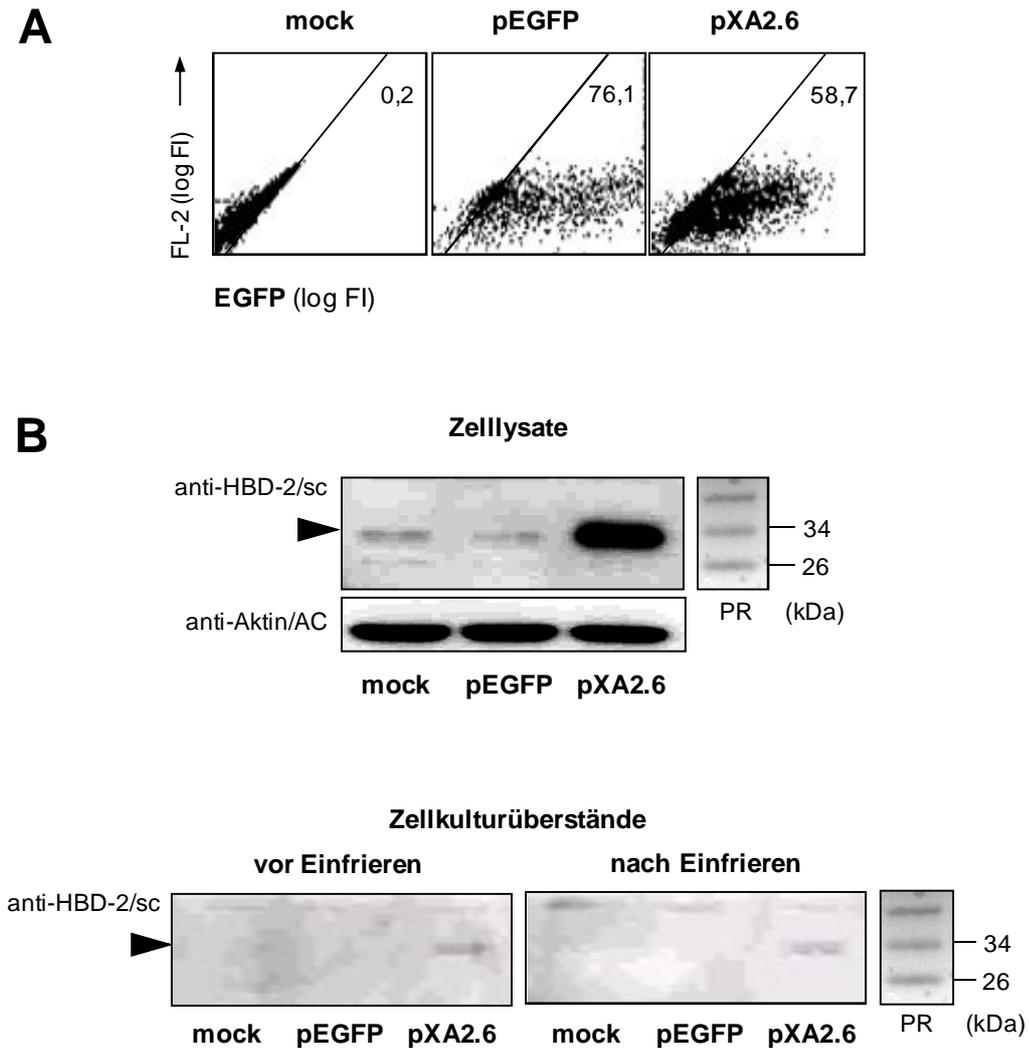


Abbildung 31: **Expression und Sekretion von HBD-2-EGFP durch transfizierte primäre murine Präadipozyten.** Jeweils 1×10^6 Präadipozyten aus dem mesenterischen Fett von aus C57/BL10-Mäusen wurden ohne Plasmid (mock) und mit $4 \mu\text{g}$ pEGFP oder pXA2.6 in einer Elektroporationsküvette zwei Pulsen mit $600 \text{ V}/600 \mu\text{s}$ und $100 \text{ V}/15 \text{ msec}$ ausgesetzt. Nach 48 h Kultur wurden die adhärenen Zellen abtrypsiniert und die Überstände gesammelt. (A) Die EGFP-Expression vitaler Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Färbung mit PI bestimmt und ist in repräsentativen Dot Plots gezeigt. (B) Totallysate von 1×10^5 Zellen sowie Kulturüberstände der transfizierten Präadipozyten wurden unmittelbar nach der Gewinnung oder nach einmaligem Einfrieren bei -20°C im Western-blot mit anti-HBD-2/sc untersucht. Die Proteinbeladung aus den Zelllysaten wurde mit anti-Aktin/AC verifiziert und M_r -Standards (PR) mitgeführt.

Während die Effizienz der Transfektion von murinen Präadipozyten mit dem Ausgangsplasmid pEGFP etwas geringer war als bei der Zelllinie HT-29 ($\sim 75\%$ vs. $\sim 85\%$), wurde das Konstrukt im pXA2.6 für HBD-2-EGFP vergleichbar gut aufgenommen ($\sim 60\%$ vs. 65%) (Abbildung 31A). Im Western-blot aus Lysaten muriner Präadipozyten zeigte anti-HBD-2/sc unter den Expositionbedingungen eine schwache Bande im Größenbereich des Fusionsproteins (Abbildung 31B). Diese konnten im Vergleich zu der starken Bande aus den Präadipozyten, die mit pXA2.6 transfiziert waren, als unspezifischer Hintergrund

angenommen werden. Wie auch schon aus HT-29-Zellen wurde aus frischen Zellkulturüberständen eine HBD-2-spezifische Bande um 34 kDa gefunden (Abbildung 31C). Unter gleichen Bedingungen im Western-blot war die Intensität der Bande unabhängig davon, ob frisches oder einmalig eingefrorenes und wieder aufgetautes Material verwendet wurde.

Diese Versuche zeigten erstmalig, dass primäre Zellen ein rekombinantes HBD-2-Protein exprimieren und sezernieren können. Gleichzeitig wurde belegt, dass HBD-2 nach der Induktion direkt aus den Zellen dargestellt werden kann und alternativ ein *Screening* in Kulturüberständen aus einer Kurzzeitkultur möglich wäre. Da das Einfrieren nicht näher definierter HBD-2-haltiger Proteingemische keinen Einfluss auf den Nachweis von HBD-2 im Western-blot hatte, wurden alle Proben für die folgenden Versuche bei -20°C aufbewahrt und unmittelbar vor der Untersuchung getaut.

3.6 HBD-2-spezifische Immunpräzipitation

Wurden HT-29 mit IL-1 β behandelt, konnte die Induktion der Expression von HBD-2 bisher nur auf Transkriptionsebene gezeigt werden. Möglicherweise war die Konzentration des gebildeten HBD-2-Proteins für den Nachweis im Western-blot insgesamt zu gering. Die Immunpräzipitation als Methode zur spezifischen Anreicherung definierter Proteine bot sich für die selektive Anreicherung von HBD-2 an. Zunächst wurde geprüft, ob Protein A- oder Protein G-Sepharose effizienter den HBD-2-spezifischen Antikörper anti-HBD-2/sc binden und inwieweit der pH-Wert der Zellkulturüberstände diese Bindung beeinflusst (Abbildung 32).

Unabhängig vom pH-Wert der Zellkulturüberstände wurde der anti-HBD-2/sc durch die Protein A-Sepharose nur sporadisch gebunden, was unter reduzierenden Bedingungen im Western-blot mit dem gleichen Antikörper nur zu schwachen oder nicht detektierbaren Banden von ~50 kDa für die schwere Kette des Antikörpers führte. HBD-2-EGFP wurde aus keinem der Ansätze nachgewiesen (Abbildung 32A). Im Gegensatz dazu wurde der HBD-2-spezifische Antikörper gleichmäßig in allen Proben mit Protein G-Sepharose gefunden. Auch hier wurden durch den pH-Wert die Bindungseigenschaften für den Antikörper nicht geändert und es wurde ebenfalls kein HBD-2-EGFP-Fusionsprotein dargestellt.

Ergebnisse

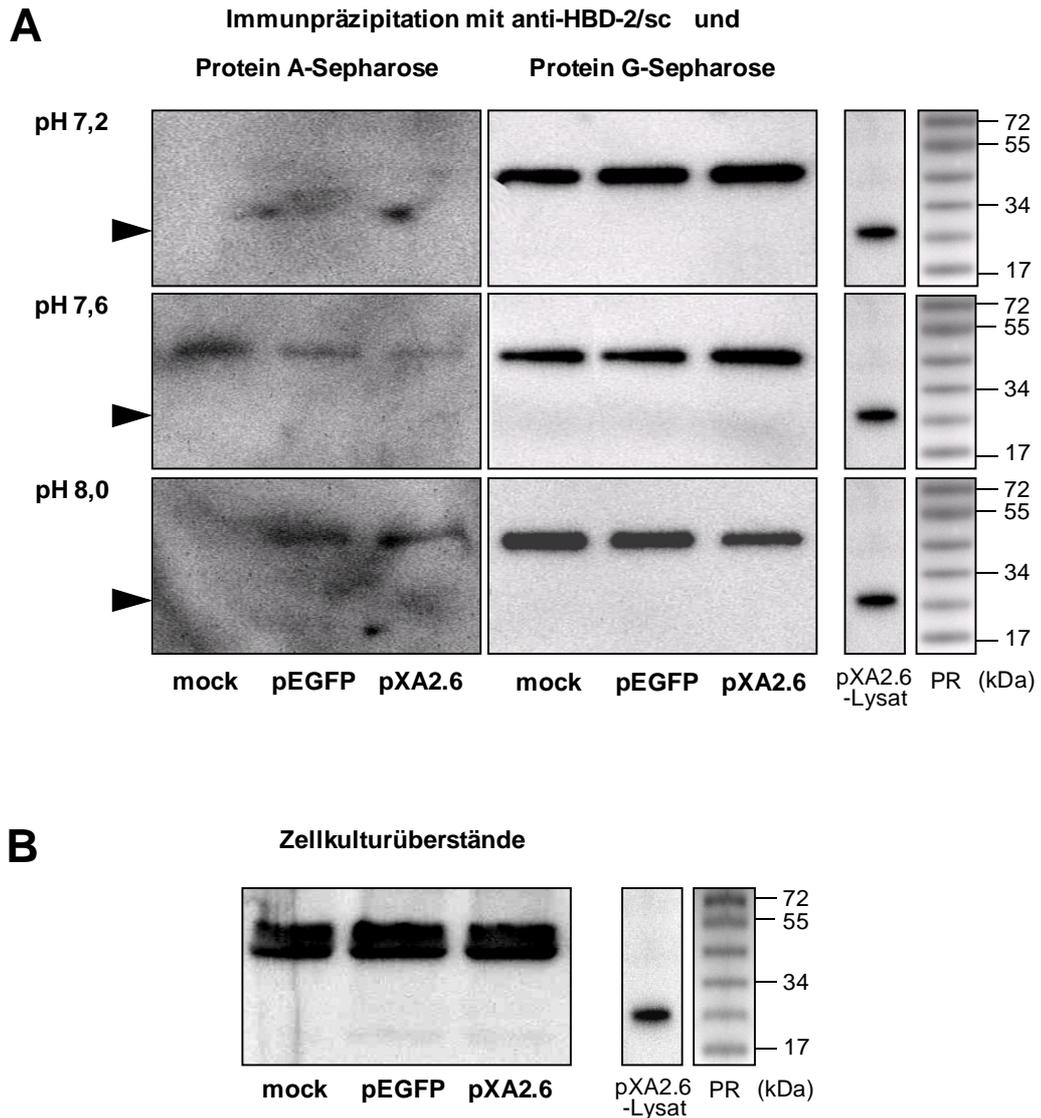


Abbildung 32: Immunpräzipitation der Überstände transfizierter HT-29-Zellen mit pXA2.6. (A) In jeweils 1 mL Kulturüberstand transfizierter HT-29-Zellen wurden mit 110 μ L 10x PBS, pH 7,2 (obere Reihe), 50 μ L 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7,6 (mittlere Reihe) oder 50 μ L 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0 (untere Reihe) gemischt. Dazu wurden 30 μ L vorgequollener Protein A bzw. Protein G-Sepharose und 1 μ g anti-HBD-2/sc inkubiert. Die Sepharosekügelchen wurden mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und die Proteine im Western-blot mit anti-HBD-2/sc detektiert. (B) Für jeden Ansatz wurden 30 μ L vorgequollene Protein G-Sepharose mit 1 μ g anti-HBD-2/sc inkubiert. In jeweils 1 mL Kulturüberstand transfizierter HT-29-Zellen wurden 110 μ L 10x PBS, pH 7,2 und die Antikörper-beladene Protein G-Sepharose gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Sepharosekügelchen mit PBS gewaschen und die Proteine im Western-blot mit anti-HBD-2/sc detektiert. In allen Gelen diente ein Gesamtlisat von 1×10^5 HT-29-Zellen, die mit pXA2.6 transfiziert waren, als Kontrolle und es wurden M_r -Standards (PR) mitgeführt.

Im folgenden Versuch sollte ausgeschlossen werden, dass ein Überschuss des anti-HBD-2/sc bezogen auf die Bindungskapazität der Protein G-Sepharose für den fehlenden Nachweis von HBD-2-EGFP nach Immunpräzipitation verantwortlich war. Dazu wurde der Antikörper unter optimierten Bedingungen mit PBS auf die Protein G-Sepharose

Ergebnisse

gebunden und der so vorgefertigte Komplex in die Ansätze zur Immunpräzipitation gegeben (Abbildung 32B). Wieder wurde keine HBD-2-spezifische Bande gefunden.

Die Bedingungen für eine Anreicherung von HBD-2 durch Immunpräzipitation wurden daher mit definierten, hohen Konzentrationen von affinitätsgereinigtem HBD-2-GST getestet. In Vorversuchen konnte Protein G-Sepharose ohne präzipitierenden Antikörper weder GST noch HBD-2-GST binden (Daten nicht gezeigt). Vor dem Hintergrund dieser fehlenden unspezifischen Bindung wurde HBD-2-GST in der Immunpräzipitation mit anti-HBD-2/sc eingesetzt (Abbildung 33).

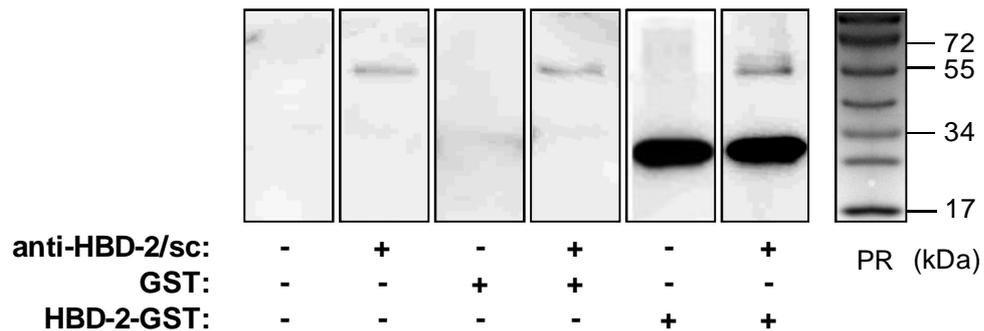


Abbildung 33: Immunpräzipitation von HBD-2-GST mit Protein G-Sepharose. Für jeden Ansatz wurden 30 μ L vorgequollene Protein G-Sepharose mit 500 ng anti-HBD-2/sc 2 h bei 4°C inkubiert. In jeweils 2 mL PBS mit 20 μ g HBD-2-GST bzw. 20 μ g GST oder ohne zusätzliches Protein wurden 30 μ L beladener Protein G-Sepharose gegeben und diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Sepharosekügelchen wurden mit PBS gewaschen und die Proteine im Western-blot mit anti-HBD-2/sc detektiert. Als Kontrollen dienten äquivalente Mengen von gereinigtem HBD-2-GST bzw. GST. Ein M_r -Standard (PR) wurde mitgeführt.

Erwartungsgemäß wurden in den Kontrollen ohne Protein und mit GST im Western-blot keine Banden detektiert. Die Bande, die der schweren Kette des präzipitierenden Antikörpers entsprach, war in allen Ansätzen aus der Immunpräzipitation vergleichbar und trat unter den gewählten Expositionsbedingungen zurück. Die Intensität der Bande, die nach der Immunpräzipitation von HBD-2-GST mit anti-HBD-2/sc-beladener Protein G-Sepharose erhalten wurde, entsprach der Bande aus der Äquivalentmenge des freien, gereinigten Fusionsproteins.

Unter den hier etablierten Bedingungen konnte also HBD-2-GST vollständig auf die mit anti-HBD-2/sc beladene Protein G-Sepharose gebunden und im Western-blot dargestellt werden. Diese Versuche zeigten aber auch, dass eine spezifische Anreicherung von HBD-2 aus Proteinlösungen eine Mindestkonzentration erforderte, die in den Zellkulturüberständen weder über eine IL-1 β -vermittelte Induktion der HBD-2-Expression in HT-29-Zellen noch durch konstitutive Hochexpression eines sezernierten HBD-2-EGFP-Fusionsproteins durch transfizierte HT-29-Zellen erreicht wurde.

4 Diskussion

Die Pathophysiologie von CED resultiert aus einem komplexen Zusammenspiel von genetischen Suszeptilitätsfaktoren, von Umweltfaktoren, von Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora und von einem fehlerhaft regulierten intestinalen Immunsystem. Das Ergebnis ist eine immunvermittelte Zerstörung von Darmgewebe und Darmabschnitte mit hoher Bakteriendichte sind besonders betroffen. Dort kommt es zur Einwanderung von Bakterien, auch von kommensalen Bakterien, in die Mukosa und man nimmt an, dass ihre ubiquitären Antigene das Entzündungsgeschehen mit aufrecht erhalten [D'Haens, 1998]. Bei Gesunden führt die auch hier vorkommende bakterielle Translokation aufgrund der intestinalen Toleranz nicht zu einer Entzündung. Prädisponierend für Morbus Crohn sind Veränderungen in Genen wie NOD2/CARD15, die die Erkennung bakterieller Peptidoglykane durch mukosale Entzündungszellen verstärken. Auch eine erhöhte Permeabilität führt zum Verlust der mukosalen Barriere, indem sie die bakterielle Translokation steigert, und kontrollierende Mechanismen z.B. durch TH17- und Treg-Zellen verändert [Tamboli, 2004]. Die verschiedenen Ebenen und Mechanismen, die die Grundlage für eine intakte Barriere bilden, sind gegenwärtig Gegenstand intensiver Untersuchungen. In diesem Zusammenhang stellen die CED also ein Modell für eine gestörte mukosale Barriere zwischen Wirt und Umwelt dar.

Die überwiegend durch Epithelzellen gebildeten β -Defensine sind Teil der angeborenen Immunität und unterstützen die Aufrechterhaltung der intestinalen Mukosabarriere einerseits durch eine antimikrobielle Wirkung, die überwiegend zum Darmlumen gerichtet ist und andererseits durch chemotaktische Wirkung z.B. für gewebständige Makrophagen [Tollin, 2003]. Ob eine massive Anreicherung von Immunzellen in Bereichen chronischer Entzündung ursächlich für die offenbar gestörte Defensin-Homöostase sein könnte, führt zu der Frage nach einem unmittelbaren Zusammenhang zwischen einem veränderten Profil der proinflammatorischen Zytokine aus der Mukosa und der in menschlichen Darmepithelien neu induzierten oder hochregulierten Synthese von Defensinen. Experimentelle Nachweise für diese Zusammenhänge führen über die Transkription Defensin-spezifischer mRNA und entsprechend sezernierte Proteine aus Epithelzellen.

In der vorliegenden Arbeit sollten in einem Modell mit der humanen kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie HT-29 und rekombinanten proinflammatorischen Zytokinen die zytokinvermittelte HBD-2-Expression in Darmepithelzellen untersucht werden. Dabei wurden Methoden zur reproduzierbaren Darstellung von HBD-2 auf transkriptioneller und translationaler Ebene etabliert und für eine mögliche Anwendung zum *Screening* in Proben aus dem menschlichen Darm evaluiert. Für den Nachweis HBD-2-spezifischer mRNA wurden mit IL-1 β -behandelte HT-29-Zellen zunächst die Bedingungen für eine

semiquantitative RT-PCR etabliert und damit die zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-17 und TNF α auf die Expression der HBD-2-mRNA untersucht. Mit dieser experimentell sehr aufwendigen Methodik wäre ein standardisiertes *Screening* für die HBD-2-Expression aus Proben des menschlichen Darms, die ggf. auch nur Biopsieformat haben, nicht möglich. Daher wurde eine ebenfalls für beschränkte Probenmengen geeignete HBD-2-spezifische Multiplex TaqMan-PCR mit klonierten absoluten Standards für das HBD-2 und das *Housekeeping Gene* GAPDH eingeführt und validiert. Mit dieser Technik wurden die o.g. Ergebnisse aus der semiquantitativen PCR bestätigt. Zur Darstellung des HBD-2-Proteins aus Zelllysaten und Überständen aus Kulturen wurde ein Western-blot mit dem Antikörper anti-HBD-2/sc etabliert. Seine Sensitivität war nicht ausreichend, die auf transkriptioneller Ebene gezeigte Induktion der Expression von HBD-2 in HT-29-Zellen durch IL-1 β , auf Proteinebene zu bestätigen. Mit HT-29-Zellen sowie primären murinen Präadipozyten, die mit rekombinanten Konstrukten für eine konstitutive Expression und Sekretion eines HBD-2-EGFP-Fusionsprotein transfiziert waren, wurde gezeigt, aus welchen zellulären und extrazellulären Kompartimenten ein HBD-2-Protein im Western-blot prinzipiell darstellbar ist.

Im folgenden werden die Ergebnisse der eigenen Arbeiten zu der einzelnen Fragestellungen diskutiert.

Unter welchen Bedingungen wird eine HBD-2-Expression durch semiquantitative Polymerasekettenreaktion nachgewiesen?

Grundsätzlich ist der experimentelle Nachweis biologischer Zusammenhänge nicht nur von der Qualität der Hypothese, die die Wahl der Methodik bestimmt, sondern auch wesentlich von den zur Verfügung stehenden Verfahren abhängig. Das von Epithelzellen exprimierte HBD-2 wird durch bisher nicht ausreichend bekannte Mechanismen induziert und ausschließlich transkriptionell reguliert. Daher bot es sich für die Untersuchung der Effekte von Zytokinen auf die Neusynthese von Defensinen durch Epithelzellen als Modell an. Bei einer relativen Quantifizierung wird die Transkription des Zielgens mit der eines nicht regulierten, ubiquitär exprimierten *Housekeeping Genes* normalisiert. Die absolute Startkopienanzahl muss nicht bestimmt werden. Vorteile liegen in einer reduzierten Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebefeffekte und unterschiedliche Extraktionseffizienzen der RNA innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das *Housekeeping Gene* betreffen. Bei der semiquantitativen PCR wurde bei den eigenen Untersuchungen die HBD-2-Expression auf das *Housekeeping Gene* GAPDH bezogen, das ein etabliertes Gen für die Normalisierung der Gen-Expressionen ist [Pfaffl, 2002]. Die größten Unterschiede von GAPDH-mRNA wurden zwischen den Herz und

Diskussion

Nervenzellen mit hohem Expressionsanteil und den wenig bildenden Pankreaszellen beobachtet [Barber, 2005]. Für Untersuchungen des Pankreas [Rodriguez-Mulero, 2005] oder humaner T-Lymphozyten [Bas, 2004] stützt man sich auf weitere *Housekeeping Genes*, wie 18S-rRNA. Auch β -Aktin wird häufig für Normalisierungen verwendet [Mori, 2008]. Bei Untersuchungen zwischen Darmproben, bei denen verschiedene Zelltypen vergleichbare Anteile haben, und bei oligoklonalen Zelllinien müssen Expressionsunterschiede verschiedener Zellarten nicht berücksichtigt werden. Die GAPDH hat sich als ein insbesondere für solche Untersuchungen geeignetes *Housekeeping Gene* durchgesetzt [Barber, 2005; Rubie, 2005].

Vorherige Studien haben den Einfluss von Zytokinen auf die mRNA-Expression von HBD-2 in Zellen unterschiedlicher Herkunft untersucht. Besonders interessant ist hier das IL-1 β , dessen Konzentration in der Darmwand der CED-Patienten erhöht ist [Leal, 2008]. Eine HBD-2-mRNA ist sowohl für Epithelzellen des Respirationstraktes [Jang, 2004], der Haut [Premratanachai, 2004], des Urogenitaltraktes [King, 2002] als auch für humane intestinale Zelllinien wie Caco-2- und HT-29-Zellen nachgewiesen [O'Neil, 1999].

Deswegen dienten mit IL-1 β inkubierte HT-29-Zellen im Vergleich zu nicht mit Zytokinen behandelten Kontrollen als Standard bei der Etablierung der HBD-2-spezifischen semiquantitativen PCR. Eine Inkubationszeit von 6 h wurde in der Literatur häufig für die Zytokin-vermittelte Induktion der Expression berichtet [Jang, 2004] und diente unter Berücksichtigung verschiedener IL-1 β -Konzentrationen der Etablierung der Anzahl notwendiger Zyklen in der PCR. In anderen Studien wurde nach 35 Zyklen eine spezifische HBD-2-mRNA nachgewiesen [O'Neil, 1999]. Das in den eigenen Untersuchungen verwendete sequenzspezifische Primer-Paar für HBD-2 amplifizierte ein 195 kb großes Transkript, das kleiner war als Transkripte anderer Arbeitsgruppen (330 bp; 30 PCR-Zyklen [Harder, 2000] oder 276 bp, 40 PCR- Zyklen [Zaalouk, 2004]). Bei der elektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe des Agarosegels und Färbung mit Ethidiumbromid liegt die erforderliche Nachweisgrenze der DNA in Lösung von 1-10 ng/ml [Glazer, 1990]. Diese kritische Menge wurde zwar für das *Housekeeping Gene* GAPDH nach 30 Zyklen in der PCR erreicht, nicht aber für HBD-2-spezifische Amplifikate. Nach insgesamt 60 Zyklen in einer zweistufigen PCR bei der alle Reaktionsbestandteile nach 30 initialen PCR-Zyklen erneuert wurden und jeweils 1 μ L aus der ersten PCR als Template dienten, amplifizierte das spezifische Primer-Paar für HBD-2 neben der 195 bp großen cDNA auch eine deutliche Bande mit einer Größe von 366 bp. Diese größere Bande war auch aus Aufarbeitungen chromosomaler DNA nachweisbar. Der chromosomale Ursprung dieser Bande wurde mit Hilfe enzymatischen Abbaus definierter Nukleinsäuren bestätigt, da nach Inkubation von Präparationen chromosomaler DNA sowie von Gesamt-RNA aus HT-29-Zellen mit DNase I die 366 bp große Bande nicht mehr detektierbar war (vgl.

Abbildung 5). Eine Verminderung der *Annealing*-Temperatur während der PCR von 60°C auf 55°C verschob das Verhältnis der beiden Banden deutlich zugunsten des Amplifikates aus chromosomaler DNA-Bande. Die Variation der Reaktionstemperaturen und die sichere Unterscheidung beider Banden im Agarosegel über den Größenunterschied gestattete in der Routine die eindeutige Beschreibung der HBD-2-spezifischen mRNA auch ohne die zeitaufwändige und verlustträchtige Vorbehandlung aller Proben mit DNase I.

Mit Hilfe einer Synchronisation des Zellzyklus könnten die Ausgangsbedingungen aller Zellen vereinheitlicht werden [Cooper, 2003].

Ist eine mögliche Wirkung von IL-1 β , IL-6, IL-17 und TNF α auf die Expression der HBD-2-mRNA durch HT-29-Zellen konzentrations- und zeitabhängig?

Die Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen zur Kinetik der Wirkung von IL-1 β auf die HBD-2-Expression durch HT-29-Zellen waren mit denen der respiratorischen Zelllinie A549 vergleichbar [Jang, 2004]. Vor dem Hintergrund einer geringen Basalexpression induzierten bei den eigenen Versuchen 10 ng/mL IL-1 β bereits nach 1-3 h eine HBD-2-mRNA-Expression in den HT-29-Zellen. Das war unabhängig von den Kulturbedingungen, die durch Variation des Serumanteils im Inkubationsmedium verändert wurden (vgl. Abbildungen 7 und 8). Ein Plateau maximaler HBD-2-mRNA-Expression wurde nach 6-10 h Inkubation mit 10 ng/mL IL-1 β erreicht, war über mindestens 72 h stabil und konnte auch durch höhere Konzentrationen des Zytokins nicht gesteigert werden. Ob dieses Plateau über die Stabilität einmalig induzierter HBD-2-spezifischer mRNA oder über eine permanente Neusynthese durch die Anwesenheit des Zytokins während der gesamten Inkubationszeit zustande kam, wurde nicht weiter untersucht.

Die proinflammatorischen Zytokine TNF α [Raddatz, 2005] und IL-6 [Arai, 1998] sowie das kürzlich beschriebene IL-17 [Nielsen, 2003] liegen wie IL-1 β in erhöhter Konzentration in der Darmwand von CED-Patienten vor.

Der Einfluss von TNF α und IL-6 auf die Expression der HBD-2-mRNA ist in Epithelzelllinien unterschiedlich. In den intestinalen HT-29- and Caco-2-Zellen induzieren weder IL-6 noch TNF α allein eine spezifische mRNA [O'Neil, 1999; Fahlgren, 2003]. In einer respiratorischen Zelllinie induzierte TNF α , nicht aber IL-6 die Bildung der HBD-2-mRNA [Harder, 2000]. In den eigenen Versuchen mit HT-29-Zellen führten IL-6 und TNF α in Konzentrationen bis zu 100 ng/mL und in Inkubationszeiten von bis zu 24 h nicht zu einer Expression der HBD-2-mRNA. Im Gegensatz zu Zellen aus der Mundschleimhaut, bei denen TNF α die Wirkung von IL-1 β auf die HBD-2-spezifische mRNA verstärkt [Premratanachai, 2004], wurde in dem System der HT-29-Zellen ein solcher Effekt nicht beobachtet (vgl. Abbildung 14).

Für IL-17 wurde bisher nur bei respiratorischen Epithelzellen gezeigt, dass dieses Zytokin sogar eine stärkere Wirkung auf die Höhe der HBD-2 mRNA-Expression hatte als IL-1 β [Kao, 2004; Kao, 2008]. Die eigenen Beobachtungen, bei denen IL-17 in Konzentrationen bis zu 100 ng/mL und während Inkubationszeiten bis zu 24 h bei der intestinalen Epithelzelllinie HT-29 keine HBD-2 mRNA induziert, legt die Vermutung nahe, dass dieses Zytokin in den entzündlichen Prozessen während der CED seine Wirkung nicht über durch Epithelzellen produzierte Defensine vermittelt.

Wie kann der quantitative Nachweis der HBD-2-mRNA in kleinen Proben durch TaqMan-PCR standardisiert werden?

Voraussetzung für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis ist eine funktionierende RNA-Analytik, die exakte Quantifizierungsergebnisse der mRNA bei ausreichender Genauigkeit und hoher Wiederholbarkeit liefert [Bustin, 2000]. Die Methode der semiquantitativen RT-PCR und Bewertung in Agarosegelen erfordert einen hohen manuellen Aufwand, hat eine lange Bearbeitungszeit, birgt viele Risiken mit großer vom Bearbeiter abhängiger Varianz der experimentellen Daten, braucht aber andererseits keine speziellen Geräte, die über die Grundausstattung in molekularbiologischen Laboratorien hinausgehen. Sie stellte die Effekte von Zytokinen auf die Expression von HBD-2 in diesem Zusammenhang mit einer Zelllinie sicher dar, schien aber für Untersuchungen direkt aus menschlichem Untersuchungsmaterial nicht geeignet. Eine technisch verfeinerte Methode zur Erfassung spezifischer mRNA, stellt die *Real Time* RT-PCR dar. Entscheidend für die mRNA-Spezifität der Amplifikation ist die Auswahl der Primer. Die Bindungsstellen der sense bzw. anti-sense Primer liegen in der genomischen Sequenz auf durch Introns getrennten Exons. Werden die Bedingungen für die Amplifikation so gewählt, dass die Effizienz für kurze Amplifikate optimal ist, spielt die lange genomische DNA als Template eine untergeordnete Rolle und eine vorangehende Inkubation der RNA-Präparation mit DNasen ist nicht notwendig. Bei der *Real Time* RT-PCR kann neben der effizienzkorrigierten relativen Quantifizierung, bei der die Normalisierung der Expressionsergebnisse ausschließlich anhand eines nicht regulierten *Housekeeping Gens* erfolgt, eine absolute Quantifizierung im Vergleich zu einer Kalibrierkurve definierter Molekülmengen des spezifischen Templates durchgeführt werden [Pfaffl, 2001]. Diese Kurve basiert auf einer Verdünnungsreihe klonierter probenindividueller cDNA. Bei der *Real Time* RT-PCR lässt sich die relative Quantifizierung weiter optimieren, indem die unterschiedlichen Effizienzen der untersuchten Faktoren berücksichtigt werden. Die sogenannte effizienzkorrigierte relative Quantifizierung mittels *Real Time* RT-PCR stellt gegenwärtig die genaueste Form der mRNA-Quantifizierung dar [Pfaffl, 2001]. Der *Crossing Point*, der C_T -Wert, ist als Umkehrpunkt im exponentiellen Verlauf der Fluoreszenzzunahme definiert und gibt Auskunft über die Effizienz der PCR [Tichopad,

2003]. Zur Markierung der Gentargets gibt es gegenwärtig grundsätzlich zwei Strategien. Sequenzunspezifische Farbstoffe wie SYBR-Green lagern sich in die während der PCR entstehende doppelsträngige DNA ein und die Fluoreszenzintensität steigt in Abhängigkeit von der Menge vorliegender DNA-Doppelstränge. Dabei werden auch unerwünschte Produkte wie Primerdimere detektiert und es kann nur jeweils ein Genprodukt aus einem Reaktionsansatz nachgewiesen werden [Ponchel, 2003]. Die Verwendung so genannter TaqMan-Sonden gestattet eine größere Präzision des sequenzspezifischen Nachweises. Diese TaqMan-Sonden basieren auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Energie-Transfers und sind an einem Ende mit einem *Quencher* am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Eine Auswahl verschiedener Farbstoffe, die sequenzspezifisch einem Amplifikat zugeordnet werden können, und Detektoren für verschiedene Wellenlängen der emittierten Fluoreszenz machen es möglich, aus einem Reaktionsansatz mehrere Zielgene zu bestimmen [Ram, 2005]. Für die eigene quantitative TaqMan-PCR wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin für HBD-2 und VIC aus der Qualle *Aequorea victoria* für GAPDH verwendet, die bei gleichzeitiger Verwendung in einem Reaktionsgefäß die Effizienz der jeweils anderen PCR nicht beeinträchtigen. Eine absolute Quantifizierung mit klonierten Standards bietet den Vorteil, dass bei bekannter Gesamt-RNA-Menge die Anzahl der HBD-2-mRNA-Moleküle pro Zelle bestimmt werden kann. Bei den eigenen Untersuchungen korrelierte die Gesamt-RNA mit der eingesetzten Zellzahl im Bereich zwischen 1×10^5 und 1×10^6 HT-29-Zellen. In dem Vektor pCR2.1 klonierte cDNA-Abschnitte, die im Falle der GAPDH durch die Primer der spezifischen PCR flankiert werden und bei HBD-2 die gesamte cDNA-Sequenz einschließlich der natürlichen Signalsequenz aber ohne den Translationsstop enthalten, wurden als absolute Standards zur Ermittlung der HBD-2-spezifischen mRNA-Moleküle einer Zelle etabliert. Um die Effizienz-entscheidende vollständige initiale Aufschmelzung der Doppelstränge zu sichern, wurden die aus der Präparation ringförmig geschlossenen Plasmide außerhalb der klonierten Sequenzen von HBD-2 und GAPDH mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bgl*I linearisiert. Mit diesen Standards wurde eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit der C_T -Werte im Bereich zwischen 10^2 und 10^8 Templatmolekülen etabliert. Wegen der unterschiedlichen Emissionseigenschaften der Sonden für HBD-2 und GAPDH, der Verfügbarkeit von bis zu vier Kanälen für die Detektion von Fluoreszenzen und der fehlenden Interferenz der Fluoreszenzen von Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin und VIC aus den beiden sequenzspezifischen Sonden können Multiplex-Analysen durchgeführt werden (vgl. Abbildungen 19 und 20). Für den simultanen Nachweis beider Zielgene ist weniger Probenmaterial ausreichend. Mit letztendlich geringerem Aufwand bestätigte diese TaqMan-PCR den Befund aus der semiquantitativen PCR. Für die nach Inkubation von HT-29-Zellen mit 10 ng/mL IL-1 β

exprimierte HBD-2-mRNA wurde der C_T nach 27 Zyklen erreicht. Dies entsprach einer relativen Zunahme der HBD-2-Expression in HT-29-Zellen um den Faktor 20 im Vergleich zu den Proben ohne IL-1 β . Nach Inkubation mit TNF α , IL-6 oder IL-17 war auch mit dieser Methode im etablierten Modell der HT-29-Zellen kein Unterschied in der HBD-2-Expression zur Kontrolle ohne Zytokine nachweisbar.

Diese Vereinfachung der HBD-2-spezifischen quantitativen TaqMan-PCR schuf die Voraussetzungen auch für umfangreiche *Screening*-Vorhaben mit vielen verschiedenen Proben in Mehrfachansätzen. Mit der in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Klonierungs- und Etablierungsprozedur können schnell vergleichbare standardisierte PCR-Nachweise zur Quantifizierung der Expression weiterer Defensine in Zellen etabliert werden.

Unter welchen Bedingungen kann ein HBD-2-Protein im Western-blot nachgewiesen werden?

In der Kommunikation zwischen Zellen können wenige Moleküle eines Proteins ausreichen, wichtige physiologische Vorgänge zu steuern oder pathologische Veränderungen auszulösen. Während der Nachweis geringster DNA-Mengen mit Hilfe einer selektiven Verstärkung durch PCR möglich ist, gibt es bisher keine Technik mit vergleichbarer Empfindlichkeit für Proteine. Selbst bei ausschließlich transkriptionell regulierten Strukturen wie HBD-2 kann aus der mRNA-Menge nicht unmittelbar auf die Proteinmenge geschlossen werden, weil mRNA- und Proteinexpression nicht direkt korrelieren [Gygi, 1999]. Bei primären Zellen der Gingiva wurde eine Korrelation zwischen der Expression der HBD-2-mRNA und des HBD-2-Proteins der Überstände aus Kurzzeitkulturen und aus Zelllysaten beschrieben [Joly, 2005].

Die Art des Effektes von HBD-2 ist nicht unwesentlich von der Topologie der produzierenden Epithelzelle abhängig. Man geht davon aus, dass einer apikalen Sekretion überwiegend eine antibakterielle Wirkung folgt und basal sezerniertes HBD-2 chemotaktisch wirkt. Beide Wirkungen haben unterschiedliche Konzentrationsbereiche der effektiven Dosis. Mit TNF α behandelte humane neutrophile Granulozyten waren bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ HBD-2 optimal stimuliert [Niyonsaba, 2004]. Eine antibakterielle Wirkung auf *E. coli* konnte bei einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ gezeigt werden [Tomita, 2000]. Das beeinflusst nicht nur die Sekretion bei gestörter Mukosa in der CED, sondern auch die Verfügbarkeit des überwiegend sezerniert vorliegenden Proteins für die experimentelle Darstellung.

Der qualitative und quantitative Proteinnachweis erfolgen durch kombinierte analytische Verfahren aus der Chromatographie, der Spektroskopie und der Enzymologie. Wie bei allen Defensinen ist die analytische und präparative Darstellung des HBD-2-Proteins durch

die geringe Größe von 5-10 kDa sowie die kationische Gesamtladung des Moleküls bestimmt. Immunologische Verfahren erfassen definierte Strukturen mit Molekülen und Mechanismen, die aus dem Immunsystem stammen oder abgeleitet wurden. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden Verfahren entwickelt, die häufig zwei Schritte umfassen: (i) die Bindung eines korrespondierenden spezifischen Antikörper an ein Protein und (ii) eine quantifizierbare Nachweisreaktion. Folgende Antikörper-basierte Nachweisverfahren sind auch für HBD-2 bereits beschrieben: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) [Ghosh, 2007], Immuno-blot [McDermott, 2003], Immunhistologie [Uehara, 2003] und Western-blot [Sayama, 2005].

Beim ELISA ist der primäre Antikörper an eine Matrix gebunden, die Quantifizierung des primären Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt über ein an den zweiten Antikörper gekoppeltes Enzym. Wichtig ist hierbei, dass die Antikörper spezifisch HBD-2 erkennen und keine Kreuzreaktionen mit anderen, strukturell ähnlichen Peptidstrukturen eingehen. Dies war das Hauptproblem für den HBD-2-Proteinnachweis. Deswegen ist dieses Verfahren kommerziell erst seit kurzer Zeit verfügbar. Für natives HBD-2 in Lösungen kann ein ELISA der Firma Peprotech (Hamburg, DE) einem Konzentrationsbereich von 8-1000 pg/ml nachweisen [Pioli, 2006] und die der Firmen Antigenix (Huntington Station, US) sowie Alpco (Salem, US) 100-3000 pg/ml [Soto, 2007] detektieren. Im Überstand der respiratorischen Epithelzelle A549 wurde nach Infektion mit dem humanen Rhinovirus-16 mittels ELISA 20 pg/ml HBD-2 dargestellt [Proud, 2004]. Auch nach Inkubation mit IL-17 mit oder ohne das Virus konnte HBD-2 in diesem Modell nachgewiesen werden [Wiehler, 2007].

Mittels Immunhistologie wurde in Magenpräparaten von Patienten mit positivem Nachweis für *Helicobacter pylori* HBD-2 mit dem auch in den eigenen Untersuchungen verwendeten Antikörper anti-HBD-2/sc detektiert [Uehara, 2003]. Auch bei SV40-transformierten H69-Zellen aus dem humanen Gallengangsepithel, die mit *Cryptosporidium parvum* inkubiert wurden, erfolgte immunhistologisch der HBD-2-Proteinnachweis [Chen, 2005].

Als enzymgekoppelte Immunoelktrotransfer- oder auch blot-Verfahren bezeichnet man Techniken, bei denen nach elektrophoretischer Auftrennung eines Proteingemisches auf Membranen transferierte Proteine mit geeigneten Antikörpern reagieren. Die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Proteine kann auf verschiedene Weise nachgewiesen werden. Beim direkten Nachweis der Proteine werden Antikörper eingesetzt, die mit Enzymen wie der Peroxidase konjugiert, oder in anderer Weise z.B. mit Biotin, kolloidalem Gold oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Beim indirekten Nachweis wird ein bereits gebundener, spezifischer Antikörper durch einen Sekundärantikörper erkannt, der die für die Detektion notwendige Markierung trägt. Da der Zweitantikörper in der Regel mehrere

Epitope auf seinem Antigen, dem primären Antikörper erkennt, wird der indirekte Nachweis trotz des erhöhten Risikos unspezifischer Effekte aus der Summe zweier Färbeschritte für die Darstellung sehr kleiner Proteinmengen bevorzugt. Grundsätzlich hängen diese Nachweise von der Sensitivität, der Spezifität und dem Fehlen von Kreuzreaktionen des Erstantikörpers ab. Das ist insbesondere für kleine Proteine wie HBD-2 ein Problem.

In den Zellkulturüberständen primärer humaner Epithelzellen der Kornea wurde nach Inkubation mit 10 ng/ml TNF α und/oder IL-1 β für 24 h mit einem HBD-2-spezifischen Antikörper HBD-2 im Dot-blot, bei dem alle Proteine im Gemisch auf einem Punkt und nicht in nach ihrer Größe getrennt als Einzelbanden vorliegen, detektiert [McDermott, 2003].

Der immunologische Nachweis versagt häufig, wenn das Protein nur gering exprimiert wird oder <10 kDa ist. Die Standardmethodik für die elektrophoretische Auftrennung im SDS-PAGE und den quantitativen Transfer auf eine Membran für den Western-blot ist für Proteine im Größenbereich zwischen 200 kDa und >10 kDa optimal; für größere und kleinere Proteine sind Trennschärfe und Transfereffizienz reduziert [Lämmli, 1970; Schägger, 1987]. In den eigenen Untersuchungen wurden die Bedingungen für den spezifischen Proteinnachweis von HBD-2 im Western-blot etabliert. Mit Hilfe von Lysaten und Kulturüberständen der HT-29-Zellen wurde für die Proteinauftrennung im Bereich von 5-70 kDa die SDS-PAGE in einem Glycin-Puffersystem nach Lämmli [Lämmli, 1970] mit einem Gradienten von 10-22,5% Polyacrylamid als optimale Auftrennung bestimmt. Die in anderen Arbeitsgruppen verwendete homogene SDS-PAGE 16,5% Polyacrylamid in einem Tricin-Puffersystem [Wehkamp, 2004; Zilbauer, 2005; Sayama, 2005] hatte in den eigenen Versuchen insgesamt nur eine geringe Trennschärfe und trennte kleine Proteine nicht deutlich. Auch die in den oben genannten Studien verwendete Inkubationslösung mit in Puffer gelöstem Magermilchpulver erzeugte in den eigenen Experimenten einen Hintergrund, der wesentlich stärker war als der unter den optimierten Bedingungen mit einem proteinfreien Blockierungsagens, das einmalig vor den Färbeschritten mit primären und sekundären Antikörpern verwendet wurde. Übliche Membranen für den Western-blot haben eine Porengröße von 0,45 μ m und erhalten ihre maximale Proteinbindungskapazität aus den Oberflächenladungen des Materials. Die in den eigenen Experimenten verwendete neuartige Membran mit einer Porengröße von 0,22 μ m verbindet die hohe Bindungskapazität des vorbehandelten PVDF mit einer geringeren Durchlässigkeit und gestattete so eine im Vergleich zu einer Standardmembran stärkere Akkumulation des kleinen HBD-2-Moleküls (Daten nicht gezeigt). In einem HBD-2 spezifischen Western-blot wurden 100 ng synthetisches HBD-2 detektiert [Sayama, 2005]. Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Western-blot mit dem anti-HBD-2/sc wies 10 ng rekombinantes HBD-2,

Diskussion

das 1,5 pMol HBD-2 entsprach, reproduzierbar nach und ist damit um den Faktor 10 sensitiver als der aus der Literatur bekannte Nachweis.

Um die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen wird dem Western-blot häufig ein mehr oder weniger spezifischer Konzentrierungsschritt vorangestellt. Die Proteine aus dem Überstand von 10^7 mit *E. coli* Nissle 1917 inkubierten Caco-2-Zellen wurden mit Trifluoressigsäure gefällt und aus dem wieder aufgelösten Konzentrat das HBD-2 auf einer C18-*Reversed Phase*-Säule angereichert. Aus diesem Extrakt wurde dann HBD-2 im Western-blot mit einem HBD-2-Antikörper aus dem Kaninchen (Peptide Institute, Osaka, JP) detektiert [Wehkamp, 2004].

In eigenen Untersuchungen wurden Totallysate aus HT-29-Zellen und aus Zellen der humanen intestinalen Mukosa durch Gefriertrocknung konzentriert. Aus diesen Proben waren wegen des hohen Salzgehaltes die Proteine im Western-blot nicht als distinkte Banden darstellbar (Daten nicht gezeigt). Eine Entsalzung der gesamten Proteinlösung oder eine spezifische chromatographische Anreicherung des HBD-2-Proteins könnten dieses Problem beheben. Im Vergleich zur klassischen Adsorptionschromatographie hätte die *Reversed Phase Chromatographie* den Vorteil der höheren Trennleistung und Reproduzierbarkeit bei gleichzeitig großer Trennkapazität. Im Western-blot wurde HBD-2 aus Präzipitaten des Überstands, nicht aber aus denen des Gesamtzelllysats von für 24 h mit *Campylobacter jejuni* inkubierten Caco-2-Zellen, mit dem auch in den eigenen Untersuchungen verwendeten Antikörper anti-HBD-2/sc gefunden [Zilbauer, 2005].

Der ursprünglich für den Nachweis von HBD-2 ausgewählte polyklonale Antikörper anti-HBD-2/ab stellte HBD-2 im Western-blot nicht dar. Weder in der Kontrollprobe aus menschlichem Darmgewebe nach Extraktion mit Acetonitril und Trifluoressigsäure, noch aus mechanisch zerkleinerten Homogenisaten verschiedener Darmproben, noch aus Lysaten oder Zellkulturüberständen von HT-29-Zellen nach Stimulation mit IL-1 β wurde eine Bande in der erwarteten Größe <10 kDa für das native HBD-2 gefunden. Ein wiederkehrendes Bandenmuster für HT-29-Zellen lag in höheren M_r -Bereichen und war vergleichbar den aus humanen EBV-transformierten B-Zellen, der humanen Leukämiezelllinie U937 sowie einer Linie hepatischer Sternzellen aus der Ratte, war also sowohl von der Spezies als auch von der phylogenetischen Abstammung der entsprechenden Zelltypen unabhängig. Daher war die Bindung des Antikörpers anti-HBD-2/ab als unspezifisch einzuschätzen.

Mit Hilfe rekombinanter HBD-2-Moleküle wurden Sensitivität und Spezifität von anti-HBD-2/ab und des ebenfalls polyklonalen anti-HBD-2/sc verglichen und in jeder Hinsicht die Überlegenheit von anti-HBD-2/sc festgestellt. Aus dem prokaryontisch exprimierten und gereinigten HBD-2-GST wurde sowohl das ~30 kDa große

Fusionsprotein als auch das ~8 kDa HBD-2, das durch spezifische Spaltung mit Thrombin aus dem Fusionsprotein freigesetzt werden kann, sicher dargestellt. Mit diesem Western-blot waren noch 1,5 pMol rekombinantes HBD-2 aus einer kommerziell erhältlichen Präparation nachweisbar. Wurde allerdings dieses gereinigte HBD-2 mit HT-29-Zellen gemischt und den Bedingungen für die Zellyse mit ausgesetzt, war eine in ihrer Intensität vergleichbare Bande erst sichtbar, wenn ursprünglich 70 pMol HBD-2 eingesetzt wurden (vgl. Abbildung 29). Das entsprach der 50-fachen Stoffmenge des rekombinanten HBD-2 im Vergleich zur Darstellung von freiem HBD-2. Offenbar veränderten die Bedingungen für die Zellyse oder die Anwesenheit anderer Proteine das Defensin so, dass es dem Antikörper-vermittelten Nachweis nicht mehr gleichmäßig zugänglich war. Aus Zellysaten und Überständen von Caco-2-Zellen war HBD-2 im Western-blot darstellbar, ohne dass hier Angaben zu den Proteinmengen gemacht wurden [O'Neil, 1999]. In den eigenen Experimenten wurden bei Inkubation von HT-29-Zellen mit IL-1 β für 72 h die erforderlichen Mengen von 70 pMol HBD-2 im Zellysat bzw. 1,5 pMol im Überstand nicht erreicht. Eine hohe initiale Expression von HBD-2 bzw. eine vorherige Anreicherung des Proteins aus Zellysaten selbst oder Überständen der Zellkultur war also eine wesentliche Bedingung für den Nachweis mittels Western-blot.

Aus welchen zellulären und extrazellulären Kompartimenten kann HBD-2 im Western-blot dargestellt werden?

Vor diesem Hintergrund und der offensichtlichen Empfindlichkeit des Defensins gegenüber den Bedingungen bei der Probenaufarbeitung sollte HBD-2 konstitutiv durch HT-29-Zellen hochexprimiert werden. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob das sekretorische Protein HBD-2 ausschließlich außerhalb oder auch in der produzierenden Zelle nachzuweisen ist. Vektoren für die eukaryontische Expression eines intrazellulären sowie eines sezernierten HBD-2-EGFP wurden mit rekombinanten Standardtechniken in *E. coli* hergestellt. Der Fusionspartner EGFP vereinfachte aufgrund seiner Eigenfluoreszenz die schnelle Überprüfung der Transfektionseffizienz mit Hilfe der Durchflusszytometrie und aufgrund seiner Größe von ~29 kDa die Darstellbarkeit im Western-blot. Ein entsprechendes Konstrukt aus HBD-2 und EGFP wurde bisher nur in Prokaryonten produziert, um nach Applikation im Tiermodell den Verbleib des fluoreszierenden Defensins untersuchen zu können [Xu, 2005; Chen H, 2006]. In eukaryontische Zellen wurden Fusionen von HBD-2 mit anderen Reportern eingebracht, wie ein Konstrukt HBD-2-mycHis in die Fibroblastenzelllinie COS-7 und in Insektenzellen [Cai, 2003; Cai, 2004]. Da es bisher keine reproduzierbaren Primärkulturen intestinaler Schleimhautzellen gibt, ist man bei der Untersuchung intestinaler Regulationsprozesse auf Karzinomzelllinien intestinalen Ursprungs angewiesen. Auch andere primäre Zellen können für die Etablierung des HBD-2-EGFP-Reporterkonstrukts genutzt werden, wenn sie nach der Präparation aus

Diskussion

Gewebe hinlänglich vital und die Präparationen sehr rein sind oder nur wenige, gut charakterisierte kontaminierende andere Zellen enthalten. Eine weitere Bedingung war, dass die Zellen in der Kurzzeitkultur über einige Passagen ihren Phänotyp nicht verändern und sich idealerweise auch noch etwas vermehren. Da murine Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett diese Bedingungen in idealer Weise erfüllen [Stroh, 2008] und primäre Zellen aus dem Darm in der notwendigen Menge nicht zur Verfügung standen, wurden die murinen Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett in den Experimenten benutzt, um prinzipiell die Expression des HBD-2-EGFP Reporterkonstrukts in primären Zellen zu studieren.

In den eigenen Versuchen wurden also die humane Darmepithelzelllinie HT-29, die murine embryonale Fibroblastenzelllinie 3T3-L1 und die primären Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett der Maus erfolgreich durch Elektroporation mit zwei aufeinanderfolgenden Rechteckpulsen transfiziert. Wurde das Plasmid pXA2.6 unter optimierten Bedingungen in HT-29-Zellen oder murine Präadipozyten eingebracht, war mit Transfektionseffizienzen von bis zu 65% ein HBD-2-EGFP-Fusionsprotein in den Zelllysaten und auch ohne weitere Anreicherung aus den Kulturüberständen im Western-blot mit anti-HBD-2/sc nachweisbar. Verglichen mit der Intensität der Bande des synthetischen HBD-2-Proteins vor dem Hintergrund der Proteine aus Totallysaten von HT-29-Zellen waren in den Lysaten aus 1×10^5 HT-29-Zellen und primären Präadipozyten wesentlich mehr als 70 pMol HBD-2. Aus dem Vergleich der Banden aus dem Kulturüberstand mit pXA2.6 transfizierten Zellen mit rekombinantem HBD-2-Protein ohne Zelllysate ergab sich eine Konzentration von 75 nM HBD-2-EGFP in der Überständen nach 48 h Kultur. Für den direkten fluorimetrischen Nachweis des HBD-2-EGFP im Kulturüberstand transfizierter Zellen war die Expression des Fusionsproteins vor dem Hintergrund des Phenolrots aus dem Grundmedium für die Zellkultur zu gering (Daten nicht gezeigt). Das Kontrollplasmid pEGFP erzielte eine Transfektionseffizienz ~85% und das EGFP-Protein war intrazellulär angereichert. Im Western-blot wurde es von anti-HBD-2/sc nicht erkannt und war eine geeignete negative Kontrolle.

Das Problem der Zuordnung der Defensinproduktion zu distinkten Zellen *in situ* ist, dass sezernierte Proteine ggf. nicht mehr direkt aus Zellen nachweisbar sind. Eine zellgebundene Anreicherung wäre Bedingung für diesen Nachweis. Das Plasmid pBA1.2, das für ein zytoplasmatisches HBD-2-EGFP kodiert, wurde nur mit einer Effizienz von 35% durch die HT-29-Zellen aufgenommen und transfizierte Zellen wiesen nur eine schwache grüne Fluoreszenz auf. So wurde angenommen, dass eine zytoplasmatische Anreicherung des Defensins für die HT-29-Zellen schädlich und ein Selektionsnachteil war.

Defensine gehören wie Zytokine zu den sekretorischen Proteinen und insbesondere für Zytokine wurden in den letzten Jahren Methoden zum spezifischen durchflusszytometrischen Proteinnachweis in ihren Produzentenzellen entwickelt. Mit dem *Cytokine Capture Assay* werden Zytokine mit bispezifischen Antikörpern unmittelbar nach dem Ausschleusen aus der produzierenden Zelle quantitativ auf deren Oberfläche gebunden und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert [Finkelman, 2003]. Einzelne Zytokin-exprimierende Zellen können auf mit Antikörpern beschichteten Zellkulturplatten und einem enzymmarkierten Zweitantikörper für eine Farbreaktion in der *Enzyme Linked Immuno Spot*-Technik dargestellt werden [Smets, 2002]. Die Zellassoziation des Nachweises erhöht seine Sensitivität. Der *Cytokine Capture Assay* ist 50-100-fach und der *Enzyme Linked Immuno Spot* 200-fach empfindlicher für Zytokine als ein Standard-ELISA. Eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der detektierten und der sezernierten Zytokine ermöglicht Quantifizierungen [Finkelman, 2003; Smets, 2002].

Eine weitere gebräuchliche Möglichkeit ist die direkte intrazelluläre Färbung von Zytokinen und ihre durchflusszytometrische Darstellung in Kombination mit weiteren Zellmarkerproteinen zur Definition des Zelltyps [Foster, 2007]. Brefeldin A blockiert den Proteintransport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat ohne die Proteinsynthese zu beeinflussen und hält so die eigentlich sekretorischen Proteine in der Zelle zurück [Han, 2007]. Ob eine solche intrazelluläre Anreicherung von HBD-2 im endoplasmatischen Retikulum ebenso schädlich ist wie die intrazytoplasmatische Einlagerung durch das Konstrukt aus pBA1.2 könnte mit dem HBD-2-EGFP aus pXA2.6 geprüft werden. Dieses Verfahren setzt voraus, dass die Antikörper die Zellmembran passieren und keine Kreuzreaktivitäten zu anderen Zellproteinen bestehen. Prinzipiell wäre der bei den eigenen Untersuchungen im Western-blot verwendete, polyklonale HBD-2-spezifische Antikörper anti-HBD-2/sc dafür denkbar. Es könnte geprüft werden, ob daraus abgeleitete Methoden für den HBD-2-Nachweis in Zellen des Darmepithels geeignet sind.

Kann HBD-2 durch HBD-2-spezifische Immunpräzipitation für die Darstellung des Proteins angereichert werden?

Zusätzlich wird aus den Befunden mit der Zelllinie HT-29 die Rationale für ein konkretes Prozedere für die Untersuchung der HBD-2-Expression in primären Darmepithelzellen auf mRNA- und Proteinebene diskutiert.

Mit den Überständen transfizierter HT-29-Zellen wurde gezeigt, dass HBD-2 nicht durch Immunpräzipitation mit Protein G-Sepharose-gebundenem anti-HBD-2/sc angereichert werden kann. Da diese Immunpräzipitation aber definiert große Mengen von gereinigtem rekombinantem HBD-2-GST-Fusionsprotein wiederfindet, ist davon auszugehen, dass für

den Erfolg eine kritische Konzentration und Menge von HBD-2 vorliegen muss, die wiederum in den Kulturüberständen transfizierter Zellen nicht erreicht wird.

Unter physiologischen Bedingungen entstehen die Epithelzellen des Dün- und Dickdarms aus in den Krypten liegenden Stammzellen, die auf ihrer Wanderung zur Kryptenoberfläche zu absorptiven Epithelzellen, schleimproduzierenden Becherzellen, Paneth'schen Körnerzellen oder enteroendokrinen Zellen differenzieren. Dieser Prozess wird durch verschiedene Signale für Proliferation, Differenzierung und Apoptose gesteuert, die so die Zellumsatzrate und die funktionelle Integrität des Epithels beeinflussen [De Santa Barbara, 2003]. Hyperproliferation ist dabei mit eingeschränkter Differenzierung, verminderter digestiv-absorptiver Leistung und Permeabilitätsstörungen verbunden [Lipkin, 1995]. Hyperproliferation stellt gleichzeitig einen Schritt in der Initialphase der Karzinogenese dar [Kunte, 2005], da DNA-Reparaturmechanismen im Rahmen der Zellzykluskontrolle und die Initiation der Apoptose nicht mehr ungestört ablaufen [De Vogel, 2008]. Die primären Aufgaben intestinaler Epithelzellen liegen in der Digestion und Resorption von Nahrungsstoffen. Oberflächenhydrolasen der Enterozyten sind an der Spaltung von Kohlenhydraten und Oligopeptiden beteiligt [Arvanitakis, 1976]. Zur Resorption dienen spezifische Transmembranproteine in der apikalen Zellmembran, die die monomeren Nährstoffe meist durch Kopplung an Ionengradienten in die Epithelzelle transportieren. Gleichzeitig finden sich *Carrier*-Systeme und Kanäle für den vektoriellen Transport von anorganischen Ionen, an die osmotisch die Wasserresorption im Darm gebunden ist [Movileanu, 1998]. Auch die Elektrolyttransportsysteme stehen unter Kontrolle zellulärer Proteinkinasen, die damit Resorptions- und Sekretionsprozesse maßgeblich beeinflussen [Tomassen, 2004]. Die Polarisation der Epithelzellen ist eine wichtige Grundlage für die intestinale Toleranz. Wiederholte Stimulation der Toll-like-Rezeptoren dieser Zellen durch Bestandteile der kommensalen intestinalen Mikroorganismen führt zu hyporesponsivem Verhalten durch Induktion inhibitorischer intrazellulärer Signalkaskaden und trägt zur intestinalen Toleranz bei [Lee, 2008].

Da es bisher keine reproduzierbaren Primärkulturen intestinaler Schleimhautzellen gibt, greift man auf Karzinomzelllinien intestinalen Ursprungs zurück. Die Zelllinie HT-29 ist hier ein gutes Modell für die Bedingungen *in vivo*. Diese bereits 1964 isolierten Zellen wachsen in Kultur subkonfluent zu unpolarierten Multilayern aus [von Kleist, 1975]. Obwohl die Zellen aus undifferenzierten Zellen der Kryptenregion eines humanen Kolon-Adenokarzinoms stammen, weisen sie im Gegensatz zu anderen Zelllinien, wie z.B. Caco-2, wesentliche phänotypische Eigenschaften intestinaler Kryptenzellen auf. Die Differenzierung der HT-29-Zellen ist ähnlich der embryonalen Entwicklung des Darmes und kann *in vitro* untersucht werden [Le Bivic, 1988]. Die HT-29-Zellen antworten über den entsprechenden Rezeptor auf das *Vasoactive Intestinal Peptide* [Marchis-Mouren, 1988].

Wie intestinale Kryptenzellen steuern HT-29-Zellen Sekretionsprozesse. Chloridkanäle regulieren die Sekretion und Resorption von Wasser und sind an der Initiation der sekretorischen Diarrhoe beteiligt.

Eine Grundlage für die Ausbildung der zellulären Polarität ist das Sortieren von Proteinen und Lipiden im Trans-Golgi-Netzwerk und in Endosomen sowie der zielgerichtete Transport von abgeschnürten Transportvesikeln des Golgi-Apparates zu den unterschiedlichen Zellkompartimenten [Rodriguez-Boulan, 1992]. Auch in nicht polarisierten Zellen, wie z.B. Fibroblasten, werden Proteine im Trans-Golgi-Netzwerk verschiedenen Transportvesikeln zugeordnet. Diese werden jedoch nicht nur in bestimmte zelluläre Domänen der Plasmamembran eingebaut, sondern erscheinen gleichmäßig verteilt an der Zelloberfläche. Zur Ausbildung der zellulären Polarität ist der direkte Kontakt der Zelle zur extrazellulären Matrix und zu Nachbarzellen notwendig [Wang, 1990].

Frisch isolierte humane intestinale Epithelzellen können nur für wenige Tage in *in-vitro*-Kultur genommen werden. Dabei adhären die Zellen der isolierten Darmkrypten an einen mit Kollagen beschichteten Untergrund, wodurch Apoptose inhibiert wird. Der Anteil kontaminierender Makrophagen in diesen Zellpräparationen liegt typischerweise bei 1-2% [Grossmann, 2003]. Auch bei Epithelzellen, die nach Zentrifugation aneinander adhären, können nach Ausbildung interzellulärer Kontakte antiapoptotische Signalwege nachgewiesen werden [Hofmann, 2007]. Da bei der Isolation insbesondere Makrophagen nicht sicher entfernt werden können, ist die Untersuchung des direkten Einflusses proinflammatorischer Zytokinen auf die Expression von HBD-2 in primären humanen Epithelzellen nur eingeschränkt möglich.

Der 1991 durch glukosefreie Kultivierung erzeugte Subklon von HT-29, HT29/B6, zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen differenzieren, sich polarisieren und in Kultur einen konfluenten Monolayer bilden [Kreusel, 1991]. Für die Untersuchung des Einflusses von Zytokinen auf die Regulation der HBD-2-Expression in entzündlich veränderten Darmepithelien scheint die Polarisierung des Epithels nicht zwingend. Rezeptoren der Zytokine werden von den HT-29-Zellen exprimiert und die Signalkaskade, die zur HBD-2-Expression führt, ist nachweisbar. Da die antibakterielle Wirkung die 4-fache HBD-2-Konzentration der chemotaktischen erfordert, wäre die Polarisierung der Zellen für die Unterscheidung einer apikalen oder basalen HBD-2-Sekretion denkbar. In diesem Kontext könnte man vergleichbare Untersuchungen zum Effekt proinflammatorischer Zytokine auf die HBD-2-Produktion durch polarisierte Zellen der Zelllinie HT29/B6 anstellen. Die dafür notwendigen Techniken auf mRNA- und Proteinebene wurden im Rahmen der vorgelegten Arbeit optimiert und validiert.

Diskussion

Bei chronischen Entzündungen der Darmwand sind die Zellzahlen aller in den Entzündungsprozess einbezogenen intestinalen sowie mesenchymalen und neuroendokrinen Zellen im Vergleich zum gesunden Darm erhöht [Fiocchi, 1998]. Durch eine gleichzeitig erhöhte Permeabilität für Antigene unterhalten diese Zellen die Entzündung und setzen proinflammatorische Substanzen wie Zytokine frei [Panes, 2001]. Sekundär ist auch das Endothel selbst geschädigt, dadurch durchlässiger und führt neben den Botenstoffen zu einer erhöhten Anzahl der Abwehrzellen [Binion, 1998]. Diese normalerweise im Blut zirkulierenden Zellen können das veränderte Zytokinprofil erklären. Diese Zytokine binden an die Zytokinrezeptoren der Epithelzellen [Pitman, 2000]. Sie können so die Expression des antimikrobiellen und chemotaktischen HBD-2 induzieren und tragen zur Rekrutierung Zytokin-sezernierender Entzündungszellen bei.

Obwohl also bei CED die Gesamtkonzentration von Zytokinen in der Darmwand erhöht ist, kommt es nicht zum Anstieg luminaler Defensine. Fragt man nach dem direkten Einfluss von Zytokinen auf die Regulation der HBD-2-Expression in Darmepithelien und möchte dies im Zusammenhang mit seiner Relevanz bei CED untersuchen, ist man beim experimentellen Nachweis der Defensinproduktion mit Problemen auf unterschiedlichen Ebenen konfrontiert. Eingewanderte Immunzellen insbesondere in der entzündlich veränderten Mukosa produzieren nicht nur Zytokine, sondern selbst auch Defensine. So erweitert sich in menschlichem Untersuchungsmaterial die Frage zwangsläufig auch immer auf die Frage nach der eigentlichen Produzentenzelle des Defensins in der untersuchten Probe. Die Immunhistologie ist eine Möglichkeit der Darstellung im Darmgewebe, mit der bei Patienten mit positivem Nachweis für *Helicobacter pylori* in Magenpräparaten HBD-2 bereits detektiert wurde [Uehara, 2003]. Auch mit seriellen Schnitten bildet die Immunhistologie nur einen kleinen Ausschnitt einer Probe ab und ist deshalb nur bedingt für eine Quantifizierung der Defensinproduktion im menschlichen Darm geeignet. Ein Nachweis von Defensinen im Western-blot gestattet es zwar größere Mengen Material zu beurteilen, erlaubt aber keine Zuordnung der Defensinproduktion zu bestimmten Zelltypen. Wie für alle sezernierten Proteine ist die Sensitivität beider Ansätze auch dadurch begrenzt, dass nur ein Teil des nachzuweisenden Proteins tatsächlich in der Zelle verbleibt. Im Falle der Defensine erschwert deren geringe Größe eine Darstellung des Proteins zusätzlich. Daraus ergeben sich besondere Anforderungen an die Spezifität Antikörper-vermittelter Nachweise.

Die hier vorgelegte Arbeit schlägt in einem Modell mit der humanen Epithelzelllinie HT-29, mit definierten rekombinanten proinflammatorischen Zytokinen, mit rekombinantem HBD-2 und mit einem in transfizierten Zellen konstitutiv exprimiertem HBD-2-EGFP-

Diskussion

Reporterprotein spezifische quantitative Methoden zum Defensinnachweis aus Darmepithelzellen auf mRNA- und Proteinebene vor.

Eine TaqMan-PCR für die Quantifizierung der Defensinexpression wurde in der vorgelegten Arbeit beispielhaft für HBD-2 mit einem klonierten HBD-2-Standard im Vergleich zu einem ebenfalls klonierten Abschnitt der GAPDH als *Housekeeping Gene* etabliert, validiert und bereitgestellt. Mit diesem Nachweis können aus einem Ansatz 10^2 - 10^9 Kopien eines definierten Moleküls reproduzierbar dargestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde schon gezeigt, dass IL-1 β , nicht aber die anderen untersuchten proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-6 und IL-17 konzentrations- und zeitabhängig die Expression von HBD-2 in der Darmepithelzelllinie HT-29 induzieren. In quantitativen TaqMan-PCR für Defensine aus Gewebeproben, z.B. aus Biopsien, die zur Minimierung des Stichprobenfehlers aus verschiedenen Positionen entnommen werden könnten, könnte die Defensinproduktion auf mRNA-Ebene quantifiziert werden. Diese könnte dann mit histologischen Befunden zur Zellularität und quantitativen RT-PCR Nachweisen z.B. der Zytokin-Produktion aus den jeweils gleichen Proben korreliert werden. Die Möglichkeit von Multiplex-Analysen schafft die Voraussetzung für Untersuchungen mehrerer Parameter aus geringen Probenmengen und gibt eine Strategie für die Standardisierung des Nachweises weiterer, mit CED assoziierten Defensine und Zytokine aus menschlichem Untersuchungsmaterial auf translationaler Ebene vor.

Da Defensin-spezifische mRNA bei konstitutiv exprimierten Defensinen nicht und bei induzierbaren nur bedingt mit der Menge des entsprechenden Proteins korreliert, würde ein unmittelbarer Nachweis des Proteins weitere und/oder andere Informationen als der transkriptionelle Ansatz liefern. Ein im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierter HBD-2-spezifischer Western-blot beschreibt die dem polyklonalen Antikörper anti-HBD-2/ab überlegene Spezifität und Sensitivität von anti-HBD-2/sc. Mit Hilfe definierter Mengen von rekombinantem HBD-2 und Zelllysaten illustriert dieser Western-blot die Empfindlichkeit des HBD-2-Proteins gegenüber strengen Extraktionsbedingungen und begründet die Notwendigkeit für Methoden, bei denen das HBD-2-Protein möglichst schonend behandelt wird. Prozeduren, die gleichzeitig der Anreicherung von Defensinen aus Zellkulturüberständen dienen, wie Lyophilisierung oder Immunpräzipitation mit einem HBD-2-spezifischem Antikörper, erfordern HBD-2-Konzentrationen und -Mengen, die durch mit IL-1 β vorbehandelte HT-29-Zellen unter den getesteten Bedingungen offensichtlich nicht produziert wurden. Mit dem eigens konstruierten HBD-2-EGFP-Reporterprotein, das unter der Kontrolle der natürlichen Signalsequenz von HBD-2 aus transfizierten Zellen sezerniert wird, konnten die Grenzen und Möglichkeiten des Proteinnachweises aus den Produzentenzellen bestimmt werden. Transfektionseffizienzen >60% in primären darmassoziierten Zellen zeigten, dass das sezernierte Fusionsprotein

Diskussion

im Gegensatz zu zytoplasmatisch exprimiertem HBD-2-EGFP keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität der produzierenden Zellen hat. Während ein Teil des HBD-2-EGFP sezerniert wird, verbleibt ein Teil in der Zelle und kann daraus durch den HBD-2-spezifischen Western-blot dargestellt werden. Würde es gelingen, natives HBD-2 direkt im endoplasmatischen Retikulum/Golgi-Apparat der Zellen aus dem Darmepithel anzureichern, könnte der experimentelle Nachweis eines HBD-2-Proteins auch aus nicht für eine Hochexpression transfizierten Zellen geführt werden. Der gezielte Block der Sekretion z.B. durch Brefeldin A würde die Sicherheit der Wiederfindung von HBD-2 aus den Zellen im Western-blot erhöhen. Gleichzeitig würde er aus isolierten Zellen des Darmgewebes die Möglichkeit eröffnen durchflusszytometrisch die HBD-2-Expression zu bestimmen und in Kombination mit zellulären Oberflächenmarkern unmittelbar die Natur der produzierenden Zelle zu ermitteln. Vor dem Hintergrund der hier vorgestellten Ergebnisse kann die Methodik dafür mit primären Zellen, z.B. auch mit Darmepithelzellen, die mit dem sekretorischen HBD-2-EGFP-Konstrukt transfiziert sind, optimiert werden.

Zusammengefasst wird auf transkriptioneller Ebene in der Zelllinie HT-29 gezeigt, dass nur IL-1 β , nicht aber TNF α , IL-6 und IL-17 in Darmepithelien die Expression von HBD-2 induzieren kann. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und bereitgestellten Methoden weisen den Weg zum Nachweis von Defensinen auf mRNA- und Proteinebene. Sie können in einem systematischen *Screening* von HBD-2 in Proben menschlicher Darmepithelien genutzt und auf andere CED-relevante Defensine übertragen werden.

5 Zusammenfassung

Titel: Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von humanem β 2-Defensin in Darmepithelien - Untersuchungen im Modell mit der epithelialen Zelllinie HT-29.

Einleitung: Die überwiegend durch Epithelzellen gebildeten β -Defensine sind Teil der angeborenen Immunität und unterstützen die Aufrechterhaltung der intestinalen Mukosabarriere. Im Krankheitsbild des Morbus Crohn ist der Anteil mukosal-adhärenter und invasiver Bakterien in den betroffenen Darmabschnitten erhöht und gleichzeitig wird eine Immunantwort gegen die kommensale luminale Flora gefunden. Daraus ergibt sich die Frage, wie bei der chronischen Entzündung die Anreicherung von Immunzellen auf die Defensin-Homöostase wirken. Für die Untersuchung eines unmittelbaren Zusammenhanges zwischen einem veränderten Profil proinflammatorischer Zytokine und den Defensinen aus menschlichen Darmepithelien eignet sich besonders das humane β 2-Defensin (HBD-2), welches transkriptionell reguliert und durch bisher nicht ausreichend bekannte Mechanismen induziert wird. In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von HBD-2 im Darmepithel modellartig mit Hilfe der humanen kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie HT-29 (ATCC HTB38) und hochgereinigten, rekombinanten Zytokinen untersucht und Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von HBD-2 auf mRNA- und Proteinebene etabliert und validiert.

Methodik: HT-29-Zellen wurden mit den rekombinanten humanen Zytokinen Interleukin (IL)-1 β , Tumornekrosefaktor (TNF) α , IL-6 bzw. IL-17 mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten kultiviert. Durch semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) für HBD-2 im Vergleich zur Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden die Mengen der HBD-2-mRNA abgeschätzt und die Ergebnisse in einer quantitativen TaqMan-PCR überprüft, die als standardisiertes *Screening*-Verfahren z.B. für Darmbiopsien etabliert wurde. Als absolute Standards wurde in den Vektor pCR2.1 die entsprechende cDNA für HBD-2 (pXA2) und GAPDH (pHGAP) kloniert. Ein HBD-2-spezifischer Western-blot wurde mit rekombinantem HBD-2 (~8 kDa) und einem HBD-2-Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (~30 kDa) für die Untersuchung von Zellkulturüberständen und Lysaten IL-1 β -behandelter HT-29-Zellen bzw. von Proben humanen Darmgewebes und nicht-epithelialer Zellen etabliert. Dabei wurden die polyklonalen Antikörper anti-HBD-2/ab und anti-HBD-2/sc für HBD-2 und anti-Aktin/AC für β -Aktin verwendet. Auf der Basis des Vektors pEGFP wurden rekombinante HBD-2-Fusionsproteine mit dem *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) für die intrazelluläre Expression (pBA1.2) bzw. Sekretion (pXA2.6) hergestellt. Die Expression und Sekretion von HBD-2-EGFP durch Elektroporation transfizierter Zellen wurde

Zusammenfassung

durchflusszytometrisch über EGFP und im HBD-2-spezifischen Western-blot aus Zelllysaten und -kulturüberständen bestimmt.

Ergebnisse: In HT-29-Zellen wurde unter Standardkulturbedingungen keine mRNA für HBD-2 gefunden. Das Zytokin IL-1 β induzierte zeit- und konzentrationsabhängig die Expression von HBD-2. Entsprechend erhöhte mRNA-Mengen wurden noch nach 72 h in den Zellen nachgewiesen. Die Zytokine TNF α , IL-6 bzw. IL-17 allein hatten keinen Effekt und die IL-1 β induzierte HBD-2-spezifische mRNA wurde durch TNF α nicht verändert. Im optimierten HBD-2-spezifischen Western-blot mit dem Antikörper anti-HBD-2/sc wurden in Zellkulturüberständen und Lysaten von 1×10^6 HT-29-Zellen nach Stimulation mit IL-1 β sowie aus Epithelzellpräparaten vom menschlichem Darmgewebe kein HBD-2-Protein gefunden. Mit diesem Western-blot waren 1,5 pMol rekombinantes HBD-2 nachweisbar. Wurde dieses HBD-2 vor dem Hintergrund aller zellulären Proteine den Bedingungen der Standardaufarbeitung ausgesetzt, waren für die sichere Darstellung mindestens 70 pMol HBD-2 notwendig. Diese Menge wurde bei der Induktion von HBD-2 in HT-29-Zellen durch IL-1 β und in den Darmproben nicht erreicht. Bei einer Effizienz der Transfektion des Plasmids für das HBD-2-EGFP-Fusionsprotein in HT-29-Zellen um 70% wurde konstitutiv exprimiertes und sezerniertes HBD-2-EGFP mit einer Größe von ~36 kDa sowohl in Lysaten aus 1×10^5 Zellen als auch Kulturüberständen direkt gezeigt. Als Kontrolle der Gleichbeladung erwies sich der monoklonale Antikörper anti-Aktin/AC sowohl in den HT-29-Zellen als auch den Patientenproben aus dem Darm am zuverlässigsten. Der im Western-blot verwendete Antikörper anti-HBD-2/sc war für eine Anreicherung von HBD-2 aus Kulturüberständen oder Zelllysaten durch Immunpräzipitation nicht geeignet.

Schlussfolgerung: Die auf Transkriptionsebene in der Zelllinie HT-29 gezeigte Induktion der HBD-2-Expression durch das proinflammatorische IL-1 β unterstützt die Annahme, dass die Defensinproduktion nicht nur direkt durch Bakterien sondern auch indirekt über zellproduzierte Zytokine in den Darmepithelien reguliert wird. Mittels TaqMan-PCR in Darmbiopsien kann die HBD-2-mRNA quantifiziert werden, doch reicht die Sensitivität des Western-blots nicht für einen direkten Nachweis des Proteins unter diesen Bedingungen aus. Mit einem konstitutiv durch transfizierte epitheliale Zellen exprimierten HBD-2-EGFP-Fusionsprotein können Methoden zur Anreicherung und Darstellung des HBD-2-Proteins sowohl aus Zelllysaten als auch aus Zellkulturüberständen etabliert und optimiert werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereitgestellten Methoden gestatten den Nachweis von Defensinen auf mRNA- und Proteinebene und können auf Proben menschlicher Darmepithelien übertragen werden.

6 Literaturverzeichnis

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004 Jan;53(1):1-4.

Dinarelli CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*. 1986 Jun 1;163(6):1433-50.

Van den Brande JM, Koehler TC, Zelinkova Z, Bennink RJ, te Velde AA, ten Cate FJ, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP, Hommes DW. Prediction of antitumour necrosis factor clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2007 Apr;56(4):509-17.

Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin Immunol*. 2008 Jan;126(1):67-80.

Stange EF, Travis SP. The European consensus on ulcerative colitis: new horizons? *Gut*. 2008 Aug;57(8):1029-31.

Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Häuser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Krieglstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M. [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Z Gastroenterol*. 2008 Sep;46(9):1094-146.

Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, Papadakis KA. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol*. 2007 Dec;125(3):281-90.

Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, Paschos E, Lohse P, Göke B, Brand S. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Feb;14(2):204-12.

Mills KH. TLR9 turns the tide on Treg cells. *Immunity*. 2008 Oct;29(4):518-20.

Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol*. 2009 Mar;2(2):173-83.

Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, Scherl E, Fleisher MR, Katz S, Johanns J, Blank M, Rutgeerts P; Ustekinumab Crohn's Disease Study Group. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1130-41.

Behm BW, Bickston SJ. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jan 23;(1):CD006893.

Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, Panaccione R, Wolf D, Pollack P. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology*. 2006 Feb;130(2):323-33; quiz 591.

Arvanitakis C, Ruhlen J, Folscroft J, Rhodes JB. Digestion of tripeptides and disaccharides: relationship with brush border hydrolases. *Am J Physiol*. 1976 Jul;231(1):87-92.

Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S,

- Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med.* 2000 May;6(5):583-8.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics.* 2005 May 11;21(3):389-95.
- Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2004 Jun;59(6):566-73.
- Bateman A, MacLeod RJ, Lembessis P, Hu J, Esch F, Solomon S. The isolation and characterization of a novel corticostatin/defensin-like peptide from the kidney. *J Biol Chem.* 1996 May 3;271(18):10654-9.
- Batra A, Pietsch J, Fedke I, Glauben R, Okur B, Stroh T, Zeitz M, Siegmund B. Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. *Am J Pathol.* 2007 Jun;170(6):1931-41.
- Bennett J, Scott KJ. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem.* 1971 Sep;43(1):173-82.
- Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 1995 Jul 17;368(2):331-5.
- Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med.* 1985 May 1;161(5):984-95.
- Bevins CL, Jones DE, Dutra A, Schaffzin J, Muenke M. Human enteric defensin genes: chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships. *Genomics.* 1996 Jan 1;31(1):95-106.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
- Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:32-63.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.
- Cai S, Du J, Cheng X, Huang N, Fumihiko N, Takaiki H, Wang B. [Expression of recombinant human beta-defensin-2 gene with C terminal of double marks of Myc and poly-histidine in transfected COS-7 cells]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2003 Jun;20(2):255-9, 280. nur Abstract
- Cai SH, Du J, Huang N, Wang BY. [Transfection and expression of recombinant human beta-defensin-2 gene in insect cells]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004 Nov;35(6):832-5. nur Abstract
- Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol.* 2000 Jan 15;164(2):966-72.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Sep;72(9):3666-70.
- Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol.* 1995 Mar 1;154(5):2434-40.

- Chang SY, Su PF, Lee TC. Ectopic expression of interleukin-1 receptor type II enhances cell migration through activation of the pre-interleukin 1alpha pathway. *Cytokine*. 2009 Jan;45(1):32-8. Epub 2008 Nov 20.
- Chen H, Xu Z, Cen P. High-level expression of human beta-defensin-2 gene with rare codons in *E. coli* cell-free system. *Protein Pept Lett*. 2006;13(2):155-62.
- Chen VL, France DS, Martinelli GP. De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells. *J Invest Dermatol*. 1986 Nov;87(5):585-7.
- Chen XM, O'Hara SP, Nelson JB, Splinter PL, Small AJ, Tietz PS, Limper AH, LaRusso NF. Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense responses to *Cryptosporidium parvum* via activation of NF-kappaB. *J Immunol*. 2005 Dec 1;175(11):7447-56.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
- Clarke DJ, Campopiano DJ. Structural and functional studies of defensin-inspired peptides. *Biochem Soc Trans*. 2006 Apr;34(Pt 2):251-6.
- Cohen SN, Chang AC. A method for selective cloning of eukaryotic DNA fragments in *Escherichia coli* by repeated transformation. *Mol Gen Genet*. 1974;134(2):133-41.
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*. 1993 Jul 23;261(5120):472-5.
- Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology*. 1992 Jul;103(1):65-71.
- Cooper S. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. *FASEB J*. 2003 Mar;17(3):333-40.
- Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jan;52(1):2-12. Epub 2007 Dec 10.
- Cottone M, Mocchiari F, Modesto I. Infliximab and ulcerative colitis. *Expert Opin Biol Ther*. 2006 Apr;6(4):401-8.
- De Santa Barbara P, van den Brink GR, Roberts DJ. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Jul;60(7):1322-32.
- De Vogel J, van-Eck WB, Sesink AL, Jonker-Termont DS, Kleibeuker J, van der Meer R. Dietary heme injures surface epithelium resulting in hyperproliferation, inhibition of apoptosis and crypt hyperplasia in rat colon. *Carcinogenesis*. 2008 Feb;29(2):398-403.
- D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology*. 1998 Feb;114(2):262-7.
- Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 1;88(9):3952-6.
- Dina D, Crippa M, Beccari E. Hybridization properties and sequence arrangement in a population of mRNAs. *Nat New Biol*. 1973 Mar 28;242(117):101-5.
- Dina D, Meza I, Crippa M. Relative positions of the "repetitive", "unique" and poly(A) fragments of mRNA. *Nature*. 1974 Apr 5;248(448):486-90.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2095-147.

- Dinarelo CA. Interleukin-18. *Methods*. 1999 Sep;19(1):121-32.
- Dinarelo CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J*. 1994 Dec;8(15):1314-25.
- Djaballah H, Rowe AJ, Harding SE, Rivett AJ. The multicatalytic proteinase complex (proteasome): structure and conformational changes associated with changes in proteolytic activity. *Biochem J*. 1993 Jun 15;292 (Pt 3):857-62.
- Dwinell MB, Eckmann L, Leopard JD, Varki NM, Kagnoff MF. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 1999 Aug;117(2):359-67.
- Eliasson M, Olsson A, Palmcrantz E, Wiberg K, Inganäs M, Guss B, Lindberg M, Uhlén M. Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. *J Biol Chem*. 1988 Mar 25;263(9):4323-7.
- Expression and regulation of novel human beta-defensins in gingival keratinocytes. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):111-7. Premratanachai P, Joly S, Johnson GK, McCray PB Jr, Jia HP, Guthmiller JM.
- Fahlgren A, Hammarström S, Danielsson A, Hammarström ML. Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*. 2003 Jan;131(1):90-101.
- Fedorcsak I, Ehrenberg L. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand* 1966;20:107-12.
- Fellermann K, Stange EF. Defensins -- innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001 Jul;13(7):771-6.
- Finkelman F, Morris S, Orekhova T, Sehy D. The in vivo cytokine capture assay for measurement of cytokine production in the mouse. *Curr Protoc Immunol*. 2003 Aug;Chapter 6:Unit 6.28.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):182-205.
- Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev*. 2006;12:6-33.
- Forsgren A, Sjöquist J. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol*. 1966 Dec;97(6):822-7.
- Foster B, Prussin C, Liu F, Whitmire JK, Whitton JL. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2007 Aug;Chapter 6:Unit 6.24.
- Furukawa K, Takahashi T, Arai F, Matsushima K, Asakura H. Enhanced mucosal expression of interleukin-6 mRNA but not of interleukin-8 mRNA at the margin of gastric ulcer in *Helicobacter pylori*-positive gastritis. *J Gastroenterol*. 1998 Oct;33(5):625-33.
- Gallo RL, Huttner KM. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol*. 1998 Nov;111(5):739-43.
- Ganz T. Defensins and host defense. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):420-1.
- García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*. 2001 Aug;15(10):1819-21.
- Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D, Allen H. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*. 1997 Apr 10;386(6625):619-23.

- Ghosh SK, Gerken TA, Schneider KM, Feng Z, McCormick TS, Weinberg A. Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. *Clin Chem.* 2007 Apr;53(4):757-65.
- Glazer AN, Peck K, Mathies RA. A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 May;87(10):3851-5.
- Görg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 1988 Sep;9(9):531-46.
- Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974 Oct;3(2):127-33.
- Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud JA, Rojkind M. Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl4-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6. *Lab Invest.* 1991 Dec;65(6):644-53.
- Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Steinkamp M, Schmautz WK, Stadler F, Bataille F, Schultz M, Schölmerich J, Rogler G. Progress on isolation and short-term ex-vivo culture of highly purified non-apoptotic human intestinal epithelial cells (IEC). *Eur J Cell Biol.* 2003 May;82(5):262-70.
- Gumport RI, Uhlenbeck OC. T4 RNA ligase as a nucleic acid synthesis and modification reagent. *Gene Amplif Anal.* 1981;2:313-45.
- Gunzer M. Migration, cell-cell interaction and adhesion in the immune system. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2007;(3):97-137.
- Guseinov TS, Guseinova ST. Effect of dehydration on morphogenesis of the lymphatic network and immune structures in the small intestine. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Jun;145(6):755-7.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):1720-30.
- Han YW, Aleyas AG, George JA, Yoon HA, Lee JH, Kim BS, Eo SK. Intracellular CD154 expression reflects antigen-specific CD8+ t cells but shows less sensitivity than intracellular cytokine and MHC tetramer staining. *J Microbiol Biotechnol.* 2007 Dec;17(12):1955-64.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983 Jun 5;166(4):557-80.
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature.* 1990 Jan 25;343(6256):336-40.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 1997 Jun 26;387(6636):861.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23;276(8):5707-13.
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Jun;22(6):714-21.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32.

- Hecht G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol.* 1999 Sep;277(3 Pt 1):C351-8.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20.
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol.* 1974 Nov;14(5):1235-44.
- Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Nagai K, Kubota T, Yao J, Kitamura M. Secreted protein-based reporter systems for monitoring inflammatory events: critical interference by endoplasmic reticulum stress. *J Immunol Methods.* 2006 Aug 31;315(1-2):202-7
- Hirose S, Kumagai H, Yoshikawa M, Mikami T, Igarashi K. Studies on salivary gland ribonucleases. II. Purification of ribonucleases from bovine submaxillary gland and the effects of polyamines on their activities. *J Biochem.* 1977 Dec;82(6):1605-12.
- Hofmann C, Obermeier F, Artinger M, Hausmann M, Falk W, Schoelmerich J, Rogler G, Grossmann J. Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology.* 2007 Feb;132(2):587-600.
- Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med.* 2000 Jan 17;191(2):313-20.
- Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:256-71.
- Jang BC, Lim KJ, Paik JH, Kwon YK, Shin SW, Kim SC, Jung TY, Kwon TK, Cho JW, Baek WK, Kim SP, Suh MH, Suh SI. Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jul 30;320(3):1026-33.
- Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol.* 2005 May;42(9):1073-84.
- Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem.* 1992 Nov 15;267(32):23216-25.
- Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol.* 2005 Sep 15;175(6):3463-8.
- Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1;100(1):6-10.
- Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Okazawa A, Hibi T, Oshima S, Miyata T, Nakamura T, Watanabe M. Macrophage-derived IL-18 targeting for the treatment of Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003 Jun;2(2):131-6.
- Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3482-91.
- Kao CY, Kim C, Huang F, Wu R. Requirements for two proximal NF-kappaB binding sites and IkappaB-zeta in IL-17A-induced human beta-defensin 2 expression by conducting airway epithelium. *J Biol Chem.* 2008 May 30;283(22):15309-18.
- Kawakami M, Cerami A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J Exp Med.* 1981 Sep 1;154(3):631-9.
- Kellersch B, Kolanus W. Membrane-proximal signaling events in beta-2 integrin activation.

Results Probl Cell Differ. 2006;43:245-57.

Kilian PL, Kaffka KL, Stern AS, Woehle D, Benjamin WR, Dechiara TM, Gubler U, Farrar JJ, Mizel SB, Lomedico PT. Interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta bind to the same receptor on T cells. *J Immunol*. 1986 Jun 15;136(12):4509-14.

King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod*. 2002 Apr;8(4):341-9.

Kitlińska J, Wojcierowski J. RNA isolation from solid tumor tissue. *Anal Biochem*. 1995 Jun 10;228(1):170-2.

Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol*. 1991 Oct;261(4 Pt 1):C574-82.

Krishnakumari V, Nagaraj R. Interaction of antibacterial peptides spanning the carboxy-terminal region of human beta-defensins 1-3 with phospholipids at the air-water interface and inner membrane of *E. coli*. *Peptides*. 2008 Jan;29(1):7-14.

Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod*. 2000 Feb;62(2):412-9.

Kunte DP, Wali RK, Koetsier JL, Hart J, Kostjukova MN, Kilimnik AY, Pyatkin IG, Strelnikova SR, Roy HK. Down-regulation of the tumor suppressor gene C-terminal Src kinase: an early event during premalignant colonic epithelial hyperproliferation. *FEBS Lett*. 2005 Jul 4;579(17):3497-502.

Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta J, Kuroiwa A, Ina K, Kanayama K, Ando T, Matsuura T, et al. Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci*. 1995 May;40(5):949-59.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Le Bivic A, Hirn M, Reggio H. HT-29 cells are an in vitro model for the generation of cell polarity in epithelia during embryonic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(1):136-40.

Leal RF, Coy CS, Ayrizono ML, Fagundes JJ, Milanski M, Saad MJ, Velloso LA, Góes JR. Differential expression of pro-inflammatory cytokines and a pro-apoptotic protein in pelvic ileal pouches for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. *Tech Coloproctol*. 2008 Mar;12(1):33-8.

Lee J, Gonzales-Navajas JM, Raz E. The "polarizing-tolerizing" mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Semin Immunopathol*. 2008 Feb;30(1):3-9.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 1993 Aug 11;21(16):3761-6.

Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:105-28.

Leong MM, Fox GR. Luminescent detection of immunodot and western blots. *Methods Enzymol*. 1990;184:442-51.

Lindl T. Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Spektrum, Akad. Verl., 2000.

Lipkin M, Newmark H. Calcium and the prevention of colon cancer. *J Cell Biochem Suppl*. 1995;22:65-73.

- Loppnow H. [Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action] *Internist (Berl)*. 2001 Jan;42(1):13-4, 17-27.
- Lottspeich F, Zorbach H. Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren. *Bioanalytik*. Heidelberg; Berlin. Akad. Verl., 1998. 21:571-574
- MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*. 2000 Jan;51(1):2-9.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007 Jul;23(4):379-83.
- Mansfield MA, *Protein Blotting, A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, USA 1994.
- Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today*. 1997 May;18(5):231-40.
- Marchis-Mouren G, Martin JM, Luis J, el Battari A, Muller JM, Marvaldi J, Pichon J. HT 29, a model cell line: stimulation by the vasoactive intestinal peptide (VIP); VIP receptor structure and metabolism. *Biochimie*. 1988 May;70(5):663-71.
- McDermott AM, Redfern RL, Zhang B, Pei Y, Huang L, Proske RJ. Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1beta stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May;44(5):1859-65.
- Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, Harada K, Tateishi H, Nishiyama T, Tanikawa K. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut*. 1995 Jan;36(1):45-9.
- Morgan MM, Clayton CC, Heinricher MM. Dissociation of hyperalgesia from fever following intracerebroventricular administration of interleukin-1beta in the rat. *Brain Res*. 2004 Oct 1;1022(1-2):96-100.
- Morgera F, Antcheva N, Pacor S, Quaroni L, Berti F, Vaccari L, Tossi A. Structuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes. *J Pept Sci*. 2008 Apr;14(4):518-23.
- Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV. Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate*. 2008 Oct 1;68(14):1555-60.
- Movileanu L, Flonta ML, Mihailescu D, Frangopol PT. Characteristics of ionic transport processes in fish intestinal epithelial cells. *Biosystems*. 1998 Feb;45(2):123-40.
- Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Aug;13(8):1016-23.
- Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1991 Aug;32(8):913-7.
- Nagaoka I, Niyonsaba F, Tsutsumi-Ishii Y, Tamura H, Hirata M. Evaluation of the effect of human beta-defensins on neutrophil apoptosis. *Int Immunol*. 2008 Apr;20(4):543-53. Epub 2008 Feb 27.
- Nathans D, Smith HO. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem*. 1975;44:273-93.
- Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med*. 2002 Jun;8(6):567-73.

- Nicklin MJ, Hughes DE, Barton JL, Ure JM, Duff GW. Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *J Exp Med*. 2000 Jan 17;191(2):303-12.
- Nielsen OH, Kirman I, Rüdiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2003 Feb;38(2):180-5.
- Niess JH. Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008
- Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology*. 2004 Mar;111(3):273-81.
- Oh HM, Oh JM, Choi SC, Kim SW, Han WC, Kim TH, Park DS, Jun CD. An efficient method for the rapid establishment of Epstein-Barr virus immortalization of human B lymphocytes. *Cell Prolif*. 2003 Aug;36(4):191-7.
- O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*. 1999 Dec 15;163(12):6718-24.
- Onoé K, Yanagawa Y, Minami K, Iijima N, Iwabuchi K. Th1 or Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells. *Immunol Res*. 2007;38(1-3):319-32.
- Papadakis KA, Targan SR. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2000 Nov;6(4):303-13.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41. Epub 2005 Oct 2.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 1;30(9):e36.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
- Pioli PA, Weaver LK, Schaefer TM, Wright JA, Wira CR, Guyre PM. Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):6647-55.
- Platt AM, Mowat AM. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett*. 2008 Aug 15;119(1-2):22-31.
- Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol*. 1997 Dec 15;159(12):6276-82.
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*. 2003 Oct 13;3:18.
- Potter H. Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem*. 1988 Nov 1;174(2):361-73.
- Proud D, Sanders SP, Wiehler S. Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4637-45.
- Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for

Literaturverzeichnis

- staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2791-7.
- Raddatz D, Bockemühl M, Ramadori G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005 May;17(5):547-57.
- Raffael A, Valet G. Distinction of macrophage subpopulations: measurement of functional cell parameters by flow cytometry. *Adv Exp Med Biol.* 1982;155:453-9.
- Ram S, Shanker R. Computing TaqMan probes for multiplex PCR detection of *E. coli* O157 serotypes in water. *In Silico Biol.* 2005;5(5-6):499-504.
- Rappolee DA, Wang A, Mark D, Werb Z. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J Cell Biochem.* 1989 Jan;39(1):1-11.
- Rehaume LM, Hancock RE. Neutrophil-derived defensins as modulators of innate immune function. *Crit Rev Immunol.* 2008;28(3):185-200.
- Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology.* 1995 Jan;108(1):40-50.
- Rodriguez-Boulan E, Powell SK. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:395-427.
- Rodriguez-Mulero S, Montanya E. Selection of a suitable internal control gene for expression studies in pancreatic isletgrafts. *Transplantation.* 2005 Sep 15;80(5):650-2.
- Rogler G, Hausmann M, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, Andreesen R, Schölmerich J, Gross V. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1998 May;112(2):205-15.
- Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5445-56.
- Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes.* 2005 Apr;19(2):101-9.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.
- Salmond RJ, Pitman RS, Jimi E, Soriani M, Hirst TR, Ghosh S, Rincón M, Williams NA. CD8+ T cell apoptosis induced by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit occurs via a novel pathway involving NF-kappaB-dependent caspase activation. *Eur J Immunol.* 2002 Jun; 32(6):1737-47.
- Sambrook J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K. New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immunol.* 2005 Jun;35(6):1886-95.
- Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987 Nov 1;166(2):368-79.
- Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, Tack BF, Vogel HJ. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of

- the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8;277(10):8279-89.
- Schmid M, Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger K, Stange EF. [The role of defensins in the pathogenesis of chronic-inflammatory bowel disease]. *Z Gastroenterol*. 2004 Apr;42(4):333-8.
- Schrimpf G, *Gentechnische Methoden*, 3.Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 2002, 46-47.
- Schröder JM, Harder J. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jun;31(6):645-51.
- Schwarz A, Tutsch E, Ludwig B, Schwarz EC, Stallmach A, Hoth M. Ca²⁺ signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa. Relation to hyporeactivity, proliferation, and inflammatory bowel disease. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):5641-7.
- Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest*. 1985 Oct;76(4):1436-9.
- Shibolet O, Podolsky DK. TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jun;292(6):G1469-73.
- Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13973-8.
- Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*. 1994 Dec 23;269(51):32678-84.
- Shuman S. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10104-8.
- Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 6;98(23):13249-54.
- Smets F, Latinne D, Bazin H, Reding R, Otte JB, Buts JP, Sokal EM. Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation*. 2002 May 27;73(10):1603-10.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85.
- Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, Santolaya-Forgas J, Romero R. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2007 Jan;20(1):15-22.
- Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics*. 1992 Jul;13(3):654-7.
- Stroh T, Batra A, Glauben R, Fedke I, Erben U, Kroesen A, Heimesaat MM, Bereswill S, Girardin S, Zeitz M, Siegmund B. Nucleotide oligomerization domains 1 and 2: regulation of expression and function in preadipocytes. *J Immunol*. 2008 Sep 1;181(5):3620-7.
- Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976 May 15;17(5):565-77.
- Sventoraityte J, Zvirbliene A, Kiudelis G, Zalinkevicius R, Zvirbliene A, Praskevicius A, Kupcinskis L, Tamosiūnas V. Immune system alterations in patients with inflammatory

- bowel disease during remission. *Medicina (Kaunas)*. 2008;44(1):27-33.
- Syrový I, Hodný Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Chromatogr*. 1991 Sep 13;569(1-2):175-96.
- Takeda H, Suzuki Y, Takeda Y, Nishise S, Fukui T, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Suzuki K, Nakamura Y, Kawata S. A multi center study of granulocyte and monocyte adsorption apheresis therapy for ulcerative colitis-clinical efficacy and production of interleukin-1 receptor antagonist. *J Clin Apher*. 2008;23(3):105-10.
- Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*. 2003 Oct 15;31(20):e122.
- Tollin M, Bergman P, Svenberg T, Jörnvall H, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. *Peptides*. 2003 Apr;24(4):523-30.
- Tomassen SF, Fekkes D, de Jonge HR, Tilly BC. Osmotic swelling-provoked release of organic osmolytes in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Jun;286(6):C1417-22.
- Tomita T, Hitomi S, Nagase T, Matsui H, Matsuse T, Kimura S, Ouchi Y. Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol Immunol*. 2000;44(9):749-54.
- Uehara N, Yagihashi A, Kondoh K, Tsuji N, Fujita T, Hamada H, Watanabe N. Human beta-defensin-2 induction in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosal tissues: antimicrobial effect of overexpression. *J Med Microbiol*. 2003 Jan;52(Pt 1):41-5.
- Van Deventer SJ. Immunomodulation of Crohn's disease using TNF-alpha neutralizing monoclonal antibodies. *Clin Nutr*. 1997 Dec;16(6):271-5.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89.
- Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Feb;76(2):615-9.
- von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M, Fogh J. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst*. 1975 Sep;55(3):555-60.
- Waetzig GH, Rosenstiel P, Arlt A, Till A, Bräutigam K, Schäfer H, Rose-John S, Seeger D, Schreiber S. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1. *FASEB J*. 2005 Jan;19(1):91-3.
- Walker J M, *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, 11,56-61, Totowa, New Jersey, 1996.
- Wang AZ, Ojakian GK, Nelson WJ. Steps in the morphogenesis of a polarized epithelium. I. Uncoupling the roles of cell-cell and cell-substratum contact in establishing plasma membrane polarity in multicellular epithelial (MDCK) cysts. *J Cell Sci*. 1990 Jan;95 (Pt 1):137-51.
- Wang D, Moore S. Preparation of protease-free and ribonuclease-free pancreatic deoxyribonuclease. *J Biol Chem*. 1978 Oct 25;253(20):7216-9.
- Wang YD, Mao JW. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2007 Nov 28;13(44):5926-32.
- Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Schwind B, Duchrow M, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF. Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J*

Gastroenterol Hepatol. 2002 Jul;14(7):745-52.

Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. Infect Immun. 2004 Oct;72(10):5750-8.

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2003 Jul;9(4):215-23.

Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. Clin Chem. 1979 Sep;25(9):1531-46.

Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jul 30;248(3):904-9.

Wiehler S, Proud D. Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Aug;293(2):L505-15.

Wilde CG, Griffith JE, Marra MN, Snable JL, Scott RW. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. J Biol Chem. 1989 Jul 5;264(19):11200-3.

Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. Protein Sci. 1994 Sep;3(9):1362-73.

Wingens M, van Bergen BH, Hiemstra PS, Meis JF, van Vlijmen-Willems IM, Zeeuwen PL, Mulder J, Kramps HA, van Ruissen F, Schalkwijk J. Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. J Invest Dermatol. 1998 Dec;111(6):996-1002.

Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Küsters S, Fregien B, Trautwein C, Tiegs G. TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1--relevance for concanavalin A-induced hepatitis. J Immunol. 2001 Jan 15;166(2):1300-7.

Wu BY, Wang YY, Li J, Song Z, Huang JD, Wang XS, Chen Q. An optical biosensor for kinetic analysis of soluble Interleukin-1 receptor I binding to immobilized Interleukin-1alpha. Talanta. 2006 Oct 15;70(3):485-8.

Xu Z, Chen H, Yin X, Xu N, Cen P. High-level expression of soluble human beta-defensin-2 fused with green fluorescent protein in Escherichia coli cell-free system. Appl Biochem Biotechnol. 2005 Oct;127(1):53-62.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science. 1999 Oct 15;286(5439):525-8.

Zaalouk TK, Bajaj-Elliott M, George JT, McDonald V. Differential regulation of beta-defensin gene expression during Cryptosporidium parvum infection. Infect Immun. 2004 May;72(5):2772-9.

Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Aug;84(15):5449-53.

Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. FEBS Lett. 1996 Nov 4;396(2-3):319-22.

Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential

Literaturverzeichnis

engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):967-74.

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

Danksagung

Danksagung

Vielen Menschen schulde ich einen sehr herzlichen Dank für meine Doktorarbeit, die aus einer Kooperation der Chirurgischen Klinik I für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie und der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie an der Charité Campus Benjamin Franklin entstanden ist. Beginnen möchte ich mit der Person, der meine Dissertation gewidmet ist, Frau Dr. Ulrike Erben aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Loddenkemper. In einer aussichtslosen Phase zu Beginn meiner Dissertation hat sich Frau Dr. Erben meiner Betreuung angenommen. In den letzten drei Jahren habe ich durch ihre Unterstützung nicht nur die vielen verschiedenen Methoden meiner Dissertation erlernt, sondern auch wissenschaftliches Schreiben, Präsentieren und Argumentieren. Für ihre uneingeschränkte Unterstützung und das Kennenlernen ihrer hilfsbereiten und herzlichen Persönlichkeit, bin ich ihr sehr dankbar.

Besonders danke ich auch Andreas Andreou, der mir nicht nur das rekombinante in *E. coli*-exprimierte und affinitäts-gereinigte HBD-2-GST zur Etablierung des Western-blots zur Verfügung gestellt hat, sondern der mich auch in vielen schwierigen Phasen meiner Dissertation unterstützt hat.

Für das zur Verfügung stellen von Epstein-Barr-Virus -transformierten B-Lymphozyten und Primären Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett bedanke ich mich herzlich bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Christoph Loddenkemper und PD Dr. Britta Siegmund. Allen Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und das Interesse an meiner Arbeit im Rahmen vieler Seminare. Besonders bedanken möchte ich mich bei Katja Blunert für die Hilfe bei der real time PCR und der Klonierung. Inka Fedke danke ich für die Präparation und Bereitstellung primärer muriner Präadipozyten und Thorsten Stroh für die Unterstützung bei der Elektroporation. Mein weiterer Dank gilt Tarkan Dagdelen und Dr. Martin Rühl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Rajan Somasundaram für die Unterstützung bei der Etablierung und Auswertung der semiquantitativen Polymerasekettenreaktionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater PD Dr. Anton J. Kroesen und Nadja Slavova für die Vergabe des Themas. Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. H.-J. Buhr für den Zuspruch und das Interesse an meiner Dissertation im Rahmen der chirurgischen Workshops.

Zum Abschluss möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie, meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern bedanken. Ohne ihre uneingeschränkte Unterstützung wäre ich in meinem Leben nicht so weit gekommen. Sie waren jederzeit für mich da und haben mich während der Schulzeit, des Medizinstudiums, meiner Dissertationsarbeit und bei vielen weiteren Lebenssituationen gestärkt und beraten.

Erklärung

Erklärung

„Ich, Annekatriin Cordes, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von humanem β 2-Defensin in Darmepithelien - Untersuchungen im Modell mit der epithelialen Zelllinie HT 29“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 15.04.2009

Lebenslauf

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

Berlin, 15.04.2009