

Charakterisierung neuer humaner
antimikrobieller Peptide: LEAP-1, LEAP-2 und
humanes β -Defensin 4

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Apotheker Alexander Krause

geboren am 19.01.1973 in Rinteln / Weser

2001

Referent: Prof. Dr. Walter Müller
Korreferent: PD Dr. Knut Adermann
Tag der Promotion: 12.12.2001

Meinen Eltern

Zusammenfassung: Antimikrobielle Peptide sind ein wichtiger Teil der angeborenen Immunität in vielen Tierarten, und sie sind an einer Vielzahl von Mechanismen der frühen Immunabwehr beteiligt. Darüber hinaus könnten Vertreter dieser Substanzklasse ein nützliches Werkzeug bei der Bekämpfung antibiotikaresistenter Problemkeime in der Klinik darstellen. Da bisher nur wenige humane antimikrobielle Peptide bekannt sind, war es das Ziel dieser Arbeit, über zwei verschiedene Ansätze neue humane Peptide mit antimikrobieller Aktivität zu identifizieren.

Einerseits führte die Suche nach konservierten Struktureigenschaften von antimikrobiellen Peptiden, wie einem hohen Cysteingehalt oder einer positiven Nettoladung, in bereits aus humanem Hämofiltrat isolierten Peptiden zur Identifizierung von LEAP-1 und LEAP-2. Diese strukturell nicht verwandten Peptide zeigen in mikromolaren Konzentrationen eine schwache antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene nicht-pathogene Keime. Unerwarteterweise werden beide Peptide vor allem in der Leber exprimiert und zeigen zudem eine hohe Konserviertheit in verschiedenen Säugetieren. Da diese Befunde für antimikrobielle Peptide ungewöhnlich sind, ist es möglich, dass LEAP-1 und LEAP-2 auch andere, bisher noch unbekannte Funktionen innehaben könnten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit führte ein bioinformatischer Ansatz zur Identifikation neuer antimikrobieller Peptide im menschlichen Genom zur Entdeckung des humanen β -Defensin 4 (hBD-4). Die Expressionsanalyse ergab, dass hBD-4 hauptsächlich im Nebenhoden transkribiert wird. Außerdem ist die Expression von hBD-4 in primären humanen Lungenepithelzellen durch den Kontakt mit *Streptococcus pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* und in der humanen Lungenepithel-Zelllinie SAEC 6043 durch Stimulation mit PMA induzierbar. Synthetisches hBD-4(25-61) weist eine schwache antimikrobielle Aktivität gegen pathogene und nicht-pathogene Bakterien auf, wobei der antimikrobielle Effekt stark von der Ionenkonzentration des Testmediums abhängig ist. hBD-4(25-61) zeigt einen synergistischen Effekt in Kombination mit Lysozym und ist kaum hämolytisch aktiv. Darüber hinaus lockt hBD-4(25-61) in nanomolaren Konzentrationen humane Monozyten chemotaktisch an. Obwohl hBD-4 durch PMA induzierbar ist, konnte per Western Blot bisher keine native Peptidform aus den Überständen stimulierter SAEC-Zellen isoliert werden.

Schlagerworte: angeborene Immunität – antimikrobielle Peptide – Defensine

Abstract: Antimicrobial peptides are an important part of the innate immunity in many species, and they are involved in a variety of early immune response mechanisms. Moreover, members of this substance class might become a useful tool to counteract the increasing problem of drug-resistant pathogenic bacteria in the clinic. Since only rather few human antimicrobial peptides are known, it was the aim of this work to identify additional human peptides with antimicrobial activity by means of two different approaches.

On the one hand, searching for conserved structural properties of antimicrobial peptides like high cysteine content or positive net charge in peptides that have already been isolated from human hemofiltrate led to the identification of LEAP-1 and LEAP-2. These structurally unrelated peptides exhibit weak antimicrobial activity against various nonpathogenic germs at micromolar concentrations. Unexpectedly, both peptides are mainly expressed in the liver and proved to be highly conserved among mammals. Since these findings are uncommon for antimicrobial peptides, it can be speculated that LEAP-1 and LEAP-2 may also have different, yet unknown functions.

In the second part of this work, a bioinformatical approach to discover novel antimicrobial peptides in the human genome resulted in the identification of human β -defensin 4 (hBD-4). The expression analysis revealed that hBD-4 is mainly transcribed in the epididymis. Furthermore, hBD-4 expression is inducible upon contact with *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in primary human lung epithelial cells and by stimulation with PMA in the human lung epithelial cell line SAEC 6043. Synthetic hBD-4(25-61) exhibits weak antimicrobial activity against pathogenic and non-pathogenic bacteria, and the antimicrobial effect is significantly influenced by the ionic strength of the utilized test medium. hBD-4(25-61) shows synergistic activity in combination with lysozyme and only a weak hemolytic activity. Additionally, hBD-4(25-61) is chemoattracting human monocytes at nanomolar concentrations. Although hBD-4 is inducible by PMA, no native peptide form could be isolated from supernatants of stimulated SAEC cells by means of Western blot so far.

Keywords: innate immunity – antimicrobial peptides - defensins

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar	
Acc.-No.	Nummer einer Nukleotidsequenz, die in <i>GenBank</i> hinterlegt wurde	
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	
bp	Basenpaare	
cDNA	komplementäre DNA	
Da	Dalton	
ddH ₂ O	Aqua bidestillata	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)	
DNAse	Desoxyribonuklease	
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
EtOH	Ethanol	
et al.	et altera	
FCS	Fetales Kälberserum	
g	Erdbeschleunigung	
h	Stunde	
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungs- flüssigchromatographie	
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase	
IL-1	Interleukin-1	
kb	Kilobasen	
kDa	Kilodalton	
l	Liter	
LB	Luria-Bertani-Vollmedium	
LPS	Lipopolysaccharide	
min	Minute/n	
M	Molar	
ml	Milliliter	
mM	Millimolar	
nt	Nukleotide	
nM	Nanomolar	
OD	Optische Dichte	
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)	
PKC	Proteinkinase C	
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat	
PVDF	Polyvinylidendifluorid	
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)	
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)	
RT	Raumtemperatur	
SD	Standardabweichung	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
s	Sekunden	
TFA	Trifluoressigsäure	
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	
U	Units (definierte Einheiten)	

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

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	5
1.1 AUFBAU DES IMMUNSYSTEMS.....	6
1.2 HUMANE ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE.....	8
1.3 STRUKTUR UND WIRKUNGSWEISE KATIONISCHER ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE	10
1.4 PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDE.....	14
1.5 GRUNDZÜGE DER ANTIBAKTERIELLEN THERAPIE	17
1.6 ZUNEHMENDE RESISTENZ GEGENÜBER ANTIBAKTERIELLEN SUBSTANZEN	18
1.7 VOR- UND NACHTEILE ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE ALS WIRKPRINZIP IN DER ANTIBIOTIKATHERAPIE	20
1.8 ZIEL DER ARBEIT	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 MATERIALIEN, ORGANISMEN UND KULTURBEDINGUNGEN.....	22
2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen.....	22
2.1.2 Geräte und Apparaturen.....	22
2.1.3 Kits und Enzyme.....	22
2.1.4 Verwendete Oligonukleotide	23
2.1.5 Verwendete Organismen und Plasmide.....	25
2.2 KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	25
2.2.1 DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen.....	25
2.2.2 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.3 Kolonie-PCR	27
2.2.4 5'-RACE-PCR.....	28
2.2.5 Gelelektrophoretische Trennung von DNA	28
2.2.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	29
2.2.7 Ligation.....	29
2.2.8 Herstellung von transformationskompetenten Zellen.....	30
2.2.9 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli-Zellen.....	31
2.2.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	32
2.2.11 Sequenzierung von DNA.....	32
2.2.12 Aufreinigung der Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation	33
2.3 ARBEITEN MIT RNA UND TRANSKRIPTANALYSE.....	33
2.3.1 Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen	34
2.3.2 Entfernung von DNA aus RNA-Präparationen	34
2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung	35
2.3.4 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese).....	35
2.3.5 Quantifizierung von Transkripten mittels Echtzeit-PCR (TaqMan).....	36

2.3.6	<i>Quantifizierung der endogenen Expression der Zielmoleküle</i>	39
2.4	KULTIVIERUNG VON PROKARYOTISCHEN ZELLEN UND HEFEN	40
2.5	KULTIVIERUNG HUMANER ZELLINIEN	42
2.5.1	<i>Allgemeine Zellkulturbedingungen</i>	42
2.5.2	<i>Stimulation von Zellen</i>	44
2.5.3	<i>Verwendete Zytokine und Stimulanzen</i>	44
2.5.4	<i>Stimulation von Lungenepithelzellen mit pathogenen Bakterien</i>	45
2.5.5	<i>Stimulation von SAEC-Zellen zum Nachweis von hBD-4</i>	45
2.6	TESTS AUF ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT.....	46
2.6.1	<i>Radialdiffusions-Hemmtest</i>	46
2.6.2	<i>Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU-Test)</i>	47
2.6.3	<i>Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration</i>	47
2.6.4	<i>Interaktion von hBD-4 mit anderen antibiotischen Substanzen</i>	48
2.6.5	<i>Bestimmung der hämolytischen Aktivität</i>	49
2.7	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	50
2.7.1	<i>Probenvorbereitung</i>	50
2.7.2	<i>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	50
2.7.3	<i>Immuno-Blot Analyse (Western Blot)</i>	51
2.7.4	<i>Antikörper</i>	53
2.8	NACHWEIS DER CHEMOTAKTISCHEN AKTIVITÄT VON hBD-4.....	53
2.9	PEPTIDSYNTHESE	53
2.9.1	<i>Nachweis der Disulfidverbrückung</i>	54
2.10	DATENBANKRECHERCHE.....	55
2.10.1	<i>Genutzte Datenbanken und Software</i>	55
2.10.2	<i>Auffinden der Nukleotidsequenz von hBD-4 in silico</i>	55
3.	ERGEBNISSE	57
3.1	IDENTIFIZIERUNG DER PEPTIDE LEAP-1 UND LEAP-2.....	57
3.2	LEAP-1 (<i>LIVER-EXPRESSED ANTIMICROBIAL PEPTIDE 1</i>).....	58
3.2.1	<i>Nukleinsäuresequenz von LEAP-1</i>	58
3.2.2	<i>Endogene Expression von LEAP-1 in humanen Geweben</i>	59
3.2.3	<i>Antimikrobielle Aktivität von LEAP-1</i>	60
3.3	LEAP-2 (<i>LIVER-EXPRESSED ANTIMICROBIAL PEPTIDE 2</i>).....	62
3.3.1	<i>Nukleinsäuresequenz von LEAP-2</i>	62
3.3.2	<i>Alternatives Spleißen generiert verschiedene LEAP-2-cDNA- Varianten</i>	63
3.3.3	<i>Identifikation von zwei Transkriptionsstartpunkten im LEAP-2-Gen</i>	63
3.3.4	<i>Nachweis eines PCR-Artefaktes bei der Amplifikation von LEAP-2</i>	65
3.3.5	<i>Identifikation von LEAP-2-Homologen in verschiedenen Spezies</i>	65
3.3.6	<i>Endogene Expression von LEAP-2 in humanen Geweben</i>	66
3.3.7	<i>Antimikrobielle Aktivität von LEAP-2</i>	68

3.4	HBD-4 (HUMANES β -DEFENSIN 4)	70
3.4.1	Computergestützte Identifizierung des <i>hBD-4</i> -Gens.....	70
3.4.2	Endogene Expression von <i>hBD-4</i> in humanen Geweben.....	70
3.4.3	Untersuchung der <i>hBD-4</i> -Expression in Testis.....	71
3.4.4	Stimulation der <i>hBD-4</i> -Expression <i>in vitro</i>	72
3.4.4.1	Stimulation der <i>hBD-4</i> -Expression durch pathogene Bakterien.....	72
3.4.4.2	Stimulation der <i>hBD-4</i> -Expression durch Phorbol-12-myristat-13-acetat	73
3.4.5	Antimikrobielle Aktivität von <i>hBD-4</i>	74
3.4.5.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration.....	74
3.4.5.2	Interaktion von <i>hBD-4</i> mit anderen antibiotischen Substanzen.....	75
3.4.5.3	Einfluss der Mediensalzkonzentration auf die antimikrobielle Aktivität	75
3.4.6	Hämolytische Aktivität von <i>hBD-4</i>	76
3.4.7	Chemotaktische Aktivität von <i>hBD-4</i>	76
3.4.8	Isolation von <i>hBD-4</i> aus SAEC 6043-Zellen	77
4.	DISKUSSION	79
4.1	IDENTIFIKATION NEUER HUMANER ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE.....	79
4.2	LEAP-1	79
4.3	LEAP-2.....	82
4.4	HUMANES β -DEFENSIN 4.....	86
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	93
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	94
7.	ANHANG	105

1. Einleitung

Infektionskrankheiten waren bis in das 20. Jahrhundert die häufigste Todesursache, und aufgrund mangelnder Behandlungsmethoden konnten selbst kleinere Verletzungen lebensbedrohliche Folgen haben. Erst der von Louis Pasteur und Robert Koch vor über 125 Jahren erbrachte Nachweis, dass Bakterien definierte Krankheitsbilder verursachen, ermöglichte die zuverlässige Diagnose von Infektionskrankheiten sowie die Suche nach deren Ursache. Nachdem jahrhundertlang toxische Stoffe wie arsen- und quecksilberhaltige Zubereitungen zur Bekämpfung von Infektionen angewandt wurden, konnte nun mit isolierten Bakterienstämmen systematisch nach Substanzen gesucht werden, die selektiv gegen die Krankheitserreger wirksam waren. Ein erster Erfolg dieser neuen Methode war die Entdeckung des Salvarsans (Arsphenamin) durch Paul Ehrlich im Jahre 1910. Allerdings hatte die arsenhaltige Verbindung zur Behandlung der Syphilis noch eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen, und es dauerte bis 1935, ehe Gerhard Domagk das besser verträgliche Prontosil (Sulfamidochrysoidin) entdeckte, welches einen hervorragenden Effekt gegen lebensbedrohliche Streptokokkeninfektionen zeigte (SAUERTEIG, 1996). Das bereits 1929 von Alexander Fleming entdeckte Penicillin konnte erst 1940 durch Howard W. Florey und Ernst B. Chain soweit isoliert und in *in vivo*-Studien erprobt werden, dass es zur Therapie von Infektionskrankheiten genutzt werden konnte (BICKEL, 1996). Seit dem Beginn des Antibiotika-Zeitalters vor gut 90 Jahren wurden viele verschiedene Stoffklassen wie u.a. β -Lactam-Antibiotika, Makrolide (ALVAREZ-ELCORO und ENZLER, 1999) oder Chinolone (WALKER, 1999) zur Bekämpfung bakterieller Infektionen entwickelt.

Als neue Substanzklasse finden seit einigen Jahren antimikrobiell aktive Peptiden zunehmendes Interesse. Nachdem anfänglich vor allem Pflanzen und Insekten als Organismen ohne adaptives Immunsystem zur Isolierung von antimikrobiellen Peptiden herangezogen wurden, konnten Mitte der achtziger Jahre entsprechende Substanzen auch aus Amphibien und Vertebraten gewonnen werden (GARCÍA-OLMEDO *et al.*, 1998; LEHRER und GANZ, 1999; SIMMACO *et al.*, 1999; OTVOS, 2000). Eine umfassende Untersuchung antimikrobieller Peptide in den neunziger Jahren führte zu der These, dass diese Substanzen nicht nur ein bedeutender Teil der angeborenen Immunität sind, sondern dass sie in direktem Kontakt mit dem adaptiven Immunsystem stehen (ANDREU und RIVAS, 1998). Zudem deuten die Ergebnisse zahlreicher *in vivo*-Versuche daraufhin, dass antimikrobielle Peptide auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung bzw. Bekämpfung bestimmter Krankheitszustände spielen (GOLDMAN *et al.*, 1997; HANCOCK und DIAMOND, 2000). Schließlich trägt die zunehmende Resistenzentwicklung pathogener Bakterien gegenüber klinisch eingesetzten Antibiotika und die dadurch forcierte Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen dazu bei, dass die Erforschung antimikrobieller Peptide immer mehr an Bedeutung gewinnt.

Obwohl sich die Anzahl isolierter antimikrobieller Peptide in den letzten 10 Jahren verzehnfacht hat (ANDREU und RIVAS, 1998), sind bisher nur wenige humane Peptide bekannt. Gegenstand dieser Dissertation ist deshalb die Charakterisierung neuer humaner Peptide mit antimikrobieller Wirkung.

1.1 Aufbau des Immunsystems

Zur Abwehr von permanent mit dem Organismus in Kontakt tretenden Krankheitserregern und Fremdstoffen aller Art steht dem Menschen eine Vielzahl von Schutzmechanismen zur Verfügung. Diese lassen sich in unspezifische, angeborene Abwehrmaßnahmen und in erlernte oder adaptive Mechanismen einteilen. Die Besonderheit des adaptiven Immunsystems liegt dabei in der Fähigkeit, nach dem Erkennen einer körperfremden Struktur diese mit einer spezifisch angepassten Reaktion zu neutralisieren und darüber hinaus Informationen über diese Struktur in Gedächtniszellen abzuspeichern. Das adaptive Abwehrsystem besteht aus T- und B-Lymphozyten, die jeweils durch den Kontakt mit den als Antigenen bezeichneten Fremdstoffen aktiviert werden. Aktivierte T-Lymphozyten dienen vor allem der Zerstörung von antikörpermarkierten Antigenen und der Stimulation von B-Lymphozyten, die daraufhin zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren.

Der Nachteil dieses hochspezifischen Abwehrsystems ist die lange Zeitspanne von mindestens 3-7 Tagen, die zwischen Kontakt mit dem Antigen und der Verfügbarkeit von Antikörpern verstreicht (HANCOCK und DIAMOND, 2000). Zur Überbrückung dieser Latenzzeit und als erste Barriere des menschlichen Körpers gegen potentiell schädigende Stoffe dienen die Mechanismen der unspezifischen Immunität. So erschwert der kompakte Aufbau der Epidermis, die ständige Schleimsekretion von Mukosazellen und das Flimmerepithel des unteren Respirationstrakts das Anhaften von Keimen. Nach erfolgter Besiedlung von Körperoberflächen wirkt ein saures Milieu auf der Haut, der Vaginalschleimhaut oder im Magen einer Vermehrung pathogener Keime genauso entgegen wie die lokale Normalflora. In das Körperinnere eingedrungene Antigene können mit verschiedenen humoralen oder zellulären Faktoren inaktiviert werden. Die humoralen Faktoren umfassen die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Freisetzung von Interferonen, Akute-Phase-Proteinen und Lysozym, während die Mobilisierung von natürlichen Killerzellen und die Phagozytose zelluläre Faktoren darstellen.

Das Komplementsystem besteht aus etwa 20 Plasmaproteinen, die in einer Kaskade verschiedener spezifischer Proteasen zusammenwirken und an dessen Endpunkt die Lyse einer Bakterienzelle durch Porenbildung steht. Dabei dient die Bindung der Komplementkomponente C3b an Membranpolysaccharide pathogener Mikroorganismen als Initiator des so genannten alternativen Weges der Komplementaktivierung. Nach Ablauf mehrerer Zwischenschritte bildet sich schließlich ein Komplex aus fünf Komplementkomponenten (C5b, C6, C7, C8 und C9), der die Zellmembran des zuvor mit C3b markierten Keims perforiert (KLINKE und SILBERNAGL,

1994). Außerdem bewirkt die Markierung von Bakterienzellen mit C3b eine effizientere Phagozytose dieser Zellen durch Makrophagen, die chemotaktische Anlockung von Phagozyten sowie die Initiierung einer Entzündungsreaktion. Ein weiterer Baustein der humoralen Abwehr ist die Bildung von Interferon α und β in virusinfizierten Zellen. In einem parakrinen Mechanismus werden diese Interferone v.a. von Leukozyten (Interferon α) und Fibroblasten (Interferon β) sezerniert, bevor sie an den speziesspezifischen Interferonrezeptor benachbarter Zellen binden. Daraufhin werden in der Zielzelle über einen JAK-STAT-Signaltransduktionsweg verschiedene Gene dereprimiert, welche für Proteine kodieren, die die Virusreplikation effektiv unterdrücken (JANEWAY *et al.*, 1999). Darüber hinaus aktivieren Interferon α und β natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese großen Lymphozyten enthalten eine Vielzahl hydrolasehaltiger Granula, mit deren Hilfe sie virusinfizierte oder bösartig transformierte Zellen zerstören können. Allerdings ist bisher nicht genau bekannt, wie NK-Zellen infizierte Zellen erkennen können (JANEWAY *et al.*, 1999). Auch die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen als dritter humoraler Mechanismus des unspezifischen Immunsystems wird durch Zytokine vermittelt. Von Makrophagen freigesetztes Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und TNF- α induzieren in Hepatozyten die Synthese bestimmter Proteine, deren erhöhte Plasmakonzentration in einer akuten Entzündung messbar ist. Zwei dieser Proteine, das C-reaktive Protein (CRP) und das Mannan-bindende Lektin (MBL), wirken dabei als starke Opsonine, d.h. durch ihre spezifische Bindung an bakterielle Phospholipide (CRP) bzw. Mannose-Reste (MBL) markieren diese Proteine die eingedrungenen Erreger für eine effektivere Phagozytose durch Leukozyten. Zudem aktivieren CRP und MBL das Komplementsystem, was ebenfalls zur Eliminierung der Bakterien führt. (JANEWAY *et al.*, 1999).

Den wichtigsten Bestandteil des unspezifischen Abwehrsystems stellt die Antikörper-unabhängige Phagozytose dar, die mit allen bisher genannten Mechanismen in Verbindung steht. Phagozytose ist die Aufnahme von Fremdkörpern und Mikroorganismen ins Zellinnere von Phagozyten mit anschließendem intrazellulären Verdau der aufgenommenen Partikel. Zur Phagozytose befähigte Blutzellen sind die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Monozyten, wobei Letztere nach zweitägiger Zirkulation in den Blutgefäßen in verschiedene Gewebe einwandern und dort zu sessilen Makrophagen (z.B. Histozyten, Kupffer-Zellen oder Alveolarmakrophagen) differenzieren. Nach dem Eindringen ins Körperinnere treffen Bakterien direkt auf subepitheliale Makrophagen, welche daraufhin durch Abgabe von Chemokinen oder Komplementkomponenten (C3a, C5a) weitere Phagozyten chemotaktisch anlocken. Phagozyten erkennen Mikroorganismen über verschiedene Rezeptoren, die gegen bakterienspezifische Moleküle wie Lipopolysaccharide (CD14, CR4-Rezeptor), Mannose oder Komplementkomponenten (s.o.) gerichtet sind (JANEWAY *et al.*, 1999). Die Bakterien werden anschließend von den Phagozyten umflossen und durch Lysosomenkontakt inaktiviert. Neben hochreaktiven Sauerstoffradikalen, sauren Hydrolasen und Proteasen enthalten Lysosomen auch antimikrobielle Peptide wie α -Defensine und Cathelizidine (RISSO, 2000) sowie Lysozym, das beim Zerfall von Phagozyten in nahezu alle Körperflüssigkeiten abgegeben wird.

Die weite Verbreitung antimikrobieller Peptide in Epithelzellen, ihr breites Aktivitätsspektrum, ihre Induzierbarkeit durch Zytokine und bakterielle Faktoren (1.2) sowie die Ergebnisse einiger *in vivo*-Versuche (HANCOCK und SCOTT, 2000) deuten daraufhin, dass diese Peptide nicht nur Kofaktoren bei der Phagozytose sind, sondern vielmehr einen wichtigen, eigenständigen Bestandteil der angeborenen Immunität darstellen.

1.2 Humane antimikrobielle Peptide

Die Nutzung von antimikrobiellen Peptiden zur Bekämpfung von Mikroorganismen ist ein in der Natur weit verbreitetes Prinzip, und bis dato konnten über 600 verschiedene Vertreter dieser Substanzklasse in Pflanzen, Insekten, Fischen, Amphibien und Säugetieren identifiziert werden (TOSSI, 1999). In Säugetieren gehören die meisten antimikrobiellen Peptide der Familie der Defensine und der Cathelizidine an. Defensine bestehen aus 29-45 Aminosäuren und enthalten 6 konservierte Cysteinreste und je nach relativer Position und Verknüpfung der Cysteine unterscheidet man α - und β -Defensine (Abbildung 1). Darüber hinaus wurde vor kurzem in Rhesusaffen eine dritte Defensinfamilie entdeckt, deren bisher einziger Vertreter aus einer posttranslationalen Verknüpfung zweier α -Defensin-ähnlicher Nonapeptide entstanden ist (TANG *et al.*, 1999). α -Defensine werden spezifisch in neutrophilen Granulozyten verschiedener Spezies und in Paneth-Körnerzellen von Mensch, Maus und Ratte gefunden (KAISER und DIAMOND, 2000). Die humanen leukozytären α -Defensine HNP1-4 machen bis zu 50 % des Proteingehalts der azurophilen Granula aus und wirken, im Gegensatz zu den enterischen α -Defensinen HD-5 und HD-6, intrazellulär. Letztere können aktiv von den Darmzellen sezerniert werden (PORTER *et al.*, 1998). Während HNP1-4 gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Hefen und Mycobakterien wirksam sind, zeigen HD-5 und HD-6 eine wesentlich geringere Aktivität gegen

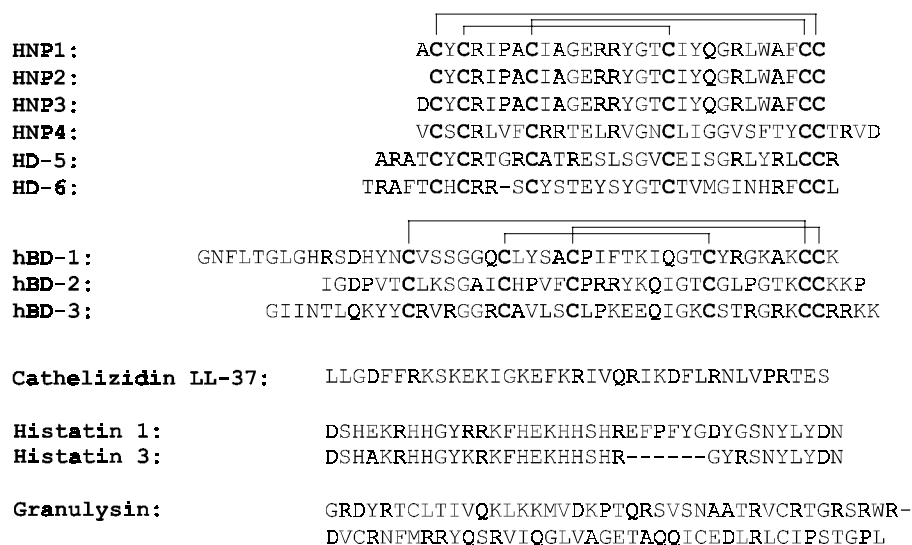


Abbildung 1: Aminosäuresequenzen genkodierter humaner antimikrobieller Peptide. Konservierte Cysteinreste in α - und β -Defensinen sind fett gedruckt.

humanpathogene Keime (PORTER *et al.*, 1997; SCHRÖDER, 1999). Alle humanen α -Defensine werden konstitutiv exprimiert und nur HNP1 und HNP2 lösen eine Chemotaxis verschiedener T-Zellpopulationen bzw. unreifer dendritischer Zellen aus.

Anders als die α -Defensine werden die drei bisher bekannten humanen β -Defensine hBD-1 (BENSCH *et al.*, 1995), hBD-2 (HARDER *et al.*, 1997) und hBD-3 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a; HARDER *et al.*, 2001; JIA *et al.*, 2001) hauptsächlich in epithelialen Geweben der Haut, der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts gebildet. Das nur schwach antimikrobiell aktive, primär in Niere und Uterus gebildete hBD-1 (VALORE *et al.*, 1998) unterscheidet sich von den anderen humanen β -Defensinen vor allem durch seine konstitutive Expression. So ist hBD-1 auch in der bronchoalveolären Lavage (BAL) gesunder Patienten zu detektieren, während hBD-2 nur aus der BAL von Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen zu isolieren ist (SINGH *et al.*, 1998). Die Transkriptionsrate von hBD-2 und hBD-3 lässt sich darüber hinaus auch durch *in vitro*-Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α oder Interferon γ sowie durch Kontakt mit pathogenen Keimen wie *Pseudomonas aeruginosa* induzieren (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a; HARDER *et al.*, 2001). Außerdem zeigen beide Peptide ein breites Aktivitätsspektrum gegen Bakterien und Hefen (HARDER *et al.*, 1997; 2001; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a). Die chemotaktische Wirkung von hBD-2 (YANG *et al.*, 1999) und hBD-3 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a) auf T-Zellen und Monozyten deutet darauf hin, dass diesen Peptiden neben der direkten Inaktivierung pathogener Erreger noch weitere Funktionen im menschlichen Immunsystem zukommen könnten (1.4).

Im Vergleich mit den strukturhomologen β -Defensinen aus Maus und Rind fällt auf, dass trotz einer ähnlichen chromosomalen Organisation in diesen Spezies bisher weit weniger humane als bovine oder murine β -Defensine bekannt sind (DIAMOND und BEVINS, 1998). Ähnliches gilt für die aus 20 verschiedenen Peptiden bestehende Gruppe der Cathelizidine, in der bisher nur ein humaner Vertreter identifiziert werden konnte (RISSO, 2000). Inaktive Cathelizidin-Proformen bestehen aus einer aminoterminalen Signalpeptidsequenz, einer zentralen, hochkonservierten Cathelin-ähnlichen Domäne und aus einem variablen carboxyterminalen Bereich. Die antimikrobielle Aktivität des Proteins liegt in der carboxyterminalen Region, die durch Elastase (Rind, Schwein) bzw. im Menschen durch Proteinase 3 abgespalten wird (SØRENSEN *et al.*, 2001). Das inaktive humane Cathelizidin hCAP-18 wird hauptsächlich in sekundären Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert und durch Exozytose an den Entzündungsort abgegeben, wobei zugleich die enzymatische Freisetzung des antimikrobiell aktiven LL-37 erfolgt. Darüber hinaus konnte LL-37 auf Lungenepithelzellen und in Keratinozyten von Patienten mit entzündlichen Hauterkrankungen lokalisiert werden (FROHM *et al.*, 1997; BALS *et al.*, 1998b). Neben einer breiten antibakteriellen Aktivität zeichnet sich LL-37 durch seinen chemotaktischen Effekt auf Phagozyten und T-Zellen (YANG *et al.*, 2001) sowie durch die Fähigkeit zur Bindung von fieberauslösendem bakteriellen Lipopolysaccharid aus (TURNER *et al.*, 1998).

Außer den Defensinen und Cathelizidinen stehen dem menschlichen Organismus mit den Histatinen und mit Granulysin zwei weitere, humanspezifische antimikrobielle Peptide zur Verfügung. Histatine sind histidinreiche, lineare Peptide aus dem menschlichen Speichel mit einer Aktivität gegen *Candida albicans*. Von den 12 bisher isolierten Histatinen werden nur Histatin 1 und 3 ribosomal translatiert, während alle anderen Peptide Abbauprodukte dieser Leitstrukturen darstellen (TROXLER *et al.*, 1990). Histatin 5 zeigt den stärksten Effekt gegen *Candida albicans*, wobei der Mechanismus der Wachstumshemmung nicht genau bekannt ist. Im Gegensatz zu den übrigen humanen antimikrobiellen Peptiden spielt aber eine Zerstörung des Keims durch Interaktion mit der Zellmembran keine Rolle, denn der Wirkort der Histatine sind die Mitochondrien der Hefen (HELMERHORST *et al.*, 2001).

Das 9 kDa-Peptid Granulysin entsteht durch posttranslationale Prozessierung eines 15 kDa-Vorläuferproteins und wird selektiv in den Granula zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺) sowie natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) gebildet und gespeichert. Granulysin wirkt über eine Erhöhung der Permeabilität mikrobieller Zellmembranen und hat ein breites Aktivitätsspektrum gegen Bakterien, Pilze und Parasiten (ERNST *et al.*, 2000). Die Besonderheit des Granulysins liegt neben der Verwandtschaft zu einem antimikrobiellen Peptid aus *Entamoeba histolytica* darin, dass es die einzige bisher bekannte, direkt antibakterielle Struktur aus T-Zellen darstellt. Darüber hinaus ist es im Zusammenspiel mit dem lymphozytär kolokalisierten Perforin in der Lage, intrazelluläre Pathogene wie Tuberkelbakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) effektiv abzutöten (STENGER *et al.*, 1998).

Zusätzlich zu den genkodierten, kationischen Peptiden stehen dem Menschen auch zahlreiche durch partielle Hydrolyse entstandene, antimikrobiell aktive Fragmente größerer Proteine wie Casein, Laktoferrin oder BNP (VORLAND, 1999; KRAUSE *et al.*, 2001; LIEPKE *et al.*, 2001) und höhermolekulare Proteine wie BPI, Lysozym oder sekretierte Phospholipase A2 zur Unterdrückung antimikrobieller Besiedlung zur Verfügung (LEVY, 2000).

1.3 Struktur und Wirkungsweise kationischer antimikrobieller Peptide

Nahezu alle der aus 12-50 Aminosäureresten aufgebauten antibakteriellen Peptide aus Vertebraten tragen aufgrund des höheren Anteils der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin gegenüber den sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure eine positive Nettoladung von +2 bis +7 (HANCOCK und DIAMOND, 2000). Durch den gleichzeitig vorhandenen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren entsteht eine amphipathische Struktur, die eine Interaktion antimikrobieller Peptide mit der Bakterienoberfläche ermöglicht. Alle Vertreter dieser Substanzklasse werden als Präpropeptid ribosomal synthetisiert (KAISER und DIAMOND, 2000), wobei die Signalpeptidstruktur die Voraussetzung für die lysosomale Speicherung bzw. die Sekretion der Peptide in das umliegende Gewebe und die Blutbahn ist (STRYER, 1994). Die in vielen Fällen anionische Prosequenz wird als Neutralisator für das kationische, oftmals

zytotoxische, reife Peptid diskutiert (MICHAELSON *et al.*, 1992; KAISER und DIAMOND, 2000); die für die Freisetzung der bioaktiven Peptide verantwortlichen Enzyme sind kaum bekannt (WILSON *et al.*, 1999; SØRENSEN *et al.*, 2001).

Trotz ihrer geringen Größe und ihrer ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften lassen sich die antimikrobiellen Peptide basierend auf ihren Sekundärstrukturen in vier Klassen einteilen. In Vertebraten am weitesten verbreitet sind Peptide mit einer β -Faltblattstruktur, die durch zwei oder mehr Disulfidbrücken stabilisiert wird. Zu dieser Klasse zählen u.a. die Defensine und Protegrine. α -helikale Strukturen kommen überwiegend in linearen, cysteinfreien antimikrobiellen Peptiden aus Insekten und Amphibien vor, obwohl die in 1.2 näher beschriebenen, humanspezifischen Histatine und das Cathelizidin LL-37 auch α -helikale Peptide darstellen. Untersuchungen an Bakterienmembranen und künstlichen Phospholipidmizellen zeigten, dass sich eine stabile Helizität der Peptide erst durch den Membrankontakt ausbildet (HWANG und VOGEL, 1998). Eine Sonderstellung nimmt humanes Granulysin ein, das trotz seiner Disulfidbrücken aus vier α -helikalen Bereichen aufgebaut zu sein scheint (ERNST *et al.*, 2000). Die dritte Strukturklasse bilden prolinreiche Peptide wie bovines Bactenezin 5, Indolizidin oder porcines PR-39, die durch frei drehbare, gestreckte Sekundärstrukturen gekennzeichnet sind. Carboxyterminale Schleifen aus wenigen Aminosäureresten, die durch eine einzelne Disulfidbrücke stabilisiert werden, kommen fast ausschließlich in Amphibien vor und stellen die vierte Strukturklasse antimikrobieller Peptide dar.

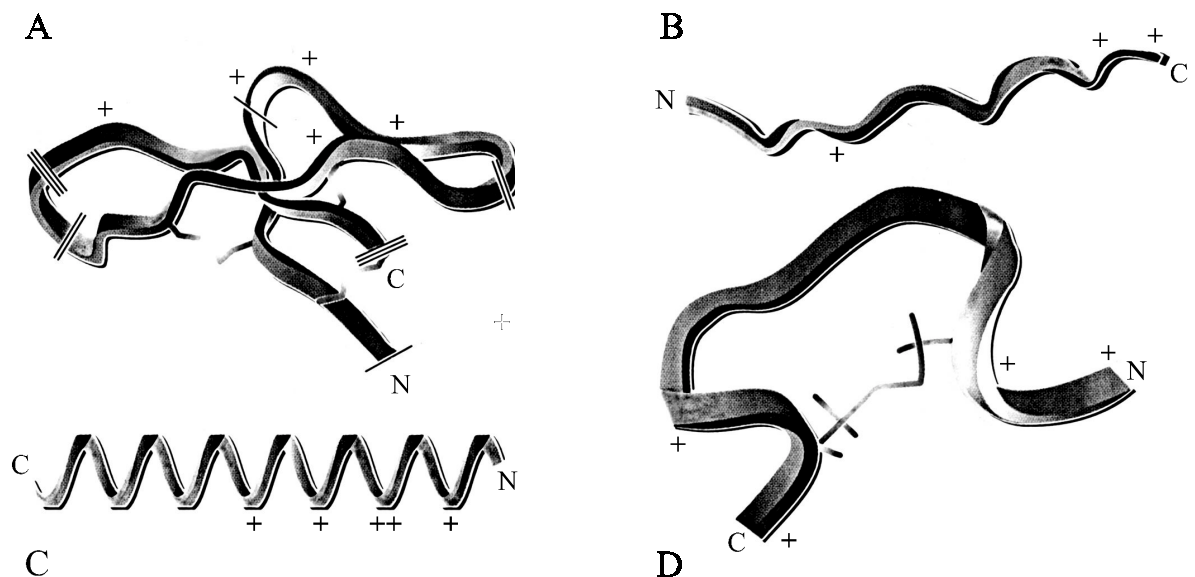


Abbildung 2: Beispiele für die vier Klassen von Sekundärstrukturen in antimikrobiellen Peptiden. (A) β -Faltblattstruktur von HNP1, (B) gestreckte Helix des Indolizidins, (C) α -helikales Cecropin-Melittin-Hybrid und (D) Schleifenstruktur des Dodecapeptids Bactenezin. Insbesondere die Beispiele (A) und (C) zeigen, wie sich die basischen Aminosäuren („+“) durch die räumliche Anordnung auf einer Seite des Moleküls konzentrieren und so eine amphipathische Struktur ausbilden. [Nach HANCOCK, 1997]

Das breite Aktivitätsspektrum antimikrobieller Peptide gegen Bakterien, Pilze und umhüllte Viren legte den Schluss nahe, dass es sich bei dem Wirkmechanismus um ein allgemeines

Prinzip handeln muss, und viele modellhafte Untersuchungen konnten eine Interaktion von kationischen antimikrobiellen Peptiden mit der bakteriellen Zytoplasmamembran zeigen (VAN 'T HOF *et al.*, 2001). Die Aufhebung der Integrität der Membran erfolgt in zwei Stufen. Zuerst müssen sich die antimikrobiell aktiven Peptide an die äußere Hülle des Pathogens anlagern, was durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den kationischen Peptiden und den durch die Anwesenheit von Lipopolysaccharid (gramnegative Bakterien), Lipoteichonsäuren (grampositive Bakterien) oder Proteoglykanen (Hefen) negativ geladenen Keimoberflächen erleichtert wird (VAN 'T HOF *et al.*, 2001). Insbesondere für die Überwindung der äußeren Bakterienmembran gramnegativer Bakterien besteht ein allgemein anerkanntes Modell (Abbildung 3). Hierbei verdrängen kationische Peptide, die eine hohe Affinität zu Lipopolysaccharid (LPS) haben, zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} von ihren Bindestellen, wobei zweiwertige Kationen essentiell für die Stabilität der Zelloberfläche gramnegativer Bakterien sind. Der Einbau der sperrigen Peptide zerstört die Integrität der äußeren Membran, so dass weitere Peptidmoleküle ungehindert zur Zytoplasmamembran vordringen können (HANCOCK und SCOTT, 2000). Die Konkurrenz um die Bindungsstellen von Kationen in der äußeren Bakterienhülle wird als Ursache für die Abhängigkeit der antimikrobiellen Potenz vieler Peptide von der Mediensalzkonzentration angesehen (VAN 'T HOF *et al.*, 2001), obwohl die Salzunempfindlichkeit einiger Peptide mit diesem Modell nicht erklärbar ist (HARDER *et al.*, 2001; STEINSTRÄESSER *et al.*, 2001).

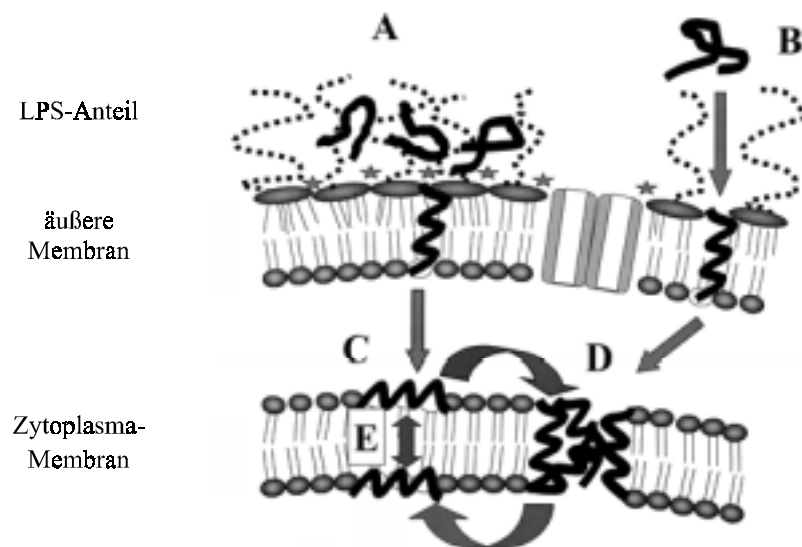


Abbildung 3: Modell der Interaktion kationischer antimikrobieller Peptide mit der Bakterienhülle gramnegativer Bakterien. Die Passage der anfangs ungefalteten Peptide durch die äußere Membran erfolgt entweder über eine stellenweise Neutralisation der Oberflächenladung, was zur Auflösung der Membranintegrität führt (A), oder durch die direkte Bindung der Peptide an Kationenbindungsstellen, die zwischen den LPS-Ketten liegen (B). Der hohe Gehalt bakterieller Zytoplasmamembranen an negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylglycerol und Cardiolipin ermöglicht dann die Integration der Peptide in die Membran (C). Dort können mehrere Moleküle zu einer Transmembranpore aggregieren (D), oder einzelne Moleküle passieren in einem „flip-flop“-Mechanismus, der vom hohen negativen Membranpotential im Inneren der Bakterienzelle angetrieben wird, die Zellmembran (E). [Nach HANCOCK und CHAPPLE, 1999]

Für die sich anschließende Wechselwirkung der antimikrobiellen Peptide mit der Phospholipiddoppelschicht existieren mehrere Modelle, die bisher nicht experimentell bewiesen werden konnten (VAN 'T HOF *et al.*, 2001). Im *barrel-stave*-Modell integrieren sich amphiphile, α -helikale Moleküle so in die Plasmamembran, dass die hydrophoben Teile der Peptide mit den Fettsäureresten der Phospholipiddoppelschicht in Wechselwirkung treten, während die positiven Ladungen ins Innere der so entstehenden Pore weisen. Allerdings deuten theoretische Überlegungen und einige experimentelle Befunde darauf hin, dass dieses Modell nur für einzelne Peptide Gültigkeit haben kann (WU *et al.*, 1999; VAN 'T HOF *et al.*, 2001). Beim *carpet*-Modell legen sich die amphiphilen Moleküle wie ein Teppich auf die Plasmamembran, um dann nach Überschreiten einer Grenzkonzentration die Integrität der Membran so weit gestört zu haben, dass die Barrierefunktion mit einem Schlag aufgehoben und die Bakterienzelle lysiert wird (HANCOCK und CHAPPLE, 1999). Beide Modelle hätten den Zusammenbruch des bakteriellen Membranpotentials zur Folge, da die Perforation der Membran eine erleichterte Diffusion von

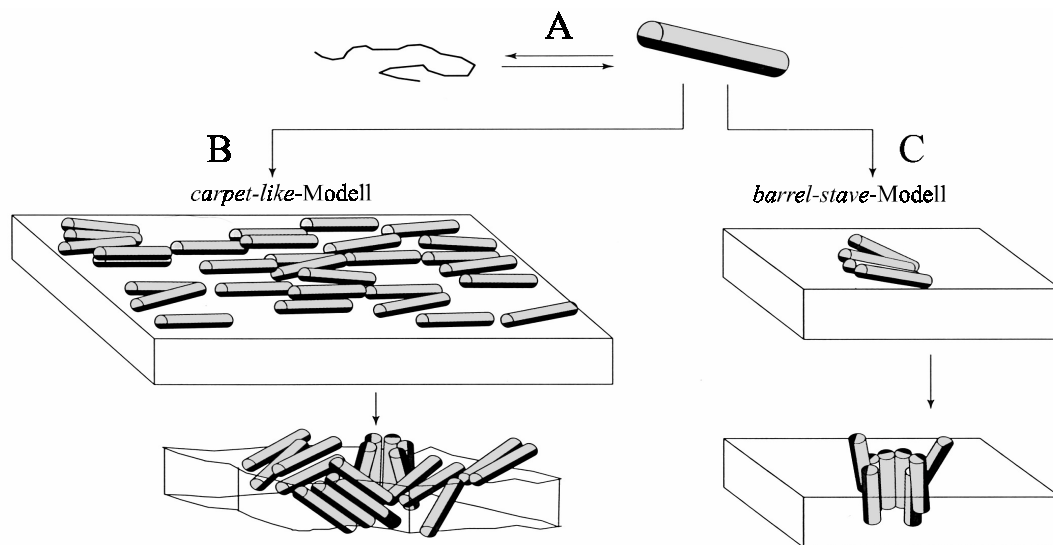


Abbildung 4: Schematische Darstellung des *carpet-like* und des *barrel-stave*-Modells zur Interaktion antimikrobieller Peptide mit der Bakterienmembran. (A) Die in Lösung unstrukturiert vorliegenden antimikrobiellen Peptide bilden bei Kontakt mit einer Bakterienmembran eine geordnete, amphiphile Struktur aus. (B) Im *carpet-like*-Modell gehen die Moleküle mit ihrer hydrophoben Seite (schwarz) Wechselwirkungen mit der bakteriellen Membran ein und bedecken diese wie ein Teppich. Nach Überschreiten einer Grenzkonzentration dringen die Monomere ungeordnet ins Membraninnere ein und zerstören so die Membranintegrität. (C) Im *barrel-stave*-Modell hingegen lagern sich die Monomere ab einer bestimmten Konzentration wie die Dauben eines Fasses so aneinander, dass sie eine Transmembranpore bilden. Dabei liegen die hydrophilen Teile der Moleküle (grau) innen, und die hydrophoben Teile interagieren direkt mit der Membran. [Nach SHAI, 1995]

Ionen ermöglicht. Die Untersuchung von Membranpotentialen nach Zugabe von antimikrobiellen Peptiden in bakteriziden Konzentrationen zeigte jedoch, dass in vielen Fällen keine Depolarisation zu beobachten ist (WU *et al.*, 1999). Deshalb geht man in einem dritten Modell davon aus, dass antimikrobielle Peptide kurzzeitig Aggregate unterschiedlicher Größe auf der Bakterienoberfläche bilden, die die Passage weiterer Moleküle in das Zellinnere erlauben. Dort könnte dann die Bindung an essentielle Proteine und Nukleinsäuren den Zelltod

auslösen (HANCOCK und CHAPPLE, 1999). Beispielsweise sind für PR-39 eine Inhibition der DNA-Synthese und für Bactenezine eine drastische Reduktion der RNA- und Proteinbiosynthese nachweisbar (ANDREU und RIVAS, 1998; BOMAN, 2000; RISSO, 2000).

Die Bedeutung der Kationizität der antimikrobiellen Peptide und die Beteiligung einer negativ geladenen Zelloberfläche zeigt sich trotz des nicht vollständig geklärten Mechanismus in weiteren Beobachtungen. So kann in elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Veränderung der Zellwand und der Zytoplasmamembran gezeigt werden (HARDER *et al.*, 2001). Zudem verbessert die Erhöhung der Nettoladung einiger Peptide wie α -Defensine oder Histatine deren antimikrobielle Aktivität im Vergleich zu den unveränderten Ausgangssubstanzen (BOMAN, 1995; ANDREU und RIVAS, 1998). Die Bedeutung der Ladungsverteilung auf Oberflächen pathogener Keime wird besonders deutlich durch die Möglichkeit von Bakterien, über eine Verringerung der negativen Ladungen resistent gegenüber kationischen Peptiden zu sein. Beispiele hierfür sind die Veresterung von Phosphatidylglycerol mit L-Lysin im grampositiven *Staphylococcus aureus* oder die Maskierung negativ geladener Phosphatreste im Lipid A-Anteil gramnegativer Salmonellen durch Aminoarabinose (GUO *et al.*, 1998; PESCHEL *et al.*, 2001). Die geringe Dichte negativer Ladungen auf eukaryotischen Zellen durch Einbau des zwitterionischen, neutralen Phosphatidylcholins sowie von Cholesterol wird neben dem geringeren Transmembranpotential dafür verantwortlich gemacht, dass antimikrobielle Peptide kaum Zytotoxizität gegenüber Säugerzellen aufweisen (ANDREU und RIVAS, 1998; RISSO, 2000).

1.4 Physiologische Bedeutung der antimikrobiellen Peptide

Nach der Entdeckung der ersten antimikrobiellen Peptide in den unterschiedlichsten Organismen wurde angenommen, dass die alleinige Funktion dieser phylogenetisch sehr alten Peptide das unspezifische Abtöten eingedrungener Mikroorganismen sei (GUDMUNDSSON und AGERBERTH, 1999; RISSO, 2000). Die Vorteile dieses Systems liegen auf der Hand, denn die Synthese kleiner, leicht zu speichernder Peptide ist energetisch günstiger als die ständige Aufrechterhaltung einer entzündlichen Reaktion gegen ubiquitär vorkommende Krankheitserreger (VAN 'T HOF *et al.*, 2001). Offensichtlich scheint das breite Wirkungsspektrum der antimikrobiellen Peptide gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Protozoen, umhüllte Viruspartikel und entartete Krebszellen in Organismen mit wenig entwickeltem Immunsystem zur Krankheitsabwehr auszureichen (OTVOS, 2000). Allerdings deuten die Resultate vieler neuerer Untersuchungen darauf hin, dass diese Peptide in höheren Wirbeltieren nicht nur zur Überbrückung der Zeit bis zum Anlaufen der spezifischen Immunabwehr dienen, sondern dass sie ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr darstellen (GUDMUNDSSON und AGERBERTH, 1999; HANCOCK und SCOTT, 2000).

Die Induzierbarkeit der Expression antimikrobieller Peptide durch proinflammatorische Zytokine und durch Kontakt mit lebenden oder inaktivierten Bakterienzellen zeigt, dass es sich bei den

antimikrobiellen Peptiden nicht um ein immer gleich ablaufendes, starres System der unspezifischen Immunabwehr handelt. Bei der Induktion von hBD-2 durch verschiedene Bakterien (HARDER *et al.*, 2000; O'NEIL *et al.*, 2000; OGUSHI *et al.*, 2001) wird davon ausgegangen, dass der humane CD14-Rezeptor Oberflächenstrukturen eindringender Bakterien erkennt (ADEREM und ULEVITCH, 2000; BECKER *et al.*, 2000). Bakteriell Lipopolysaccharid (LPS) ist der Prototyp einer solchen Struktur und aktiviert das angeborene Immunsystem schon in einer Konzentration von unter 1 nM. Dabei bindet LPS an das zirkulierende, LPS-bindende Protein (LBP), bevor dieser Komplex anschließend mit hoher Affinität an CD14 bindet. Da CD14 keine zytoplasmatische Domäne besitzt, erfolgt die Signaltransduktion ins Zellinnere von Epithelzellen oder Phagozyten über den Korezeptor TLR4, dessen Aktivierung eine Signalkaskade in Gang setzt, welche der des IL-1-Rezeptors ähnelt und an deren Ende die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B steht (ADEREM und ULEVITCH, 2000). Nach Translokation in den Zellkern bindet NF- κ B u.a. an den Promotor des hBD-2-Gens und stimuliert so dessen Expression. Diese Signaltransduktionskaskade zur Stimulation antimikrobieller Peptide ist hochkonserviert und läuft in ähnlicher Form auch in *Drosophila* ab.

Eine andere LPS-assoziierte Funktion antimikrobieller Peptide ist deren Fähigkeit, LPS direkt an sich zu binden und somit einer bakteriellen Sepsis *in vivo* entgegenzuwirken (KIRIKAE *et al.*, 1998; BALS *et al.*, 1999c). Durch die Bindung von LPS wird die oben beschriebene Signaltransduktionskaskade in Makrophagen verhindert, so dass diese nachweislich keine Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF- α bilden können, welche für die Symptome einer Sepsis verantwortlich sind. Von LPS induzierte und zugleich LPS-bindende Peptide wie hBD-2 können über diesen Regelkreis also die Zytokinantwort des Körpers auf eine bakterielle Infektion beeinflussen (HANCOCK und SCOTT, 2000). Eine andere positive Rückkopplung zwischen Zytokin und kationischem Peptid ist die Stimulation der Expression von IL-8 durch α -Defensine, was die vermehrte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und somit erhöhte Konzentrationen von α -Defensinen am Infektionsort zur Folge hat (GUDMUNDSSON und AGERBERTH, 1999).

Generell lässt sich die Bedeutung der antimikrobiellen Peptide gut anhand der chronologischen Abläufe am Infektionsort darlegen. Nach der Lyse der eingedrungenen Bakterienzellen durch epitheliale und leukozytäre antibakterielle Peptide werden IL-8 und bakterielle Entzündungsmediatoren wie LPS freigesetzt, was die Synthese weiterer Peptide induziert. α -Defensine (HNP1/4) aus Granulozyten unterstützen die Degranulation von Mastzellen und die histaminvermittelte lokale Dilatation von Kapillargefäßen. Deren Permeabilitätserhöhung vereinfacht die Extravasation weiterer Phagozyten, T-Lymphozyten und unreifer dendritischer Zellen, welche durch parallel hergestellte β -Defensine und LL-37 chemotaktisch angelockt werden. Unreife dendritische Zellen sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APZ).

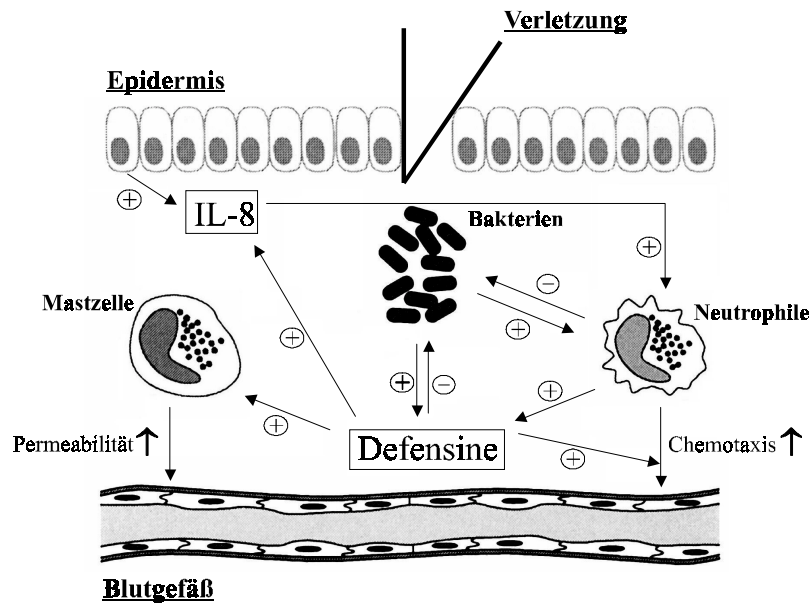


Abbildung 5: Übersicht über die Funktionen antimikrobieller Defensine bei einer akuten Entzündung. Die hier skizzierten Vorgänge sind im Text genauer beschrieben. [Nach HANCOCK und DIAMOND, 2000]

Die chemotaktische Aktivität der Defensine gegenüber den APZ sowie gegen die von den APZ stimulierten T-Lymphozyten stellt die offensichtlichste Verbindung des angeborenen Immunsystems zum adaptiven Immunsystem dar (YANG *et al.*, 2001). α -Defensine hemmen weiterhin den Gewebsplasminogen-Aktivator (tPA), so dass der Entzündungsherd durch Hemmung der Fibrinolyse eingekapselt und ein tieferes Eindringen der Bakterien verhindert werden kann. Darüber hinaus wirken α -Defensine wachstumsfördernd auf Epithelzellen und Fibroblasten, was die Wundheilung positiv beeinflussen kann (HANCOCK und DIAMOND, 2000). Sollte eine akute Entzündungsreaktion nicht zur Klärung der bakteriellen Besiedlung ausreichen (Abbildung 5), so können Defensine und LL-37 durch rezeptorvermittelte Anlockung weiterer Monozyten und T-Lymphozyten sowie durch eine ebenfalls rezeptorvermittelte Hemmung der lokalen Cortisonfreisetzung eine chronische Entzündung unterstützen.

Ein Effekt antibakterieller Peptide an den beteiligten Rezeptoren CCR6, FPRL1 bzw. dem ACTH-Rezeptor wird schon bei 20 bis 500-mal niedrigeren Peptidkonzentrationen erreicht als sie für eine mikrobizide Wirkung nötig sind (YANG *et al.*, 2001). Tatsächlich wird kontrovers diskutiert, ob antimikrobielle Peptide aufgrund ihrer starken Salzabhängigkeit und ihrer hohen Affinität zu Plasmaproteinen *in vivo* überhaupt in antimikrobiell aktiven Konzentrationen vorliegen können (VAN 'T HOF *et al.*, 2001). Trotzdem weisen sowohl der Mangel als auch die Überexpression einiger antimikrobieller Peptide in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen auf ihre Bedeutung *in vivo* hin. So ist die Expression von hBD-2 in Entzündungen der Haut, des Zahnfleisches und des Kolon erhöht, während LL-37 auch in entzündeter Haut und bei der Sarkoidose vermehrt gebildet wird. Andererseits haben einige HIV-Patienten verringerte Histatinkonzentrationen im Speichel, was sie anfälliger für eine orale Candidose macht (ANDREU und RIVAS, 1998), und der Mangel an α -Defensinen im *specific granule deficiency syndrome*

scheint für ständig wiederkehrende Infektionen bei diesen Patienten mitverantwortlich zu sein (VAN 'T HOF *et al.*, 2001).

Jüngste Forschungsergebnisse deuten zudem darauf hin, dass antimikrobielle Peptide in der Reifung oder der Funktionalität von Spermien involviert sind. Beispielsweise ist hCAP-18, das Vorläuferprotein des humanen Cathelizidins LL-37, in großen Mengen in der Samenflüssigkeit enthalten, wo es direkt am Kopf der Spermien lokalisiert werden kann (MALM *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurden sowohl bei Menschen als auch in Ratten und verschiedenen Affenarten epididymisspezifisch exprimierte Nukleinsäuresequenzen isoliert, die alle das konservierte Cysteinmuster der β -Defensine aufwiesen (PERRY *et al.*, 1999; FRÖHLICH *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2001). Das humane HE2 β ₁ und Bin1b aus Ratte zeigen eine große Sequenzübereinstimmung, und beide Sequenzen werden androgenabhängig im Kopf des Nebenhoden (Caput epididymis) exprimiert. Antimikrobielle Peptide könnten hier eine weitere physiologische Funktion haben, denn Spermien werden erst durch die Nebenhodenpassage, bei der sie mit einer Vielzahl von dort synthetisierten Proteinen in Kontakt treten, befruchtungsfähig (FRÖHLICH *et al.*, 2001).

1.5 Grundzüge der antibakteriellen Therapie

Seit Pasteur und Koch gegen Ende des 19. Jahrhunderts nachweisen konnten, dass die Ursache verschiedener ansteckender Krankheiten definierte Bakterien sind, ist die Suche nach spezifisch wirkenden antibakteriellen Substanzen Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Je nach Wirkungsmechanismus und bakteriellem Target lassen sich die etwa 150 verschiedenen, für die Therapie zugelassenen Antibiotika in vier Klassen einteilen. So interferieren Penicilline und Cephalosporine mit der Synthese bakterieller Zellwandbestandteile, während die Sulfonamide mit der Hemmung der Dihydrofolsäure-Synthese einen wichtigen bakteriellen Stoffwechselfvorgang zur Herstellung von Nukleinsäurebausteinen unterbinden (MUTSCHLER, 1996). Die Hemmung der bakteriellen Gyrase als drittes Prinzip ist ein antibakterieller Mechanismus auf Replikationsebene (WALKER, 1999), und die nachgeschaltete Proteinbiosynthese an prokaryotischen 70S-Ribosomen schließlich kann durch eine Vielzahl von antibiotischen Wirkstoffen gestört werden. Tetrazykline (SCHNAPPINGER und HILLEN, 1996) und Aminoglykoside verhindern beispielsweise die Initiation der Translation, Chloramphenicol hemmt die Transpeptidierung und Makrolide (ALVAREZ-ELCORO und ENZLER, 1999) wie Erythromycin machen die Translokation der wachsenden Peptidkette am Ribosom unmöglich. Die Wirkweise von Stoffen, die in die Proteinbiosynthese eingreifen, ist im Allgemeinen bakteriostatisch, während solche Antibiotika, welche die Bildung der Zellwand beeinflussen, bakterizid sind. Der Wirkungsbereich mancher so genannter Schmalspektrum-Antibiotika wie Isoniazid oder Vancomycin beschränkt sich auf einzelne Keime, während Breitbandantibiotika wie Tetrazykline gegen alle Bakteriengruppen aktiv sind (KAYSER *et al.*, 1998). Dabei wird die Wirkstärke eines Antiinfektivums über die minimale Hemmkonzentration (MIC) oder minimale

bakterizide Konzentration (MBK) beschrieben, unter denen man die geringste Konzentration eines Stoffes versteht, die *in vitro* Bakterienvermehrung vermindert bzw. über 99 % der Erreger abtötet. Unter einer Antibiotikatherapie können vor allem allergische Reaktionen, Störungen im Gastrointestinaltrakt durch Beeinflussung der normalen Mikroflora und toxische Wirkungen beispielsweise an der Niere auftreten. Deshalb sollten antibiotisch wirksame Arzneimittel möglichst nur bei nachgewiesener Indikation gegeben werden, und die prophylaktische Einnahme ist nur als Komplikationsprophylaxe bei Operationen oder als Infektionsprophylaxe bei wahrscheinlicher Exposition sinnvoll. Der wichtigste Grund für einen restriktiven Umgang mit Antibiotika ist allerdings die Vermeidung unnötiger Resistenzentwicklungen in bakteriellen Krankheitserregern.

1.6 Zunehmende Resistenz gegenüber antibakteriellen Substanzen

Die zunehmende Resistenz pathogener Keime gegenüber der Therapie mit Antibiotika stellt ein globales medizinisches Problem dar, dessen zukünftiges Ausmaß heute noch nicht abzuschätzen ist. Der Begriff der Resistenz beschreibt dabei die erworbene Unempfindlichkeit von Bakterien gegen etablierte und lange Zeit erfolgreich angewandte Therapieschemata der ersten und zweiten Wahl. Dies führt in den Industrienationen primär zu Zusatzausgaben für verlängerte Krankenhausaufenthalte und teure so genannte Reserveantibiotika, obwohl auch einige hundert Patienten an ehemals behandelbaren Infektionen verstarben (WHO, 2000). Weitaus dramatischer stellt sich die Lage in den Entwicklungsländern dar, in denen mit Versagen von Antibiotika der ersten Wahl oft bereits alle Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft sind, da alternative Behandlungsmöglichkeiten finanziell unerschwinglich sind. So sterben jährlich hunderttausende Menschen an der Shigellen-Ruhr, die bis vor 10 Jahren noch leicht mit preisgünstigem Cotrimoxazol behandelt werden konnte, weil eine zweitägige Therapie mit Ciprofloxacin dort unbezahlbar ist (WHO, 2000). Bereits 1998 wurden Stämme der drei potentiell lebensbedrohlichen Bakterienarten *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Mycobacterium tuberculosis* identifiziert, die mit keinem der über 150 zur Verfügung stehenden Antibiotika mehr behandelt werden konnten (LEVY, 1998).

Die Hauptursache für das vermehrte Auftreten von Resistenzen ist der fehlerhafte Einsatz von Antibiotika bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten. So ist beispielsweise der nutzlose Einsatz von antibakteriellen Substanzen bei viralen Infektionen wie Bronchitiden, Schnupfen oder Influenza auch in Industrieländern an der Tagesordnung. Untersuchungen der WHO zeigen, dass beispielsweise nur 20 % der Patienten mit respiratorischen Erkrankungen tatsächlich eine antibiotische Therapie benötigen (WHO, 2000). Neben der Wahl des richtigen Antibiotikums ist auch die Dosierung und die Einnahmedauer von entscheidender Bedeutung (HELLINGER, 2000). Während eine in die Länge gezogene Einnahme von Antibiotika den Selektionsdruck von Bakterien im Patienten erhöht, macht die zu kurze Gabe von Medikamenten in subletalen Dosen

viele Betroffene unbemerkt zu Ausscheidern. So wird bei jeder unterdosierten Antibiotikatherapie ein Großteil der natürlichen, nicht pathogenen Bakterienflora abgetötet und die überlebenden resistenten Keime breiten sich aufgrund der entfallenen Nahrungskonkurrenz stärker aus (LEVY, 1998). Das Prinzip des „so viel wie nötig, so wenig wie möglich“ muss gleichermaßen für die Verwendung von antibakteriellen Substanzen in der Fleisch-, Fisch- und Obstproduktion sowie für den Einsatz von Desinfektionsmitteln gelten (LEVY, 1998). So wird die Resistenz verschiedener Keime gegen Chinolone oder Vancomycin mit der intensiven Nutzung von strukturell ähnlichen Antibiotika in der Tiermast in Verbindung gebracht (LEVY, 1998; FERBER, 2000; WHO, 2000). Zudem trägt die stetig steigende Mobilität der Menschen dazu bei, dass sich resistente Erreger innerhalb weniger Tage über die ganze Welt verteilen können (WHO, 2000).

Es existieren unterschiedliche Mechanismen, die das Überleben von Bakterien in Gegenwart hoher Antibiotikakonzentrationen ermöglichen. Ein Prinzip ist die Inaktivierung der antimikrobiellen Substanz, wie bei der Hydrolyse des β -Lactamrings in Penicillinen oder Cephalosporinen (HANDAL und OLSEN, 2000). Auch die Acetylierung von Chloramphenicol oder von Aminoglykosidantibiotika durch bakterieneigene Acetyltransferasen inaktiviert angreifende Antibiotika (NEU, 1992; CHOPRA *et al.*, 1997). Darüber hinaus können Bakterien durch spontane oder durch Umwelteinflüsse induzierte Mutationen Zielmoleküle antibiotischer Substanzen verändern. Beispiele hierfür sind Chinolon-resistente Stämme mit einer Mutation in der DNA-Gyrase A oder die Methylierung ribosomaler RNA durch 23S rRNA-Methylasen, die die Wirkung von Makrolidantibiotika aufheben (KAYSER *et al.*, 1998). Schließlich sind einige Bakterien in der Lage, die Konzentration antimikrobiell aktiver Stoffe im Zellinnern entweder durch verminderten Influx oder gesteigerten Efflux zu reduzieren. Dabei spielen die ubiquitär vorkommenden, in der Zytoplasmamembran gelegenen Effluxpumpen vor allem bei der Tetrazyklinresistenz eine große Rolle (NEU, 1992).

Die ausgeprägte genetische Variabilität gekoppelt mit kurzen Generationszeiten ist die Ursache für die schnelle Resistenzentwicklung in Bakterien. Bei der genetischen Variabilität muss zwischen Veränderungen auf dem bakteriellen Chromosom und Weitergabe von Erbinformation auf Plasmiden unterschieden werden. Etwa alle 10^6 bis 10^{10} Zellteilungen findet eine Mutation in einem bakteriellen Gen statt, und diese Gene können dann durch inter- oder intrabakterielle Verschiebung zur Expression kommen. Für die klinisch und epidemiologisch bedeutendere Übertragung von Resistenzgenen zwischen verschiedenen Bakterienspezies gibt es drei verschiedene Wege. Bei der Transformation nehmen Bakterien freigewordene DNA-Stücke abgestorbener Keime auf, während die Transduktion ein interbakterieller Übertrag von Erbinformation durch virale Bakteriophagen ist. Die so eingebrachten fremden Gene werden dann durch verschiedene Rekombinationsmechanismen und durch Transposition in das Genom der Rezeptorzelle eingebaut und exprimiert (KAYSER *et al.*, 1998; LEVY, 1998). Die Konjugation als dritter Mechanismus erlaubt den Übergang von chromosomal oder extrachromosomal

kodierten Resistenzgenen von einem Bakterienstamm (Donor) auf einen anderen (Rezeptor). Die Übertragung von Plasmiden stellt eine sehr effektive Methode der Resistenzentwicklung für Bakterien dar, da jede Rezeptorzelle automatisch zum Donor wird. Außerdem können Bakterien die Plasmide, die teilweise für mehrere Resistenzmechanismen gleichzeitig kodieren, auch an andere Bakterienarten oder -gattungen weitergeben.

Mit Ausnahme eines Oxazolidinons (INN: Linezolid) stellen alle seit etwa 25 Jahren in den Markt eingeführten Antibiotika lediglich Derivate bereits bekannter Stoffe dar (CHOPRA *et al.*, 1997), so dass auch gegen diese neuen Substanzen schnell bakterielle Resistenzen entstanden. Die Entwicklung von Antibiotika mit neuem Wirkmechanismus hat große Bedeutung bei der Verlangsamung der Resistenzentwicklung.

1.7 Vor- und Nachteile antimikrobieller Peptide als Wirkprinzip in der Antibiotikatherapie

Der Einsatz von antimikrobiellen Peptiden in der Medizin als neues antibiotisches Wirkprinzip könnte einen hilfreichen Schritt zur Verlangsamung der Resistenzentwicklung pathogener Bakterien darstellen (HANCOCK 1997; 2000). Die sich aus den Eigenschaften dieser Stoffe ergebenden Vor- und Nachteile in der Therapie werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Als herausragende Merkmale antimikrobieller Peptide sind deren breites Wirkspektrum, das auch multiresistente Erreger einschließt, sowie der schnelle Wirkungseintritt zu nennen (HANCOCK, 1997; HANCOCK und DIAMOND, 2000). Die Aufhebung der Membranintegrität binnen weniger Minuten soll dazu beitragen, dass eine Resistenzentwicklung gegen antimikrobielle Peptide kaum zu beobachten ist, auch wenn sie nach der Isolierung einiger Resistenzgene nicht unmöglich erscheint (HANCOCK, 1997; GUO *et al.*, 1998; PESCHEL *et al.*, 2001). Neben der direkten Reduktion der Bakterienzahl könnten applizierte antibakterielle Peptide durch die Bindung von bakteriellem Endotoxin (LPS) oder durch die Anlockung immunkompetenter Zellen den Heilungsprozess positiv beeinflussen. Bei der Verwendung körpereigener Antibiotika dürften Nebenwirkungen wie allergische Reaktionen nur eine untergeordnete Bedeutung haben, und eine gentherapeutische Induktion der genkodierten antimikrobiellen Peptide (O'CONNELL *et al.*, 1996; BALS *et al.*, 1999c) könnte eine Alternative zu der problematischen systemischen Applikation von peptidergen Wirkstoffen darstellen. Nachteilig bei der Nutzung antimikrobieller Peptide in der Therapie ist deren vergleichsweise teure Produktion und die kurze biologische Halbwertszeit. Letzteres könnte durch Derivatisierung oder durch die Einführung geeigneter Applikationsformen z.B. auf Polymer- oder Liposomenbasis so weit beeinflusst werden, dass auch nasale, pulmonale oder parenterale Arzneiformen erfolgreich eingesetzt werden können. Allerdings wurde die *in vivo*-Toxizität nach Applikation größerer Peptidmengen bislang kaum untersucht (HANCOCK, 1997; LATHAM, 1999; VAN 'T HOF *et al.*, 2001).

Tatsächlich sind schon einige klinische Studien mit antimikrobiell aktiven Peptiden durchgeführt worden. Die Anwendung von IB-367, einem Derivat des Protegrin-I (STEINBERG *et al.*, 1997) zur Behandlung von Entzündungen der Mundschleimhaut bei Krebspatienten befindet sich in einer Phase III-Studie, während die Nutzung des gleichen Peptids als Aerosol zur Therapie von Atemwegsinfektionen in einer Phase II-Studie untersucht wird. Ebenfalls in klinischen Studien der Phase III befinden sich das aus dem bovinen Indolizidin abgeleitete MBI-226, das zur Prävention von Katheter-assoziierten Infektionen eingesetzt werden soll, sowie eine Mundspülung mit der Histatin-Variante P113 zur Vorbeugung von Zahnfleischentzündungen und Parodontose (HANCOCK, 2000). Diese Beispiele zeigen genauso wie die bereits auf dem Markt befindlichen Polypeptidantibiotika Polymyxin E, Colistin und Bacitracin, dass die Anwendung von antimikrobiellen Peptiden als Arzneimitteln zur Zeit hauptsächlich auf die topische Applikation beschränkt ist. Das einzige Beispiel für die parenterale Gabe eines kationischen Proteins ist rBPI₂₁ (Neuprex). Dieses N-terminale Fragment eines 55 kDa-Proteins aus humanen neutrophilen Granulozyten bindet und inaktiviert bakterielles Endotoxin (LPS) und kann als Adjuvans bei der Therapie von juveniler Meningokokken-Sepsis genutzt werden (HANCOCK, 2000).

1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer humaner antimikrobieller Peptide. Dazu sollten zwei unterschiedliche Strategien genutzt werden. Einerseits sollten die bereits am IPF isolierten Peptide LEAP-1 und LEAP-2, deren Primärstrukturen auf eine antimikrobielle Aktivität hindeuteten, mit einem Diffusionshemmtest auf ihre Wirksamkeit gescreent werden. In einem zweiten Ansatz sollte die Sequenzinformation aus dem Humanen Genomprojekt dazu genutzt werden, neue Mitglieder der als antimikrobiell wirksam bekannten Familie der humanen β -Defensine (hBD) zu identifizieren und gegebenenfalls zu isolieren. Neben der Bestimmung der antimikrobiellen Potenz der synthetischen Peptide sollten weitergehende umfassende Untersuchungen wie beispielsweise Expressionsanalysen und Stimulationsexperimente dazu dienen, nähere Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieser endogenen Substanzen zu bekommen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen

2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen

Thermostabile wässrige Lösungen und Gebrauchsgegenstände (Glaswaren, Polypropylen-Pipettenspitzen) wurden 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3.021001, Schütt Labortechnik) sterilisiert.

Lösungen, die nicht mit feuchter Hitze behandelt werden konnten, wurden über Cellulose-Acetat-Phthalat(CAP)-Membranfilter sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt, Ø 0,22 µm), während Metall- und Keramikwaren über 3 h bei 180 °C trockener Hitze entkeimt wurden.

Das Ansetzen von Pufferlösungen, Nährmedien und Agarplatten erfolgte stets mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF} plus, Millipore), während für molekularbiologische Zwecke steriles, schwermetallfreies Wasser (ACS-grade) genutzt wurde. Die für die Reagenzienherstellung benötigten Lösungsmittel und Feinchemikalien hatten Analysequalität und wurden von den Firmen Difco, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.2 Geräte und Apparaturen

Für alle experimentellen Arbeiten wurden, sofern im Text nicht anders angegeben, autoklavierte Polypropylen-Einwegartikel (z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) bzw. Glasmaterialien (z.B. Messzylinder, Vorratsflaschen) verwendet. Neben laborüblichen Standardgeräten wie Präzisionspipetten, Heizplatten, Magnetrührern u.ä. wurden folgende Geräte verwendet:

Bildbearbeitung:	-Kodak EDAS 290-Dokumentationssystem mit Software Kodak 1D V. 3.5.0, der Fa. Kodak
DNA-Sequenzierer:	-Kapillarelektrophorese-Sequenzier PRISM 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (ABI)
Echtzeit-PCR-Verfahren:	- PRISM 7700 Sequence Detection System von Applied Biosystems
Mikrotiterplatten-Reader:	-Microplate Autoreader EL 311 der Fa. Bio-Tek Instruments
Proteingelelektrophorese:	-Xcell SureLock Elektrophoresezellen der Fa. Novex
Spektralphotometer:	-DU 640 der Fa. Beckman
Sterilisation:	-Bioclav 3.021001 der Fa. Schütt Labortechnik
Thermocycler:	-GeneAmp PCR System 2400 der Fa. Applied Biosystems
Ultraschallgerät:	-Vibra cell der Fa. Sonics & Materials
Ultraturax:	-Ultra-Turrax T25 der Fa. Janke & Kunkel

2.1.3 Kits und Enzyme

Zur schnelleren und einheitlicheren Durchführung von molekularbiologischen Routinearbeiten wurden die in Tabelle 1 angegebenen Reagenziensätze („Kits“) verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Kits für molekularbiologische Arbeiten.

Anwendung	Kit
Isolierung genomischer DNA	QIAamp DNA Mini Kit (Fa. Qiagen)
Isolierung von Total-RNA	RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen)
Plasmid-Isolierung	NucleoSpin Plus (Fa. Macherey-Nagel)
DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen	NucleoSpin Extract (Fa. Macherey-Nagel)
Aufreinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin Extract (Fa. Macherey-Nagel)
DNA-Sequenzierung	PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Fa. ABI)
5'-RACE-PCR	Marathon cDNA Amplification Kit (Fa. Clontech)
Real-time PCR (<i>TaqMan</i>)-Experimente	<i>TaqMan</i> Universal PCR Master Mix, <i>TaqMan</i> PCR Core Reagent Kit (Fa. ABI)

2.1.4 Verwendete Oligonukleotide

Die zur Aufklärung der vollständigen cDNA-Sequenzen und zur quantitativen RT-PCR benötigten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech bezogen und sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung / Richtung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Bemerkungen
β-Tub-1 ¹	TTCCCTGGCCAGCTSAANGCNGACCTNCGC AAG	degenerierter Primer (sense) für β-Tubulin-Haushaltsgen
β-Tub-2 ¹	CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAA GGC	degenerierter Primer (antisense) für β-Tubulin-Haushaltsgen
Intro-β-Tub for	TCAGATCTTTTCGGCCGGACAACCTT	Primer (sense) für intronische β-Tubulin Sequenz zum Test auf genomische Verunreinigungen
Intro-β-Tub rev	TACCTGGATTCCAGCTTCTAGAAC	Primer (antisense) für intronische β-Tubulin Sequenz zum Test auf genomische Verunreinigungen
M13/pUC forward sequencing primer	AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzier-Primer für Klonierungsvektoren pCR 2.1-TOPO und pGEM-T
M13/pUC reverse sequencing primer	CAATTTACACAGGAAACAGCTAT- GACCATG	Sequenzier-Primer für Klonierungsvektoren pCR 2.1-TOPO und pGEM-T
SN-2S	CCGCTTGCCTCCTGCTCCTCCTCCTCCTCG	Primer (sense) für LEAP-1
SN-6AS	CGATGACAGCAGCCGCAGCAG- AAAATGCAG	Primer (antisense) für LEAP-1
L1 Sonde ²	FAM- CCAGCTGGATGCCCATGTTCCAGA- TAMRA	<i>TaqMan</i> -Sonde (sense) für LEAP-1
L1 TM for	AGAGCTGCAACCCAGGAC	<i>TaqMan</i> -Primer (sense) für LEAP-1

L1 TM rev	TCGATGACAGCAGCCGC	<i>TaqMan</i> -Primer (antisense) für LEAP-1
L2 Race outer A	AACGGAGCATTGTCTGGAGGTGACTG	5'-Race-primer für LEAP-2
L2 Race inner A	TGGGCCACACTTAAGGAACAGCGTC	5'-Race-primer für LEAP-2
L2 Race outer B	CCAACAGCAACAGGAAGATCATGAGGA	5'-Race-primer für LEAP-2, alternativer Promotor Pos. 1425 - 1399 in AJ409065
L2 Race inner B	GCCACCTTTCAGGCACGTTGTATTTACTG	5'-Race-primer für LEAP-2, alternativer Promotor Pos. 1204 - 1176 in AJ409065
L2 Race inner B1	CAGGGCAACAGGCATAGGGATGAGATAC	5'-Race-primer für LEAP-2, alternativer Promotor Pos. 537 - 510 in AJ409065
L2 Race inner B2	GGCCGTCTCATCTTCACAGGTTTGGGTATT	5'-Race-primer für LEAP-2, alternativer Promotor Pos. 235-207 in AJ409065
pre-L2 E1-S	GGCTTTCAGGCTCCAACATCCT	Primer (sense) für LEAP-2 5'-UTR, Pos. 1340 - 1361 in AJ409065
L2 E1-S	CCTGTCAAGATGTGGCACCTCAAAC	Primer (sense) für LEAP-2, Exon 1
L2 E3-AS	AAGATTGCTTCACTTGGGTGTCTCCAG	Primer (antisense) für LEAP-2, Exon 3
L2 PROM-S	GGTGCAGATTAGGGTGACAGTCCATC	Primer (sense) für LEAP-2, alternativer Promotor Pos. 810 - 835 in AJ409065
L2 (350) TM for	GCTGTTGGGCCAGATAGATG	<i>TaqMan</i> -Primer (sense) für LEAP-2 ³⁵⁰
L2 (350) TM rev	GAACAGCGTCTTTTTCTGCATAG	<i>TaqMan</i> -Primer (antisense) für LEAP-2 ³⁵⁰
L2 (550) TM for	GTCTTTGCCCTTACAGATAGATGG	<i>TaqMan</i> -Primer (sense) für LEAP-2 ⁵⁵⁰ , Pos. 439 - 462 in AJ409064
L2 (550) TM rev	GAACAGCGTCTTTTTCTGCATAG	<i>TaqMan</i> -Primer (antisense) für LEAP-2 ⁵⁵⁰ , Pos. 929 - 915/ Pos. 594 - 587 in AJ409064
L2 Sonde	FAM- CCCAATACCAGAAGTGAGTTCGGCAAAG- TAMRA	<i>TaqMan</i> -Sonde (sense) für beide LEAP-2 Hauptformen (LEAP-2 ³⁵⁰ und LEAP-2 ⁵⁵⁰)
hBD-4 for	CCAGCATTATGCAGAGACTTGT	Primer (sense) für hBD-4, Exon 1
hBD-4 rev	GGTCCTACTTCCAGCGACTCTA	Primer (antisense) für hBD-4, Exon 1
hBD-4 Race outer	TCCAATTCTGTATTCTTGGCTGCGACAT	5'-Race-primer für hBD-4
hBD-4 Race inner	CAACGGCAGTCCCATAACCACATATTC	5'-Race-primer für hBD-4
hBD-4 TM for	TGCTGCTATTAGCCGTTTCTCTT	<i>TaqMan</i> -Primer (sense) für hBD-4
hBD-4 TM rev	GGCAGTCCCATAACCACATATTC	<i>TaqMan</i> -Primer (antisense) für hBD-4
hBD-4 Sonde	FAM- TGTTCCAATTCAAATTCGCTTCTCACTGGA- TAMRA	<i>TaqMan</i> -Sonde für hBD-4
murine L2 for	TTGCCAAGATGCTACAGCTAAACTCTTT	Primer (sense) für murines LEAP-2
murine L2 rev	AACAGATCACTGTTGGAGGTGACTCTTC	Primer (antisense) für murines LEAP-2

bovine L2 for	CCCTCGATCAAGATG	Primer (sense) für bovines LEAP-2
GAPDH TM for	CCTGCACCACCAACTGCTTA	Primer (sense) für Haushaltsgen GAPDH
GAPDH TM rev	CATGAGTCCTTCCACGATACCA	Primer (antisense) für Haushaltsgen GAPDH
GAPDH TM Sonde	FAM- CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAAC- TAMRA	<i>TaqMan</i> -Sonde (sense) für Haushaltsgen GAPDH
18S TM for	GAAACTGCGAATGGCTCATTA	Primer (sense) für Haushaltsgen ribosomale 18S-RNA
18S TM rev	CACAGTTATCCAAGTGGGAGAGG	Primer (antisense) für Haushaltsgen ribosomale 18S-RNA
18S TM Sonde	FAM- TCAGTTATGGTTCCTTTGGTCGCTCGC- TAMRA	<i>TaqMan</i> -Sonde (sense) für Haushaltsgen ribosomale 18S-RNA

- 1) Redundanzen: S = (G + C) und N = (A + T + G + C).
- 2) FAM (6-Carboxy-fluorescein) bezeichnet den Reporterfarbstoff, TAMRA den Quencher (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin).

2.1.5 Verwendete Organismen und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für molekular- und zellbiologische Experimente verschiedene Bakterienstämme und Plasmide verwendet. Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen dienten *Escherichia coli* XL2 Blue und Epicurian Coli XL10-Gold Ultracompetent Cells-Stämme von Stratagene bzw. *Escherichia coli* TOP10F'-Zellen von Invitrogen. Für T/A-Standardklonierungen wurden die Plasmide pGEM-T von Promega und pCR2.1-TOPO von Invitrogen genutzt. Die Selektion erfolgreich transformierter Vektoren erfolgte über deren Ampicillinresistenz auf antibiotikumhaltigen Agarplatten.

2.2 Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

2.2.1 DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen

Die für die Durchführung verschiedener gentechnischer Arbeiten benötigten Enzyme und Puffer wurden von den angegebenen Herstellern (Tabelle 3) bezogen, und alle Reaktionen wurden gemäß Herstelleranweisungen durchgeführt. Abweichend davon wurden enzymatische Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen in einem größeren Volumen als angegeben durchgeführt (mindestens 30 µl), um Nebeneffekte durch hohe Konzentration an Glycerin, in dem die Enzyme gelagert werden, zu vermeiden.

Tabelle 3: Verwendete DNA-modifizierende Enzyme.

Enzym	Hersteller
Reverse Transkriptase	SuperScript II RT (Life Technologies)
DNA-Polymerasen	Taq Platinum DNA-Polymerase (Life Technologies) AmpliTaq-Gold (Applied Biosystems)
DNA-Nukleasen	DNase I Amp Grade (Life Technologies) Mung bean nuclease (Life Technologies)
Restriktionsendonukleasen	Sac I / Sac II (Life Technologies)
RNase-Inhibitor	RNasin (Promega)
Klenow-Fragment	DNA-Polymerase II Fragment (Klenow) (Pharmacia)
DNA-Ligase	T4 DNA Ligase (Promega)

2.2.2 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion oder *polymerase chain reaction* (PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von teilweise bekannten DNA-Abschnitten (SAIKI *et al.*, 1985). Die Vervielfältigung eines bestimmten Sequenzabschnitts ist Voraussetzung dafür, ihn für weitere Schritte wie Klonierung oder Sequenzierung zugänglich zu machen, beispielsweise um die genaue Basenabfolge einer Sequenz festzustellen oder deren Transkriptionshöhe in einem bestimmten Gewebe zu untersuchen.

Reaktionsansatz für eine Standard-PCR:

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

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

Eine Standard-PCR wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1.	Initiale Denaturierung der Matrize	98 °C	3 min	1 Zyklus
2.	Denaturierung	94 °C	10 s	
	Oligonukleotidanlagerung	52-60 °C ¹	30 s	
	Elongation (Verlängerung)	72 °C	50 s	36 Zyklen
3.	End-Elongation	72 °C	8 min	1 Zyklus
4.	Reaktionsende	4 °C	∞	

¹ Die Standard-Annealingtemperatur für LEAP-1 und LEAP-2 betrug 60 °C, die für hBD-4 57 °C. Zur experimentellen Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur wurden initiale PCR-Reaktionen mit einer um 5 °C geringeren Temperatur als der errechneten Primer-Schmelztemperatur begonnen und anschließend langsam gesteigert.

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

2.2.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine effiziente Methode zur Überprüfung der Insertlänge rekombinanter Plasmid-DNA in Transformanten und stellt eine Alternative zum Restriktionsverdau dar. Hierbei wird Zellmaterial weißer Bakterienkolonien der Transformation direkt in ein PCR-Reaktionsgefäß eingebracht und eine Amplifikation mit pUC/M13 sense- und antisense-Oligonukleotiden durchgeführt. Diese Primer schließen die Polylinker-Regionen der verwendeten Plasmide ein, so dass sich ein rekombinantes Plasmid an der Länge seines PCR-Produktes erkennen lässt, da sich dessen Größe nun aus der Länge der umspannten Polylinker-Region zuzüglich der Länge des inklonierten DNA-Fragments ergibt.

PCR-Premix I (Angaben pro Reaktion):

2 µl 10 × PCR-Puffer
0,8 µl 50 mM MgCl₂
17,5 µl ddH₂O

PCR-Premix II (Angaben pro Reaktion):

1 µl 10 × PCR-Puffer
0,6 µl MgCl₂ (50 mM)
0,25 µl dNTP-Mix (10 mM)
0,25 µl Oligonukleotidprimer (je 10 µM)
7,5 µl ddH₂O
0,15 µl Taq Platinum DNA-Polymerase

Mittels steriler Pipettenspitzen wurde Zellmaterial aus entsprechenden Bakterienkolonien (2.2.9) in mit je 20 µl PCR-Premix I gefüllte PCR-Reaktionsgefäße überführt. Zum Anlegen einer Plattenkultur der zu untersuchenden Transformanten wird anschließend mit derselben Pipettenspitze ein Impfstich auf eine Selektions-Agarplatte gebracht, welche später als Ausgangskultur für die Herstellung der Plasmid-Präparation (2.2.10) dient. Nach der Denaturierung der überspiralisierten Plasmid-DNA (*supercoiled DNA*) bei 99 °C über 10 min und darauf folgender Abkühlung auf 53 °C wurden jeder Reaktion 10 µl PCR-Premix II hinzugefügt und eine Standard-PCR nach den jeweiligen Gegebenheiten durchgeführt. Der Zwischenschritt bei dieser Reaktion ist notwendig, da die Halbwertszeit der Taq-Polymerase bei

99 °C nur wenige Minuten beträgt. Durch die abschließende gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte konnten die Kolonien mit korrekt rekombiniertem Plasmid identifiziert werden. Die entsprechenden Klone der Replikaplatte konnten dann zur Vorbereitung der Mini-Präparation von Plasmid-DNA inokuliert werden.

2.2.4 5'- RACE-PCR

Bei einer RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR wird ein kurzer, bekannter Sequenzabschnitt einer cDNA genutzt, um deren Nukleotidsequenz in 5'- wie auch in 3'-Richtung zu vervollständigen (FROHMAN *et al.*, 1988). Da die 3'-Enden der Zielmoleküle durch öffentlich zugängliche cDNA-Klone (ESTs) bzw. durch die isolierte Peptidsequenz bereits bekannt waren, wurden nur die 5'-terminalen Sequenzen der drei cDNAs mit Hilfe des RACE-PCR-Kits der Fa. Clontech aufgeklärt.

Hauptbestandteil dieses Systems ist eine gewebsspezifische cDNA-Bank, die aus poly-A⁺-RNA unter Verwendung eines komplementären Polythymidin-Primers und einer reversen Transkriptase erstellt wurde. An die Enden der so erstellten doppelsträngigen cDNAs wurde eine Adapterregion bekannter Sequenz ligiert. Durch Nutzung eines Adapterprimers und eines zum bereits bekannten Teilstück der cDNA komplementären genspezifischen Antisense-Primers ist man nun in der Lage, den bisher unbekanntem 5'-terminalen Bereich zu amplifizieren. Die Spezifität dieser Reaktion wurde durch eine sich anschließende zweite PCR mit verschachtelten Primern erhöht. Beide Reaktionen wurden gemäß Herstellerangaben mit einem *touchdown*-Temperaturprogramm durchgeführt, bei dem während der PCR-Zyklen die Anlagerungstemperatur von einem Wert oberhalb der Schmelztemperatur der Primer zu einem Wert darunter abgesenkt wurde, was ebenfalls der Verringerung unspezifischer Amplifikation diene.

2.2.5 Gelelektrophoretische Trennung von DNA

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht zu präparativen oder analytischen Zwecken erfolgte in nativen, horizontalen Agarosegelen. In Abhängigkeit vom Trennungsziel wurden 0,8 - 2,0 %ige (w/v) Agarosegele in 1 × TAE-Puffer mit einer Lauflänge von 8-13 cm hergestellt und die Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von 80-120 V in 1 × TAE-Laufpuffer durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden zum erleichterten Einsinken in die Geltaschen mit 0,1 Volumen glycerinhaltigem Auftragspuffer versetzt, dessen Bromphenolblau-Anteil gleichzeitig die Lauffront der Elektrophorese erkennen ließ. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde der Agaroselösung vor dem Gelieren 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Ein jeweils in einer Konzentration von 0,5 µg/ml aufgetragener DNA-Größenstandard (1 kbp- bzw. 100 bp-Leiter, Fa. Life Technologies) erlaubte die Abschätzung der relativen Größe der aufgetrennten

DNA-Fragmente. Die fertigen Gele wurden mit dem Kodak EDAS 290-Dokumentationssystem fotografiert und archiviert.

Ethidiumbromid-Stammlösung: 1 mg/ml Ethidiumbromid in ddH₂O

50 × TAE-Puffer (Stammlösung):

2 M Tris
100 mM EDTA
1 M Essigsäure

5 × Auftragspuffer:

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

2.2.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufarbeitung gelelektrophoretisch getrennter DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract-Kits der Fa. Macherey-Nagel (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Das die jeweilige DNA-enhaltende Gelstück wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer NT1 wurde die Agarose bei 50 °C und 400 rpm für 10 min geschmolzen. Die gesamte Lösung wird auf eine NucleoSpin Extract-Säule aufgebracht und 1 min bei 8000 × g zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend erfolgen zwei einminütige Waschschrte mit je 500 µl EtOH-haltigem Puffer NT3 bei 12.000 × g, bevor die Silikasäule durch zweiminütige Zentrifugation getrocknet wird. Die Elution der DNA erfolgte nach Inkubation der Säule (1 min, RT) mit 50 µl ddH₂O bei ebenfalls 12.000 × g. Falls erforderlich, wurde die DNA-Konzentration des Eluats durch Einengen des Volumens auf ca. 30 µl im Vakuum erhöht.

2.2.7 Ligation

Die Auswahl des Klonierungsvektors erfolgte über die Größe des zu klonierenden PCR-Produktes, wobei Fragmente mit einer Länge von mehr als 750 bp in das pCR2.1-TOPO-Plasmid (Invitrogen) statt in den pGEM-T Standardvektor (Promega) eingebracht wurden.

Für die Ligation in den pGEM-T Vektor wurde ein 3 bis 8-facher molarer Überschuss des zuvor über eine NucleoSpin Extract-Säule aufgereinigten PCR-Produktes zu 20 ng Vektor gegeben. Nach Zugabe von 10 × Ligationspuffer und 3 U T4 DNA Ligase (Promega) wurde der 10 µl-

Ansatz für mindestens 12 h bei 8-10 °C inkubiert. Die auf diesem Wege erhaltene rekombinante Plasmid-DNA wurde anschließend in kompetente *Escherichia coli* XL2 blue oder -XL10-Zellen transformiert (2.2.8).

Aufgrund eines anderen Ligationsprinzips beim pCR2.1-TOPO-Plasmid wird hier nur ein etwa äquimolarer Anteil aufgereinigten PCR-Produktes zu 5 ng Vektor gegeben, bevor man mit 6 × Reaktionspuffer und ddH₂O auf 3 µl Endvolumen auffüllt. Durch die in der Vektorlösung enthaltenen Topoisomerase I aus *Vaccinia*-Viren werden die Thymidin-Überhänge im Vektor mit den Adenosin-Überhängen im PCR-Produkt innerhalb von 10 min bei RT miteinander verknüpft. Diese rekombinante DNA wird dann für die Transformation in kompetente *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen) genutzt.

2.2.8 Herstellung von transformationskompetenten Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode von NISHIMURA *et al.* (1990). Der Gebrauch von MgSO₄ sowie die Zugabe von Glukose als Kohlenstoffquelle soll dabei für die deutlich verbesserte Transformationskompetenz gegenüber mit CaCl₂ inkubierten Bakterienzellen verantwortlich sein.

1 ml einer Übernachtskultur der entsprechenden Bakterienstämme (z.B. Epicurian Coli XL10-Gold Ultracompetent Cells) werden in 100 ml Medium A inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einem OD_{578nm} = 0,55 inkubiert. Nach 10 min auf Eis werden die Zellen 10 min bei 1500 × g und 4 °C abzentrifugiert und vorsichtig in 1 ml eiskaltem Medium A resuspendiert. 5 ml Medium B (Einfriermedium) werden tropfenweise unter leichtem Schwenken hinzugegeben, anschließend werden 100 µl-Aliquots in bei -80 °C vorgekühlte sterile Eppendorfgläser pipettiert und sofort bei -80 °C gelagert.

LB (Luria-Bertani) - Flüssigmedium: siehe 2.4

Medium A :

LB - Flüssigmedium mit Zusatz von : 10 mM MgSO₄
0,2 % Glukose

MgSO₄-Lösung und eine Glukose-Stammlösung werden über einen Spritzenfilter zum LB-Medium gegeben.

Medium B:

LB - Flüssigmedium mit Zusatz von: 36 % Glycerin
12 % Polyethylenglykol (PEG 8000)
12 mM MgCl₂

Das PEG 8000 wird in Glycerin gelöst und zum magnesiumhaltigen LB-Medium gegeben.

2.2.9 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot der für die Transformation benötigten kompetenten Bakterienzellen (2.2.8) wurde langsam auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz (2.2.7) versetzt und vorsichtig durch Antippen gemischt. Nach mindestens 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte das Einbringen der rekombinanten Plasmid-DNA in die Zellen durch einen Hitzeschock von 42 °C für 45 s. Sofort danach wurde der Ansatz für mindestens 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 900 µl vorgewärmtes SOC-Medium hinzugefügt und 60 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Bakterienzellen wurden dann bei 400 × g über 5 min sedimentiert und das in 150 µl SOC-Medium resuspendierte Pellet wurde zusammen mit je 40 µl IPTG- und X-Gal-Lösung auf ampicillinhaltige (100 µg/ml) Selektions-Agarplatten ausgestrichen. Nur erfolgreich mit ampicillinresistenz-vermittelndem Vektor transfizierte *E. coli*-Zellen konnten bei der anschließenden Inkubation bei 37 °C über Nacht wachsen. Die Auswahl der Transformanten mit korrektem Insert erfolgte durch das so genannte Blau-Weiß-Screening, bei dem die Insertierung von DNA in die Polylinker-Region des Vektors eine Inaktivierung einer Untereinheit des β-Galaktosidasegens zur Folge hat. Dadurch kann selbst bei erfolgreicher Transformation die in *E. coli* exprimierte zweite Untereinheit des β-Galaktosidasegens nicht mehr zu einem funktionstüchtigen Enzym komplementiert werden. Deshalb kann das zugegebene X-Gal als chromogenes Substratanalogon der Lactose nicht mehr gespalten werden und die Rekombinanten entwickeln keine blaue Farbe auf den Transformationsplatten (α-Komplementationstest). Die Feststellung der genauen Insertgrößen der rekombinanten weißen Zellkolonien erfolgte dann über eine Kolonie-PCR.

SOC-Medium:

2 %	Caseinhydrolysat
1 %	Hefeextrakt
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
10 mM	NaCl
20 mM	Glukose

Das Medium wurde vor Zugabe der Glukose autoklaviert und mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

IPTG-Lösung (sterilfiltriert):

100 mM Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid in ddH₂O

X-Gal-Lösung:

2 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid in N,N-Dimethylformamid

Selektions-Agarplatten:

LB-Flüssigmedium mit Zusatz von: 1,5 % Agar (Sigma A-5054)
100 µg/ml Ampicillin

Der Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin erfolgte nach Abkühlung des autoklavierten Ansatzes auf 50 °C, pH 7,4 wurde mit 1 N NaOH eingestellt.

2.2.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen beruht im Wesentlichen auf der Methode der alkalischen Lyse (BIRNBOIM und DOLY, 1979), wobei Reinheit und Ausbeute der Präparation über die zusätzliche Zentrifugation durch eine Silikamembran erhöht wird. Von in der Kolonie-PCR (2.2.3) positiv getesteten Klonen wurde eine 3 ml Übernachtskultur mit ampicillinhaltigem LB-Selektivmedium angesetzt. 2 ml der so gewonnenen Bakteriensuspension wurden für 30 s bei $12.000 \times g$ abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Pellet mit 250 µl RNase A-haltigem Puffer A1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl alkalischem, SDS-haltigen Puffer A2 und anschließender 5-minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln bei RT. Im nächsten Schritt wurden störende Zelltrümmer sowie bakterielle Proteine und genomische DNA durch Zugabe von 300 µl Puffer A3 gefällt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei $12.000 \times g$ und 4 °C abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine silikahaltige NucleoSpin Plus-Säule überführt und in diese durch Zentrifugation ($12.000 \times g$, 1 min) eingebracht, der Durchfluss wurde verworfen. Zur Inaktivierung möglicherweise noch aktiver bakterieller Nukleasen wurde die an die Silikasäule gebundene Plasmid-DNA einmal mit 500 µl Puffer AW (50 °C) gewaschen, ehe sich ein weiterer Waschschrift mit 600 µl EtOH-haltigem Puffer A4 anschloss. Auf der Säule verbliebene und die weitere Bearbeitung der DNA störende ethanolische Rückstände wurden durch 3-minütige Zentrifugation entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch Inkubation der Säule mit 50 µl ddH₂O für 2 min bei RT und abschließender Zentrifugation ($12.000 \times g$, 1 min).

2.2.11 Sequenzierung von DNA

Für die Identifizierung der Nukleotidsequenz von DNA-Fragmenten wurde eine weiterentwickelte Form des Kettenabbruchverfahrens von SANGER *et al.* (1977) genutzt. Ein Vorteil dieses so genannten *cycle sequencing*-Verfahrens ist, dass nur geringe Mengen einzel- oder doppelsträngiger DNA eingesetzt werden müssen, da das DNA-Fragment durch Anlagerung eines einzelnen Primers linear amplifiziert wird. Die Amplifikation erfolgt dabei wie bei einer PCR durch die temperaturabhängige Anlagerung des Primers und dessen Verlängerung nach Denaturierung der Zielsequenz. Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) nach Anweisung des

Herstellers durchgeführt, wobei sowohl aufgereinigte PCR-Produkte als auch präparierte Plasmid-DNA (2.2.10) sequenziert werden konnten.

Einfacher Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion:

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

Die Amplifizierung der Zielsequenz erfolgte mit folgendem Temperaturprogramm:

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

2.2.12 Aufreinigung der Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation

Nach Ablauf des Temperaturprogrammes wurden die Reaktionsansätze mit je 80 µl ddH₂O verdünnt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Fällung der DNA erfolgte bei 4 °C durch Zugabe von 15 µl 2 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 250 µl 95 %igem Ethanol. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation auf Eis wurde die DNA durch Zentrifugation bei 15.000 rpm über 15 min sedimentiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das unsichtbare DNA-Pellet wurde mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 15.000 rpm) und danach einige Minuten im Vakuum getrocknet. Zur Sequenzierung im PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI) wurden die Proben mit Formamid-haltigem TSR-Reagenz (ABI) aufgenommen, bei 95 °C für 2 min denaturiert und zur Unterdrückung der Renaturierung schnell auf Eis abgekühlt. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz über 30 s auf das Kapillargel aufgetragen und bei einer Spannung von 15 kV und einer Temperatur von 50 °C elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzsignale erfolgte vollautomatisch durch die Sequence Analysis V3.4.1-Software (ABI).

2.3 Arbeiten mit RNA und Transkriptanalyse

Da RNA sehr anfällig für spontane oder enzymatische Hydrolyse durch ubiquitär vorkommende RNasen ist, wurden beim Arbeiten mit RNA besondere Vorkehrungen getroffen. Hierzu gehörten beispielsweise die Benutzung steriler gestopfter Pipettenspitzen sowie RNase-freier Lösungen. Isolierte RNA wurde in sterilem ddH₂O in RNase-freien Eppendorfgefäßen bei

-80 °C gelagert. Die Aufarbeitung von Total-RNA aus zuvor homogenisiertem Gewebe oder Zelllinien erfolgte unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen).

2.3.1 Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen

Bei der Isolierung von RNA aus humanem Gewebe wurden etwa 500 mg schwere Organstücke in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zerkleinert und nach Zugabe von 3 ml Lysispuffer (RLT-Puffer, Qiagen) und 1 % β -Mercaptoethanol im Ultra-Turrax T25 weiter homogenisiert. Zur Isolierung von RNA aus Zelllinien wurden diese mit 500 μ l Lysispuffer (inkl. 1 % β -Mercaptoethanol) aufgeschlossen und bei Bedarf, d.h. bei Verwendung großer Zellzahlen, mit einem QIAshredder weiter zerkleinert.

Das in RNA-Lysispuffer vorliegende Homogenisat wurde zur Abtrennung von Fettpartikeln und größerer Zelltrümmer 3 min bei $12.000 \times g$ zentrifugiert und der resultierende Überstand sorgfältig mit 1 Volumenteil 70 % Ethanol gemischt, wobei die Anwesenheit von 4 M Guanidiniumisothiocyanat und β -Mercaptoethanol im Lysispuffer die Denaturierung aller Proteine und auch RNasen bewirkte. Dann erfolgte die Bindung von RNA an die silikahaltige RNeasy-Säule durch Zentrifugation des ethanolischen Homogenisats bei $8000 \times g$ für 15 s. Die für die Säulenbindung benötigte hohe Salzkonzentration und andere Verunreinigungen wurden durch Waschen mit 700 μ l RW1-Puffer und 500 μ l ethanolischem RPE-Puffer bei $8000 \times g$ für 15 s entfernt. Nach erneuter Zugabe von 500 μ l RPE-Puffer wurde die Säule für 2 min bis zur Trocknung zentrifugiert und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Elution von RNA mit 50 μ l RNase-freiem ddH₂O erfolgte dann durch Zentrifugation bei $8000 \times g$ und 4 °C über 2 min. Abschließend wurde ein Aliquot dieser RNA-Lösung zur photometrischen Analyse abgenommen, bevor die RNA in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C aufbewahrt wurde.

Gewebe zur Isolierung von RNA aus Ösophagus, Jejunum, Kolon, Rektum, Harnblase sowie aus verschiedenen Magensegmenten (Antrum, Fundus, Korpus) wurden von Herrn Prof. Dr. Markus Bächler und Herrn PD Dr. Helmut Friess vom Inselspital Bern zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Entfernung von DNA aus RNA-Präparationen

Zur Entfernung von Verunreinigungen mit genomischer DNA wurden RNA-Präparationen routinemäßig mit DNase-I verdaut, bevor sie zur Herstellung von cDNA verwendet wurden. Dazu wurden 2 μ g lyophilisierte RNA in 7 μ l RNase-freiem Wasser gelöst und nacheinander je 1 μ l RNasin (Promega), $10 \times$ DNase-Reaktionspuffer und DNase-I (Life Technologies) hinzugegeben. Der DNA-Verdau wurde nach 15 min bei RT durch Zugabe von 25 mM MgCl₂ gestoppt und die beteiligten Enzyme durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C vollständig inaktiviert.

2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

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

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times \varepsilon \times V$$

Der Extinktionskoeffizient ε beträgt für einzelsträngige DNA bzw. RNA 0,04 und für doppelsträngige DNA 0,05, während V den Verdünnungsfaktor der Nukleinsäure in der Lösung beschreibt.

Anhand der UV-Absorption lässt sich zusätzlich die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation bestimmen. Der Quotient aus den gemessenen optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) gibt an, inwieweit die Nukleinsäurelösung durch Proteinreste verunreinigt ist. Reine DNA-Präparationen weisen einen Quotienten von 1,8 auf, bei sauberen RNA-Lösungen ist er 2,0.

2.3.4 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Die sensitive Methode der PCR lässt sich nicht nur auf DNA-Matrizen anwenden, sondern man kann auch RNA-Moleküle indirekt vervielfältigen, beispielsweise um die Transkriptionsrate verschiedener RNAs in unterschiedlichen Geweben zu untersuchen. Voraussetzung für eine solche Untersuchung ist das Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels viraler reverser Transkriptase.

Für die Herstellung von cDNA wurden 5 μ l DNase-behandelte (2.3.2), aus Zelllinien oder Gewebe gewonnene Total-RNA mit 13 μ l ddH₂O verdünnt und mit 500 ng *random hexamer primer* versetzt. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 70 °C wurde der Ansatz schnell im Eisbad abgekühlt, um ein Anlagern der Hexamere zu ermöglichen. Anschließend wurden 6 μ l 5 \times Erststrangsynthesepuffer, 3 μ l 0,1 M Dithiothreitol (DTT) und 1 μ l dNTP-Mix (je 10 mM) hinzugefügt und vorsichtig vermischt. Der Reaktionsansatz wurde 1 min bei 42 °C äquilibriert und die reverse Transkription durch Zugabe von 200 U SuperScript II (Life Technologies) gestartet. Nach weiteren 50 min bei 42 °C wurde das zwischenzeitlich am Deckel des Eppendorfgefäßes kondensierte Wasser herunterzentrifugiert und die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C über 15 min gestoppt. Die Konzentration der so gewonnenen komplementären DNA wurde aus der genutzten RNA-Äquivalentmenge berechnet. Eine Abschätzung der cDNA-Qualität wurde in zwei sich anschließenden Kontrollexperimenten

vorgenommen, wobei eine PCR mit einem β -Tubulin-Primerpaar die Effizienz parallel durchgeführter Erststrangsynthesen überprüfte, während eine zweite PCR mit intronischen β -Tubulin-Primern auf mögliche genomische Verunreinigungen testete.

2.3.5 Quantifizierung von Transkripten mittels Echtzeit-PCR (*TaqMan*)

Die Transkriptionshöhen von LEAP-1, LEAP-2 und hBD-4 in humanen Zelllinien und Geweben wurden per *real-time reverse transcription-PCR* (SCHILD, 1996) in einem PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) erfasst. Das Prinzip dieser Analyse, die im Folgenden als *TaqMan* bezeichnet wird, ist in Abbildung 6 dargestellt.

Die Echtzeit-PCR-Technologie wird zur Analyse der Transkriptionshöhe der untersuchten Moleküle in humanem Gewebe sowie zur Untersuchung ihrer Induzierbarkeit in Zelllinien genutzt. Diese Technik zeichnet sich neben der PCR-eigenen Sensitivität auch durch ein hohes Maß an Selektivität und Reproduzierbarkeit aus, wobei Letztere für die verlässliche Untersuchung der Stimulation der mRNA-Expression in Zelllinien von entscheidender Bedeutung ist. Die hohe Reproduzierbarkeit des Assays ergibt sich zum einen aus dem Wegfall weiterer Arbeitsschritte zum Nachweis der Spezifität des PCR-Produktes (z.B. Gelelektrophorese, Blot-Methoden), zum anderen aus der Quantifizierung der PCR im logarithmischen Bereich der Amplifikation. Die *TaqMan*-Technologie basiert auf einem 5'-Nuklease-Assay (HOLLAND *et al.*, 1991), bei dem man unter Ausnutzung der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase relativ einfach sequenzspezifische Amplifikation nachweisen kann. Durch die Einführung einer mit fluoreszierenden Farbstoffen markierten Oligonukleotidsonde (LEE *et al.*, 1993) wurde dieser Assay automatisierbar.

Die fluorogene Sonde wird zusätzlich zum spezifischen Primerpaar einer Standard-PCR eingesetzt und hybridisiert genau wie diese spezifisch an die zu amplifizierende DNA-Zielsequenz. Die Sonde besteht aus einem 24-30 bp langem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (6-Carboxy-fluorescein) verknüpft ist, während das 3'-Ende mit einem so genannten Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) versehen ist. Zudem ist das 3'-Ende durch einen Phosphatrest blockiert, damit die sequenzspezifische Sonde nicht auch durch die Polymerase verlängert werden und somit als dritter Primer fungieren könnte. Solange die Sonde intakt ist, findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt. Die normalerweise nach Anregung (Wellenlänge $\lambda=488$ nm) als Licht emittierte Energie des Reporterfarbstoffs wird auf den Quencher übertragen, so dass nach außen nur sehr geringe Lichtsignale messbar werden. Die Absorption der Energie durch den Quencher ist nur möglich, solange sich Reporter-Markierung und Quencher in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden, wie es bei intakten Sondenmolekülen gegeben ist. Wird die Oligonukleotidsonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase während der Elongationsphase einer PCR-Reaktion hydrolysiert, so entfernen sich die beiden Farbstoffe voneinander und die emittierte

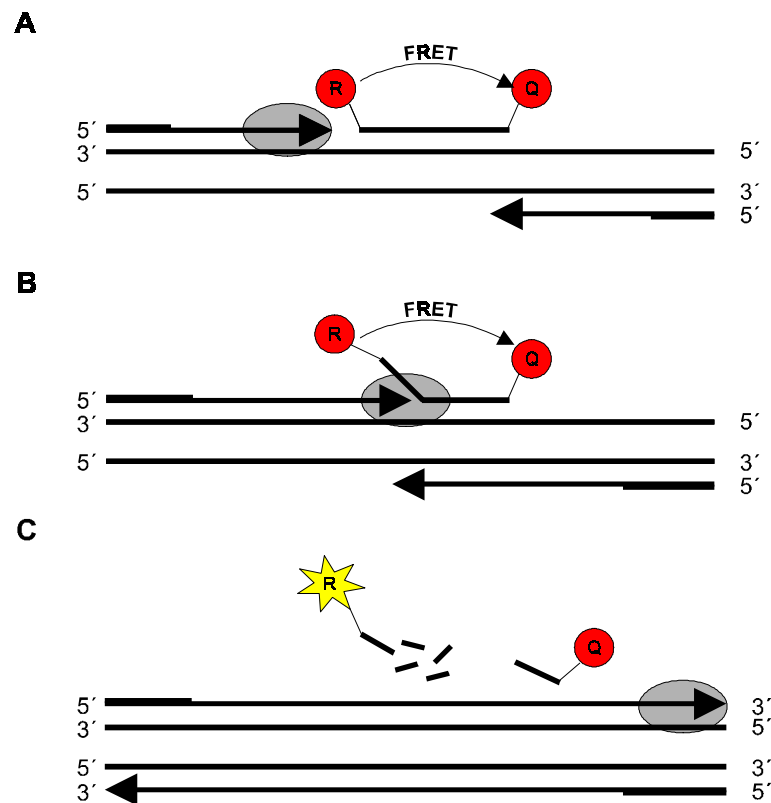


Abbildung 6: Prinzip der *TaqMan*-PCR: (A) Zu Beginn der PCR hybridisiert die mit Reporterfarbstoff (R) und Quencher (Q) markierte Oligonukleotidsonde an die Zielsequenz. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt, der ein Fluoreszenzsignal unterdrückt. (B) Während der Elongationsphase trifft die Taq-Polymerase auf die gebundene Sonde. Eine Y-förmige Übergangsstruktur während der Verdrängungsreaktion aktiviert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase und führt zur Sondenhydrolyse. (C) Aufgrund der nun zunehmenden Entfernung zwischen Reporterfarbstoff und Quencher wird der FRET unterbrochen und ein Fluoreszenzsignal wird messbar. Die Taq-Polymerase ist durch eine graue Ellipse symbolisiert, gebundene Oligonukleotidprimer durch fettgedruckte Balken.

Energie des Reporterfarbstoffs wird als Fluoreszenzsignal ($\lambda=518$ nm) messbar. Voraussetzung für eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase ist eine stabile Hybridisierung der Sonde an die Zielsequenz. Zu diesem Zweck sollte die Schmelztemperatur (T_m) der Sonde mindestens 8-10 °C über T_m der Oligonukleotidprimer liegen. Ist dies der Fall, so trifft die Taq-Polymerase während der Extensionsphase auf die Sonde und beginnt, diese zu verdrängen. Die dabei entstehende Y-förmige Sekundärstruktur, in der die ersten Basen der Sonde bereits verdrängt wurden, induziert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, und die Sonde wird hydrolysiert. Eine nur schwach an die Matrize gebundene Sonde, wie z.B. bei einer Fehlpaarung in einer abweichenden Sequenz eines Allels, würde von der Polymerase so schnell verdrängt werden, dass keine Hydrolyse stattfinden könnte.

Zur Berechnung der Ausgangsmenge cDNA in einer unbekanntem Probe wird die Anzahl der PCR-Zyklen herangezogen, die nötig ist, um einen festgelegten Schwellenwert eines Fluoreszenzsignals zu überschreiten. Die benötigte Zyklenzahl wird als C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. In der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion, in der die

Fluoreszenzintensitäten entsprechend ihrer Wellenlängen detektiert werden, verdoppelt sich die Anzahl ungequenchter Reporter-moleküle mit jedem Zyklus. Da die Amplifikation in der exponentiellen Phase im Gegensatz zur Endpunktbestimmung keinem limitierenden Faktor unterliegt, ist die *TaqMan*-Methode gut reproduzierbar. Durch die Abhängigkeit eines detektierbaren Fluoreszenzsignals von der Hybridisierung dreier verschiedener Oligonukleotide (2 Primer und die Sonde) ist die Echtzeit-PCR ein hochspezifischer Assay. Trotzdem wurde eine mögliche Amplifikation genomischer Sequenzen durch die Verwendung exonübergreifender Primer zusätzlich unterbunden. Die im *TaqMan*-Assay verwendeten Primerpaare wurden zuvor in einer Standard-PCR darauf getestet, dass sie nur ein spezifisches PCR-Produkt amplifizieren. Außerdem ermöglichte die Verwendung von Wasser anstelle von cDNA die Kontrolle auf mögliche Kontaminationen der genutzten Reagenzien.

Die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten während einer Echtzeit-PCR wurde mit Hilfe des PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) gemessen. Alle benötigten Sonden (Tabelle 2) waren mit 6-Carboxy-fluorescein (FAM) als Reporterfarbstoff und mit 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin als Quencher markiert, welche beide vom Argon-Laser des PRISM 7700 ($\lambda=488$ nm) angeregt werden. Die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe wurden im Bereich von 500-660 nm automatisch aufgenommen und durch eine CCD-Kamera (*charge-coupled device*) in vom Computer bearbeitbare Datenpunkte umgewandelt.

Oligonukleotidprimer und -sonden wurden mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems) abgeleitet und von den Firmen MWG (Primer) und TIB MOLBIOL (Sonden) bezogen (Tabelle 2). Als endogene Amplifikationskontrolle zum Abgleichen der eingesetzten cDNA-Mengen dienten Oligonukleotide und Sonden für die so genannten Haushaltsgene ribosomale 18S-RNA und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH).

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

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

Die für eine quantitative Auswertung notwendigen Absorptionsspektren der beteiligten Fluorogene wurden während der Amplifikation der Zielsequenz (Schritt 3) aufgenommen.

Für jeden PCR-Reaktionsansatz (25 μ l Endvolumen) wurden folgende Reagenzien benötigt:

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

2.3.6 Quantifizierung der endogenen Expression der Zielmoleküle

Die Quantifizierung der Transkription von LEAP-1, LEAP-2 und hBD-4 erfolgte über zwei verschiedene Berechnungsmethoden, denen beiden prinzipiell die Standardkurvenmethode zugrunde lag. Bei der Quantifizierung von LEAP-1 wurde die Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe einer Stammlösung cDNA aus HUH-7-Zellen konstruiert, während die Standardkurve zur Bestimmung von LEAP-2 und hBD-4 durch Verdünnung eines rekombinanten Plasmids, welches das jeweilige Amplikon der Echtzeit-PCR enthielt, gewonnen wurde. Aufgrund der Datenaufnahme des *TaqMan*-Systems in der exponentiellen Phase der PCR sowie aufgrund der kurzen Amplifikationsprodukte ist die gemessene Effizienz der PCR von der Startkopienzahl nahezu unabhängig. Der Logarithmus der Startkopienzahl ist daher über mindestens 5 Größenordnungen proportional zum C_T -Wert. Die aus diesen zwei Parametern konstruierte Standardkurve weist im Experiment meist einen Korrelationskoeffizienten $R > 0,97$ auf, was das Standardkurvenverfahren zu einer sehr genauen Auswertungsmethode macht.

Quantifizierung von LEAP-1 in humanen Geweben

Zur Erstellung der Standardkurve wurde cDNA aus HUH-7-Zellen in 6 Verdünnungsstufen im Bereich von 50 ng - 10 pg RNA-Äquivalentmenge eingesetzt. Da es sich bei der Bestimmung von LEAP-1 um eine relative Quantifizierung handelte, waren die absoluten Startkopienzahlen von LEAP-1 in der cDNA aus HUH-7-Zellen ohne Belang und konnten durch willkürlich gewählte Werte ersetzt werden. Entscheidend waren nur die akkuraten 5-fach bzw. 10-fach Verdünnungen der cDNA-Stammlösung. Für die Erstellung der Standardkurven sowohl für die Bestimmung der Transkriptionsrate von LEAP-1 wie auch für die endogene Kontrolle GAPDH wurde für alle Experimente die gleiche, zuvor aliquotierte cDNA-Stammlösung aus HUH-7-Zellen genutzt. Die Doppelbestimmungen für die Standards wurden im gleichen Experiment wie die zu untersuchenden Gewebe analysiert. Es kamen nur solche Versuche zur Auswertung, in denen die Standardreihen für Zielsequenz und Haushaltsgen einen Korrelationskoeffizienten $R > 0,97$ aufwiesen und zugleich alle Probenwerte umspannten.

Die Berechnung der endogenen Expression von LEAP-1 erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden die Signale der einzelnen Proben normalisiert, indem die ermittelten Startkopienzahlen von LEAP-1 durch die Startkopienzahl des Haushaltsgens GAPDH dividiert wurden. Dieser Schritt erlaubte das Vernachlässigen abweichender Mengen eingesetzter cDNA, die z.B. durch

unterschiedliche Effizienzen bei der reversen Transkription entstanden sein könnten. Im zweiten Schritt wurden dann alle so normalisierten Startkopienzahlen kalibriert, indem man sie durch die normalisierte Startkopienzahl des Gewebes mit der niedrigsten Transkriptionsrate (Kalibrator) dividierte. Das Ergebnis dieser Berechnung war also ein relatives Expressionsniveau der Zielsequenz LEAP-1 in verschiedenen humanen Geweben, wobei der Kalibrator gleich 1 gesetzt wurde.

Quantifizierung von LEAP-2 und hBD-4 in humanen Geweben

Die Standardkurven zur absoluten Quantifizierung von LEAP-2 und hBD-4 wurden durch Verdünnungsreihen von rekombinantem Plasmid bekannter Kopienzahl erstellt. Nach der spektralphotometrischen Bestimmung der Konzentration (2.3.3) der jeweiligen aufgereinigten Plasmid-DNA konnte die enthaltene Kopienzahl Zielsequenz bzw. Haushaltsgen pro μl Plasmidpräparation über folgende Berechnung bestimmt werden:

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

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

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

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

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

Zur Berechnung der endogenen Expression in den verschiedenen Geweben wurde anschließend die experimentell festgestellte Startkopienzahl des Zielgens durch die der endogenen Kontrolle dividiert. Diese Ergebnisdarstellung hat den Vorteil, dass man die Transkriptionshöhen von verwandten Sequenzen (z.B. von β -Defensinen) in einem Gewebe gut miteinander vergleichen kann.

2.4 Kultivierung von prokaryotischen Zellen und Hefen

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

Die für die Untersuchungen der antimikrobiellen Aktivität der drei Zielmoleküle benötigten Keime sowie deren Wachstumsbedingungen und Herkunft sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Auflistung aller benutzten Keime zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von LEAP-1, LEAP-2 und hBD-4.

Bakterienstamm	Nummer	Medium	Gram-Färbung	Wachstumsoptimum
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC14581	LB	+	30 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6051	LB	+	37 °C
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC9341	LB	+	37 °C
<i>Staphylococcus carnosus</i>	DSM20501	LB	+	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	TSB	+	37 °C
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC33400	TSB	+	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	BL21	LB	-	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	DSM1103	LB	-	37 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM681	LB	-	37 °C
<i>Neisseria cinerea</i>	ATCC14685	TSB	-	30 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	LB	-	37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM1128	LB	-	37 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM1976	LB	-	30 °C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC9763	YPD	Hefe	30 °C
<i>Rhodotorula rubra</i>	DSM70404	YPD	Hefe	30 °C

Folgende Nährmedien wurden für die Kultivierung der genannten Bakterienstämme verwendet:

LB (Luria-Bertani) - Flüssigmedium:

- 1,0 % Caseinhydrolysat (Sigma C-0626)
- 0,5 % Hefeextrakt (Sigma Y-4000)
- 0,5 % NaCl

Lösen der Feststoffe in Wasser, einstellen des pH 7,4 mit 1 N NaOH und autoklavieren.

MHB-Medium:

- 2,1 % Müller-Hinton-Broth (Merck)
- 97,9 % Aqua bidest.

Das Medium hatte vor dem Autoklavieren einen pH-Wert von 7,2-7,4.

TSB-Medium:

- 0,3 % Tryptic Soy Broth (Sigma T-8261)
- 99,7 % Aqua bidest.

Der Ansatz wird mit 5 N NaOH auf pH 7,2 gebracht und autoklaviert.

YPD (Yeast-Peptide-Dextrose)-Medium:

1,0 % Hefeextrakt (Sigma Y-4000)

2,0 % Pepton (Difco)

Der pH-Wert des Mediums wird mit 1 N HCl auf 6,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wird eine 3 M Glukoselösung durch einen Spritzenfilter hinzugefügt (Endkonzentration: 20 g Glukose pro Liter Medium).

Alle genannten Medien können zur Herstellung entsprechender Nähragarplatten genutzt werden, indem vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar (Sigma A-5054) hinzugegeben wird.

2.5 Kultivierung humaner Zelllinien

2.5.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Für die Arbeiten mit humanen Zellkulturen wurden die von LINDL *et al.* (2000) zusammengefassten allgemeinen Empfehlungen eingehalten. Die für die beschriebenen Stimulations- und Bindungsexperimente genutzten Arbeitskulturen (Tabelle 5) wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. In flüssigem Stickstoff gelagerte Dauerkulturen wurden bei Bedarf vorsichtig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und einmal mit dem zehnfachen Volumen 20 % FCS in Kulturmedium gewaschen, um im Einfriermedium enthaltenes, zytotoxisches DMSO zu entfernen. Nach Sedimentation für 5 min bei 120 × g wurde das Zellpellet in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und anschließend in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt.

Zum Passagieren 80-90 % konfluenten Kulturen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 2-4 min bei 37 °C mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Die Ablösungsreaktion wurde dann durch Zugabe von 10 ml FCS-haltigem Kulturmedium abgestoppt, die Zellen wurden abzentrifugiert und je nach Zellstamm und -dichte im Verhältnis 1:3 bis 1:8 in je 20 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Überzählige Zellen bzw. nicht mehr benötigte Arbeitskulturen wurden wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren, indem man das nach der Trypsinierung erhaltene Zellpellet unverdünnt in 1 ml Einfriermedium aufnahm und in geeignete Einfriergefäße (Cryovial, Roth) überführte. Nach 48 h Lagerung bei -80 °C konnten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff (-196 °C) eingebracht werden.

Einfriermedium:

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

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

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.

Zellstamm	Gewebe / Morphologie	Herkunft / Referenz
Bronchiale Epithelzellen	Primärzellen aus den oberen Atemwegen, gewonnen bei der Resektion eines Bronchialkarzinoms	Dr. Dr. Robert Bals, Ludwig-Maximilians-Universität, München
HUH-7	Humane Hepatoma-Zelllinie Adhärente Zellen, die als einschichtiger Zellrasen (<i>monolayer</i>) wachsen	Etabliert aus der Resektion der Leber eines 57-jährigen Patienten (NAKABAYASHI <i>et al.</i> , 1982)
HaCaT	Humane Keratinozyten-Zelllinie adhärent, als Monolayer wachsend	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten (BOUKAMP <i>et al.</i> , 1988)
SAEC 6043	Humane Lungenprimärzellen adhärent, als Monolayer wachsend	Etabliert aus einer Resektion aus den unteren Atemwegen einer 54-jährigen Patientin Fa. Cellsystems, Nummer CC-2547
NCI H720	Atypisches Karzinoid der Lunge nicht-adhärente Suspensions-Zelllinie	ATCC-Nummer: CRL-5838
NCI N417	Kleinzelliges Bronchialkarzinom nicht-adhärente Suspensions-Zelllinie	ATCC-Nummer: CRL-5809

Tabelle 6: Verwendete Agenzien zur Kultivierung von Zellen.

Medien, sonstiges Zellkulturmaterial	Anbieter, Bestellnummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/l Glucose	Life Technologies, 41965-039
HAM F12	Life Technologies, 21765-029
RPMI 1640	Life Technologies, 31870-025
BEGM Bullet Kit	Clonetics, CC-3170
SAGM Bullet Kit	Cell Systems CC-3118
Fetales Kälberserum (FCS)	BioWhittaker, 14-701F
Ultrosor G	Life Technologies, 15950-017
PBS Dulbecco's	Life Technologies, 14190-094
Trypsin/EDTA-Lösung (1x)	Life Technologies, 25300-054
10.000 µg/ml Penicillin/Streptomycin (100x)	Life Technologies, 15140-130
200 mM (100x) L-Glutamin	Life Technologies, 25030-024
Zellkultur-Flaschen:	Anbieter, Bestellnummer
75 cm ² Zellkultur-Flaschen, Filterdeckel	Sarstedt, 83.1813.002
6-Well- Zellkultur-Schalen, Ø 35 mm	Corning Costar, 3516

Tabelle 7: Verwendete Kulturbedingungen.

Zellstamm	Kulturmedium
Bronchiale Epithelzellen	DMEM/HAM F12 1:1, 2 % Ultrosor G, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
HaCaT	RPMI 1640, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS
HUH-7	DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS
NCI-H 720	RPMI 1640, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS
NCI-N 417	RPMI 1640, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS
SAEC 6043	SAGM Bullet Kit

2.5.2 Stimulation von Zellen

Für die Untersuchung einer Induzierbarkeit der Transkriptionsraten von LEAP-2 und hBD-4 *in vitro* wurden verschiedene humane Zelllinien 24 h mit proinflammatorischen Zytokinen inkubiert. Dazu wurden seit mindestens 10 Tagen in Kultur befindliche Zellen in einer Dichte von 2×10^5 (HaCaT) bis 1×10^6 (NCI-Suspensionszellen) Zellen pro Kavität auf einer 6-Well Kulturschale ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Kulturmedium der nun 60-70 % konfluenten Zellen durch zytokinhaltiges, auf RT äquilibriertes Medium (Tabelle 7) ersetzt, wobei zur Vernachlässigbarkeit eines möglichen Lösemiteleinflusses die Stammlösung der Zytokine jeweils 1:1000 in Medium verdünnt worden waren. Im Anschluss an die entsprechenden Stimulationszeiten wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zur Vorbereitung der darauf folgenden RNA-Extraktion (2.3.1) durch Zugabe von 500 µl Lysispuffer aufgeschlossen.

Jede Stimulation mit einer proinflammatorischen Substanz wurde in drei Wells parallel durchgeführt, wobei die Inkubation mit zusatzfreiem Kulturmedium als Kontrolle diente.

2.5.3 Verwendete Zytokine und Stimulanzen

Die für die Stimulation von humanen Zelllinien genutzten Zytokine wurden in den in Tabelle 8 aufgeführten Konzentrationen angewendet.

Tabelle 8: Verwendete Stimulanzen.

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

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

2.5.4 Stimulation von Lungenepithelzellen mit pathogenen Bakterien

Die Isolation, Kultivierung und Stimulation von differenzierten Epithelzellen der oberen Atemwege wurde von Herrn Dr. Dr. Robert Bals im Klinikum Großhadern durchgeführt. Die von der Ethikkommission der Universität München genehmigte Isolierung von humanen bronchialen Epithelzellen wurde im Zuge großflächiger Resektionen von Bronchialkarzinomen durchgeführt. Nach enzymatischem Vorverdau der Biopsien über 24 h bei 4 °C wurden die Mucosazellen mit einem Skalpell abgekratzt und in BEGM-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Ausdifferenzierung dieser Primärzellen erfolgte dann in einem *air/liquid interface*-System, in dem nur die basolaterale Seite der Zellen mit Medium versorgt wird, während die apikale Seite von Luft umgeben ist. Dazu wurden die Membranen entsprechender Einsätze (Millicell CM PICM 01250, Millipore) über Nacht mit einer 0,01 %igen Lösung von Kollagen I in 0,1 M Essigsäure vorbehandelt und in eine 24-Well-Kulturschale überführt. Anschließend wurden etwa 5×10^5 Zellen pro Membran aufgebracht und 72 h bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Die Differenzierung der Zellen erfolgte nach Entfernung des Mediums von der apikalen Seite innerhalb von 2-3 Wochen (BALS *et al.*, 1999b). Der Vorteil des *air/liquid interface*-Systems liegt darin, dass es die physiologischen Verhältnisse in den Luftwegen besser wiedergibt als normale Zellkultursysteme (DIAMOND *et al.*, 2000).

Zur Untersuchung des Einflusses einer bakteriellen Besiedlung dieser Zellen auf die Expression von hBD-4 wurden 10^4 bzw. 10^6 koloniebildende Einheiten *Streptococcus pneumoniae* ATCC33400 und *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 über 6 h auf der apikalen Zellseite inkubiert. Neben den vermehrungsfähigen Keimen wurden auch durch Autoklavierung inaktivierte Pseudomonaden zur Stimulation genutzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Epithelzellen mit PBS gewaschen und sofort mit Lysispuffer zur RNA-Extraktion versetzt (2.3.1).

2.5.5 Stimulation von SAEC-Zellen zum Nachweis von hBD-4

Analog zu der in 2.5.2 beschriebenen Vorgehensweise wurden 5×10^5 SAEC-Zellen in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät und 24 h später über 12 h mit 1 μ M PMA stimuliert. Obwohl mit diesem Stimulationsprotokoll die Induktion von hBD-4 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (Abbildung 22), ließ sich im Western Blot weder in den Zelllysaten noch in den Überständen hBD-4 detektieren. Deshalb wurde sowohl die PMA-Konzentration schrittweise auf maximal 5 μ M erhöht als auch die Inkubationszeit auf bis zu 48 h verlängert. Nach Ablauf der

Stimulationszeit wurden die Überstände und z.T. auch die Zellaufschlüsse gemäß 2.7.1 aufgearbeitet und anschließend analysiert.

2.6 Tests auf antimikrobielle Aktivität

2.6.1 Radialdiffusions-Hemmtest

Der in Anlehnung an LEHRER *et al.* (1991) durchgeführte Radialdiffusions-Hemmtest (RDH) ist ein schnelles und einfaches Verfahren zur Überprüfung einer antimikrobiellen Aktivität wässriger Lösungen. Hierbei zeigt das Entstehen trübungsfreier Hemmhöfe um die aufgetragenen Substanzen die Hemmung mikrobiellen Wachstums in einem Nähragar an.

Die zu untersuchenden Bakterienstämme (Tabelle 4) wurden in flüssigem Nährmedium entsprechend ihren Wachstumsbedingungen bis zu einer $OD_{600nm} = 0,8$ inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l dieser Bakteriensuspension unter Rühren mit 100 ml der 40 °C warmen, flüssigen Nähragaroselösung verdünnt. Je 25 ml dieses Ansatzes wurden in sterile Petrischalen ausgegossen und für 2 h bei 4 °C ausgehärtet. Mit Hilfe einer sterilen Hohnadel wurden Zylinder von 3 mm Durchmesser aus dem Gel gestanzt und mit einer Pasteurpipette entfernt. In die so entstandenen Kavitäten wurden je 10 μ l Peptidlösung verschiedener Konzentration eingebracht, und die Agaroseplatte wurde je nach Keim für 18 h bei 30 °C bzw. 37 °C im Brutschrank gelagert. Als Positivkontrolle diente eine Lösung von 11 μ g Casocidin-I (ZUCHT *et al.*, 1995) in 10 μ l sterilem bidestillierten Wasser, als Negativkontrolle verschiedene ebenfalls synthetisch hergestellte Peptide ähnlichen Molekulargewichts wie z.B. Parathormon (1-37).

Da eine lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der Antibiotikakonzentration und den Hemmhofradien besteht (LEHRER *et al.*, 1991), wurden die entstandenen Hemmhöfe zur Auswertung des Testes manuell vermessen und die Hemmhofdurchmesser in Einheiten (*units*) umgerechnet. Nach Abzug der 3 mm Innendurchmesser entspricht 1 U dabei einem Durchmesser von 0,1 mm.

RDH-Nähragarose:

	0,03 % Tryptic Soy Broth (Sigma T-8261)
(Inkubation bei 37 °C) ¹⁾	0,20 % Agarose (Sigma A-6013) + 0,60 % NuSieve GTG Agarose (Biozym) oder
(Inkubation bei 30 °C) ¹⁾	0,80 % NuSieve GTG Agarose (Biozym)
	0,02 % Tween-20
	10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 (aus 0,5 M Stammlösung)

Die Lösung wurde aufgekocht und anschließend im Wasserbad auf 40 °C abgekühlt.

¹⁾ Je nach optimaler Wachstumstemperatur der Keime (Tabelle 4) wurden unterschiedliche Agarosen verwendet.

2.6.2 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU-Test)

Eine Methode zur direkten Zählung vermehrungsfähiger oder koloniebildender Bakterienzellen ist das so genannte Präinkubationsexperiment, welches auch als CFU-Test (CFU = *colony forming unit*) bezeichnet wird. Hierbei wird ein Teil einer ausreichend verdünnten bakteriellen Flüssigkultur auf eine Nähragarplatte ausgebracht und die nach Inkubation entstandenen Bakterienkolonien ausgezählt (SÜBMUTH *et al.*, 1999).

Zur CFU-Bestimmung wurden 50 µl einer Übernachtskultur in 5 ml frischem Nährmedium inokuliert und 3 h bei 30 °C (*S. cerevisiae*) bzw. 37 °C (*B. subtilis*) inkubiert, um Keime in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten. Die Zellen wurden bei 600 × g und 4 °C über 15 min abzentrifugiert und anschließend zweimal unter denselben Bedingungen mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) / 1 % Nährmedium gewaschen. Nach Bestimmung der optischen Dichte der vorliegenden Keimsuspension wurde eine Arbeitslösung von 2×10^6 CFU pro ml 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) hergestellt, wobei eine OD_{620nm} von 0,2 etwa 5×10^7 Bakterienzellen bzw. 5×10^6 Hefezellen entsprachen. In einer 24-Well-Mikrotiterplatte vorgelegtes und lyophilisiertes Peptid (1-11 µg) wurde in 100 µl dieser Keimsuspension gelöst und für 2 h bei der optimalen Wachstumstemperatur inkubiert, ehe die Reaktion durch Zugabe des 500-fachen Volumens eiskalten Phosphatpuffers beendet wurde. Mit Hilfe eines Drigalski-Spatels wurden abschließend 100 µl dieser Suspension auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und 16 h bei 30 °C/37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der sichtbaren Einzelkolonien, wobei ein ohne Peptid inkubierter Ansatz die Ausgangskeimzahl darstellte. Als repräsentativer Wert dieser Untersuchung diente der IC_{50} -Wert, der angibt, welche Peptidkonzentration erforderlich war, um das Keimwachstum auf 50 % des Ausgangswertes zu reduzieren.

2.6.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Als minimale Hemmkonzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) wird die niedrigste Konzentration eines Hemmstoffs bezeichnet, die benötigt wird, um das Anwachsen eines Inokulums innerhalb von 18 ± 2 h zu verhindern, wobei hier nicht zwischen einer bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkung unterschieden werden kann (SÜBMUTH *et al.*, 1999).

Zur Bestimmung der MIC wurde das zu untersuchende Peptid in einer geometrischen Verdünnungsreihe (Faktor 0,5) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Dazu wurden 100 µl einer definierten Peptidkonzentration in Testmedium in der obersten Kavität vorgelegt, während alle anderen Vertiefungen mit 50 µl reinem Testmedium befüllt wurden. Mit dem obersten Well beginnend wurden jeweils 50 µl peptidhaltige Lösung in die darunterliegende Reihe überführt, vermischt und diese Lösung halbiertes Konzentration anschließend wieder überführt. Dann wurden 50 µl einer Keimsuspension mit 2×10^5 Zellen hinzugefügt und dieser Ansatz für 18 h bei 30 °C oder 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine

durch Bakterienwachstum entstehende Trübung in den Vertiefungen spektralphotometrisch ($\lambda=570$ nm) erfasst. Der MIC-Wert entspricht der kleinsten Peptidkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$], bei der keine Trübung, also kein Bakterienwachstum, mehr festzustellen war. Da die Anzahl der hinzugefügten Zellen direkten Einfluss auf den MIC-Wert hat, musste zuvor mit einer CFU-Bestimmung ermittelt werden, bei welcher Verdünnung der Übernachtskultur eines Bakteriums auch tatsächlich 2×10^5 Keime / Well vorlagen. Diese Verdünnungsstufen reichten von 1:2000 für *Micrococcus luteus* bis 1:10.000 für *E. coli* BL21. Entsprechend den NCCLS-Richtlinien (ISENBERG, 1993) kamen nur solche Experimente zur Auswertung, bei denen die nachträglich festgestellte Anfangskeimzahl unter 5×10^5 Keimen lag.

Parallel zu den eigenen Untersuchungen wurden MIC-Bestimmungen von Herrn Dr. Dr. Robert Bals an der Universität München durchgeführt. Dabei wurden 10 μl einer Peptid-Stammlösung mit 90 μl ionenschwachem, 25 %igen MHB-Medium (2.4) verdünnt und mit $1-5 \times 10^5$ Bakterien inokuliert. Diese vorab experimentell bestimmte Keimdichte ergab sich durch eine 1:100-Verdünnung einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Tagkultur, deren optische Dichte auf $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,2$ eingestellt worden war. Die mit diesem Versuchsaufbau bestimmten MIC-Werte wichen aufgrund der Salzabhängigkeit von hBD-4 z.T. erheblich von den eigenen Untersuchungsergebnissen ab (Tabelle 12).

2.6.4 Interaktion von hBD-4 mit anderen antibiotischen Substanzen

Als Messgröße für die Feststellung einer Interaktion von hBD-4 mit anderen Antibiotika diene der FIC-Index (*fractional inhibitory concentration*), der über eine aufwendige, aber gut quantifizierbare Schachbrett-Titration bestimmt wurde (SÜBMUTH *et al.*, 1999).

Analog zur Bestimmung des MIC-Wertes (2.6.3) wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte mehrere identische Verdünnungsreihen von hBD-4 vorgelegt, wobei der zuvor experimentell bestimmte MIC-Wert für den Versuchskeim die höchste Konzentration darstellte. Zusätzlich zu diesen vertikal aufgetragenen Verdünnungsstufen wurde eine horizontale Verdünnungsreihe des auf Interaktion zu testenden Peptids (z.B. Lysozym) in die bereits gefüllten Kavitäten pipettiert, so dass jede Konzentration hBD-4 in Gegenwart jeder Konzentration Testpeptid vorlag. Nach Lyophilisation der Lösungen wurden 100 μl einer 2×10^5 CFU enthaltenen Keimsuspension von *Staphylococcus carnosus* TM300 in TSB-Medium (2.4) hinzugefügt und 18 h bei 37 °C inkubiert. Die durch Bakterienwachstum verursachte Trübung wurde abschließend im Plattenleser bei einer Wellenlänge $\lambda=570$ nm erfasst.

Die in diesem Test ermittelte minimale Hemmkonzentration (MIC) jeder Einzelsubstanz in der Kombination dividiert durch die MIC jeder Einzelsubstanz ohne Kombinationspartner wird als fraktionierte inhibitorische Konzentration (FIC) bezeichnet. Durch Addition der einzelnen FIC-Werte ergab sich der FIC-Index, der zur Auswertung einer Interaktion herangezogen wurde.

Berechnung des FIC-Indexes aus den in der Schachbrett-Titration ermittelten MIC-Werten:

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

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

FIC-Index	Interaktion
≤ 0,5	synergistisch
> 0,5 – 1,0	additiv
> 1,0 – 2,0	indifferent
> 2,0	antagonistisch

2.6.5 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Da die Aktivität antimikrobieller Peptide durch eine Interaktion mit bakteriellen Membranen zustande kommt, ist es von Interesse, ob auch humane Strukturen wie z.B. Erythrozytenmembranen mit diesen Substanzen wechselwirken.

Die Untersuchung der hämolytischen Aktivität von hBD-4 wurde in Anlehnung an HELMERHORST *et al.* (1999) durchgeführt. Erythrozyten aus dem citrathaltigen Vollblut (Monovetten, Sarstedt) eines gesunden Probanden wurden bei $1500 \times g$ und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 10 min sedimentiert und der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette entfernt. Das erythrozytenreiche Pellet wurde zweimal gewaschen, indem es in 1 Volumenteil Testmedium resuspendiert und wie zuvor abzentrifugiert wurde. Die Erythrozyten wurden nach Entfernung des Überstandes 200-fach mit Testmedium verdünnt.

Verschiedene Konzentrationen hBD-4 (1-250 $\mu\text{g/ml}$) wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit V-förmig zulaufendem Boden pipettiert und lyophilisiert. Dann wurden 200 μl der oben beschriebenen Lösung hinzugefügt und für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem Peptid inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei $1000 \times g$ für 5 min zentrifugiert, um überschüssige Erythrozyten abzutrennen. Je 150 μl Überstand pro Kavität wurden in eine neue 96-Well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden überführt und die Absorption der durch freigesetztes Hämoglobin gefärbten Überstände wurde bei einer Wellenlänge $\lambda=450\text{ nm}$ im Mikrotiterplatten-Leser bestimmt. Als Referenzwert für die Hämolyse diente die Inkubation mit einer 1 %igen Lösung Tween-20 bzw. die Verwendung verschiedener Konzentrationen des hämolytisch aktiven, antimikrobiellen Peptids MBI-28 (GOUGH *et al.*, 1996). Nur mit Testmedium inkubierte Erythrozyten dienten als Negativkontrolle.

Die Angabe der hämolytischen Aktivität von hBD-4 erfolgte in Bezug auf die totale Hämolyse mit Tween-20 und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Hämolyse [\%]} = \frac{\text{Ø } A_{450 \text{ nm}} (\text{hBD} - 4) - \text{Ø } A_{450 \text{ nm}} (\text{Negativkontrolle})}{\text{Ø } A_{450 \text{ nm}} (1 \% \text{ Tween-20}) - \text{Ø } A_{450 \text{ nm}} (\text{Negativkontrolle})}$$

Als Testmedium diente TSB-Medium mit 287 mM Glukose (2.4). Nach Zugabe von 56,9 g Glukosemonohydrat pro Liter vollständigem TSB-Medium erfolgte eine Sterilfiltration des Ansatzes in eine autoklavierte Duran-Flasche. Die isotonische Glukosekonzentration soll einer unspezifischen Hämolyse im hypotonen Milieu vorbeugen (Osmoprotektion).

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Probenvorbereitung

Experimente zum Nachweis von hBD-4 in mit PMA stimulierten SAEC 6043-Zellen (2.5.5) erfolgte über SDS-PAGE- und anschließender Western Blot-Analyse. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde der Überstand entfernt und die Zellen durch Zugabe von 500 µl 2 × Probenpuffer aufgeschlossen. Das zähflüssige Lysat wurde zur Zerstörung hochmolekularer DNA mehrfach bei 10-12 W über 3 s mit Ultraschall behandelt. Die Zellüberstände wurden lyophilisiert und in 0,1 Teilen 2 × Probenpuffer aufgenommen. Direkt vor Durchführung der Gelelektrophorese wurden die Proben mit 50 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt und über 10 min bei 70 °C vorsichtig denaturiert.

Zur Untersuchung der Sensitivität und Spezifität der monoklonalen hBD-4-Antikörper (2.7.4) wurden synthetische humane β-Defensine in ddH₂O gelöst und mit 0,33 Teilen 4 × Probenpuffer sowie 50 mM DTT versetzt. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 70 °C wurden 3-300 ng Peptid pro Spur auf das Gel aufgetragen.

2 × Probenpuffer:

1 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
1 ml	0,5 M Imidazol, pH 6,8
4 ml	10 % SDS
1 ml	Glycerin
0,2 ml	β-Mercaptoethanol
0,8 ml	0,1 % Bromphenolblau

2.7.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Abtrennung von hBD-4 aus komplexen Proteingemischen wie lysierten SAEC-Zellen wurden Bis-Tris gepufferte Polyacrylamid-Gradientengele (Invitrogen,

NP0323) verwendet. Die Nutzung von 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure-haltigem Laufpuffer ermöglichte die Trennung von Proteinen im Bereich zwischen 2,5-200 kDa unter reduzierenden Bedingungen. Als Gelapparatur diente eine XCell Sure Lock-Gelkammer (Invitrogen).

Nach dem Einbringen der Gele in die Kammer wurde das innenliegende Reservoir mit 500 μ l Antioxidans (NP0005) und ca. 200 ml Laufpuffer gefüllt. Maximal 12 μ l der bereits denaturierten Proben wurden in die mit Laufpuffer gespülten Geltaschen überführt und 35 min bei einer Spannung von 200 V gelelektrophoretisch getrennt, wobei der *Mark 12 unstained standard* (Invitrogen) als Größenmarker diente. Anschließend entfernte man die Gele aus ihren Rahmen und lagerte sie bis zur Durchführung des Western Blots in Transferpuffer.

Laufpuffer:

50 ml 20 \times NuPAGE Running Buffer (NP0002)
950 ml ddH₂O

2.7.3 Immuno-Blot Analyse (Western Blot)

Die Überführung der mittels PAGE (RITTENHOUSE und MARCUS, 1984) aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte durch elektrophoretischen Transfer im *XCell II Blot Module* (Invitrogen). In diesem *Wet Blot*-Verfahren wurden PVDF-Membran (0,2 μ m Porengröße, NEN) und Polyacrylamidgel so zwischen je 2 transferpuffergetränkten Schwammtüchern und Filterkartons (Whatman 3MM, Roth) angeordnet, dass die Membran näher zur Anode und das Gel näher zur Kathode lag. Nach Einbringen des *Blot-Sandwiches* in die Blotkammer wurde diese mit 800 ml Transferpuffer vollständig gefüllt. Das Blotten erfolgte über 60 min bei 30 V, was einer Stromdichte von ca. 2 mA/cm² entsprach.

Transferpuffer:

50 ml 20 \times NuPAGE Transfer Buffer (NP0006-1)
1 ml NuPAGE Antioxidans
200 ml Methanol
749 ml ddH₂O

Zur Entfernung methanolischer Rückstände aus dem Transferpuffer wurde die Membran anschließend zweimal für 5 min in TBS-Tween gewaschen. Vor der Zugabe des hBD-4-spezifischen Erstantikörpers wurden überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran abgesättigt, indem der Blot mindestens 1 h mit 1 \times Roti-Block-Lösung (Roth) inkubiert wurde. Dann wurde der gegebenenfalls in Roti-Block verdünnte Erstantikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C und leichtem Schütteln gebunden. Nach Entfernung des Blockpuffers durch dreimaliges Waschen mit reichlich TBS-Tween wurde der 1:50.000 in 1 \times Roti-Block verdünnte Zweitantikörper aufgebracht und 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch erneutes, fünfmaliges Waschen entfernt. Die Visualisierung der Zweitantikörper-Bindung

erfolgte über ein Chemilumineszenz-Signal. Hierbei katalysiert die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase die Oxidation von Luminol zu einem lichtemittierenden Produkt. Dazu wurde der Blot für 1 min mit 1,5 ml frisch angesetztem, luminolhaltigen Detektionsreagenz (Super Signal, Pierce) benetzt, ehe die Membran luftblasenfrei in eine dünne Polyethylenfolie eingewickelt und je nach Signalintensität für 15 s bis 30 min auf einem Film (CL-X Posure Röntgenfilm, Pierce) exponiert wurde. Der Film wurde anschließend mit Agfa Rodinal (1:25) entwickelt, über die doppelte Entwicklungszeit fixiert (Agfa Tetenal Superfix I 1:7), gewässert und im Warmluftstrom getrocknet.

Zur genaueren Beurteilung eines positiven Signals ist es erforderlich, dass alle zu vergleichenden Spuren eines Gels oder Blots ähnliche Proteinbeladungen aufweisen. Deshalb wurden die Blots/Gele abschließend mit allgemeinen Proteinfärbereagenzien wie Coomassie-Lösung (Gele) oder India-Ink-Lösung (Membranen) behandelt und gefärbt archiviert.

10x TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung):

24,2 g Tris
80,0 g NaCl

Der pH-Wert der Lösung wurde mit ca. 20 ml 25 % HCl auf 7,6 eingestellt, anschließend wurde mit ddH₂O ad 1000 ml aufgefüllt.

1x TBS-Tween:

100 ml 10 × TBS
0,5 ml Tween-20
900 ml ddH₂O

Coomassie-Lösung:

0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250
0,05 % Coomassie Brilliant Blue G-250
42,5 % Ethanol
5 % Methanol
10 % Essigsäure

Bereits geblottete Gele wurden mindestens 30 min in Coomassie-Lösung geschüttelt und anschließend bis zum gewünschten Kontrast über Nacht mit ddH₂O gewaschen.

India-Ink-Lösung:

50 ml TBS-Tween
0,15 ml Fount India Ink (Pelikan)

Mit ddH₂O gespülte PVDF-Membranen wurden über 2 h bei RT in India-Ink-Lösung geschüttelt, überschüssige Tinte wurde anschließend mit 1 × TBS-Tween abgewaschen. Zur Vorbereitung einer direkten Aminosäuresequenzierung von der PVDF-Membran folgten drei weitere Waschschrte mit ddH₂O.

2.7.4 Antikörper

Monoklonale, hBD-4-spezifische Antikörper wurden von Dr. Aleksandra Heitland zur Verfügung gestellt. Zu ihrer Herstellung wurden Mäuse mehrfach mit an Hämocyanin gekoppeltem hBD-4(25-61) über 17 Tage immunisiert. Anschließend wurden popliteale Lymphknoten mit X63-Ag8.653 Tumorzellen fusioniert und die Überstände der so erhaltenen Hybridomazellen mittels direktem ELISA auf das Erkennen von synthetischem hBD-4 überprüft. Diese in Anlehnung an NIEBUHR *et al.* (1998) durchgeführte Methode führte zur Etablierung mehrerer Antikörper-produzierender Klone. Ungereinigte und unverdünnte Hybridomaüberstände wurden per Western Blot auf Spezifität und Sensitivität getestet. Die für weitere Versuche genutzten Antikörper detektierten bis 3 ng synthetisches Peptid und zeigten dabei eine vernachlässigbare Kreuzreaktivität zu den bisher bekannten humanen β -Defensinen hBD-1, hBD-2 und hBD-3.

Als Zweitantikörper diente ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Antikörper, der gegen murines IgG gerichtet war (New England Biolabs, 7072-1).

2.8 Nachweis der chemotaktischen Aktivität von hBD-4

Die Fähigkeit von hBD-4 zur chemotaktischen Anlockung humaner Leukozyten *in vitro* wurde von Dr. Ulf Forssmann untersucht. Neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten wurden aus Frischblut freiwilliger, gesunder Spender nach Routineprotokollen gewonnen (PARDIGOL *et al.*, 1998). Der Chemotaxisassay wurde mit einer 48-Well-Kammer (Neuro Probe) unter Verwendung einer polyvinylpyrrolidonfreien Membran (PVPF; Porengröße 5 μ m, Whatman) durchgeführt. Zu testendes hBD-4 (0,1-1000 nM) sowie N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) und Eotaxin als Positivkontrollen wurden in die unteren Kammern gefüllt, während 5×10^4 Zellen der entsprechenden Leukozytenpopulation in die obere Kammer eingebracht wurden. Als Negativkontrolle dienten nur mit Testmedium gefüllte Kammern (RPMI 1640 inkl. 0,5 % BSA, 25 mM Hepes). Nach 25- (Neutrophile) bzw. 60-minütiger (Eosinophile, Monozyten) Inkubation bei 37 °C wurde die PVPF-Membran entnommen, zur Entfernung an der Oberseite aufliegender Zellen vorsichtig mit einer Gummilippe abgestreift und entsprechend der Herstellerangaben mit DIFF-Quick (Dade Diagnostika, Marburg) angefärbt. Die Bestimmung der chemotaktischen Aktivität erfolgte durch Auszählung migrierter Zellen in fünf zufällig ausgewählten Augenfeldern bei einer 1000-fachen Vergrößerung. Alle Versuchsansätze wurden in Tripelika durchgeführt (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b).

2.9 Peptidsynthese

Die Herstellung aller verwendeten Peptide erfolgte in der Abteilung Peptidsynthese bei IPF PharmaCeuticals. Die Synthese von LEAP-1(60-84) wurde von Herrn Dr. Axel Schulz

durchgeführt, während LEAP-2(38-77) und hBD-4(25-61) von Herrn Dr. Enno Klüver bereitgestellt wurden. Aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten dieser cysteinreichen, kationischen Peptide wurden ähnliche Synthesestrategien erforderlich. Im Folgenden wird deshalb nur die Darstellung von LEAP-2 exemplarisch ausgeführt. Details zur Synthese von LEAP-1 und hBD-4 wurden kürzlich veröffentlicht. (KRAUSE *et al.*, 2000; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b). Alle in dieser Arbeit verwendeten Chargen synthetischer Peptide haben eine durch HPLC ermittelte Reinheit von mindestens 93 %.

Lineares LEAP-2(38-77) wurde nach dem Prinzip der Festphasenpeptidsynthese (MERRIFIELD, 1986) unter Verwendung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppenchemie auf einem automatischen Peptidsynthesizer 433A (ABI) hergestellt. Die Synthese wurde auf 0,1 mmol eines vorbeladenen TentaGel S PHB Harzes (Rapp Polymere) durchgeführt. Die zu koppelnden, Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden der Reaktion im zehnfachen Überschuß hinzugefügt und durch HBTU ((2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat)) aktiviert. Fmoc-Cystein war Trityl-geschützt. Lineares LEAP-2(38-77) wurde nach Beendigung der Synthese mit einer frisch angesetzten Mischung von Trifluoressigsäure, Ethandithiol und Wasser (94:3:3) 3 h vom Harz abgespalten und durch Zugabe von kaltem tert-Butylmethylether ausgefällt. Das Rohpeptid wurde lyophilisiert, in Wasser aufgenommen, filtriert und über eine präparative HPLC (Vydac C18, The Separations Group) vorgereinigt. Nach der Abtrennung von Synthesenebenprodukten erfolgte die Einführung der Disulfidbrücken, indem 0,5 mg/ml reduziertes LEAP-2(38-77) in Karbonatpuffer (0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8,3) gelöst und 48 h bei RT an der Luft oxidiert wurde. Das analog zum nativen LEAP-2 gefaltete, 1-3/2-4 disulfidverbrückte Isomer wurde abschließend durch HPLC (Vydac C18) gereinigt. In einem alternativ durchgeführten Syntheseprotokoll wurden die Disulfidbrücken selektiv eingeführt, indem nacheinander zuerst die Trityl-geschützten Cysteine an Position 54 und 65 durch Luftoxidation und dann die Acetamidomethyl-gekoppelten Cysteine Cys⁶⁰ und Cys⁷⁰ durch Iodoxidation verknüpft wurden (Abbildung 11). Beide unterschiedlich hergestellte, synthetische Produkte waren identisch mit dem aus Hämofiltrat isolierten, nativen LEAP-2(38-77), was durch Komigration in der Kapillarzonenelektrophorese und durch Koelution in einer analytischen HPLC belegt wurde. Das durch ESIMS (API 100, ABI) ermittelte Molekulargewicht von LEAP-2(38-77) stimmte in allen drei Fällen mit dem theoretisch berechneten Molekulargewicht von 4581,3 überein.

2.9.1 Nachweis der Disulfidverbrückung

Die Anordnung der 4 Disulfidbrücken im LEAP-1-Molekül (Abbildung 8) wurde bisher nicht untersucht, während die Analyse der Cysteinverknüpfung in LEAP-2 und hBD-4 in den entsprechenden Publikationen eindeutig bestimmt wurden (KLEEMEIER, 1997; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b). Das Prinzip der Untersuchung von verbrückten Cysteinen in einem Peptid bekannter Sequenz besteht dabei aus der massenspektrometrischen Untersuchung von

Peptidfragmenten, die durch enzymatischen Verdau erhalten wurden. Da Disulfidbrücken unter den gewählten Versuchsbedingungen erhalten bleiben, kann jedem Fragment aufgrund seiner Masse eine Aminosäuresequenz zugeordnet werden. Trotz der rechnerisch möglichen 15 verschiedenen Disulfide wies das Hauptsyntheseprodukt von hBD-4 das für alle β -Defensine vorausgesagte Verbrückungsmuster (1-5, 2-4, 3-6) auf (TANG und SELSTED, 1993).

2.10 Datenbankrecherche

2.10.1 Genutzte Datenbanken und Software

Der Vergleich verschiedener sequenzierter DNA-Fragmente untereinander sowie die Übersetzung dieser Nukleotidsequenzen in eine Aminosäureabfolge wurde mit der Sequencher V3.1 Software (ABI) durchgeführt. Die Suche nach öffentlich zugänglicher Sequenzinformation (z.B. EST-Klone, genomische Contigs) in Internetdatenbanken erfolgte auf dem NCBI (National Center for Biotechnology Information)-Server und dessen BLAST-Algorithmus (*Basic Local Alignment Search Tool*, ALTSCHUL *et al.*, 1997). Zur Vorhersage putativer Signalpeptidsequenzen wurde das Programm Signal P V2.0 (NIELSEN *et al.*, 1997) genutzt. Die in dieser Arbeit identifizierten Nukleotidsequenzen (Tabelle 14) wurden mit Hilfe der *WEBIN*-Software des *European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk) an *GenBank* übermittelt. Darüber hinaus wurden die in Abbildung 7 angegebenen Internetadressen genutzt.

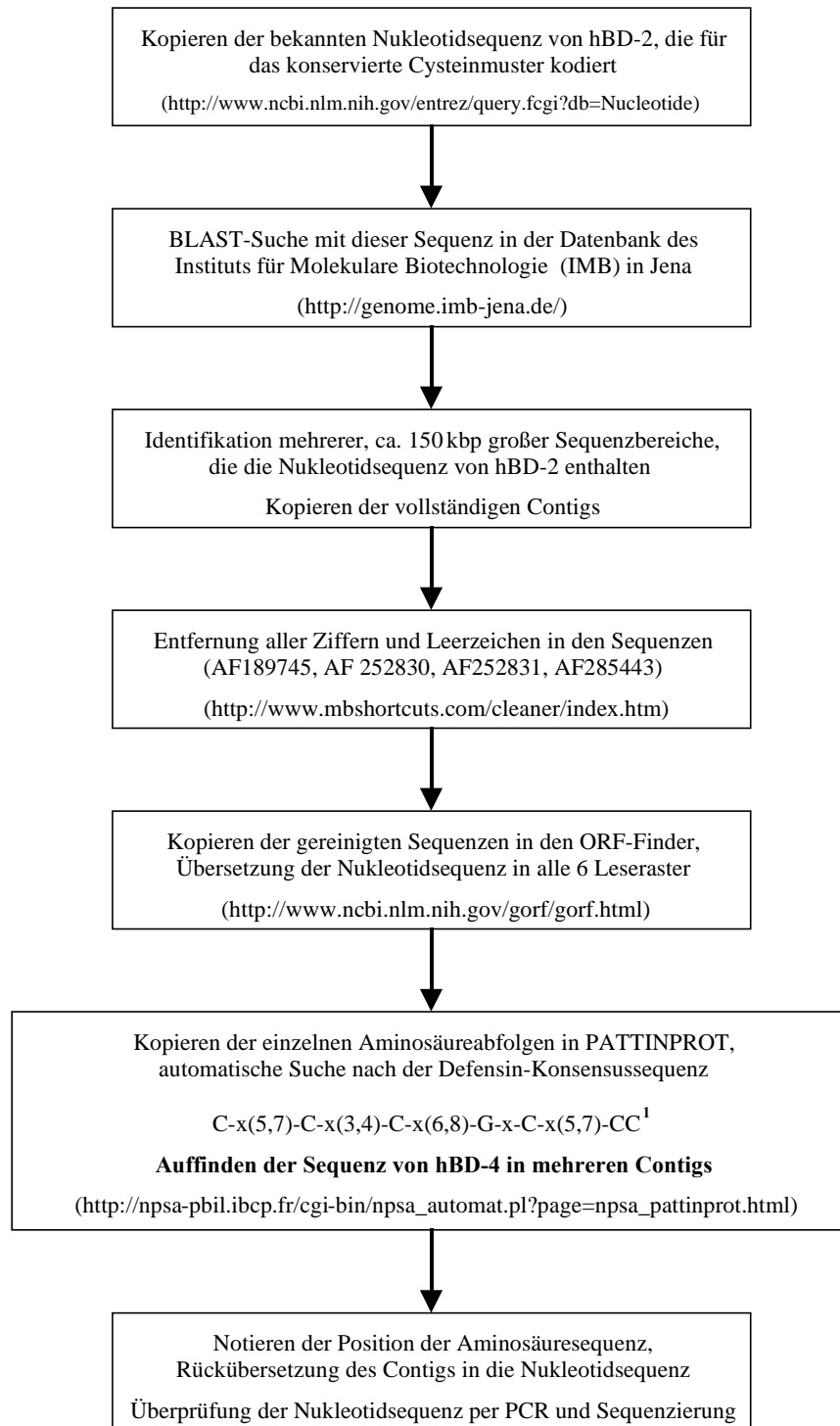
Diese Dissertation wurde mit Programmen des Microsoft Office-Paketes sowie mit Adobe Photoshop und Corel Draw V6.0 erstellt. Die im Ergebnisteil dargestellten Standardabweichungen (SD) wurden mit Excel 97 nach folgender Formel berechnet:

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

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

2.10.2 Auffinden der Nukleotidsequenz von hBD-4 *in silico*

Durch die Fortschritte bei der Sequenzierung des humanen Genoms wurden im Verlauf dieser Arbeit immer mehr genomische Nukleotidsequenzen in öffentlichen Datenbanken bereitgestellt. Neben dem Auffinden bisher unbekannter Gene erlaubte die Bereitstellung dieser riesigen Datenmengen insbesondere die Suche nach weiteren Mitgliedern bereits bekannter Genfamilien. Die β -Defensine eignen sich aufgrund ihrer hochkonservierten, von nur einem Exon kodierten Cysteinstruktur sowie ihrer bekannten chromosomalen Lokalisation besonders gut für die computergestützte Suche nach Homologen.



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

Abbildung 7: Übersicht zum computergestützten Auffinden des neuen humanen β -Defensins hBD-4.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung der Peptide LEAP-1 und LEAP-2

Die in dieser Arbeit behandelten neuen humanen Peptide LEAP-1 und LEAP-2 wurden erstmals im Rahmen der am IPF etablierten Technologie zur Isolierung von zirkulierenden Peptiden aus Hämofiltrat (HF) nierenkranker Patienten identifiziert. Systemisch zirkulierende Peptide sind in HF in vergleichbarer Konzentration vorhanden wie in Plasma (SCHEPKY *et al.*, 1994), und FORSSMANN *et al.* (1986) konnten mit der Isolierung von α -ANP schon früh zeigen, dass sich HF ähnlich gut zur Aufreinigung bioaktiver Peptide eignet wie Plasma. Die Aufarbeitung von mehreren tausend Litern HF (FORSSMANN *et al.*, 1993; SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1997) erlaubt die Identifikation von Polypeptiden, die in nur pikomolaren Konzentrationen im Blut zirkulieren. LEAP-1 und LEAP-2 wurden durch einen massenspektrometrischen Ansatz isoliert, bei dem cysteinreiche Peptide in Hämofiltratfraktionen nach Reduktion und Derivatisierung über ihre Massenzunahme detektiert wurden (KRAUSE *et al.*, 2000). Bis heute konnten drei LEAP-1-Varianten und zehn LEAP-2-Formen in Hämofiltrat und Urin identifiziert werden. Angaben zur Aufreinigung von LEAP-1 bzw. zur Aufreinigung und Klonierung von LEAP-2 können an anderer Stelle nachgelesen werden (KLEEMEIER, 1997; KRAUSE *et al.*, 2000).

Tabelle 9: Aufstellung der bisher identifizierten Formen von LEAP-1 und LEAP-2.

Peptid	Quelle	Referenz
LEAP-1(60-84)	Hämofiltrat, Urin	KRAUSE <i>et al.</i> , 2000; PARK <i>et al.</i> , 2001
LEAP-1(63-84)	Urin	PARK <i>et al.</i> , 2001
LEAP-1(65-84)	Urin	KRAUSE <i>et al.</i> , 2000; PARK <i>et al.</i> , 2001
LEAP-2(38-77)	Hämofiltrat	Dr. Peter Schulz-Knappe, persönliche Mitteilung (2000)
LEAP-2(39-77)	Hämofiltrat	KLEEMEIER, 1997
LEAP-2(43-77)	Hämofiltrat	Dr. Peter Schulz-Knappe, persönliche Mitteilung (2000)
LEAP-2(44-77)	Hämofiltrat	KLEEMEIER, 1997; A.Krause, unveröffentlichte Daten
LEAP-2(48-77)	Hämofiltrat	KLEEMEIER, 1997
LEAP-2(48-76)	Hämofiltrat	Dr. Peter Schulz-Knappe, persönliche Mitteilung (2000)
LEAP-2(48-75)	Hämofiltrat	Dr. Peter Schulz-Knappe, persönliche Mitteilung (2000)
LEAP-2(46-75)	Hämofiltrat	Dr. Peter Schulz-Knappe, persönliche Mitteilung (2000)
LEAP-2(48-73)	Hämofiltrat	Dr. Peter Schulz-Knappe, persönliche Mitteilung (2000)
LEAP-2(44-61)	Urin	Gaby Heine, unveröffentlichte Daten (1996)

Zum Zeitpunkt ihrer Isolierung am damaligen Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung (IPF) waren beide humanen Peptide noch in keiner öffentlich zugänglichen Datenbank enthalten. Lediglich eine aus humanem Urin isolierte, partielle LEAP-1-Sequenz, die die Aminosäuren 50-84 der hier beschriebenen Form umfasste, war bekannt und wurde als *antimicrobial peptide*

hepcidin bezeichnet (Swiss-Prot, Acc.-No. P81172). Etwa zeitgleich mit der Veröffentlichung der Ergebnisse über LEAP-1 (KRAUSE *et al.*, 2000) wurden weitere Daten zu LEAP-1 bzw. zu dessen muriner Form HEPC publiziert (FLEMING und SLY, 2001; NICOLAS *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2001; PIGEON *et al.*, 2001). Die vom Autor durchgeführten Experimente zur näheren Charakterisierung von LEAP-1 und LEAP-2 beziehen sich hauptsächlich auf deren antimikrobielle Aktivität sowie deren gewebspezifische Expression. Diese Daten werden in dieser Dissertation im Zusammenhang mit den zuvor erwähnten Resultaten diskutiert.

3.2 LEAP-1 (*liver-expressed antimicrobial peptide 1*)

3.2.1 Nukleinsäuresequenz von LEAP-1

Zur Bestimmung der vollständigen Sequenz von LEAP-1 wurde die aus Hämofiltrat isolierte Aminosäureabfolge DTHFPICIFCCGCCCHRSKCGMCCCKT (Abbildung 8) als Vorlage für eine tblastn-Suche (ALTSCHUL *et al.*, 1997) genutzt. Auf diese Weise konnte ein DNA-Abschnitt auf Chromosom 19q13 identifiziert werden (*GenBank*, Acc.-No. AD000684, Position 31400-34200), der das LEAP-1-Gen enthielt. Durch die Untersuchung dieses Nukleinsäureabschnitts auf offene Leseraster, Signalpeptidsequenzen und Exon/Intron-Übergänge konnte eine putative LEAP-1-cDNA-Sequenz ermittelt werden, welche durch entsprechende Standard- und RACE-PCR-Reaktionen verifiziert wurde. Diese Arbeiten wurden bei IPF PharmaCeuticals unter der Leitung von Herrn PD Dr. Hans-Jürgen Mägert durchgeführt.

```

1          M A L S S Q I W A A 10
1 tcaagaccagcagctgggacagccagacagacggcagc ATG GCA CTG AGC TCC CAG ATC TGG GCC GCT 68

11 C L L L L L L L A S L T S G S V F P Q Q 30
69 TGC CTC CTG CTC CTC CTC CTC CTC GCC AGC CTG ACC AGT GGC TCT GTT TTC CCA CAA CAG|128
                                           Intron 1 (2121 bp)

31 T G Q L A E L Q P Q D R A G A R A S W M 50
129 ACG GGA CAA CTT GCA GAG CTG CAA CCC CAG GAC AGA GCT GGA GCC AGG GCC AGC TGG ATG|188
                                           Intron 2 (89bp)

149 P M F Q R R R R D T H F P I C I F C C 70
189 CCC ATG TTC CAG AGG CGA AGG AGG CGA GAC ACC CAC TTC CCC ATC TGC ATT TTC TGC TGC 248

149 G C C H R S K C G M C C K T Ter 84
249 GGC TGC TGT CAT CGA TCA AAG TGT GGG ATG TGC TGC AAG ACG tagaacctacctgccctgcccc 313

314 gtccccctcccttccttattttattctctgctgccccagaacataggtcttggaaataaaatggctggttctttttgttttcc 391

```

Abbildung 8: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäureabfolge von LEAP-1. Kodierende Sequenzabschnitte sind in Großbuchstaben dargestellt, die putative Signalpeptidsequenz ist fett gedruckt. Lage und Orientierung der für die Expressionsanalyse verwendeten Oligonukleotide sind mit Pfeilen angedeutet. Die aus Hämofiltrat isolierte und antimikrobiell aktive Form LEAP-1(60-84) und das potentielle Polyadenylierungssignal sind unterstrichen, die Lage der Exon-Intron-Übergänge sind angegeben. [*GenBank* Acc.-No. AJ277280]

Durch weitergehende Recherchen in cDNA-Datenbanken (EST- oder *expressed sequence tag*-

Banken) konnte eine murine cDNA identifiziert werden, welche für ein Peptid kodiert, das bei konserviertem Cysteinmuster eine 51 %ige Sequenzübereinstimmung zum humanen LEAP-1(1-84) aufweist.

3.2.2 Endogene Expression von LEAP-1 in humanen Geweben

Die Höhe der endogenen Expression von LEAP-1 in verschiedenen humanen Geweben wurde mittels semiquantitativer RT-PCR im *PRISM sequence detection system* (ABI) bestimmt (2.3.5). Dazu wurde das in Abbildung 8 beschriebene Primerpaar und die dazugehörige Sonde genutzt. Zur Untersuchung der Spezifität der Amplifikation wurde in einem Vorversuch belegt, dass die gewählte Primerkombination nur ein einzelnes PCR-Produkt bildet, welches anschließend sequenziert wurde. Um auszuschließen, dass trotz des DNA-Verdaus bei der cDNA-Herstellung zurückgebliebene genomische Verunreinigungen zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals führen, wurde die Sonde über einen Exon-Intron-Übergang gelegt.

Die Auswertung der Expressionsanalyse erfolgte als relative Quantifizierung der Transkriptionshöhe von LEAP-1 in den untersuchten Geweben (2.3.6). Bei dieser Berechnungsmethode wird die Expression der Zielsequenz relativ zu einer zweiten, nicht verwandten Sequenz in Beziehung gesetzt. Im Falle von LEAP-1 wurde die Gensequenz für das Haushaltsgen (*housekeeping-Gen*) der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) genutzt.

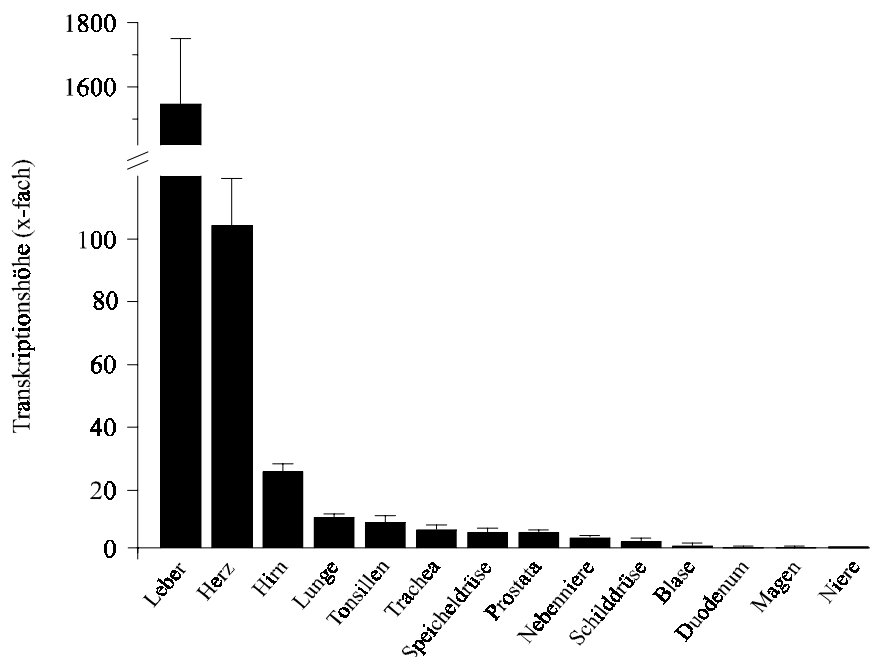


Abbildung 9: Expression von LEAP-1 in humanen Geweben. Die dargestellten Transkriptionshöhen ergeben sich nach Normalisierung der Zielsequenz auf das Haushaltsgen GAPDH und anschließendem Abgleich auf das Kalibratorgewebe Niere, dessen endogene Expression gleich 1 gesetzt wurde. Die dargestellte Standardabweichung errechnet sich aus drei jeweils in Duplika durchgeführten Experimenten.

Aus Abbildung 9 geht hervor, dass LEAP-1 überwiegend in der Leber, Herz und Hirn exprimiert wird. Die Leber als Hauptentstehungsort produziert mindestens 15-mal mehr LEAP-1-Transkripte als jedes andere getestete Gewebe. Die Expression in Herz und Hirn setzt sich wiederum in ihrer Höhe klar von den übrigen Organen ab. Eine solche, für antimikrobielle Peptide unerwartete Gewebsverteilung konnte bisher nur für das murine β -Defensin mBD-1 festgestellt werden (HUTTNER *et al.*, 1997; BALS *et al.*, 1998a). Andere Gewebe wie Lunge, Tonsillen und Trachea, deren Epithelzellen oft die unmittelbare Barriere für in der Atemluft befindliche Bakterien darstellen, zeigen eine vergleichbare, aber geringe endogene Expression von LEAP-1, während in Organen wie Niere, Magen und Duodenum kaum noch Transkripte nachzuweisen sind.

Aufgrund des Expressionsmusters, der typischen Signalpeptidstruktur (Abbildung 8) und der Existenz von LEAP-1 in Blut und Urin lässt sich vermuten, dass das Peptid primär in der Leber gebildet wird, von dort ins Blut sekretiert und letztlich renal eliminiert wird.

3.2.3 Antimikrobielle Aktivität von LEAP-1

Strukturelle Eigenheit vieler antimikrobiell aktiver Peptide ist deren amphipathischer Charakter, ein hoher Cystein-Gehalt sowie das Auftreten einer positiven Nettoladung von mindestens +2 (HANCOCK, 1997). Da die im Blut zirkulierende Form LEAP-1(60-84) diese Kriterien erfüllte, wurde mit Hilfe des Radialdiffusions-Hemmtests (2.6.1) und des Präinkubationsexperiments (2.6.2) eine mögliche antibakterielle Aktivität untersucht.

In einer ersten Versuchsreihe wurde synthetisches LEAP-1(60-84) benutzt, um im sensitiven Diffusions-Hemmtest (LEHRER *et al.*, 1991) nachzuweisen, gegen welche Keime eine dosisabhängige Aktivität zu beobachten ist. Die Verwendung von synthetischem Material war wegen der geringen Isolierungsausbeuten von LEAP-1 aus Hämofiltrat nötig, wobei allerdings beide Peptidformen in der Kapillarzonenoelektrophorese und in der HPLC identisch waren. Der Hemmtest wurde mit den grampositiven Stämmen *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* und *Staphylococcus carnosus* TM300 sowie den gramnegativen Bakterien *Escherichia coli* BL21, *Neisseria cinerea* und *Pseudomonas fluorescens* durchgeführt. Da antimikrobielle Peptide oft über ein breites Wirkungsspektrum verfügen (HANCOCK, 1997; GANZ, 1999), welches auch Pilze mit einschließt, wurden zusätzlich die beiden Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Rhodotorula mucilaginosa* (Synonym: *R. rubra*) mitgetestet. Die Ergebnisse der Radialdiffusions-Hemmtests sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Der Hemmtest deutet darauf hin, dass LEAP-1 vor allem gegen grampositive Bakterien dosisabhängig aktiv ist. Allerdings zeigen sich auch der gramnegative Keim *Neisseria cinerea* und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* empfindlich gegenüber der Behandlung mit synthetischem LEAP-1.

Tabelle 10: Antimikrobielle Aktivität von LEAP-1 im Radialdiffusions-Hemmtest.

Getesteter Keim	Aktivität von 11 µg LEAP-1 in [U]*	Aktivität von 11 µg Casocidin-I in [U]*
<i>Bacillus megaterium</i>	180 / 140	110 / 110
<i>Bacillus subtilis</i>	105 / 110	110 / 110
<i>Micrococcus luteus</i>	10 / 13	85 / 85
<i>Staphylococcus carnosus</i>	35 / 33	70 / 70
<i>Neisseria cinerea</i>	65 / 60	100 / 100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85 / 85	80 / 80
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0 / 0	60 / 60
<i>E.coli</i> BL21	0 / 0	80 / 80
<i>Rhodotorula rubra</i>	0 / 0	70 / 70

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

Die Diffusion des jeweiligen Peptids und somit auch die Größe eines möglichen Hemmhofs ist von so verschiedenen Faktoren wie aufgebrachtener Stoffkonzentration, Molekülgröße und -ladung, Wasserlöslichkeit des Moleküls, Dicke der Agarschicht und Inkubationstemperatur abhängig. Deshalb ist eine vergleichende quantitative Auswertung von Diffusionshemmtests nur bedingt möglich, auch wenn unter Idealbedingungen der Durchmesser des Hemmhofs direkt proportional zum Logarithmus der aufgetragenen Peptidkonzentration ist. Eine genauere quantitative Aussage über die Aktivität von LEAP-1 konnte deshalb erst nach Durchführung eines Präinkubationsexperiments gemacht werden. Abbildung 10 zeigt den Vergleich der beiden genannten Experimente am Beispiel des grampositiven *Bacillus subtilis*.

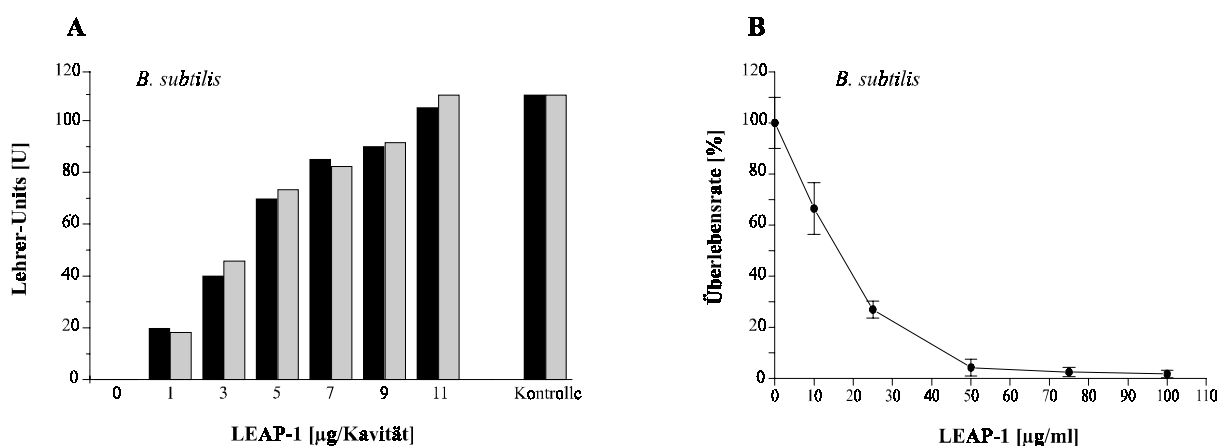


Abbildung 10: Antimikrobielle Aktivität von LEAP-1 gegen *Bacillus subtilis* ATCC6051. (A) Die Auswertung von zwei unabhängigen Hemmtest-Experimenten (schwarze/grau Balken) zeigt die dosisabhängige Wirkung von LEAP-1 gegen den grampositiven Keim. 1 Unit entspricht dabei 0,1 mm Hemmhofdurchmesser. Als Kontrolle dienten 11 µg Casocidin-I, das in seiner antimikrobiellen Aktivität dem Magainin-II ähnelt (ZUCHT *et al.*, 1998). (B) Während der Diffusions-Hemmtest nur bedingt quantitative Aussagen über die Aktivität eines Peptids zulässt, kann im CFU-Assay der IC₅₀-Wert als halbmaximale inhibitorische Konzentration eines Stoffes hinreichend genau bestimmt werden. Im hier dargestellten Experiment sind etwa 20 µg/ml LEAP-1 nötig, um 50 % des Bakterienwachstums zu hemmen. Die angegebenen Fehlerbalken beschreiben den jeweils höchsten/niedrigsten Wert der Dreifachbestimmung.

Aufgrund der schwierigen chemischen Synthese von LEAP-1 stand nur eine geringe Menge des gereinigten Peptids für eine CFU-Bestimmung zur Verfügung. Diese wurde zur Durchführung von je drei unabhängigen CFU-Bestimmungen mit *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae*, jeweils in Triplika, genutzt. Dabei ergab sich für das grampositive Bakterium ein IC_{50} -Wert von $14,4 \mu\text{M}$ ($\cong 40 \mu\text{g/ml}$) und für die Hefe ein IC_{50} von $18 \mu\text{M}$ ($\cong 50 \mu\text{g/ml}$). Die für eine Wachstumshemmung benötigte Konzentration von LEAP-1 ist also, genau wie für andere antimikrobielle Peptide, im mikromolaren Bereich anzusiedeln (GANZ, 1999; BOMAN, 2000; RISSO, 2000).

3.3 LEAP-2 (*liver-expressed antimicrobial peptide 2*)

3.3.1 Nukleinsäuresequenz von LEAP-2

Analog zur Vorgehensweise bei LEAP-1 wurde mit der Primärstruktur des aus Hämofiltrat isolierten Peptids eine tblastn-Suche durchgeführt, um einen korrespondierenden Eintrag in einer Nukleinsäuredatenbank zu erhalten. Obwohl das Peptid selbst noch in keiner Proteindatenbank hinterlegt war, konnte mehr als ein Dutzend verwandter EST-Klone (z.B. *GenBank* Acc.-No. T60528, R11462) und genomische Sequenzen (z.B. Acc.-No. AC004500, AC026794) identifiziert werden.

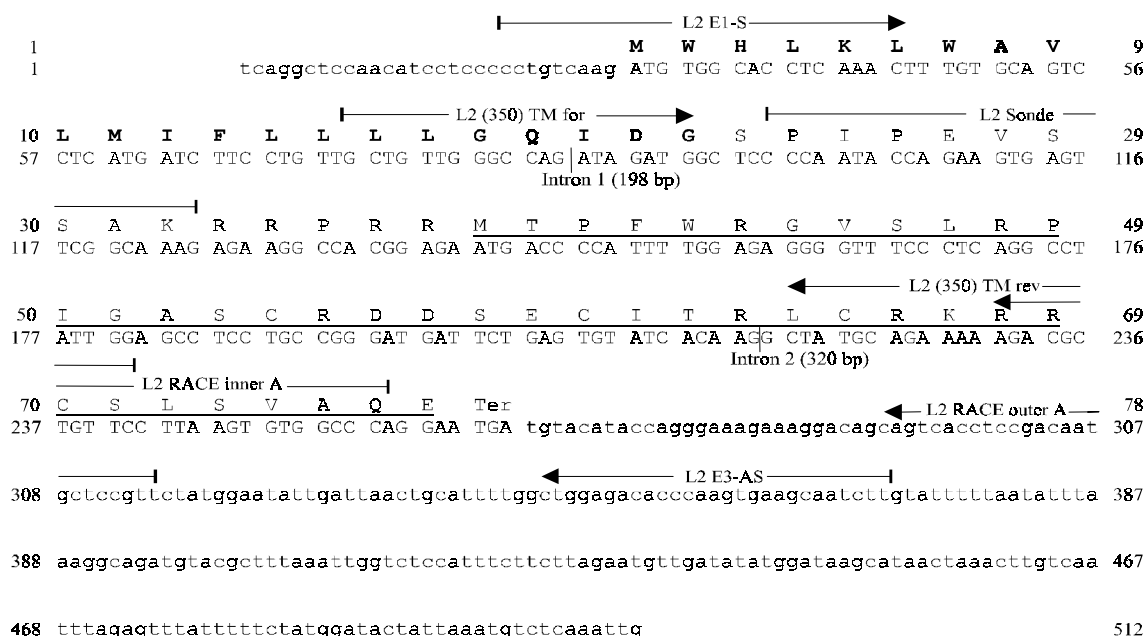


Abbildung 11: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäureabfolge von LEAP-2. Kodierende Sequenzabschnitte sind in Großbuchstaben dargestellt, die putative Signalpeptidsequenz ist fett gedruckt. Lage und Orientierung der für die Expressionsanalyse verwendeten Oligonukleotide sind mit Pfeilen angedeutet. Die aus Hämofiltrat isolierte und antimikrobiell aktive Form LEAP-2(38-77) ist genau wie das potentielle Polyadenylierungssignal unterstrichen, die Positionen der Exon-Intron-Übergänge sind angegeben. [*GenBank* Acc.-No. AJ306405]

Überraschenderweise wurden auch EST-Klone anderer Spezies wie Maus (W29825, AA238147) und Schwein (BE233297, BF078725) bei dieser Recherche gefunden. Die der aus Hämofiltrat gewonnenen Form LEAP-2(38-77) entsprechende cDNA ist in Abbildung 11 dargestellt.

3.3.2 Alternatives Spleißen generiert verschiedene LEAP-2-cDNA-Varianten

Zur Überprüfung der aus den entsprechenden Datenbankeinträgen erhaltenen cDNA-Sequenz wurde eine Standard-PCR mit dem Primerpaar L2 E1-S / L2 E3-AS (Abbildung 11) durchgeführt. Die gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte ergab ein aus 5 Signalen bestehendes, gewebsspezifisches Bandenmuster (Abbildung 12). Nach Klonierung und Sequenzierung dieser Nukleinsäuren wurde deutlich, dass es sich bei den zusätzlichen Banden um Spleißprodukte der für LEAP-2 kodierenden cDNA (im Folgenden als LEAP-2³⁵⁰ bezeichnet) handelte. Während in Leber, Niere, Dünndarm, Kolon, Antrum ventriculi und Blase LEAP-2³⁵⁰ das Haupttranskript darstellte, war LEAP-2⁵⁵⁰ in allen anderen getesteten Organen dominierend. Die LEAP-2⁵⁵⁰-Form enthielt das ungespleißte Intron 1, LEAP-2⁶⁷⁰ das ungespleißte Intron 2 und LEAP-2⁸⁶⁰ beide ehemalige Introne, und mit Ausnahme von LEAP-2⁶⁷⁰ existiert für jede Spleißvariante ein EST-Eintrag in der *GenBank* (Acc.-No. T60528, LEAP-2³⁵⁰; AF143867, LEAP-2⁵⁵⁰; AV650047, LEAP-2⁸⁶⁰). LEAP-2⁶⁷⁰ stellt insofern eine Besonderheit dar, als dass diese Variante nur in solchen Geweben zu finden war, die zugleich hauptsächlich für LEAP-2³⁵⁰ kodieren. Die in Abbildung 12 gezeigten Banden bei 480 bp und 720 bp waren temperaturinduzierte PCR-Artefakte und konnten nicht kloniert werden.

3.3.3 Identifikation von zwei Transkriptionsstartpunkten im LEAP-2-Gen

Alle Klonierungsexperimente zur Aufklärung der in Abbildung 11 gezeigten cDNA-Sequenz wurden mit Lebergewebe als Organ der höchsten Expression durchgeführt. Das Auftreten mehrerer Hybridisierungssignale mit einer LEAP-2-spezifischen Sonde im Northern Blot (KLEEMEIER, 1997) sowie ein EST-Klon (AF143867), dessen 5'-Terminus im Vergleich zur ursprünglichen Nukleotidsequenz von LEAP-2 um 230 bp verlängert war, gaben Anlass zur Suche nach 5'-terminal verlängerten LEAP-2-cDNA-Isoformen. Da bekannt war, dass verschiedene Spleißvarianten gewebsspezifisch auftreten, wurde die Untersuchung einer möglichen verlängerten LEAP-2-Isoform in Lungengewebe durchgeführt, dessen Transkriptmuster sich von dem der Leber unterscheidet. Während eine 5'-RACE-PCR mit Erststrang aus Leber genau die erwartete cDNA-Sequenz lieferte, konnte in Lungengewebe schrittweise eine 1856 bp lange cDNA amplifiziert werden, deren 5'-Ende 1345 bp vor dem ursprünglichen Transkriptionsstart lag (Acc.-No. AJ409065). 76 bp stromaufwärts von dieser im Weiteren als distaler Promotor bezeichneten Sequenz lag ein TATATA-Signal, und die Gesamtlänge der cDNA korrelierte gut mit dem 2,0 kb-Signal im Northern Blot (KLEEMEIER,

1997). Auffällig war, dass Standard-PCRs mit Primern, die in dieser distalen Promotorregion lokalisiert waren (z.B. L2 PROM-S), teilweise ein anderes Bandenmuster lieferten als PCR-Ansätze mit Oligonukleotiden, die im Exon 1 hybridisierten (z.B. L2 E1-S, Abbildung 12).

Die zwei wesentlichen Unterschiede zwischen den genannten Ansätzen liegen darin, dass einerseits der distale Promotor immer für eine Intron 1-enhaltene Form als Hauptprodukt kodiert, während in der kürzeren LEAP-2-Isoform entweder LEAP-2³⁵⁰ oder LEAP-2⁵⁵⁰ dominierend sind. Andererseits konnte bei Verwendung des stromaufwärts gelegenen Senseprimers PROM-S in keinem Fall ein Transkript sequenziert werden, welches das ungespleißte Intron 2 enthielt. Dies beweist gleichzeitig, dass es sich bei den erhaltenen Amplifikaten nicht um eine genomische Verunreinigung handeln kann. Analog zu den Banden bei 480 bp und 720 bp in Abbildung 12A stellen die Banden bei etwa 1100 bp und 1250 bp in Abbildung 12B PCR-Artefakte dar.

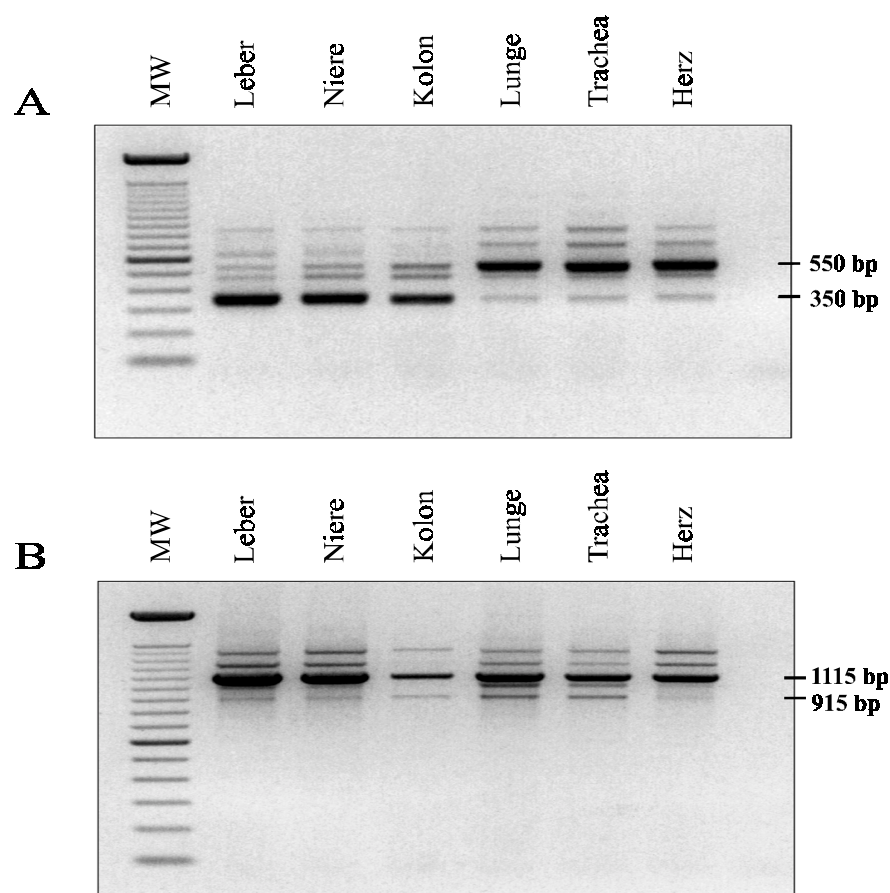


Abbildung 12: Identifikation von alternativen Spleißprodukten des LEAP-2-Gens. (A) Gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte einer Standard-PCR, durchgeführt mit den Primern E1-S und E3-AS. Je nach Gewebe wird entweder LEAP-2³⁵⁰ oder LEAP-2⁵⁵⁰ als Haupttranskript nachgewiesen. Die Banden bei 550 bp, 670 bp und 860 bp entsprechen alternativen Spleißprodukten, das Signal bei 480 bp ist ein PCR-Artefakt. (B) Standard-PCR mit den Primern Prom-S und E3-AS. Prom-S liegt 565 bp stromaufwärts von E1-S und ist somit für die entsprechende Größenverschiebung der PCR-Produkte verantwortlich. Auffällig ist, dass das Haupttranskript in Leber, Niere und Kolon nun nicht mehr LEAP-2³⁵⁰, sondern der nur teilweise gespleißten Variante LEAP-2⁵⁵⁰ entspricht. (MW = 100 bp-DNA-Leiter, Life Technologies).

3.3.4 Nachweis eines PCR-Artefaktes bei der Amplifikation von LEAP-2

Die in der gelelektrophoretischen Auftrennung einer LEAP-2-Standard-PCR auftretende Bande bei 480 bp (LEAP-2⁴⁸⁰) konnte trotz mehrerer Ansätze nicht kloniert werden. Da dieses Signal zudem immer nur in Gegenwart von LEAP-2³⁵⁰ und LEAP-2⁵⁵⁰ zu detektieren war, wurde vermutet, dass es sich um ein PCR-Artefakt handelte. Dieses wurde durch den nachstehend beschriebenen Versuch bewiesen.

Die cDNA-Sequenzen von LEAP-2³⁵⁰ und LEAP-2⁵⁵⁰ wurden mit den Restriktionsendonukleasen Sac-I und Sac-II aus Minipräparationen der entsprechenden rekombinanten Plasmid-DNA reisoliert. Dazu wurden ca. 2 µg DNA mit je 1,5 U Sac-I und Sac-II über 16 h bei 37 °C verdaut. Die cDNAs von LEAP-2³⁵⁰ und LEAP-2⁵⁵⁰ wurden in 2 PCR-Reaktionsgefäßen vereinigt und einer dieser gepoolten Ansätze wurde ohne Zugabe weiterer Substanzen über 3 Zyklen mit dem Temperaturprogramm einer Standard-PCR (2.2.2) behandelt. Nach anschließender Trennung der Nucleinsäuren in einem 2 %igen Agarosegel war die 480 bp-Bande nur in dem temperaturbehandelten Ansatz nachzuweisen.

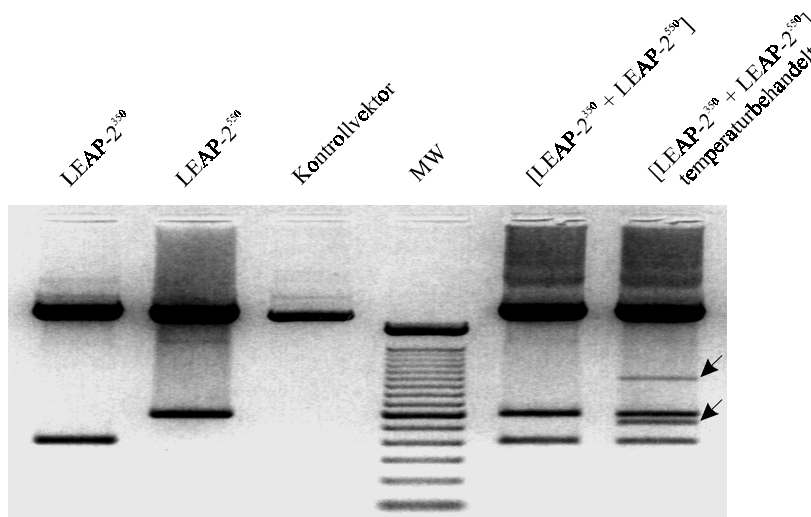


Abbildung 13: Nachweis eines PCR-Artefaktes in der LEAP-2 Standard-PCR. Spalte 1+2 (v.l.n.r.): reisiolierte cDNA aus dem pGEM-T-Vektor. Spalte 3: leerer Vektor, der zur Kontrolle parallel mitverdaut wurde. Spalte 5: gepoolte cDNAs aus Spalte 1+2 ohne weitere Behandlung. Spalte 6: Ansatz wie in Spalte 5, nachträglich mit dem Temperaturprogramm einer Standard-PCR über 3 Zyklen behandelt. Die im Vergleich zur Spalte 5 zusätzlich auftretenden Banden stellen temperaturbedingte Artefakte in der PCR dar. Die Länge der Sequenzen ergibt sich aus der ursprünglichen Länge der cDNA und dem Abstand der Erkennungssequenzen von Sac-I und Sac-II in der Polylinkerregion des Vektors (48 bp). Als Größenstandard (MW) diente die 100 bp-DNA-Leiter der Fa. Life Technologies.

3.3.5 Identifikation von LEAP-2-Homologen in verschiedenen Spezies

Bei der Datenbankrecherche nach für LEAP-2 kodierenden Nucleinsäuresequenzen wurden auch einige Klone nicht-humanen Ursprungs identifiziert, die große Ähnlichkeit mit den humanen Sequenzen aufwiesen. Durch Kombination sich überlappender EST-Klone konnten für Maus (W29825, W82161) und Schwein (BE233297, BF078725) cDNA-Sequenzen konstruiert

werden, die jeweils ein vollständiges offenes Leseraster für LEAP-2 enthielten. Darüber hinaus konnte unter Verwendung des Primerpaares pre-L2 E1-S / L2 E3-AS (2.1.4), das eigentlich zur spezifischen Amplifikation der humanen LEAP-2-Formen dienen sollte, auch PCR-Produkte aus cDNA von Rind und Meerschweinchen sowie aus genomischer DNA vom Rhesusaffen gewonnen werden. Die sich aus den klonierten Nukleinsäuresequenzen ergebenden Aminosäureabfolgen sind in Abbildung 14 dargestellt.

<i>Homo sapiens</i>	<u>MWHLKLC</u> AVLMIFLLLLGQIDGSP ¹ PIPEVSSAKRRPRR-MTPFWRGVS ² LRPIGASCRDDSECITRLCKRRRC ³ SLSVAQE
<i>Macaca mulatta</i>	<u>MWHLKLC</u> AVLMIFLLLLGQTDGSP ¹ PIPEVSSAKRRPRR-MTPFWRGVS ² LRPIGASCRDDSECITRLCKRRRC ³ SLSVAQE
<i>Bos taurus</i>	<u>MWHLKLF</u> AVLMICLLLLAQVDGSP ¹ PQQSSAKRRPRR-MTPFWR ⁴ AVSLRPIGASCRDDSECITRLCKRRRC ³ SLSVAQE
<i>Sus scrofa</i>	<u>MWHLKLF</u> AVLVICLLLA ⁵ VQVHGSP ¹ PELSSAKRRPRR-MTPFWR ⁴ AVSLRPIGASCRDDSECITRLCKRRRC ³ SLSVAQE
<i>Mus musculus</i>	<u>MLQLKLF</u> AVLLTCLLLLGQVNS ¹ SPVPEVSSAKR-SRR-MTPFWRGVS ² LRPIGASCRDDSECITRLCKRRRC ³ SLSVAQE
<i>Cavia porcellus</i>SVLLICLLLLGQVDGSP ¹ PEKSSVKKRLRR-MTPFWRGVS ² LRPIGASCRDDSECITRLCKRRRC ³ SLSVAQE

Abbildung 14: Gegenüberstellung von LEAP-2-Homologen aus verschiedenen Wirbeltieren. Die dargestellten Aminosäuresequenzen wurden aus Nukleinsäuresequenzen abgeleitet, die aus Gewebe von Rhesusaffe, Rind, Schwein, Maus und Meerschweinchen amplifiziert wurden. Die putativen reifen Peptide sind mit einem Bindestrich von der jeweiligen Präproform abgetrennt, von der humanen LEAP-2-Form abweichende Aminosäuren sind fett gedruckt. Unterstrichene Aminosäuren repräsentieren die von der Signal P V2.0-Software vorgeschlagene Signalpeptidstruktur. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen wurden in *GenBank* hinterlegt.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, sind die vorhergesagten LEAP-2-Homologen aus Maus und Rhesusaffen identisch mit der aus Hämofiltrat isolierten Struktur, während in den anderen Spezies eine oder zwei Aminosäuren abweichen. Zudem werden Aminosäuren immer gegen chemisch ähnliche Bausteine ersetzt, wie z.B. beim Austausch des basischen Arginins gegen das ebenfalls basische Lysin im Meerschweinchen. Auffällig ist weiterhin das in allen Peptiden konservierte Motiv [R-X-(K/R)-R], welches der Proprotein-Konvertase Furin als Erkennungssequenz dient (NAKAYAMA, 1997), sowie das in allen Fällen streng konservierte Cysteinmuster.

3.3.6 Endogene Expression von LEAP-2 in humanen Geweben

Die Transkriptionshöhe von LEAP-2 in 16 verschiedenen humanen Geweben wurde analog zu den Untersuchungen mit LEAP-1 durchgeführt (3.2.2). Die für die Expressionsanalyse genutzten Primer und Sonden sind der Tabelle 2 bzw. der Abbildung 11 zu entnehmen, wobei die Sonde und der reverse Primer für beide zu untersuchenden LEAP-2-Formen identisch waren. Im Unterschied zur relativen Quantifizierung von LEAP-1 wurde den beiden Haupttranskripten LEAP-2³⁵⁰ und LEAP-2⁵⁵⁰ in diesem Assay als Ergebnis eine Startkopienzahl zugeordnet. Dazu musste, wie in 2.3.6 beschrieben, die als Basis der Quantifizierung dienende Standardkurve aus Proben bekannter LEAP-2-Kopienzahl bestehen. Aufgrund der mit steigender Amplikonlänge deutlich abnehmenden Amplifikationseffizienz und der daraus resultierenden maximal

zulässigen Amplikonlänge von 200 bp (SCHILD, 1996) ist es im *TaqMan*-System nicht möglich, die vom distalen Promotor kodierten Transkripte zu quantifizieren. Demnach ist es möglich, dass das Primer-Sonde-System zur Quantifizierung von LEAP-2^{350/550} auch die entsprechenden LEAP-2^{915/1115}-Formen miterfasst (Abbildung 12), da ja beide Transkripte ein jeweils identisches 3'-Ende aufweisen. Allerdings kann man davon ausgehen, dass der Anteil des distalen Promotors an einer vollständig gespleißten und somit für das isolierte Peptid kodierenden cDNA zumindest in den sieben LEAP-2³⁵⁰-dominierten Geweben (Leber, Niere, Duodenum, Jejunum, Kolon, Blase und Antrum ventriculi) eher gering ist und dass LEAP-2(38-77) hauptsächlich vom proximalen Promotor kodiert wird. Diese Abschätzung kann unter Berücksichtigung der Signalintensitäten der einzelnen Transkripte in einer Standard-PCR getroffen werden. So kodiert der distale Promotor weit weniger für ein komplett prozessiertes Transkript (LEAP-2⁹¹⁵) als für sein Intron 1-enhaltendes Hauptprodukt LEAP-2¹¹¹⁵ (Abbildung 12). Gleichzeitig ist aber die Gesamtheit aller mit dem *TaqMan* erfassten Transkripte, die das erste Intron enthalten, in den LEAP-2³⁵⁰-dominierten Geweben deutlich geringer als die Anzahl der vollständig gespleißten Variante (Abbildung 16).

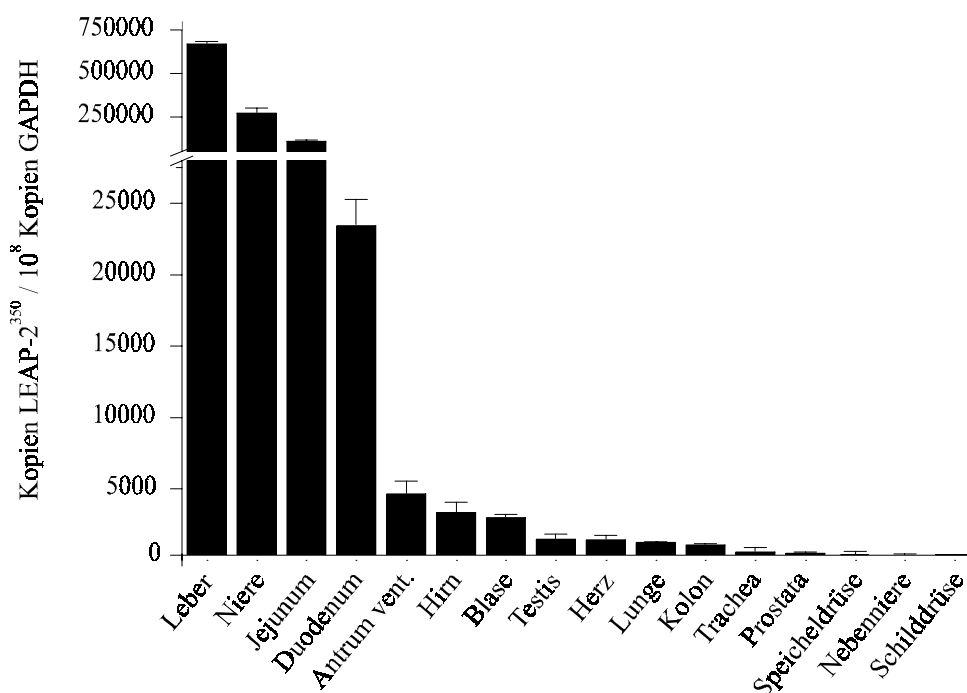


Abbildung 15: Endogene Expression von LEAP-2³⁵⁰ in humanem Gewebe. Die Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve, die aus Verdünnungsstufen eines LEAP-2³⁵⁰-Referenzplasmids mit bekannter Kopienzahl erstellt wurde. Transkriptionsraten können deshalb als Kopienzahl der Zielsequenz pro 10⁸ Kopien GAPDH dargestellt werden, was den direkten Vergleich mit der Expression des zweiten Haupttranskripts LEAP-2⁵⁵⁰ (Abbildung 16) erlaubt. Die angegebene Standardabweichung errechnet sich aus den Werten zweier unabhängiger Experimente, die jeweils in Duplika durchgeführt wurden.

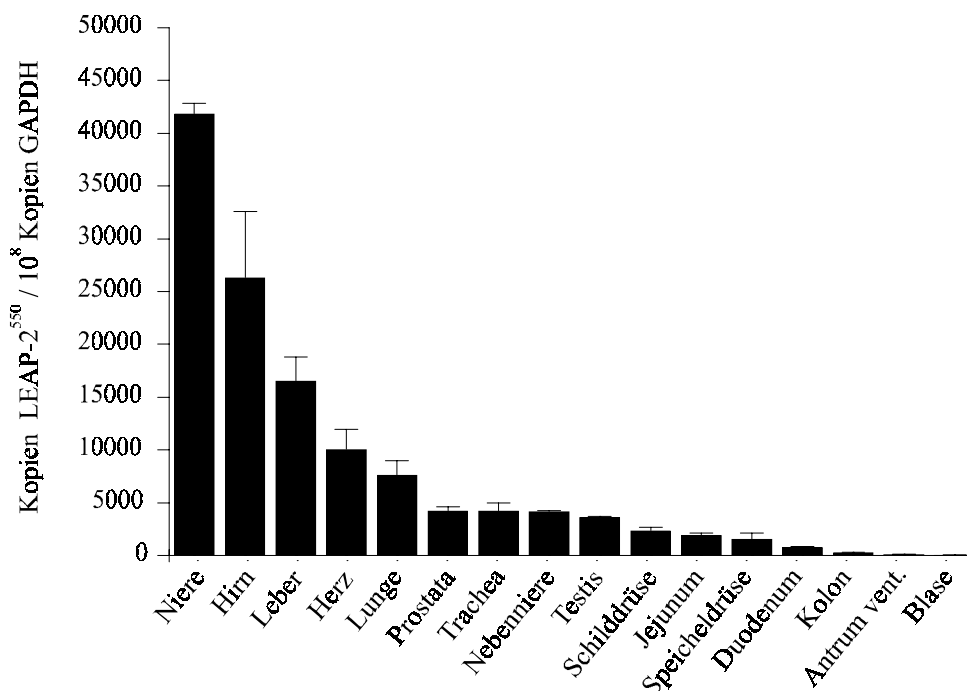


Abbildung 16: Endogene Expression von LEAP-2⁵⁵⁰ in humanem Gewebe. Zur Berechnung der angegebenen Werte und Standardabweichungen vgl. Abbildung 15.

Wie aus den obigen Abbildungen ersichtlich, dominiert die für die isolierte Aminosäuresequenz kodierende cDNA in sieben von sechzehn analysierten Geweben. Das Verhältnis von LEAP-2³⁵⁰ zu LEAP-2⁵⁵⁰ variiert dabei von 80:1 in Blase bis 4:1 in Kolon, wobei die absolute Zahl der Transkripte unter Annahme gleichbleibender GAPDH-Expression in Leber, Niere und den Dünndarmabschnitten am höchsten sind. Auffälligerweise ist das Verhältnis der beiden untersuchten cDNA-Isoformen in keinem Gewebe ausgeglichen, d.h. die jeweils dominierende Form ist immer mindestens im vierfachen Überschuss exprimiert.

3.3.7 Antimikrobielle Aktivität von LEAP-2

Da LEAP-2 genau wie LEAP-1 ein cysteinreiches zirkulierendes Peptid mit einer positiven Nettoladung ist, wurde es ebenso wie das zuvor untersuchte LEAP-1 in antimikrobiellen Assays auf eine mögliche biologische Aktivität getestet. Bis auf LEAP-2(44-77) konnten alle in Tabelle 9 aufgeführten Peptidformen nur in analytischen Mengen aus Hämofiltrat isoliert werden. Deshalb sind die im Folgenden beschriebenen Versuche entweder mit nativem LEAP-2(44-77) oder mit synthetischem LEAP-2(38-77) durchgeführt worden, wobei sich Letzteres als chemisch identisch zur nativen Form erwies, was über Komigration in der Kapillarzonelektrophorese und über Koelution in der HPLC nachgewiesen wurde.

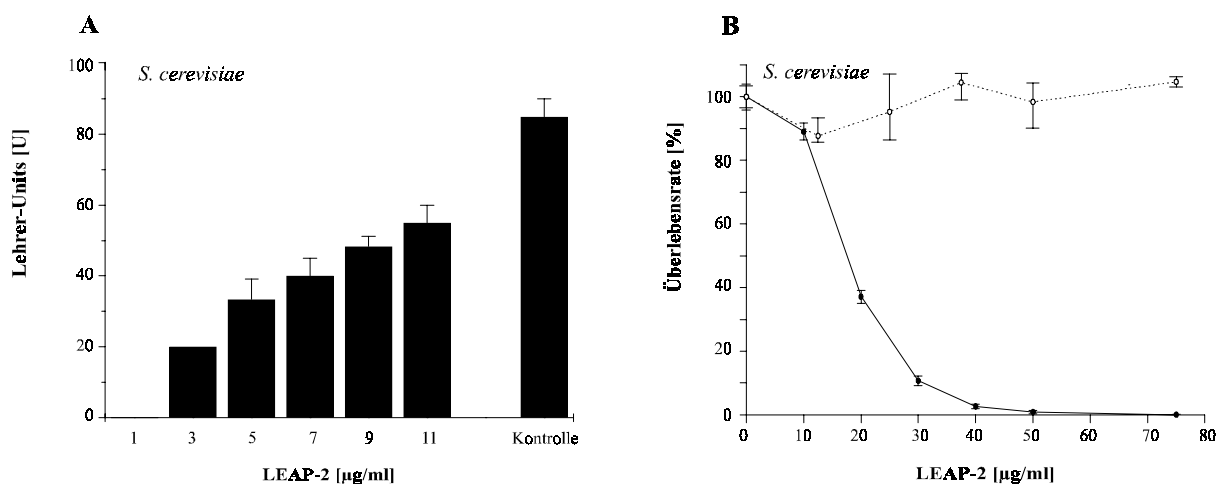


Abbildung 17: Antimikrobielle Aktivität von LEAP-2 am Beispiel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763. (A) LEAP-2(38-77) zeigt im Radialdiffusions-Hemmtest eine dosisabhängige Aktivität gegen *S. cerevisiae*. Die angegebene Standardabweichung wurde aus den Resultaten von drei unabhängigen, jeweils in Duplika durchgeführten Experimenten berechnet. Als Kontrolle dienten auch hier 11 µg Casocidin-I. (Abbildung 10). (B) Präinkubationsexperimente mit LEAP-2(38-77) (●) und dem ebenfalls aus Hämofiltrat isolierten LEAP-2(44-77) (○). Eine halbmaximale Hemmung des Hefewachstums wurde mit 20 µg/ml LEAP-2(38-77) erreicht, was einem IC_{50} -Wert von etwa 5 µM entspricht. Im Gegensatz dazu zeigte LEAP-2(44-77) weder im Diffusionstest noch im CFU-Assay Aktivität gegenüber *S. cerevisiae*. Die angegebenen Fehlerbalken beschreiben den jeweils höchsten/niedrigsten Wert der dargestellten Dreifachbestimmung.

Die antimikrobielle Aktivität von LEAP-2(38-77) gegen *B. subtilis* und *S. cerevisiae* wurde exemplarisch sowohl im Radialdiffusions-Hemmtest (RDH) als auch im CFU-Assay untersucht. Darüber hinaus wurde der sensitive RDH (LEHRER *et al.*, 1991) genutzt, um weitere sieben Bakterienstämme auf ihre Empfindlichkeit gegenüber LEAP-2(38-77) und LEAP-2(44-77) zu testen. Während das letztgenannte in keinem Fall zu einer Inhibition des Wachstums führte, konnte für LEAP-2(38-77) eine Aktivität vor allem gegen grampositive Bakterien nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass LEAP-2(38-77) und LEAP-1(60-84) ein nahezu identisches Aktivitätsspektrum aufweisen (Tabelle 10 und Tabelle 11).

Tabelle 11: Antimikrobielle Aktivität von LEAP-2 im Radialdiffusions-Hemmtest.

Bakterienstamm	Gramfärbung	Aktivität von 11 µg LEAP-2 in [U]*
<i>Bacillus megaterium</i>	+	83 ± 10,6**
<i>Bacillus subtilis</i>	+	72 ± 4,3
<i>Micrococcus luteus</i>	+	20 ± 2,3
<i>Staphylococcus carnosus</i> TM300	+	55 ± 5,0
<i>Neisseria cinerea</i>	-	49 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i> BL21	-	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	55 ± 5,0
<i>Rhodotorula rubra</i>	Hefe	21 ± 8,0

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

** Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten

3.4 hBD-4 (Humanes β -Defensin 4)

3.4.1 Computergestützte Identifizierung des hBD-4-Gens

Die in 2.10.2 beschriebene systematische Suche nach dem Gen eines neuen humanen β -Defensins führte zur Identifikation von vier genomischen Contigs, die das Gen des bislang unbekanntes hBD-4 enthielten. Alle Datenbankeinträge waren kurz zuvor von am Humanen Genomprojekts (HUGO) beteiligten Instituten erstellt und publiziert worden. Aus den drei identischen Sequenzen AF202031 (Pos. 71867-76662), AF285443 (Pos. 21932-26727) und AF252830 (Pos. 14366-19161) wurden anschließend Oligonukleotidprimer abgeleitet, mit deren Hilfe die vollständige hBD-4-cDNA kloniert und sequenziert werden konnte (Abbildung 18). Das hBD-4-Gen kodiert für 2 Exone, die von einem 4495 bp langen Intron getrennt werden (Acc.-No. AJ314835). Da die drei veröffentlichten Gensequenzen identisch waren, wurde auf die nachträgliche, eigenhändige Sequenzierung des Introns verzichtet. Andererseits ergab der Sequenzvergleich von 12 unabhängigen cDNA-Klonen einen Polymorphismus an Position 42, welche je sechsmal mit Adenosin oder Guanin besetzt war. Der Austausch dieser Nukleotide hätte zur Folge, dass das in Abbildung 18 dargestellte Valin als 10. Aminosäure des Signalpeptids durch Isoleucin ersetzt werden würde.

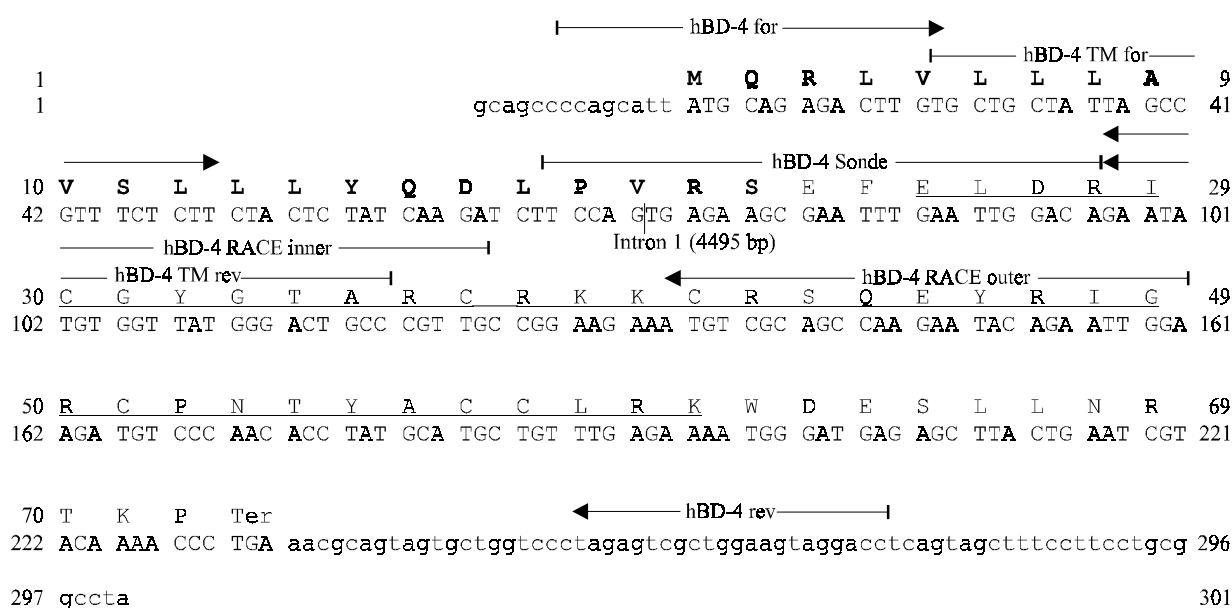


Abbildung 18: cDNA-Sequenz und abgeleitete Primärstruktur von hBD-4. Kodierende Sequenzabschnitte sind in Großbuchstaben dargestellt, das putative Signalpeptid ist fett gedruckt. Lage und Orientierung aller für Klonierung und Expressionsanalyse benötigten Oligonukleotide sind angegeben. Die Aminosäuresequenz des für die Bioassays genutzten synthetischen hBD-4 ist unterstrichen und die Position des Introns ist angegeben. [GenBank Acc.-No. AJ314834]

3.4.2 Endogene Expression von hBD-4 in humanen Geweben

Die quantitative Untersuchung der hBD-4-Genexpression wurde analog zu dem in 3.3.6

beschriebenen Verfahren durchgeführt und ausgewertet. Als endogene Amplifikationskontrolle dienten die Haushaltsgene GAPDH und ribosomale 18S-RNA. Die Sequenzen aller für den Echtzeit-PCR-Assay benötigten Oligonukleotide sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Im Gegensatz zu LEAP-1 und LEAP-2, deren Transkripte in jeweils allen untersuchten Organen nachzuweisen waren, konnte hBD-4 nur in 7 von 25 Geweben detektiert werden. Während neutrophile Granulozyten, Niere oder Uterus schon mehrfach als Expressionsort antimikrobieller Peptide beschrieben wurden, ist die Expression in Hoden, Cerebellum und Skelettmuskel bemerkenswert.

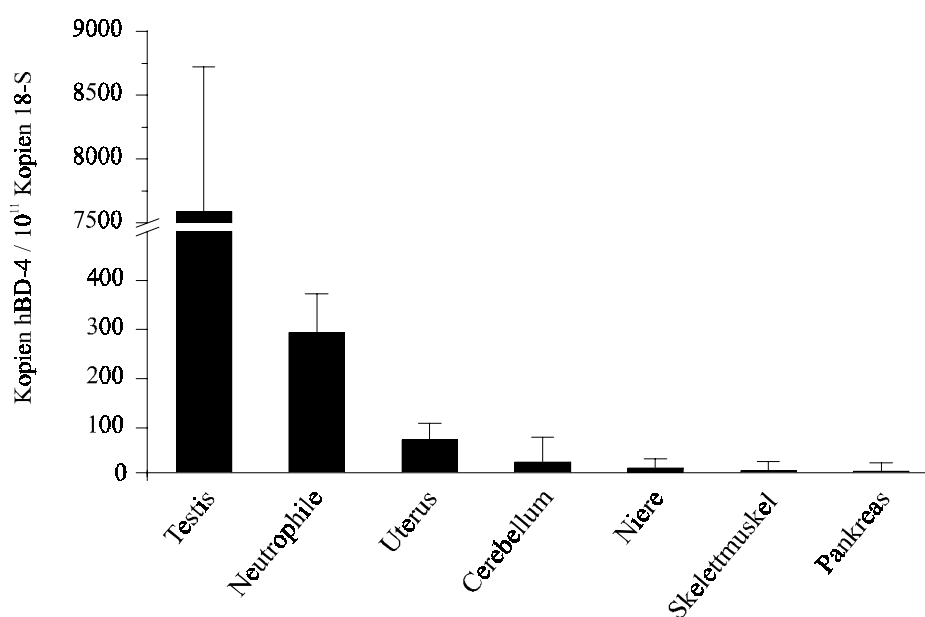


Abbildung 19: Endogene Expression von hBD-4 in humanen Geweben. Zur Berechnung der angegebenen Werte vgl. Abbildung 15. Fehlerbalken wurden aus zwei unabhängigen, in Triplika durchgeführten Experimenten berechnet. Die hohe Standardabweichung in Cerebellum, Niere, Skelettmuskel und Pankreas deuten daraufhin, dass die Transkriptzahl in diesen Geweben nahe am Detektionslimit des *TaqMan*-Assays liegt.

3.4.3 Untersuchung der hBD-4-Expression in Testis

Transkripte antimikrobieller Peptide werden vor allem in Schleimhäuten und Leukozyten erwartet, da diese oft in direktem Kontakt zu eindringenden Bakterien stehen (MALLOW *et al.*, 1996; LEHRER und GANZ, 1999; RISSO, 2000). Allerdings zeigen aktuelle Publikationen (MALM *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001; FRÖHLICH *et al.*, 2001), dass antimikrobielle Peptide und insbesondere Defensin-ähnliche Strukturen spezifisch im Nebenhoden unterschiedlicher Spezies exprimiert werden. Deshalb sollte geklärt werden, ob die hohe Anzahl von hBD-4-Transkripten im untersuchten Gesamthoden (Total-RNA von Clontech, Heidelberg) auf eine Epididymis-spezifische Expression von hBD-4 zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden aus Orchiektomien stammenden Geweben 6 definierte Bereiche (Testis, Rete testis, Caput epididymis, Corpus epididymis, Cauda epididymis und Ductus deferens) herauspräpariert und zur Gewinnung von Total-RNA genutzt. Insgesamt wurden Biopsien von 4 Patienten im

Echtzeit-PCR-Assay auf Expression von hBD-4 untersucht. Die Auswertung des Experiments in Abbildung 20 zeigt deutlich, dass hBD-4 in allen 3 Teilen des Nebenhodens transkribiert wird, während die übrigen Regionen kaum Expression zeigen. Trotz teilweise hoher interindividueller Schwankungen kann Corpus epididymis als der Ort der höchsten hBD-4-Expression bezeichnet werden.

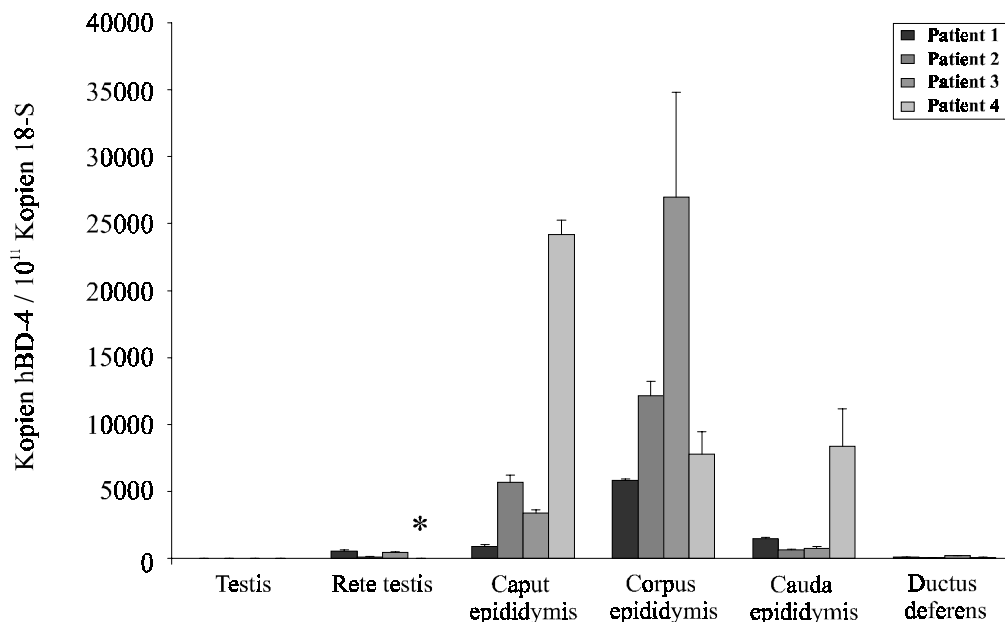


Abbildung 20: Endogene Expression von hBD-4 in Hoden und Nebenhoden. Die Standardabweichungen ergeben sich aus zwei in Duplika bzw. Tripliaka durchgeführten Experimenten. * Von Patient 4 wurde kein Rete testis präpariert, da diese Region im Gegensatz zu den anderen Patienten von Tumorgewebe durchzogen war. Die hier untersuchten Gewebeproben stammen aus Orchiektomien bei Hodentumoren und wurden von Herrn Prof. Dr. C. Stief von der urologischen Abteilung der MHH anonymisiert zur Verfügung gestellt.

3.4.4 Stimulation der hBD-4-Expression *in vitro*

3.4.4.1 Stimulation der hBD-4-Expression durch pathogene Bakterien

Die Expressionsanalyse von hBD-4 in Lungenepithelzellen aus der *air/liquid interface*-Kultur zeigt, dass hBD-4 in diesen Zellen verhältnismäßig hoch exprimiert wird, obwohl in derselben Analyse mit cDNA aus Gesamtlunge keine Transkripte nachgewiesen wurden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass hBD-4 selektiv im Bereich der bronchialen Epithelzellen exprimiert wird. Der Einfluss der zugegebenen Bakterienzellen auf die Transkriptionsrate von hBD-4 ist in Abbildung 21 dargestellt. So wurde die basale Expression von hBD-4 in den Epithelzellen durch Stimulation mit hitzeinaktivierten Pseudomonaden verdoppelt, während die Inkubation mit 10^4 bzw. 10^6 koloniebildenden Einheiten *Pseudomonas aeruginosa* zur einer Erhöhung um den Faktor 1,5 bzw. 3,3 führte. Nach Zugabe von 10^6 Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) konnte eine 7-fache Induktion nachgewiesen werden. Parallel zu hBD-4 wurde die Expression von hBD-2 untersucht, dessen Induzierbarkeit durch *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (HARDER

et al., 2000) bestätigt werden konnte. Durch den Abgleich der endogenen Expression der Defensine auf eine Kopienzahl des Haushaltsgens (2.3.6) ist es möglich, die Transkriptionsraten von hBD-2, hBD-3 und hBD-4 in differenzierten Lungenepithelzellen direkt miteinander zu vergleichen. hBD-2 ist dabei etwa 1000-fach höher exprimiert als hBD-4 und etwa 10.000-fach höher als hBD-3.

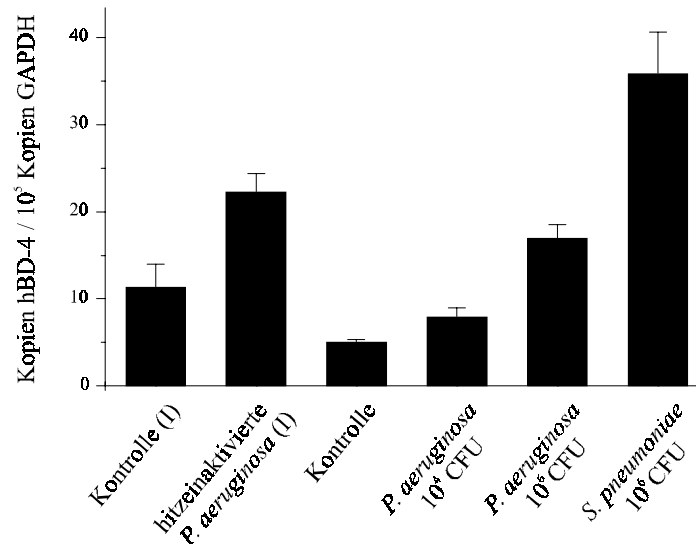


Abbildung 21: Stimulation der Transkription von hBD-4 in humanen Lungenepithelzellen durch Inkubation mit pathogenen Bakterien. Bei der Zugabe von hitzeinaktivierten bzw. vermehrungsfähigen Keimen handelt es sich um verschiedene Experimente, so dass zwei Kontrollen nötig waren. Die angegebene Standardabweichung berechnet sich aus n=4 Einzelwerten.

3.4.4.2 Stimulation der hBD-4-Expression durch Phorbol-12-myristat-13-acetat

Nachdem die Induktion von hBD-4 durch Bakterien nachgewiesen werden konnte (3.4.4.1), sollte anschließend untersucht werden, ob eine solche Stimulation auch über proinflammatorische Agenzien zu erreichen ist. Wegen der aufwendigen Haltung der primären Bronchialepithelzellen in der *air/liquid interface*-Kultur wurden alle weiteren Stimulationen an

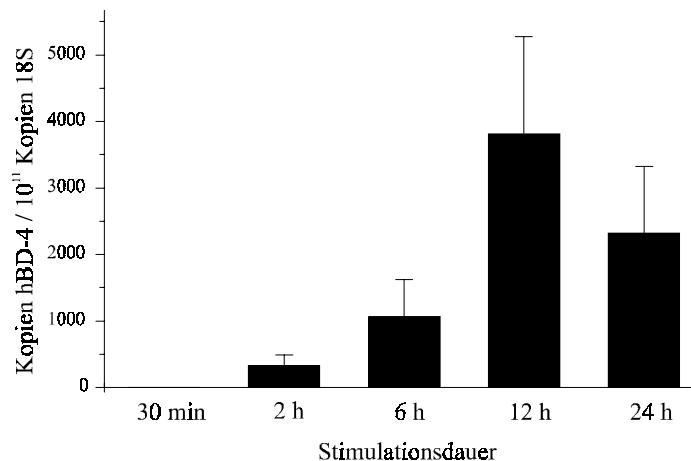


Abbildung 22: Induktion der endogenen Expression von hBD-4 in SAEC 6043-Zellen durch Phorbol-12-myristat-13-acetat. Die angegebenen Fehlerbalken errechnen sich aus n=6 Einzelwerten.

Zelllinien durchgeführt. Dabei blieb unberücksichtigt, ob die untersuchte Kultur basale hBD-4-Expression zeigte oder nicht, da eine endogene Expression von β -Defensinen in Geweben oder Zellkulturen oft erst nach Stimulation messbar wird (O'NEIL *et al.*, 1999; BALS *et al.*, 1999a). Während in NCI H 720-, NCI N 417- und HaCaT-Zellen selbst nach Inkubation mit IL-1 α , IL-6, TNF- α , Interferon γ , Lipopolysaccharid (LPS) oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) keine hBD-4-Transkripte nachweisbar waren, konnte hBD-4 durch PMA-Stimulation in SAEC 6043-Zellen induziert werden. Die Höhe der hBD-4-Transkription in diesen primären Epithelzellen der unteren Atemwege war abhängig von der Stimulationszeit und erreichte ihr Maximum nach etwa 12 h (Abbildung 22).

3.4.5 Antimikrobielle Aktivität von hBD-4

3.4.5.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MIC) ist neben dem Radialdiffusions-Hemmtest und dem CFU-Assay eine dritte Methode zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität eines Stoffes. Der MIC-Wert stellt dabei den üblicherweise in der Literatur angegebenen Referenzwert für die antimikrobielle Wirksamkeit einer Substanz dar. Aufgrund der Abhängigkeit des MIC von Parametern wie Größe des bakteriellen Inokulums oder Art bzw. Ionenstärke des genutzten Mediums sind die Versuchsbedingungen beim Vergleich von MIC-Werten immer zu berücksichtigen. So unterscheiden sich auch die experimentell ermittelten MIC-Werte (Tabelle 12) je nach verwendetem Testmedium stark voneinander. Analog zu der in 3.4.5.3 beschriebenen Salzabhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von hBD-4 sind die MIC-Werte im ionenstärkeren Müller-Hinton-Broth (MHB) generell höher als im Tryptic-Soy-Broth (TSB). Außerdem zeigt sich für hBD-4, wie bereits in der Literatur beschrieben (TURNER *et al.*, 1998), dass die Salzabhängigkeit einer antimikrobiellen Aktivität bei unterschiedlichen Keimen verschieden stark ausgeprägt ist.

Tabelle 12: Minimale Hemmkonzentrationen von hBD-4 gegen pathogene und nicht-pathogene Keime.

Bakterienstamm	Gramfärbung	MIC _{TSB} [$\mu\text{g/ml}$]*	MIC _{MHB} [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Staphylococcus carnosus</i> TM300	+	4,6	145
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+	64	128
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC33400	+	192	> 192
<i>Escherichia coli</i> BL21	-	125	n.b.
<i>Escherichia coli</i> DSM 1103	-	64	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM681	-	128	>192
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	-	128	4,1**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1128	-	128	> 192
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC9763	Hefe	125	n.b.

* 4,37 $\mu\text{g/ml} \cong 1 \mu\text{M}$

** Bestimmung in $\frac{1}{4}$ MHB-Medium

Die von HANCOCK (1997) beschriebene Größenordnung von 1-8 µg/ml als akzeptable MIC-Werte für klinisch relevante kationische Peptide wird nur in 2 Fällen erreicht. Außerdem sind die minimalen Hemmkonzentrationen für parallel getestetes MBI-28 (GOUGH *et al.*, 1996) in allen Fällen mindestens um den Faktor 6 geringer als die von hBD-4 (z.B. 10,6 vs. 64 für *Staphylococcus aureus* oder 5,3 vs. 64 für *E. coli* DSM 1103). hBD-4 ist also als eine relativ schwach antimikrobiell aktive Substanz einzuordnen.

3.4.5.2 Interaktion von hBD-4 mit anderen antibiotischen Substanzen

Im Unterschied zu den antimikrobiellen *in vitro*-Assays kann eine getestete Substanz *in vivo* neben anderen antibiotisch wirksamen Stoffen vorliegen. Diese zusätzlichen Stoffe können entweder parallel vom Organismus synthetisiert werden (LEVY, 2000; DIAMOND *et al.*, 2000), oder als appliziertes Arzneimittel in den Körper gelangen. Die Untersuchung von Interaktionen zwischen hBD-4 und anderen antibiotischen Substanzen wie körpereigenem Lysozym oder Ampicillin soll Hinweise darauf geben, ob und wie sich diese Substanzen in ihrer antimikrobiellen Aktivität beeinflussen. Die Ergebnisse des zur Beurteilung einer Interaktion durchgeführten FIC-Assays sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Interaktion zwischen hBD-4 und verschiedenen Antibiotika gegen *S. carnosus*.

Getestete Substanz	FIC-Index *	Interaktionstyp
Lysozym	< 0,5	Synergismus
Ampicillin	1	Additivität / Indifferenz

* Zur Berechnung des FIC-Indexes s. Absatz 2.6.4

3.4.5.3 Einfluss der Mediensalzkonzentration auf die antimikrobielle Aktivität

Die Aktivität vieler antimikrobieller Peptide ist abhängig von der Salzkonzentration des Testmediums. So ist die Aktivität vieler Peptide in Puffern niedriger Ionenstärke gut messbar, während sie unter Verwendung physiologischer Salzkonzentrationen nicht mehr wachstumshemmend wirken (BALS *et al.*, 1998a; VALORE *et al.*, 1998; TURNER *et al.*, 1998). Obwohl einige Autoren vermuten, dass salzsensitive Peptide unter *in vivo*-Bedingungen keine Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern spielen (VAN 'T HOF *et al.*, 2001), ist dieser Punkt bisher nicht belegt worden. Die Bestimmung des MIC-Wertes von hBD-4 gegen *Staphylococcus carnosus* TM300 bei steigender Mediumsalzkonzentration ergab, dass hBD-4 ein salzabhängiges Peptid ist. Der MIC-Wert erhöht sich bei Zusatz von 25 mM NaCl um das Vierfache, bei 50 mM NaCl um das Achtfache und im Bereich einer physiologischen Osmolarität (150 mM NaCl) um den Faktor 16 (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b).

3.4.6 Hämolytische Aktivität von hBD-4

Die Fähigkeit antimikrobieller Peptide, sich an Plasmamembranen anzulagern und diese zu permeabilisieren, wird in vielen Fällen als Wirkmechanismus dieser Substanzen angesehen (SHAI, 1995; ANDREU und RIVAS, 1998). Dabei ist es wichtig, dass bakterielle Membranen selektiv geschädigt werden, während die Zellen des Wirtes möglichst unbeeinflusst bleiben. Als einfaches Modell zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung eines Peptids auf eukaryotische Zellen wird der Hämolysetest genutzt (VAN 'T HOF *et al.*, 2001).

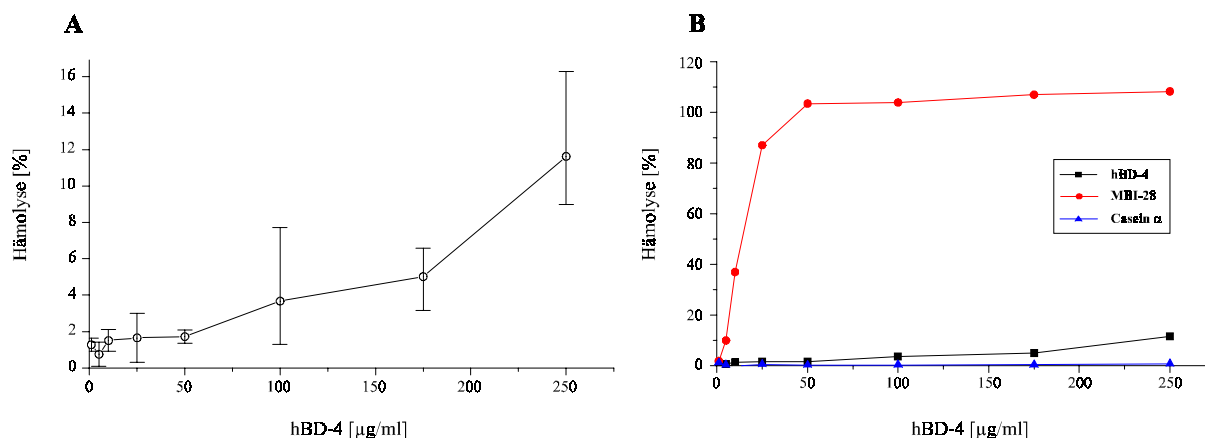


Abbildung 23: Hämolytische Aktivität von hBD-4. (A) Die hämolytische Aktivität von hBD-4 wurde über die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten bestimmt, die spektralphotometrisch quantifizierbar ist. Eine mit Tween-20 (1 %) erreichte vollständige Hämolyse diente dabei als Referenzwert. Die gezeigten Fehlerbalken beschreiben den höchsten bzw. niedrigsten Wert einer Dreifachbestimmung. (B) Zur besseren Übersicht wurde der in (A) abgebildete Graph hier in Relation zur Positivkontrolle (MBI-28) und zur Negativkontrolle (Casein α -S₁, 16-57) dargestellt.

Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, wirkt hBD-4 in einer Konzentration, die etwa 50-fach über dem MIC-Wert gegen *Staphylococcus carnosus* TM300 und *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 liegt, nur mäßig hämolytisch. Die exakten prozentualen Werte sind dabei von untergeordneter Bedeutung, und aufgrund der Abhängigkeit der Hämolyse von Versuchsparametern wie Testmedium, Alter und individueller Herkunft der Erythrozyten kann das mit hBD-4 erzielte Ergebnis auch nur bedingt mit Literaturwerten anderer Peptide verglichen werden (HELMERHORST *et al.*, 1999). Dennoch ist es über die Versuchsanordnung möglich, Stoffe mit deutlicher hämolytischer Aktivität wie MBI-28 von solchen mit geringer Aktivität zu unterscheiden.

3.4.7 Chemotaktische Aktivität von hBD-4

Die chemotaktische Aktivität einiger antimikrobieller Peptide deutet darauf hin, dass diese Substanzen neben der Inaktivierung lebender Bakterienzellen weitere Funktionen bei der Abwehr bakterieller Infektionen innehaben. So können die bisher bekannten humanen β -Defensine hBD-1 und hBD-2 unreife dendritische Zellen (iDC) und T-Lymphozyten

chemotaktisch anlocken, während hBD-3 neben iDC auch Monozyten mobilisieren kann (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a; YANG *et al.*, 2001).

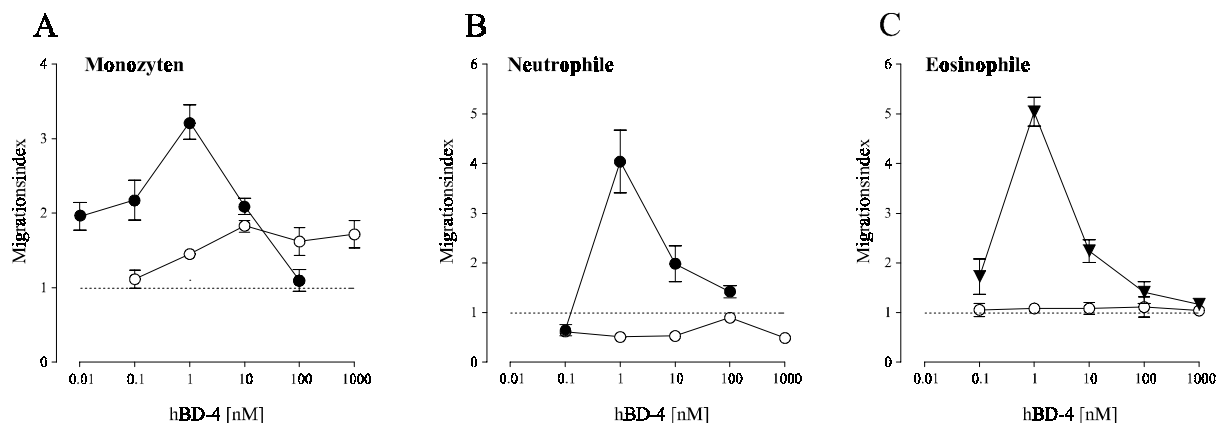


Abbildung 24: hBD-4 wirkt schwach chemotaktisch auf humane Monozyten (A), nicht aber auf neutrophile (B) und eosinophile (C) Granulozyten. Die chemotaktische Aktivität von hBD-4 (○) und den als Positivkontrollen genutzten Chemokinen fMLP (●) und Eotaxin (▼) ist als Migrationsindex dargestellt. Der Migrationsindex ist definiert als Quotient aus Anzahl der gewanderten Zellen unter Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle (Medium). Insgesamt wurden 4 Experimente mit Leukozyten unterschiedlicher Spender in Triplika durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs.

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, wirkt hBD-4 auf Monozyten, während Eosinophile und Neutrophile keinen Effekt *in vitro* zeigen. Die für chemotaktische Stoffe typische glockenförmige Dosis-Wirkungskurve (YANG *et al.*, 2001) hat ihr Maximum bei einer Konzentration von 10 nM. Damit ist für die maximale chemotaktische Aktivität von hBD-4 in Monozyten zwar eine etwa zehnmal höhere Konzentration nötig als beim moderat chemotaktisch aktiven Chemokin fMLP, andererseits ist für die antimikrobielle Aktivität selbst gegen den empfindlichsten Keim *Staphylococcus carnosus* eine etwa 100-mal höhere Konzentration erforderlich. Im Gegensatz zu LL-37 wirkt hBD-4 nicht auf neutrophile Granulozyten als Ort der eigenen Expression (Abbildung 19), wobei die selektive Attraktion nur bestimmter Leukozytenarten auch bei anderen Defensinen beobachtet wird (YANG *et al.*, 2001).

3.4.8 Isolation von hBD-4 aus SAEC 6043-Zellen

Da die antimikrobielle Potenz der Defensine deutlich von ihrer Primärstruktur beeinflusst wird (OUELLETTE *et al.*, 2000; RAJ *et al.*, 2000), ist es wichtig, die native Form des hBD-4 zu ermitteln. So könnte eine vom synthetischen Peptid abweichende Peptidlänge beispielsweise eine höhere antibakterielle Aktivität besitzen. Wegen der schweren Zugänglichkeit humaner, hBD-4-exprimierender Gewebe wurde als Quelle für die Peptidreinigung auf humane SAEC-Zellen zurückgegriffen, die nach Stimulation mit PMA hBD-4 exprimieren (3.4.4.2). Die erfolgreiche Isolation von β -Defensinen aus zuvor stimulierten Zelllinien wurde bereits mehrfach beschrieben (O'NEIL *et al.*, 2000; HARDER *et al.*, 2001), und die gewählte Dimension des Versuchsansatzes in 6-Well-Zellkulturschalen dürfte für die Sensitivität der zur Verfügung stehenden Antikörper ausreichend sein (O'NEIL *et al.*, 1999; 2000). Zur Überprüfung der Sensitivität und Spezifität

mehrerer bei IPF hergestellter monoklonaler Antikörper wurden zuvor Western Blots mit synthetischen β -Defensinen durchgeführt, wobei sich der mit L13-10-D1 bezeichnete Antikörper als der geeignetste herausstellte (Abbildung 25). Die Untersuchung einer Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen hBD-1 bis hBD-3 ist zweckmäßig, da alle humanen β -Defensine in Lungengewebe bzw. -zelllinien nachgewiesen werden können (SINGH *et al.*, 1998; HARDER *et al.*, 2000; 2001).

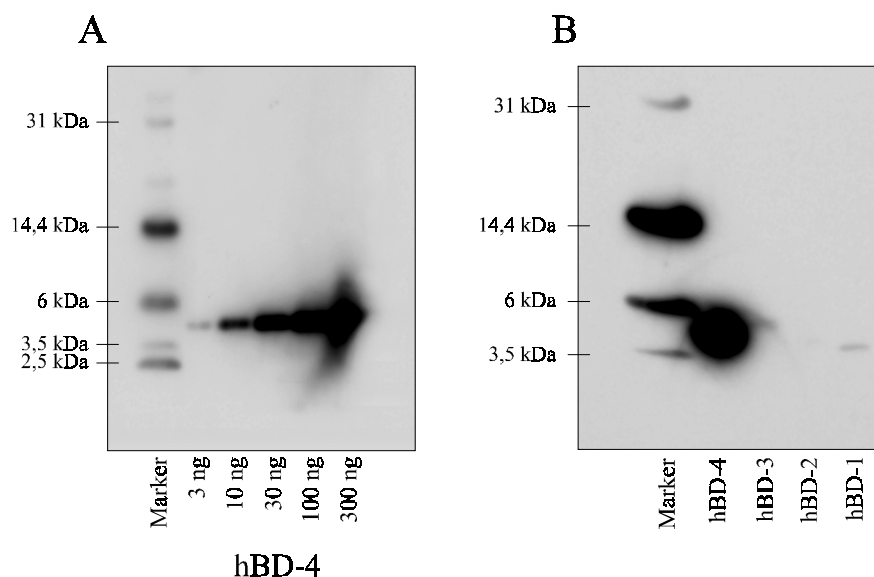


Abbildung 25: Western Blots zur Bestimmung der Sensitivität (A) und Spezifität (B) des genutzten hBD-4-Antikörpers. (A) Der Antikörper L13-10-D1 erkennt mindestens 3 ng des synthetischen hBD-4(25-61). (B) Die Verwendung von je 100 ng synthetischem Peptid zeigt, dass der Antikörper auch schwach an hBD-1 und hBD-3 binden kann, wobei mit hBD-4 das weitaus intensivste Signal erhalten wird.

Da die Verwendung des auf mRNA-Ebene erfolgreich angewandten Stimulationsprotokolls zu keiner nachweisbaren Proteinexpression in SAEC-Zellen führte, wurde als Variation sowohl die Konzentration des Stimulans von 1 μ M auf bis zu 5 μ M erhöht als auch die Inkubationszeit von 12 h auf bis zu 48 h verlängert. Bei einer Inkubationszeit von 12 h wurden neben den Zellüberständen auch die Zellextrakte im Western Blot analysiert, da diese kurze Zeitspanne möglicherweise nicht ausreichend ist für die Sekretion von hBD-4 aus SAEC-Zellen. Trotz der Variation im Stimulationsprotokoll konnte unter Nutzung der in 2.7.1 beschriebenen Probenvorbereitung in keinem Fall ein immunreaktives Signal im Western Blot detektiert werden.

4. Diskussion

4.1 Identifikation neuer humaner antimikrobieller Peptide

Hintergrund der Suche nach neuen antimikrobiellen Peptiden war die Erkenntnis, dass humane Vertreter in dieser Stoffklasse im Vergleich zu anderen Säugetierspezies wie z.B. Rindern deutlich unterrepräsentiert sind (HANCOCK und DIAMOND, 2000). Eine mögliche Ursache hierfür ist die oftmals schwierige Zugänglichkeit größerer Mengen Gewebe wie Thymus (ARNDT, 2001), Trachea (DIAMOND *et al.*, 1991) oder Zunge (SCHONWETTER *et al.*, 1995), welche bereits erfolgreich zur Isolation antimikrobieller Peptide aus nicht-humanen Säugern genutzt wurden. Da alle bisher bekannten antimikrobiellen Peptide sekretiert werden bzw. Bestandteil von Blutzellen sind und sich somit im Plasma detektieren lassen müssten, ist die Verwendung von Hämofiltrat als Quelle zur Isolierung von antimikrobiellen Peptiden eine erwiesenermaßen effektive Alternative (BENSCH *et al.*, 1995). Deshalb wurden in dieser Arbeit bereits aus Hämofiltrat isolierte Peptide unbekannter Funktion auf ihrer antimikrobielle Aktivität hin untersucht. Ein zweiter experimenteller Ansatz zur Identifikation neuer Vertreter einer bekannten Peptidfamilie ist die Suche nach verwandten Strukturen auf cDNA-Ebene. Auch hier stand mit der Veröffentlichung der Ergebnisse des Humanen Genomprojekts eine umfassende Quelle zur Identifikation neuer antimikrobieller Peptide zur Verfügung. Für die *in silico*-Suche nach neuen Peptiden eignen sich β -Defensine besonders gut, da die bekannte Lokalisation der geclusterten β -Defensin-Gene auf Chromosom 8p21-23 den zu untersuchenden Bereich des menschlichen Genoms stark einschränken.

4.2 LEAP-1

Struktur von LEAP-1

LEAP-1 (3.2.1) wurde durch massenspektrometrische Detektion cysteinreicher Peptide aus Hämofiltrat (KRAUSE *et al.*, 2000) isoliert. Das außergewöhnlich cysteinreiche Peptid hat eine Nettoladung von +2 bei physiologischem pH, wobei sich die dafür verantwortlichen basischen Aminosäuren im carboxyterminalen Teil des Peptids befinden, während der aminoterminal Bereich überwiegend hydrophobe Aminosäurereste enthält. Das aus 3 Exonen und 2 Intronen bestehende LEAP-1-Gen kodiert für eine Präproform aus 84 Aminosäureresten, die nach Abspaltung der Signalpeptidsequenz vermutlich von einer Furin-ähnlichen Protease zum reifen Peptid prozessiert wird, welches aus Hämofiltrat und Urin (PARK *et al.*, 2001) isoliert wurde. Recherchen in der Proteindatenbank (NCBI) zeigten, dass bislang keine mit LEAP-1 verwandten Peptide im Menschen bekannt sind. Andererseits konnten auf Nukleinsäureebene EST-Klone aus Schwein, Ratte, Maus und Flunder detektiert werden, und die korrespondierenden

Proteinsequenzen zeigen, dass sowohl die Positionen der acht Cysteinreste als auch das Motiv der Furinspaltungsstelle konserviert waren (NAKAYAMA, 1997; PARK *et al.*, 2001).

Antimikrobielle Aktivität von LEAP-1

Da amphipathische, cysteinreiche kationische Peptide oft antimikrobiell wirksam sind (HANCOCK, 1997), wurde LEAP-1(60-84) in zwei verschiedenen Assays mit nicht-pathogenen Keimen auf eine solche Aktivität hin überprüft. Dabei zeigte sich LEAP-1(60-84) vor allem gegen grampositive Bakterien und eine Hefe wirksam. Dieser Befund wurde später durch eine Veröffentlichung von Park (PARK *et al.*, 2001) gestützt, in der LEAP-1(60-84) wachstumshemmend auf pathogene, grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* oder *Streptococcus agalactiae* (B-Streptokokken) sowie gegen *Candida albicans* wirkte. Anders als bei LEAP-2 ist die aminoterminal verkürzte Form LEAP-1(65-84), die ebenfalls aus Hämofiltrat und Urin zu isolieren ist, aktiver als das reife Peptid LEAP-1(60-84), wie im Sprossungstest mit zwei Aspergillusarten nachgewiesen wurde. Zwar liegt die für eine antimikrobielle Aktivität benötigte Konzentration von LEAP-1 ähnlich wie bei anderen Peptiden im mikromolaren Bereich (GANZ, 1999; RISSO, 2000), doch reichen diese großen Peptidmengen selbst in den sensitiven Diffusionshemmtests bzw. Präinkubationsexperimenten nur für eine 50 %ige Reduktion (3.2.3) apathogener Keime bzw. für eine Verminderung der Keimzahl um eine logarithmische Einheit bei den pathogenen Stämmen (PARK *et al.*, 2001) aus. Da LEAP-1 sowohl in Blut als auch in Hämofiltrat wahrscheinlich nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist und zudem die Aktivität des Peptids durch physiologische Salzkonzentrationen herabgesetzt wird (PARK *et al.*, 2001), ist es fraglich, ob LEAP-1 *in vivo* antimikrobiell aktiv ist. Andererseits hängt die Konzentration und Aktivität eines antimikrobiellen Peptids *in vivo* auch von der Mikroumgebung (GUDMUNDSSON und AGERBERTH, 1999) ab, d.h. unter bestimmten Bedingungen wie einer lokal erhöhten Konzentration proinflammatorischer Zytokine bei akuten Infektionen (VORLAND, 1999; HANCOCK und DIAMOND, 2000) können insbesondere im Synthesegewebe hohe Peptidkonzentrationen erreicht werden. Tatsächlich konnte Pigeon (PIGEON *et al.*, 2001) zeigen, dass die Expression von murinem LEAP-1 in der Leber sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch Lipopolysaccharid (LPS) aus *E. coli* etwa um das fünffache erhöht wird, was auf eine Funktion von LEAP-1 in der Abwehr von Mikroorganismen hindeutet. Ob LEAP-1, ähnlich wie andere durch LPS stimulierbare antimikrobielle Peptide (HANCOCK und SCOTT, 2000), auch zur Neutralisierung von LPS fähig ist, bleibt unklar. Ein LPS-Bindemotiv, das aus 2 basischen Aminosäuren besteht, welche von einer dritten über einige hydrophobe Aminosäuren getrennt sind (VAN 'T HOF *et al.*, 2001), existiert in LEAP-1(60-84) allerdings nicht.

Endogene Expression von LEAP-1

Die durch *real-time*-PCR durchgeführte Expressionsanalyse (3.2.2) ergab, dass LEAP-1-Transkripte in erster Linie in der Leber und in geringerem Maße im Herzen und im Hirn gebildet werden, während die für die Bildung antimikrobieller Peptide prädestinierten Organe wie Lunge,

Trachea oder Speicheldrüse (TROXLER *et al.*, 1990; LEHRER und GANZ, 1999) nur vernachlässigbare Expressionsniveaus aufwiesen. Dieses ist ein überraschender Befund, denn obwohl die Leber über die Pfortader mit allen im Blut zirkulierenden Mikroorganismen in Berührung kommen müsste, ist bisher für kein klassisches antimikrobielles Peptid die Leber als Hauptsyntheseort identifiziert worden (BALS *et al.*, 1998a; 1999a). Dies steht im Gegensatz zum Fettkörper in *Drosophila*, da dieses zur Säugerleber äquivalente Organ einen Großteil der *Drosophila*-eigenen antimikrobiellen Peptide produziert (HOFFMANN *et al.*, 1999), wobei die molekularen Mechanismen der Syntheseinduktion in Säugern und Insekten konserviert sind (ADEREM und ULEVITCH, 2000). Dennoch nimmt die Leber eine wichtige Stellung im menschlichen Immunsystem ein. So produzieren Hepatozyten als Antwort auf eine Stimulation mit proinflammatorischen Faktoren wie IL-1, IL-6 oder TNF- α die Akute-Phase-Proteine, zu denen neben dem antimikrobiellen Protein Phospholipase A₂ (LEVY, 2000) auch Gerinnungsfaktoren zur Eindämmung des Entzündungsortes, Radikalfänger, vasodilatierende Proteine (Präkallikreine) oder Opsonine wie MBL und CRP gehören (1.1). Zudem synthetisiert die Leber die Komponenten des Komplementsystems sowie eine Reihe von Zytokinen, und darüber hinaus beherbergt sie große Mengen antigenpräsentierender und phagozytischer Zellen (DOHERTY und O'FARRELLY, 2000).

Weitere Funktionen von LEAP-1

Obwohl aus der oben gegebenen Aufzählung hervorgeht, dass die Expression eines antimikrobiellen Peptids in der Leber physiologisch durchaus sinnvoll sein kann, ließ neben dieser ungewöhnlichen Expression die atypische Struktur und Konserviertheit sowie die schwache antibakterielle Aktivität von LEAP-1 die Überlegung zu, dass das Peptid noch weitere Funktionen innehaben könnte. Diese Vermutung wurde durch zwei vor kurzem veröffentlichte Arbeiten bestätigt, in denen LEAP-1 eine wichtige Rolle in der Eisen-Homöostase zugesprochen wird. So konnten PIGEON *et al.* (2001) in *in vivo*-Experimenten zeigen, dass sich die Transkriptionsrate von murinem LEAP-1 in mit Eisen überladene Lebergewebe proportional zum Eisengehalt der Leber verhielt. Dabei konnte die Expression von LEAP-1 bis um den Faktor 10 gesteigert werden. NICOLAS *et al.* (2001) beobachteten, dass in USF2 (*upstream stimulatory factor 2*)-Knock-out-Mäusen, bei denen die LEAP-1-Genexpression vollständig unterdrückt war, verschiedene Gewebe massiv mit Eisen überladen waren. Da gleichzeitig die Transkription von 6 verschiedenen Genen, für die eine Funktion in der Regulation des Eisenhaushalts bekannt ist, in USF2(-/-)-Mäusen unverändert blieb, gehen die Autoren davon aus, dass LEAP-1 ein wichtiges Signalmolekül im Rahmen des Eisenstoffwechsels ist. Allerdings fehlt bislang der Beweis, dass einzig LEAP-1 für diesen Phänotyp verantwortlich ist und nicht auch andere Gene, die durch ein Fehlen des Transkriptionsfaktors USF2 in ihrer Expression beeinflusst werden (FLEMING und SLY, 2001). Eine Modellvorstellung von FLEMING und SLY (2001) sieht vor, dass bei hohen Bluteisenspiegeln vermehrt Eisen in die Leber aufgenommen wird, was die Induktion von LEAP-1 zur Folge hätte (PIGEON *et al.*, 2001). LEAP-1 würde dann im Zusammenspiel mit

anderen Proteinen die Aufnahme von Eisen aus dem Blut in Makrophagen und Enterozytenvorläuferzellen im Duodenum fördern, wobei die aus Letzteren entstehenden Dünndarmzellen dadurch so programmiert würden, dass sie nur wenig Eisen aus der Nahrung resorbieren würden. Die so durch LEAP-1 zu erreichende Senkung des Eisenspiegels im Blut würde auch erklären, warum die Induktion von LEAP-1 durch LPS physiologisch sinnvoll ist, da Hyperferriämien das angeborene Immunsystem z.B. durch eine verminderte Phagozytoseaktivität von Granulozyten oder durch eine reduzierte Aktivität von zytotoxischen T-Zellen schwächen können (WALKER und WALKER, 2000). Solange das oben beschriebene Modell nicht durch Nachweise wie erhöhte LEAP-1-Spiegel bei Anämien oder verminderte Konzentrationen bei Eisenresorptionsstörungen der Leber untermauert wird, kann man sich jedoch auch einen anderen Wirkmechanismus vorstellen. So könnte LEAP-1, ähnlich wie die ebenfalls cysteinreichen Metallothioneine oder das schwach antimikrobiell aktive Laktoferricin, Eisen und andere Metallionen komplexieren und dadurch deren renale Elimination fördern. Darüber hinaus lässt das von FLEMING und SLY (2001) beschriebene Modell offen, ob nicht auch spezifische Wechselwirkungspartner wie Rezeptoren bei der Vermittlung einer LEAP-1-Funktion eine Rolle spielen. Zur Beantwortung der Frage, ob auch die antimikrobielle Aktivität durch eine spezifische Interaktion des Peptids mit der Bakterienoberfläche vermittelt wird, könnte vollständig reduziertes, lineares LEAP-1 im Diffusions-Hemmtest eingesetzt werden. Letztlich ist LEAP-1 ein weiteres Beispiel dafür, dass antimikrobielle Peptide nicht, wie noch vor einigen Jahren propagiert, allein zur Überbrückung der Zeit bis zum Anlaufen der spezifischen Immunabwehr dienen (1.4).

4.3 LEAP-2

Struktur von LEAP-2

LEAP-2 (3.3.1) wurde genau wie LEAP-1 durch einen massenspektrometrischen Assay aus Hämofiltrat isoliert (KLEEMEIER, 1997; KRAUSE *et al.*, 2000). Die Analyse der Disulfidverbrückung ergab eine [1-3/2-4]-Verküpfung der Cysteinreste, so dass es sich bei LEAP-2 um ein polyzyklisches Peptid handelt. Während in der Primärstruktur keine ausgeprägten hydrophoben Sequenzabschnitte zu beobachten sind, verfügt das Peptid mit den Motiven -CRKRRC- (Position 66-69) und -CRDDSEC- (Position 55-59) über je einen Cluster basischer bzw. saurer Aminosäuren, die zudem jeweils direkt von 2 Cysteinen flankiert werden. Ob der auf diese Weise mit einer Symmetrieachse versehene Loop im Molekül für eine antimikrobielle oder andersartige biologische Aktivität verantwortlich ist, kann noch nicht beantwortet werden, zumal in der Datenbankrecherche keine mit LEAP-2 verwandten Peptide gefunden werden konnten. Allerdings zeigen die ebenfalls zyklischen, antimikrobiell aktiven Peptide Protegrin I (-CRRRFC-) und Androctonin (-CRRRGGC-) ähnliche Anhäufungen basischer Aminosäuren (ANDREU und RIVAS, 1998). Die aus der korrespondierenden cDNA abgeleitete Primärstruktur von Präpro-LEAP-2 (3.3.1) zeigt wie LEAP-1 die klassische

Erkennungssequenz für Furin-ähnliche Proproteinkonvertasen, welche insbesondere biologisch aktive Wachstumsfaktoren, Hormone und Plasmaproteine aus den jeweiligen Proformen freisetzen (NAKAYAMA, 1997). Das ubiquitäre Vorkommen dieser Enzyme könnte der Grund dafür sein, dass weder LEAP-1 noch LEAP-2 mit einer putativen Propeptidsequenz aus Hämofiltrat isoliert werden konnten.

Spleißvarianten von LEAP-2

Obwohl in der Proteindatenbank (NCBI) kein LEAP-2-ähnliches humanes Peptid identifizierbar war, existieren doch mehrere EST-Einträge für verschiedene Spezies (3.3.1), und die überraschend hohe Sequenzübereinstimmung in Maus und Schwein wurde durch nachträgliches Klonieren der LEAP-2-Homologen auch im Rhesusaffen, Rind und Meerschweinchen bestätigt. Eine Sequenzübereinstimmung von mindestens 95 % für ein Peptid in 6 unterschiedlichen Spezies ist eher bei der Stoffklasse der Hormone (z.B. ANP, ACTH, Insulin) verbreitet und stellt einen ungewöhnlichen Befund für ein antimikrobielles Peptid dar. So weisen β -Defense unterschiedlicher Spezies erheblich größere Abweichungen in ihrer Aminosäuresequenz auf. Ebenso untypisch ist die Identifikation von verschiedenen Spleißvarianten sowie das Auftreten von Transkripten mit variabler 5'-terminaler Region. Die biologische Bedeutung von alternativen Spleißprodukten und alternativen Promotoren, die oft vergesellschaftet auftreten, liegt in einer erhöhten Flexibilität bei der Kontrolle der Genexpression. So kann eine temporäre, gewebspezifische oder subzelluläre Expression von Genen genauso über diese Mechanismen gesteuert werden wie die Translationseffizienz der jeweiligen mRNA (AYOUBI und VAN DE VEN, 1996). Da alle isolierten Formen von LEAP-2 (3.1) auf die mRNA-Isoform LEAP-2³⁵⁰ zurückzuführen sind, kann über die Bedeutung der Spleißvarianten und Promotoren bislang nur spekuliert werden. Durch die Retention des ersten Introns in LEAP-2⁵⁵⁰ werden 2 Stop-Kodons in die Nukleinsäuresequenz eingefügt. Einerseits könnten diese vorzeitigen Stoppsignale die Translation des isolierten LEAP-2 verhindern und so die Proteinexpression in LEAP-2⁵⁵⁰-dominierten Geweben unterbinden (SMITH und VALCARCEL, 2000), andererseits könnte sich bei Verschiebung des offenen Leserahmens (ORF) in das Intron 1 das Peptid MSLPLQIDGPIPEVSSAKRRPRR-LEAP-2(38-77) bilden. Letzteres hätte zur Folge, dass das Peptid zwar noch eine Spaltungsstelle für Furin-ähnliche Proteasen hat, durch den Verlust der Signalpeptidstruktur aber wahrscheinlich intrazellulär verbleiben müsste. Darüber hinaus ist es denkbar, dass LEAP-2⁵⁵⁰ eine nicht-translatierbare mRNA-Proform darstellt, die erst bei Bedarf, z.B. nach Induktion, posttranskriptionell modifiziert wird (KOZAK, 1991). Dieselben Vermutungen lassen sich für die Intron 2-enthaltenen Variante LEAP-2⁶⁷⁰ und die ungespleißte, aber auch als EST-Klon vorliegende Form LEAP-2⁸⁶⁰ (Abbildung 12) anstellen, die aufgrund ihrer im Vergleich zu den Haupttranskripten geringen Expressionshöhe nicht weiter untersucht wurden. Ebenso unklar wie die Funktion der Spleißvarianten ist die Bedeutung des um 1345 bp erweiterten 5'-terminalen Bereichs (3.3.3). Da dieser Abschnitt nur kurze offene Leseraster bis maximal 37 Aminosäuren enthält (AJ409065), ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um

einen nicht-translatierten Bereich (5'-UTR) handelt. Das Auftreten mehrerer offener Leseraster in erweiterten 5'-UTRs führt in vielen Fällen dazu, dass der 3'-gelegene Hauptleserahmen kaum mehr translatiert wird (NONAKA *et al.*, 1989; KOZAK, 1991), so dass die cDNA-Formen LEAP-2⁹¹⁵ und LEAP-2¹¹¹⁵ des distalen Promotors nicht in Protein übersetzt werden würden. Obwohl der experimentelle Nachweis der Funktionalität der Spleiß- und Promotorvarianten nicht erbracht wurde, scheint aufgrund der oben genannten Einschränkungen nur die gewebsspezifisch exprimierte cDNA LEAP-2³⁵⁰ für die Biosynthese von LEAP-2(38-77) relevant zu sein (3.3.6), während alle anderen cDNA-Isoformen nicht translatiert werden.

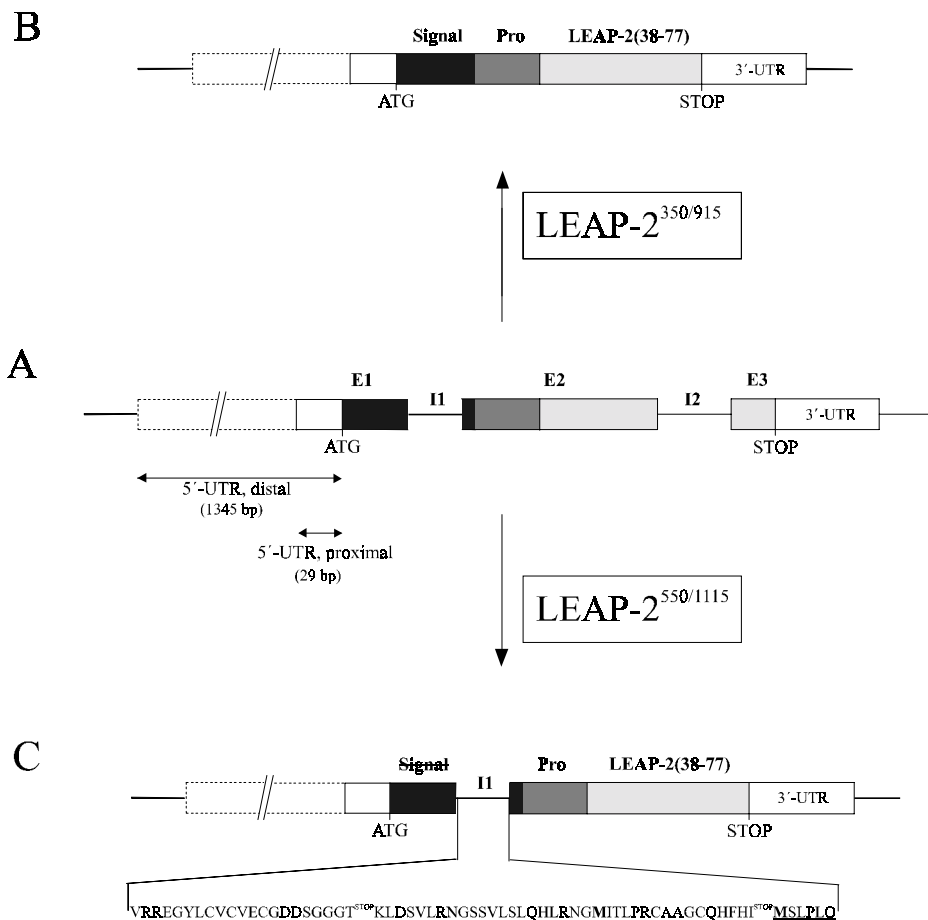


Abbildung 26: Übersicht über die Haupttranskripte des LEAP-2-Gens. (A) Das LEAP-2-Gen besteht aus drei Exonen und verfügt über zwei unterschiedlich lange 5'-terminale Bereiche. (B) Durch das Spleißen der beiden Introne entsteht ein offener Leserahmen (ORF), der für ein vollständiges LEAP-2-Vorläuferpeptid kodiert. Über die Bedeutung des verlängerten 5'-terminalen Bereichs kann bislang nur spekuliert werden. In der Regel führen solche Strukturen dazu, dass 3'-terminal gelegene ORFs nur sehr schwach translatiert werden. (C) Durch die Retention des ersten Introns wird die Signalpeptidstruktur des Vorläuferpeptids unterbrochen, und es entsteht ein abweichender Leserahmen. Da das im Blut zirkulierende LEAP-2(38-77) theoretisch nur von der Variante (B) kodiert werden kann, ist die Bedeutung dieses Spleißproduktes unklar. Möglicherweise dient es zur gewebsspezifischen Translation von LEAP-2.

Endogene Expression von LEAP-2

Ähnlich wie bei LEAP-1 ist die höchste Transkriptionsrate von LEAP-2 in der Leber und, deutlich schwächer, in Niere und Dünndarm festzustellen. Während die Leber als Expressionsort

für antimikrobielle Peptide bisher selten in Erscheinung trat (4.2), exprimieren die Niere (VALORE *et al.*, 1998; ZUCHT *et al.*, 1998) und der Dünndarm (O'NEIL *et al.*, 1999; OUELLETTE *et al.*, 2000) verschiedene Defensine in erheblichem Ausmaß. Die physiologische Bedeutung der Bereitstellung von antimikrobiellen Peptiden in der Niere könnte in der Unterstützung der Abwehr von häufig auftretenden Harnwegsinfektionen liegen, die in erster Linie durch eine aufsteigende Besiedlung der Harnröhre, der Blase und schließlich der Niere entstehen. Bakterielle Entzündungen des Dünndarms sind zwar seltener, doch übernehmen die epithelialen antimikrobiellen Peptide auch hier eine wichtige Rolle, wie die erhöhte Letalität α -Defensindefizienter Matrilysin(-/-)-Mäuse nach einer Salmonelleninfektion zeigt (WILSON *et al.*, 1999). Die Expression von LEAP-2 als antibakteriell aktivem Peptid in Leber, Niere und Dünndarm ist biologisch also durchaus sinnvoll, obwohl diese Organverteilung z.B. auch eine Beteiligung an Resorptionsvorgängen möglich erscheinen lässt, wie sie ja auch für LEAP-1 postuliert wurde.

Antimikrobielle Aktivität von LEAP-2

Das antimikrobielle Spektrum von LEAP-2(38-77) gleicht mit Ausnahme der Hefe *Rhodotorula rubra* dem von LEAP-1 (Tabelle 10+12), wobei LEAP-2(38-77) sowohl gegen *B. subtilis* (5 μ M vs. 14,4 μ M) als auch gegen *S. cerevisiae* (5 μ M vs. 18 μ M) einen niedrigeren IC₅₀-Wert im Präinkubationsexperiment aufwies. Trotzdem ist die antimikrobielle Potenz von LEAP-2 als relativ schwach anzusehen, solange diese Hemmkonzentrationen nicht auch bei pathogenen Erregern festzustellen sind. Interessanterweise zeigt LEAP-2(44-77) weder im Plattendiffusionstest noch im CFU-Assay antimikrobielle Aktivität, obwohl die Entfernung des aminoterminalen Hexapeptids -MTPFWR- die Nettoladung des Moleküls nur um eine Einheit von +4 auf +3 verringert und obwohl dieser Abschnitt weit von den stabilisierenden Cysteinbrücken entfernt ist. Allerdings wurden vergleichbare Beobachtungen für verschiedene α - und β -Defensine gemacht. So haben die humanen α -Defensine HNP1-3, die sich nur in der letzten Aminosäure des Aminoterminus unterscheiden (Abbildung 1), völlig unterschiedliche antibakterielle und chemotaktische Eigenschaften (OUELLETTE *et al.*, 2000). Ähnliches gilt für Cryptdin-4, das mit der Deletion eines Glycinrestes seine Aktivität gegen *E. coli* und *S. typhimurium* verliert, oder für hBD-1, dessen 6 aus Urin isolierbaren Molekülformen unterschiedliche Aktivität gegen *E. coli* zeigten (VALORE *et al.*, 1998; ZUCHT *et al.*, 1998). Besonders interessant in Bezug auf LEAP-2 ist die Tatsache, dass die antimikrobielle Potenz von hBD-1 nicht proportional zur Moleküllänge abnimmt, sondern dass auch kürzere und dennoch aktivere Fragmente auftraten. Es ist demnach denkbar, dass einige der insgesamt 10 bisher isolierten LEAP-2-Peptidformen eine höhere antimikrobielle Aktivität aufweisen als LEAP-2(38-77). Wegen des unbekanntes Wirkmechanismus von LEAP-2 bleiben solche Überlegungen aber genauso zukünftigen, detaillierteren Untersuchungen vorbehalten wie die Vorstellung, dass eine oder mehrere dieser N- und C-terminal verkürzten Peptide eine gänzlich andere, bisher noch unentdeckte Funktion erfüllen könnte. Zusammenfassend ist festzustellen, dass LEAP-2 ein antimikrobiell aktives Peptid der Leber ist, welches aufgrund seiner Konserviertheit und seiner

vermutlichen Regulation auf Nukleinsäure- (cDNA-Isoformen) und Proteinebene (Furin-Motiv) wahrscheinlich weitere physiologische Aufgaben besitzt.

4.4 Humanes β -Defensin 4

Identifikation von hBD-4

Die Vorgehensweise bei der Identifizierung von hBD-4 steht im direkten Gegensatz zur Isolierung von LEAP-1 und LEAP-2 aus Hämofiltrat. Während bei Letzteren das zirkulierende Peptid bekannt war und eine Wirkung zugeordnet werden konnte, wurde bei der gezielten Suche nach einem neuen β -Defensin von einem gegebenen Aminosäuresequenz-Muster ausgegangen. Anschließend wurde das entsprechende Gen identifiziert. Aufgrund der bekannten chromosomalen Lokalisation, der konservierten Cysteinreste und der einfachen genomischen Struktur eignen sich β -Defensine besonders gut als Zielstruktur für die systematische Analyse des humanen Genoms, in dem wegen der großen Anzahl von β -Defensinen in anderen Wirbeltieren (Maus, Rind) weitere Vertreter dieser Peptidfamilie vermutet wurden.

Struktur von hBD-4

Das humane β -Defensin hBD-1 wurde erstmals 1995 aus Hämofiltrat isoliert (BENSCH *et al.*, 1995) und zeigt eine nur schwach ausgeprägte antimikrobielle Aktivität gegen gramnegative Bakterien *in vitro*. Erst die Beobachtung, dass eine Hemmung der hBD-1-Produktion in der Lunge durch Antisense-Oligonukleotide die antibakteriellen Eigenschaften der Bronchialflüssigkeit unterband (GOLDMAN *et al.*, 1997), machte die β -Defensine wissenschaftlich interessant. Später erfolgte dann die Isolierung von hBD-2 (HARDER *et al.*, 1997) und hBD-3 (HARDER *et al.*, 2001) aus der Haut von Psoriasis-Patienten, nachdem hBD-3 zuvor schon *in silico* detektiert worden war (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a; JIA *et al.*, 2001). Das in dieser Arbeit beschriebene neue humane β -Defensin hBD-4 zeigt dieselbe genomische Struktur wie die bekannten β -Defensine. Die beiden kurzen Exone sind durch ein 4495 bp langes Intron voneinander getrennt, wobei Exon 1 für ein Signalpeptid sowie für einen Teil des reifen Peptids kodiert. Allerdings zeigt hBD-4 mit Ausnahme der Cysteine nur wenig Sequenzübereinstimmung zu hBD-1, hBD-2 und hBD-3. Dies gilt neben dem Signalpeptid (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001b) insbesondere für den mit 14 Aminosäureresten ungewöhnlich langen carboxyterminalen Bereich. Der Vergleich von über 30 β -Defensinen aus insgesamt 10 verschiedenen Spezies verdeutlicht, dass epitheliale β -Defensine nach dem letzten Cystein in keinem Fall mehr als sechs Aminosäurereste aufweisen (LI *et al.*, 2001). Die defensinähnlichen, epididymis-spezifischen Peptide EP2E, Bin1b (LI *et al.*, 2001) und ESP13.2 (PERRY *et al.*, 1999) verfügen dagegen bei identischem Cysteinmuster über 8-64 Aminosäuren im C-Terminus.

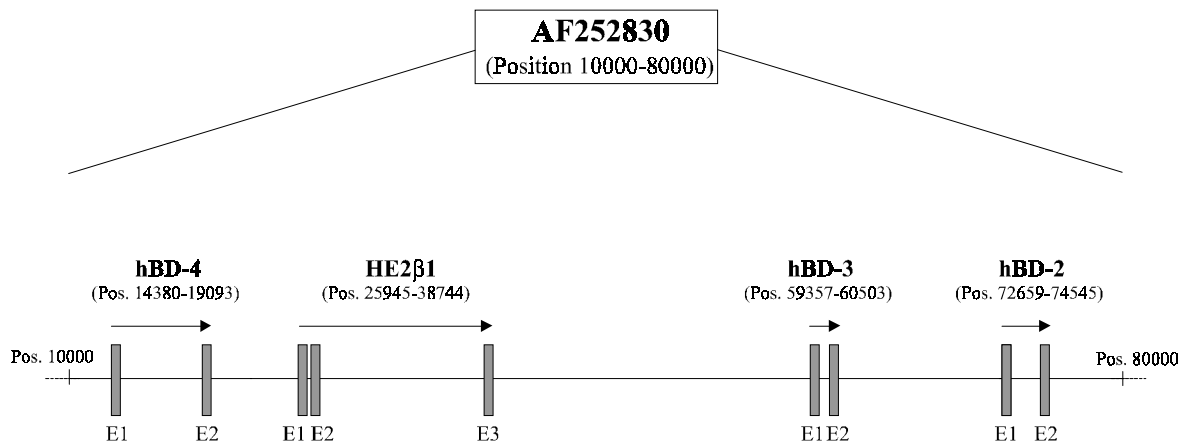


Abbildung 27: Organisation humaner β -Defensin-Gene auf Chromosom 8p23. Der im Rahmen des Humanen Genomprojektes hergestellte BAC-Klon mit der Zugangsnummer AF252830 enthält neben hBD-4 auch die Gene der ebenfalls induzierbaren Defensine hBD-2 und hBD-3. Das an Spermien anhaftende, epididymispezifische Peptid HE2 β ₁ enthält das defensintypische Cysteinmuster und ist kolokalisiert. Das konstitutiv exprimierte hBD-1 sowie die α -Defensine liegen etwa 700 kbp in Richtung Telomer von hBD-2 entfernt.

Endogene Expression von hBD-4

hBD-4-Transkripte sind trotz der verwendeten sensitiven Echtzeit-PCR-Methode nur in wenigen Organen nachweisbar, wobei die mit Abstand höchste Expressionsrate in Testis (Abbildung 19) zu beobachten ist. Sich anschließende Untersuchungen ergaben, dass diese testikuläre Expression darauf zurückzuführen ist, dass bei der Herstellung der Testis-RNA (Clontech) auch epididymales Gewebe verarbeitet wurde (Abbildung 20). Das Expressionsmuster von hBD-4 steht damit im Gegensatz zur Gewebeverteilung der bisher bekannten β -Defensine. So werden hBD-1 (Speicheldrüsen, Pankreas, Urogenitaltrakt) und hBD-2 (Respirationstrakt, Haut) primär dort gebildet, wo häufig direkter Kontakt mit Mikroorganismen besteht (SCHRÖDER, 1999). Dies gilt prinzipiell auch für hBD-3 (Haut, Ösophagus, Trachea), obwohl dieses Peptid das erste humane β -Defensin ist, für das eine deutliche Expression im Hoden nachgewiesen werden konnte (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a). Über die primäre physiologische Funktion der Expression von hBD-4 und anderen antibakteriell aktiven Peptiden (MALM *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001) in Epididymis kann derzeit nur spekuliert werden. Einerseits ist die Bekämpfung von urethral aufsteigenden bakteriellen Infektionen der männlichen Geschlechtsorgane eine sehr wichtige Aufgabe, wie die häufigen Fälle von Infertilität nach einer Epididymitis belegen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Überstände von epididymalen oder testikulären Primärkulturen durch die Anwesenheit von Cryptdinen oder Bin1b antimikrobiell wirksam waren (GRANDJEAN *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2001). Andererseits mehren sich Hinweise, dass antimikrobielle Peptide darüber hinaus eine Rolle bei der Reifung und Funktionsfähigkeit von Spermatozoen innehaben könnten. Spermazellen von Vertebraten sind nach Verlassen der Hodenkanälchen noch nicht befruchtungsfähig, da ihnen die entsprechende Motilität fehlt und sie zudem nicht in der Lage sind, an die Zelloberfläche der Oozyte zu binden (MOORE, 1998). Die drei epididymalen Regionen Caput, Corpus und Cauda stellen einen einzigen, etwa 5 m

langen Tubulus dar, in dem sich aufgrund einer typischerweise lokal begrenzten Genexpression in den umliegenden Epithelzellen ständig die Zusammensetzung der Lumenflüssigkeit ändert. Erst die Passage durch diese Ansammlung verschiedenster sekretorischer Proteine und der damit verbundene Aus-, Um- und Einbau unterschiedlicher Glykoproteine und Lipidkomponenten in die Plasmamembran lässt die Spermazelle befruchtungsfähig werden (MOORE, 1998). Da auch hBD-4 und die defensinähnlichen Peptide HE2 β ₁, Bin1b und ESP13.2 ein solches regional begrenztes Expressionsprofil aufweisen (Abbildung 20), wird für diese Substanzen eine Beteiligung an der Spermienreifung erwogen. Darüber hinaus konnte für HE2 β ₁ und auch für hCAP-18, dem Vorläufer des Cathelizidins LL-37, nachgewiesen werden, dass sie am Kopf der Samenzellen anhaften (KIRCHHOFF, 1999; MALM *et al.*, 2000). Während HE2 β ₁ nur am Spermienhals beobachtet werden kann (HAMIL *et al.*, 2000), wird ein Teil der anhaftenden hCAP-18-Moleküle direkt auf dem Akrosom lokalisiert (MARTIN-RUIZ *et al.*, 1998). Das Akrosom macht den Hauptbestandteil des Spermienkopfes aus und ist an der Erkennung und Penetration der Eihülle beteiligt (ABOU-HAILA und TULSIANI, 2000). Da sich antimikrobielle Peptide in höheren Konzentrationen als zytotoxisch für murine Oozyten erwiesen (SAWICKI und MYSTKOWSKA, 1999), könnten sie an der natürlichen, spermieninduzierten Perforation der Eizellmembran beteiligt sein. Denkbar wäre auch eine Erhöhung der Fluidität der Plasmamembran von Samenzellen, was den zuvor erwähnten Einbau neuer Glykoproteine während des epididymalen Transits erleichtern könnte. Sollten antimikrobielle Peptide tatsächlich Funktionen im männlichen Genitaltrakt haben, die über ihre ursprüngliche Aktivität hinausgehen, so beruht deren Mechanismus wahrscheinlich auf einer unspezifischen Membraninteraktion und nicht auf einer Rezeptorbindung, da ja sowohl defensinähnliche Peptide als auch Cathelizidine beteiligt zu sein scheinen (1.3).

Stimulation der endogenen Expression von hBD-4 durch pathogene Bakterien

Zur weiteren Charakterisierung von hBD-4 als antimikrobiell aktivem Peptid wurde untersucht, ob dessen Expression durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder Bakterienzellen induzierbar ist. Da die Expression von antimikrobiellen Peptiden primär in epitheliale Gewebe erwartet wird, wurden Lungen- und Hautzelllinien zum Nachweis einer Induzierbarkeit herangezogen, obwohl hBD-4 in diesen Geweben offensichtlich nicht transkribiert wird (Abbildung 19). Eine solche Vorgehensweise ist nicht unüblich, wie entsprechende Untersuchungen zu hBD-2 und -3 belegen (O'NEIL *et al.*, 1999; HARDER *et al.*, 2000; JIA *et al.*, 2001). Die Transkriptionsrate von hBD-4 in primären Lungenepithelzellen kann durch lebende Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 dosisabhängig gesteigert werden (Abbildung 21). Da hBD-4 auch im Kontrollversuch durch abgetötete Pseudomonaden stimuliert wird, scheint die Induktion nicht durch aktiv vom Bakterium sezernierte Stoffwechselprodukte verursacht zu werden. Nachfolgend durchgeführte Versuche zeigten jedoch, dass auch Lipopolysaccharid als Hauptbestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien keinen Einfluss auf die Transkription von hBD-4 in verschiedenen Zelllinien hat (3.4.4.2), so dass, ähnlich wie

bei hBD-2 (HARDER *et al.*, 2000), der auslösende Faktor für die bakterielle Stimulation von hBD-4 unbekannt bleibt. Möglicherweise sind Bestandteile polysaccharidhaltiger Kapseln nötig für eine Induktion von β -Defensinen, da sowohl der bekapselte *Streptococcus pneumoniae* (Abbildung 21) als auch mukoide Pseudomonaden Defensine stärker stimulieren als unbekapselte Bakterien (HARDER *et al.*, 2000). Denkbar ist auch, dass freigesetzte bakterielle DNA die Transkriptionsrate von hBD-4 beeinflusst, wie es bei der Verringerung der Expression von hBD-1 und LL-37 während einer Shigelleninfektion vermutet wird (ISLAM *et al.*, 2001).

Stimulation der endogenen Expression von hBD-4 durch PMA

Da neutrophile Granulozyten und Makrophagen nach bakteriellem Kontakt *in vivo* oftmals Zytokine wie TNF- α , IL-1 oder IL-6 bilden, wurde deren Einfluss auf die Expression von hBD-4 überprüft. Unter Verwendung üblicher Zytokinkonzentrationen und Stimulationszeiten (2.5.2) konnte trotz Überprüfung mehrerer Zelllinien nur eine Induktion von hBD-4 in mit PMA stimulierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 22). hBD-4 unterscheidet sich also in seiner Genregulation von hBD-2 und hBD-3, welche beide durch TNF- α oder IL-1 induzierbar sind (HARDER *et al.*, 2000; 2001; CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a). PMA ahmt die Eigenschaften des physiologischen Botenstoffs Diacylglycerol nach, der am Anfang einer Reihe von Signaltransduktionskaskaden steht und der in der Lage ist, insgesamt 8 verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) zu aktivieren (LIU und HECKMAN, 1998). Die PKC-Isoformen können in epithelialen Zellen unterschiedlichste Reaktionen wie Bildung von Zytokinen, Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies oder die Induktion von MAP-Kinasekaskaden bewirken, so dass die Stimulation von hBD-4 durch PMA als unspezifisch und schwer nachvollziehbar anzusehen ist. Allerdings deuten die Beispiele von hBD-1 (nicht induzierbar) und hBD-2 (induzierbar) darauf hin, dass durch PMA stimulierbare Substanzen sich allgemein in entzündlichen Reaktionen als nicht konstitutiv exprimiert erweisen (KRISANAPRAKORNKIT *et al.*, 1998; 2000). Abgesehen von der verminderten Aussagekraft einer solch unspezifischen Stimulation erlaubt die Verwendung von PMA jedoch, leicht zugängliche Zellkulturüberstände zur Isolierung einer nativen Peptidform zu nutzen.

Antimikrobielle Aktivität von hBD-4

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von hBD-4 wurde synthetisches hBD-4(25-61) verwendet, dessen Amino- und Carboxyterminus um 2 bzw. 11 Aminosäuren gegenüber der theoretisch längsten Peptidform hBD-4(23-72) gekürzt wurde (Abbildung 18). Diese eingeführte Trunkierung berücksichtigt, dass bislang bekannte β -Defensine für eine antimikrobielle Aktivität offensichtlich mindestens 4 Aminosäuren vor dem ersten Cystein benötigen und carboxyterminal möglichst wenige, basische Aminosäuren aufweisen (VALORE *et al.*, 1998; RAJ *et al.*, 2000). Bei der oxidativen Faltung des linearen hBD-4-Vorläuferpeptids bildete sich das Disulfidmuster, welches für β -Defensine erwartet wird (2.9.1). Die durch diese Disulfidbrücken stabilisierte Tertiärstruktur (BAUER *et al.*, 2001) der β -Defensine scheint essentiell für eine antimikrobielle Aktivität zu sein, denn entgegen ihrer abweichenden Cysteinanordnung und -verbrückung sind

die ebenfalls antimikrobiellen α -Defensine sehr ähnlich in ihrer räumlichen Struktur (ZIMMERMANN *et al.*, 1995). Trotz erfüllter struktureller Voraussetzungen ist hBD-4(25-61) sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Keime ein nur schwaches antimikrobielles Peptid (Tabelle 12), wobei die *in vitro* bestimmten minimalen Hemmkonzentrationen von 100-200 $\mu\text{g/ml}$ insbesondere gegen pathogene Bakterien etwa 20-mal höher liegen als die MIC-Werte für andere Defensine oder Cathelizidine (YANG *et al.*, 2001). Dennoch lassen diese Ergebnisse keine eindeutige Bewertung der Bedeutung von hBD-4 *in vivo* zu, denn dort spielen noch andere Einflüsse wie Peptidinduktion, Synergismus, Salzabhängigkeit und Kompartimentierung eine wichtige Rolle. So können bei Patienten mit zystischer Fibrose oder Sepsis durchaus Defensinkonzentrationen von über 100 $\mu\text{g/ml}$ in Sputum oder Plasma erreicht werden (HANCOCK und DIAMOND, 2000). Außerdem scheint es möglich, dass antimikrobielle Peptide durch die Anlagerung an negativ geladene Oberflächen wie Lungenepithelzellen (SINGH *et al.*, 1998) oder Speichel- und Plasmaproteine (VAN 'T HOF *et al.*, 2001) lokal aufkonzentriert und dadurch biologisch aktiv werden können. Darüber hinaus ist es möglich, dass die synthetische hBD-4-Form zu kurz oder zu lang war. Es ist daher zukünftig zu prüfen, ob amino- und carboxyterminal verlängerte bzw. verkürzte Varianten eine veränderte Aktivität zeigen.

Interaktion von hBD-4 mit anderen antibiotischen Substanzen

Eine mögliche synergistische Wirkung von hBD-4 mit anderen antibiotischen Stoffen wurde mit Hilfe des FIC-Tests (2.6.4) durchgeführt. Genau wie LL-37, Laktoferricin oder Cecropin B (TRAVIS *et al.*, 2001) wirkt hBD-4(25-61) synergistisch in Kombination mit Lysozym, so dass eine Herabsetzung der minimalen Hemmkonzentration von hBD-4 durch das ubiquitär vorkommende Lysozym *in vivo* erreicht werden kann. Der beobachtete Synergismus zwischen Lysozym und hBD-4(25-61) bei der Inaktivierung von *Staphylococcus carnosus* TM300 könnte auf die lysozymvermittelte Auflösung der bakteriellen Mureinschichten zurückzuführen sein, durch welche hBD-4(25-61) leichter bis zur Zellmembran als vermuteter Zielstruktur vordringen könnte. Allerdings ist diese Modellvorstellung nicht ohne weiteres mit der beobachteten Indifferenz zwischen hBD-4(25-61) und Ampicillin zu vereinbaren, da Ampicillin und das oben erwähnte Lysozym die Integrität der Zellwand über einen ähnlichen Mechanismus herabsetzen. Ampicillin wirkt hemmend auf die Mureinbiosynthese in teilungsaktiven Bakterien, während Lysozym auch in nicht wachsenden Kulturen zur Spaltung der Mureinschicht in der Lage ist, so dass die verschiedenen Wachstumsstadien einer Bakterienkultur möglicherweise einen Einfluss auf die Wechselwirkung von hBD-4(25-61) und Ampicillin haben. Weitergehende Untersuchungen sollten klären, ob bei gleichzeitiger Gabe von hBD-4 die Dosis stark toxischer Antibiotika wie Streptomycin oder Vancomycin in der Therapie herabgesetzt werden könnte.

Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von der Mediensalzkonzentration

Die Bestimmung der MIC-Werte zeigt, dass die antibakterielle Aktivität von hBD-4(25-61) stark von der Ionenstärke des Testmediums abhängig ist (3.4.5.1), was am Beispiel des *Staphylococcus carnosus* TM300 verdeutlicht wurde (3.4.5.3). Entsprechend der Diskussion

über das Erreichen von mikromolaren Peptidkonzentrationen *in vivo* ist bisher unklar, ob nicht auch die starke Salzabhängigkeit vieler antimikrobieller Peptide deren Aktivität im Organismus von vornherein unmöglich macht (VAN 'T HOF *et al.*, 2001). Diese Frage muss durch zukünftige *in vivo*-Versuche mit geeigneten Tiermodellen geklärt werden. Da hBD-4 in Medien mit geringer Ionenstärke wie $\frac{1}{4}$ MHB sogar gegen den pathogenen Keim *Pseudomonas aeruginosa* wirksam ist, scheint es gerechtfertigt, dieses Peptid als Leitstruktur zur Entwicklung ähnlicher, salzunabhängiger Peptide oder Peptidomimetika zu nutzen. Jedoch sind die strukturellen Voraussetzungen, die die Potenz einer Substanz unabhängig von der Ionenstärke werden lässt, bisher nicht bekannt (TANG *et al.*, 1999; VAN 'T HOF *et al.*, 2001).

Hämolytischer Effekt von hBD-4

Im Hinblick auf eine mögliche spätere Zulassung als Arzneimittel werden antimikrobielle Peptide grundsätzlich in Hämolyse-Assays auf ihre Selektivität gegenüber prokaryotischen Zellen bzw. Hefen überprüft. Antimikrobiell potente, aber gleichzeitig stark hämolysierende Peptide wie Melittin oder MBI-28 dienen allenfalls als Leitstruktur für eine weitere Entwicklung von Peptidantibiotika. Analog zu den antimikrobiellen Assays ist auch die hämolytische Aktivität einer Substanz stark abhängig von den verwendeten Puffern. Auch wenn das in dieser Arbeit genutzte ionenschwache TSB-Medium keine physiologischen Bedingungen widerspiegelt, ist diese Methode in Bezug auf die Sicherheit der weiteren Moleküleentwicklung die bessere, da sie sensitiver ist als z.B. die Verwendung von PBS (HELMERHORST *et al.*, 1999). Da hBD-4(25-61) selbst im empfindlicheren Assay nur etwa 10 % der eingesetzten Erythrozyten lysiert hat, kann es als schwach hämolytisch eingestuft werden (Abbildung 23). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass dieses Ergebnis allein für die getestete Peptidform hBD-4(25-61) gilt, denn die Veränderung der Molekülform kann immer, insbesondere bei der Erhöhung des Anteils hydrophober Aminosäuren, zu deutlichen Änderungen in der hämolytischen Aktivität führen (HWANG und VOGEL, 1998; HELMERHORST *et al.*, 1999).

Chemotaktische Aktivität von hBD-4

Da antimikrobielle Peptide aus neutrophilen Granulozyten (LL-37, HNP-1, HNP-2) oft chemotaktisch auf verschiedene Populationen weißer Blutkörperchen wirken, wurde hBD-4 auf eine solche Eigenschaft hin überprüft (YANG *et al.*, 2001). hBD-4 hat wie hBD-3 schon in nanomolaren Konzentrationen einen schwach chemotaktischen Effekt auf Monozyten, ohne jedoch einen Calcium-Influx in diesen Zellen hervorzurufen (CONEJO-GARCÍA *et al.*, 2001a; YANG *et al.*, 2001). Dies ist aus physiologischer Sicht sinnvoll, denn so können die vor allem durch IL-8 (GUDMUNDSSON und AGERBERTH, 1999) an den Entzündungsort dirigierten neutrophilen Granulozyten ihrerseits weitere, für die längerfristige Abwehr einer Infektion geeignete Blutzellen (Monozyten, Lymphozyten) rekrutieren. Eine chemotaktische Wirkung ohne Auslösung eines Calciumsignals wird insbesondere bei Faktoren beobachtet, die B-Lymphozyten aktivieren können. Darüber hinaus sind solche Botenstoffe wie BCA-1 oder SLC auch nicht über proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-1 zu induzieren

(BRANDES *et al.*, 2000), so dass der Effekt von hBD-4 auf B-Lymphozyten eine wichtige Fragestellung ist.

Isolierung von hBD-4 aus SAEC-Zellen

Zwar wurde hBD-4(25-61) als eine wahrscheinliche antimikrobielle Peptidform synthetisiert, doch können Variationen in der Primärstruktur natürlich die antimikrobielle (VALORE *et al.*, 1998), hämolytische (HWANG und VOGEL, 1998) oder chemotaktische Aktivität (RAJ *et al.*, 2000) sowie die Salzabhängigkeit (VAN 'T HOF *et al.*, 2001) von hBD-4 bedeutend beeinflussen. Als Anhaltspunkt für die optimale antimikrobielle Peptidform sollten deshalb eine oder mehrere native Formen von hBD-4 isoliert werden. Dazu wurden nach Immunisierung mit hBD-4(25-61) als antigener Determinante monoklonale Antikörper hergestellt, die zur Isolierung von hBD-4 aus Überständen von humanen SAEC-Zellen dienen sollten (2.5.5). Trotz hinreichender Sensitivität und Spezifität der genutzten Antikörper konnte sowohl in den Überständen als auch in den Zellaufschlüssen der Lungenepithelzellen im Western Blot bisher keine hBD-4-spezifische Immunreaktivität beobachtet werden. Deshalb könnten in Zukunft andere Isolierungsverfahren zur Aufreinigung von hBD-4 in Angriff genommen werden. Dabei bietet sich neben der bereits für hBD-1 erfolgreich durchgeführten Isolierung aus Hämofiltrat (BENSCH *et al.*, 1995) auch die Verwendung von leicht zugänglichen humanen neutrophilen Granulozyten an (SELSTED *et al.*, 1993).

Resümee und Perspektiven

Es kann abschließend festgehalten werden, dass die Suche nach neuen humanen β -Defensinen über eine bioinformatische Methode erfolgreich durchgeführt wurde, wie der experimentelle Nachweis der vorhergesagten cDNA von hBD-4 belegt. Allerdings können die chemotaktischen und antimikrobiellen Eigenschaften von hBD-4 erst nach Untersuchung weiterer Peptidformen, insbesondere der natürlichen, abschließend beurteilt werden, da diese in Abhängigkeit von einzelnen Aminosäuren oft stark variieren (VALORE *et al.*, 1998). Obwohl insbesondere die Stimulation der Transkriptionsrate von hBD-4 durch bakterielle Besiedlung auf eine Rolle bei der Infektabwehr hindeutet, kann nicht ausgeschlossen werden, dass hBD-4 auch an der Reifung oder Funktionalität von Spermien beteiligt ist. Diese These, die in erster Linie durch das für β -Defensine einzigartige Expressionsmuster gestützt wird, könnte durch den immunhistochemischen Nachweis von hBD-4 auf Spermatozoen sowie durch den Nachweis einer androgenregulierten Expression weiter gefestigt werden. Diese Nachweise stellen neben der Isolierung einer nativen Peptidform die nächsten Schritte bei der Untersuchung von hBD-4 dar. Basierend auf der isolierten Peptidform soll dann in Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen versucht werden, durch Variation der Moleküllänge die antimikrobielle Potenz von hBD-4 zu verbessern bzw. dessen Salzsensitivität zu verringern. Gegebenenfalls könnten anschließend geeignete Tiermodelle zur Untersuchung der antimikrobiellen und chemotaktischen Eigenschaften von hBD-4 *in vivo* genutzt werden, um weitere Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieses neuen humanen β -Defensins zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer humaner Peptide mit antimikrobieller Aktivität. Zu diesem Zweck wurden zwei bereits aus Hämofiltrat isolierte, strukturell nicht verwandte Peptide mit unbekannter Funktion (LEAP-1 und LEAP-2) auf eine mögliche antibakterielle Aktivität hin überprüft. In einem zweiten methodischen Ansatz wurden die vom Humanen Genomprojekt veröffentlichten Daten mit Hilfe verschiedener Computerprogramme systematisch auf die Existenz neuer humaner β -Defensine untersucht.

LEAP-1 und LEAP-2 weisen als cysteinreiche, kationische Peptide mit amphipathischem Charakter typische Strukturmerkmale antimikrobieller Peptide auf. Für die aus Hämofiltrat isolierten Peptide wurde im Radialdiffusions-Hemmtest eine schwache, dosisabhängige antimikrobielle Wirkung gegen verschiedene grampositive Keime sowie gegen ein gramnegatives Bakterium und Hefen nachgewiesen. Anschließende Präinkubationsexperimente zeigten, dass für eine bakterielle Wachstumshemmung mikromolare Konzentrationen LEAP-1 und LEAP-2 nötig sind. Beide Peptide werden hauptsächlich in der Leber exprimiert und sind in verschiedenen Wirbeltieren hochkonserviert. Darüber hinaus wurden für LEAP-2 ein alternativer Promotor und mehrere Spleißvarianten identifiziert. Diese für antimikrobielle Peptide ungewöhnlichen Eigenschaften deuten darauf hin, dass LEAP-1 und LEAP-2 weitere physiologische Funktionen innehaben könnten. Vor kurzem veröffentlichte Daten legen nahe, dass LEAP-1 eine wichtige Rolle in der Eisen-Homöostase übernehmen kann, während für LEAP-2 bislang keine Indizien für weitere Funktionen vorliegen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die genomische Sequenz des humanen β -Defensin 4 durch eine bioinformatische Analyse ausgewählter Contigs des Chromosoms 8 erstmals identifiziert. Die nach der Klonierung der vollständigen cDNA durchgeführte Expressionsanalyse ergab, dass hBD-4 hauptsächlich in Nebenhoden transkribiert wird. Die endogene Expression von hBD-4 ist in der humanen Lungenzelllinie SAEC 6043 durch PMA und in primären Lungenepithelzellen durch Besiedlung mit den pathogenen Bakterien *Streptococcus pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* induzierbar. Synthetisches hBD-4(25-61) zeigte eine nur schwach ausgeprägte antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene pathogene und nicht-pathogene Keime, wobei die antibakterielle Potenz stark von der Ionenstärke des verwendeten Testmediums abhängt. hBD-4(25-61) wirkt synergistisch im Zusammenspiel mit Lysozym und ist nur schwach hämolytisch aktiv. Zudem hat hBD-4(25-61) in nanomolaren Konzentrationen eine chemotaktische Aktivität auf humane Monozyten. Obwohl die Transkriptionsrate von hBD-4 durch PMA induzierbar war, konnte bislang kein natives Peptid aus Überständen stimulierter SAEC-Zellen isoliert werden. Die Kenntnis der Peptidlänge von hBD-4 *in vivo* ist zukünftig von besonderer Bedeutung, da seine antimikrobiellen, chemotaktischen und zytotoxischen Effekte stark von dessen Primärstruktur beeinflusst werden.

6. Literaturverzeichnis

- ABOU-HAILA, A. und TULSIANI, D.R. (2000) Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 173-182.
- ADEREM, A. und ULEVITCH, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. und LIPMAN, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- ALVAREZ-ELCORO, S. UND ENZLER, M.J. (1999) The macrolides: erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. *Mayo Clin. Proc.* **74**, 613-634.
- ANDREU, D. und RIVAS, L. (1998) Animal antimicrobial peptides. An overview. *Biopolymers (Peptide Science)* **47**, 413; 415-433.
- ARNDT, S. (2001) Isolierung und Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus. Dissertation im Fachbereich Chemie der Universität Hannover.
- AYOUBI, T. A. und VAN DE VEN, W. J. (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.* **10**, 453-460.
- BALS, R., GOLDMAN, M.J. und WILSON, J.M. (1998a) Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect. Immun.* **66**, 1225-1232.
- BALS, R., WANG, X., ZASLOFF, M. und WILSON, J.M. (1998b) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 9541-9546.
- BALS, R., WANG, X., MEEGALLA, R.L., WATTLER, S., WEINER, D.J., NEHLS, M.C. und WILSON, J.M. (1999a) Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs. *Infect. Immun.* **67**, 3542-3547.
- BALS, R., XIAO, W., SANG, N., WEINER, D.J., MEEGALLA, R.L. und WILSON, J.M. (1999b) Transduction of well-differentiated airway epithelium by recombinant adeno-associated virus is limited by vector entry. *J. Virol.* **73**, 6085-6088.
- BALS, R., WEINER, D.J., MOSCIONI, A.D., MEEGALLA, R.L. und WILSON, J.M. (1999c) Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect. Immun.* **67**, 6084-6089.
- BAUER, F., SCHWEIMER, K., KLÜVER, E., CONEJO-GARCÍA, J.R., FORSSMANN, W.-G., RÖSCH, P., ADERMANN, K. und STICHT, H. (2001) Structure determination of human and murine β -defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci.* **10**, 2470-2479.

- BECKER, M.N., DIAMOND, G., VERGHESE, M.W. und RANDELL, S.H. (2000) CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J. Biol. Chem.* **275**, 29731-29736.
- BENSCH, K.W., RAIDA, M., MÄGERT, H.J, SCHULZ-KNAPPE, P. UND FORSSMANN, W.-G. (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**, 331-335.
- BICKEL, M.H. (1996) Antibiotika gegen bakterielle Infektionen. In: Meilensteine der Medizin (Schott, H. Hrsg.), 1. Auflage, Harenberg Verlag, Dortmund, 458-464.
- BIRNBOIM, H.C. und DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1522.
- BOUKAMP, P., PETRUSSEVSKA, R.T., BREITKREUTZ, D., HORNING, J., MARKHAM, A. und FUSENIG, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* **106**, 761-771.
- BOMAN, H.G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 61-92.
- BOMAN, H.G. (2000) Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* **173**, 5-16.
- BRANDES, M., LEGLER, D.F., SPOERRI, B., SCHAERLI, P. und MOSER, B. (2000) Activation-dependent modulation of B lymphocyte migration to chemokines. *Int. Immunol.* **12**, 1285-1292.
- CHOPRA, I., HODGSON, J., METCALF, B. UND POSTE, G. (1997) The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 497-503.
- CONEJO-GARCÍA, J.R., JAUMANN, F., SCHULZ, S., KRAUSE, A., RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, F.J., FORSSMANN, U., ADERMANN, K., KLÜVER, E., VOGELMEIER, C., BECKER, D., HEDRICH, R., FORSSMANN, W.-G. und BALS, R. (2001a) Identification of a novel, multifunctional β -defensin (hBD-3) with specific antimicrobial activity: its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* **306**, 257-264.
- CONEJO-GARCÍA, J.R., KRAUSE, A., SCHULZ, S., RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, F.J., KLÜVER, E., ADERMANN, K., FORSSMANN, U., FRIMPONG-BOATENG, A., BALS, R. und FORSSMANN, W.-G. (2001b) Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**, 1819-1821.
- DIAMOND, G., ZASLOFF, M., ECK, H., BRASSEUR, M., MALOY, W.L. und BEVINS, C.L. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3952-3956.
- DIAMOND, G. und BEVINS, C.L. (1998) beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **88**, 221-225.
- DIAMOND, G., LEGARDA, D. und RYAN, L.K. (2000) The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol. Rev.* **173**, 27-38.

- DOHERTY, D.G. und O'FARRELLY, C. (2000) Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol. Rev.* **174**, 5-20.
- ERNST, W.A., THOMA-USZYNSKI, S., TEITELBAUM, R., KO, C., HANSON, D.A., CLAYBERGER, C., KRENSKY, A.M., LEIPPE, M., BLOOM, B.R., GANZ, T. und MODLIN, R.L. (2000) Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J. Immunol.* **165**, 7102-7108.
- FRÖHLICH, O., PO, C. und YOUNG, L.G. (2001) Organization of the human gene encoding the epididymis-specific EP2 protein variants and its relationship to defensin genes. *Biol. Reprod.* **64**, 1072-1079.
- FERBER, D. (2000) Superbugs on the hoof ? *Science* **288**, 792-794.
- FLEMING, R.E. und SLY, W.S. (2001) Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8160-8162.
- FORSSMANN, K., HOCK, D., HERBST, F., SCHULZ-KNAPPE, P., TALARTSCHIK, J., SCHELER, F. UND FORSSMANN, W.-G. (1986) Isolation and structural analysis of the circulating human cardiodilatin (alpha ANP). *Klin. Wochenschr.* **64**, 1276-1280.
- FORSSMANN, W.-G., SCHULZ-KNAPPE, P., MEYER, M., ADERMANN, K., FORSSMANN, K., HOCK, D. UND AOKI, A. (1993) Characterization of natural posttranslationally processed peptides from human blood: A new tool in the systematic investigation of native peptides. In: *Peptide Chemistry* (Yanaihara, N. ed.) ESCOM, Leiden, 553-556.
- FROHM, M., AGERBERTH, B., AHANGARI, G., STAHL-BACKDAHL, M., LIDEN, S., WIGZELL, H. und GUDMUNDSSON, G.H. (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* **272**, 15258-15263.
- FROHMAN, M.A., DUSH, M.K. und MARTIN, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.
- GANZ, T. (1999) Defensins and host defense. *Science* **286**, 420-421.
- GANZ, T. (2001) Fatal attraction evaded. How pathogenic bacteria resist cationic polypeptides. *J. Exp. Med.* **193**, F31-34.
- GARCIA-OLMEDO, F., MOLINA, A., ALAMILLO, J.M. und RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* **47**, 479-491.
- GOLDMAN, M.J., ANDERSON, G.M., STOLZENBERG, E.D., KARI, U.P., ZASLOFF, M. und WILSON, J.M. (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**, 553-560.
- GOUGH, M., HANCOCK, R.E. und KELLY, N.M. (1996) Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect. Immun.* **64**, 4922-4927.

- GRANDJEAN, V., VINCENT, S., MARTIN, L., RASSOULZADEGAN, M. und CUZIN, F. (1997) Antimicrobial protection of the mouse testis: synthesis of defensins of the cryptdin family. *Biol. Reprod.* **57**, 1115-1122.
- GUDMUNDSSON, G.H. und AGERBERTH, B. (1999) Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J. Immunol. Methods* **232**, 45-54.
- GUO, L., LIM, K.B., PODUJE, C.M., DANIEL, M., GUNN, J.S., HACKETT, M. und MILLER, S.I. (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**, 189-198.
- HAMIL, K.G., SIVASHANMUGAM, P., RICHARDSON, R.T., GROSSMAN, G., RUBEN, S.M., MOHLER, J.L., PETRUSZ, P., O'RAND, M.G., FRENCH, F.S. und HALL, S.H. (2000) HE2beta and HE2gamma, new members of an epididymis-specific family of androgen-regulated proteins in the human. *Endocrinology* **141**, 1245-1253.
- HANCOCK, R.E.W. (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* **349**, 418-22.
- HANCOCK, R.E.W. und CHAPPLE, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317-1323.
- HANCOCK, R.E.W. (2000) Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **9**, 1723-1728.
- HANCOCK, R.E.W. und DIAMOND, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**, 402-410.
- HANCOCK, R.E.W. und SCOTT, M.G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8856-8861.
- HANDAL, T. und OLSEN, I. (2000) Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases. *Eur. J. Oral Sci.* **108**, 163-174.
- HARDER, J., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E. und SCHRÖDER, J.M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861.
- HARDER, J., MEYER-HOFFERT, U., TERAN, L.M., SCHWICHTENBERG, L., BARTELS, J., MAUNE, S. und SCHRÖDER, J.M. (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **22**, 714-721.
- HARDER, J., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E. und SCHRÖDER, J.M. (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* **276**, 5707-5713.
- HELLINGER, W.C. (2000) Confronting the problem of increasing antibiotic resistance. *South. Med. J.* **93**, 842-848.
- HELMERHORST, E.J., REIJNDERS, I.M., VAN 'T HOF, W., VEERMAN, E.C. und NIEUW AMERONGEN, A.V. (1999) A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett.* **449**, 105-110.

- HELMERHORST, E.J., VAN 'T HOF, W., BREEUWER, P., VEERMAN, E.C., ABEE, T., TROXLER, R.F., AMERONGEN, A.V. und OPPENHEIM, F.G. (2001) Characterization of histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane integrity excludes a candidacidal mechanism of pore formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 5643-5649.
- HOFFMANN, J.A., KAFATOS, F.C., JANEWAY, C.A. und EZEKOWITZ, R.A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R. und GELFAND, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7276-7280.
- HUTTNER, K.M., KOZAK, C.A. und BEVINS, C.L. (1997) The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human beta-defensin 1. *FEBS Lett.* **413**, 45-49.
- HWANG, P.M. und VOGEL, H.J. (1998) Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell. Biol.* **76**, 235-246.
- ISLAM, D., BANDHOLTZ, L., NILSSON, J., WIGZELL, H., CHRISTENSSON, B., AGERBERTH, B. und GUDMUNDSSON, G. (2001) Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat. Med.* **7**, 180-185.
- ISENBERG, H.D. (1993) Clinical microbiology procedures handbook, Supplement 1. American Society for Microbiology, New York.
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M. und CAPRA, D. (1999) Immunobiology: the immune system in health and disease. 4th Edition, Elsevier Science, London.
- JIA, H.P., SCHUTTE, B.C., SCHUDY, A., LINZMEIER, R., GUTHMILLER, J.M., JOHNSON, G.K., TACK, B.F., MITROS, J.P., ROSENTHAL, A., GANZ, T. und MCCRAY, P.B. JR. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* **263**, 211-218.
- KAISER, V. und DIAMOND, G. (2000) Expression of mammalian defensin genes. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 779-784.
- KAYSER, F.H., BIENZ, K.A., ECKERT, J. und ZINKERNAGEL, R.M. (1998) Medizinische Mikrobiologie. 9. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- KIRCHHOFF, C. (1999) Gene expression in the epididymis. *Int. Rev. Cytol.* **188**, 133-202.
- KIRIKAE, T., HIRATA, M., YAMASU, H., KIRIKAE, F., TAMURA, H., KAYAMA, F., NAKATSUKA, K., YOKOCHI, T. und NAKANO, M. (1998) Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infect. Immun.* **66**, 1861-1868.
- KLEEMEIER, B. (1997) Isolierung und Charakterisierung von hNLP, einem humanen zirkulierenden Peptid. Dissertation im Fachbereich Chemie der Universität Hannover.
- KLINKE, R. und SILBERNAGL, S. (1994) Lehrbuch der Physiologie. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.

- KOZAK, M. (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell. Biol.* **115**, 887-903.
- KRAUSE, A., NEITZ, S., MÄGERT, H.-J., SCHULZ, A., FORSSMANN, W.-G., SCHULZ-KNAPPE, P. und ADERMANN, K. (2000) LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* **480**, 147-150.
- KRAUSE, A., LIEPKE, C., MEYER, M., ADERMANN, K., FORSSMANN, W.-G. und MARONDE, E. (2001) Human natriuretic peptides exhibit antimicrobial activity. *Eur. J. Med. Res.* **6**, 215-218.
- KRISANAPRAKORNKIT, S., KIMBALL, J.R., WEINBERG, A., DARVEAU, R.P., BAINBRIDGE, B.W. und DALE, B.A. (2000) Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect. Immun.* **68**, 2907-2915.
- KRISANAPRAKORNKIT, S., WEINBERG, A., PEREZ, C.N. und DALE, B.A. (1998) Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect. Immun.* **66**, 4222-4228.
- LATHAM, P.W. (1999) Therapeutic peptides revisited. *Nat. Biotechnol.* **17**, 755-757.
- LEE, L.G., CONNELL, C.R. und BLOCH, W. (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3761-3766.
- LEHRER, R.I. und GANZ, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 23-27.
- LEHRER, R.I., ROSENMAN, M., HARWIG, S.S.L., JACKSON, R. und EISENHAUER, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immun. Methods* **137**, 167-173.
- LEVY, O. (2000) Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood* **96**, 2664-2672.
- LEVY, S.B. (1998) The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Am.* **278**, 46-53.
- LI, P., CHAN, H.C., HE, B., SO, S.C., CHUNG, Y.W., SHANG, Q., ZHANG, Y.D. und ZHANG, Y.L. (2001) An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* **291**, 1783-1785.
- LIEPKE, C., ZUCHT, H.D., FORSSMANN, W.-G. und STÄNDKER, L. (2001) Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *J. Chromatogr. B* **752**, 369-377.
- LINDL, T. (2000) Zell und Gewebekultur. 4. Überarbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- LIU, W.S. und HECKMAN, C.A. (1998) The sevenfold way of PKC regulation. *Cell. Signal.* **10**, 529-542.
- MALLOW, E.B., HARRIS, A., SALZMAN, N., RUSSELL, J.P., DEBERARDINIS, R.J., RUCHELLI, E. und BEVINS, C.L. (1996) Human enteric defensins. *J. Biol. Chem.* **271**, 4038-4045.

- MALM, J., SØRENSEN, O., PERSSON, T., FROHM-NILSSON, M., JOHANSSON, B., BJARTELL, A., LILJA, H., STAHL-BACKDAHL, M., BORREGAARD, N. und EGESTEN A. (2000) The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect. Immun.* **68**, 4297-4302.
- MARTIN RUIZ, C., DUQUENNE, C., TRETON, D., LEFEVRE, A. und FINAZ, C. (1998) SOB3, a human sperm protein involved in zona pellucida binding: physiological and biochemical analysis, purification. *Mol. Reprod. Dev.* **49**, 286-297.
- MERRIFIELD, B. (1986) Solid phase synthesis. *Science* **232**, 341-347.
- MICHAELSON, D., RAYNER, J., COUTO, M. und GANZ, T. (1992) Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leukoc. Biol.* **51**, 634-639.
- MOORE, H.D. (1998) Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. *Andrologia* **30**, 233-239.
- MUTSCHLER, E. (1996) Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- NAKABAYASHI, H., TAKETA, K., MIYANO, K., YAMANE, T. und SATO, J. (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858-3863.
- NAKAYAMA, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* **327**, 625-635.
- NEU, H.C. (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064-1073.
- NICOLAS, G., BENNOUN, M., DEVAUX, I., BEAUMONT, C., GRANDCHAMP, B., KAHN, A. und VAULONT, S. (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8780-8785.
- NIEBUHR, K., LINGNAU, A., FRANK, R. und WEHLAND, J. (1998) Cell Biology: A Laboratory Handbook. Academic Press, second edition, Vol. 2, 398-403.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. und VON HELINE, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.
- NISHIMURA, A., MORITA, M., NISHIMURA, Y. und SUGINO, Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6169.
- NONAKA, M., ISHIKAWA, N., PASSWELL, J., NATSUUME-SAKAI, S. und COLTEN, H.R. (1989) Tissue-specific initiation of murine complement factor B mRNA transcription. *J. Immunol.* **142**, 1377-1382.

- O'CONNELL, B.C., XU, T., WALSH, T.J., SEIN, T., MASTRANGELI, A., CRYSTAL, R.G., OPPENHEIM, F.G. UND BAUM, B.J. (1996) Transfer of a gene encoding the anticandidal protein histatin 3 to salivary glands. *Hum. Gene Ther.* **7**, 2255-2261.
- OGUSHI, K., WADA, A., NIIDOME, T., MORI, N., OISHI, K., NAGATAKE, T., TAKAHASHI, A., ASAKURA, H., MAKINO, S., HOJO, H., NAKAHARA, Y., OHSAKI, M., HATAKEYAMA, T., AOYAGI, H., KURAZONO, H., MOSS, J. und HIRAYAMA, T. (2001) Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 30521-30526.
- O'NEIL, D.A., PORTER, E.M., ELEWAUT, D., ANDERSON, G.M., ECKMANN, L., GANZ, T. und KAGNOFF, M.F. (1999) Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol.* **163**, 6718-6724.
- O'NEIL, D.A., COLE, S.P., MARTIN-PORTER, E., HOUSLEY, M.P., LIU, L., GANZ, T. und KAGNOFF, M.F. (2000) Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect. Immun.* **68**, 5412-5415.
- OTVOS, L. JR. (2000) Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.* **6**, 497-511.
- OUELLETTE, A.J., SATCHELL, D.P., HSIEH, M.M., HAGEN, S.J. und SELSTED, M.E. (2000) Characterization of luminal paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine. Attenuated antimicrobial activities of peptides with truncated amino termini. *J. Biol. Chem.* **275**, 33969-33973.
- PARDIGOL, A., FORSSMANN, U., ZUCHT, H.D., LOETSCHER, P., SCHULZ-KNAPPE, P., BAGGIOLINI, M., FORSSMANN, W.-G. und MÄGERT, H.J. (1998) HCC-2, a human chemokine: gene structure, expression pattern, and biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6308-6313.
- PARK, C.H., VALORE, E.V., WARING, A.J. und GANZ, T. (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* **276**, 7806-7810.
- PERRY, A.C., JONES, R., MOISYADI, S., COADWELL, J. und HALL, L. (1999) The novel epididymal secretory protein ESP13.2 in *Macaca fascicularis*. *Biol. Reprod.* **61**, 965-972.
- PESCHEL, A., JACK, R.W., OTTO, M., COLLINS, L.V., STAUBITZ, P., NICHOLSON, G., KALBACHER, H., NIEUWENHUIZEN, W.F., JUNG, G., TARKOWSKI, A., VAN KESSEL, K.P. und VAN STRIJP, J.A. (2001) Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* **193**, 1067-1076.
- PIGEON, C., ILYIN, G., COURSELAUD, B., LEROYER, P., TURLIN, B., BRISSOT, P. und LOREAL, O. (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* **276**, 7811-7819.
- PORTER, E.M., VAN DAM, E., VALORE, E.V. und GANZ, T. (1997) Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect. Immun.* **65**, 2396-2401.

- PORTER, E.M., POLES, M.A., LEE, J.S., NAITOH, J., BEVINS, C.L. und GANZ, T. (1998) Isolation of human intestinal defensins from ileal neobladder urine. *FEBS Lett.* **434**, 272-276.
- RAJ, P.A., ANTONYRAJ, K.J. und KARUNAKARAN, T. (2000) Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins. *Biochem. J.* **347**, 633-641.
- RISSE, A. (2000) Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol.* **68**, 785-792.
- RITTENHOUSE, J. und MARCUS, F. (1984) Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal. Biochem.* **138**, 442-448.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. und ARNHEIM, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SAUERTEIG, L. (1996) Die Wende im Kampf gegen die Syphilis. In: Meilensteine der Medizin (Schott, H. Hrsg.), 1. Auflage, Harenberg Verlag, Dortmund, 438-444.
- SAWICKI, W. und MYSTKOWSKA, E.T. (1999) Contraceptive potential of peptide antibiotics. *Lancet* **353**, 464-465.
- SCHEPKY, A.G., BENSCH, K.W., SCHULZ-KNAPPE, P. UND FORSSMANN, W.-G. (1994) Human hemofiltrate as a source of circulating bioactive peptides: determination of amino acids, peptides and proteins. *Biomed. Chromatogr.* **8**, 90-94.
- SCHILD, T.A. (1996) Einführung in die Real-Time TaqManTM PCR-Technologie. Handbuch Applied Biosystems, Version 2.1, 4-21.
- SCHNAPPINGER, D. UND HILLEN, W. (1996) Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* **165**, 359-369.
- SCHONWETTER, B.S., STOLZENBERG, E.D. und ZASLOFF, M.A. (1995) Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* **267**, 1645-1648.
- SCHRÖDER, J.M. (1999) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 121-134.
- SCHULZ-KNAPPE, P., RAIDA, M., MEYER, M., QUELLHORST, E.A. und FORSSMANN, W.-G. (1996) Systematic isolation of circulating human peptides: the concept of peptide trapping. *Eur. J. Med. Res.* **1**, 223-236.
- SCHULZ-KNAPPE, P., SCHRADER, M., STÄNDKER, L., RICHTER, R., HESS, R., JÜRGENS, M. und FORSSMANN, W.-G. (1997) Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J. Chromatogr. A* **776**, 125-132.
- SELSTED, M.E., TANG, Y.Q., MORRIS, W.L., MCGUIRE, P.A., NOVOTNY, M.J., SMITH, W., HENSCHEN, A.H. und CULLOR, J.S. (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 6641-6648.

- SHAI, Y. (1995) Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 460-464.
- SIMMACO, M., MIGNOGNA, G. und BARRA, D. (1998) Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers (Peptide Science)* **47**, 453-450.
- SINGH, P.K., JIA, H.P., WILES, K., HESSELBERTH, J., LIU, L., CONWAY, B.A., GREENBERG, E.P., VALORE, E.V., WELSH, M.J., GANZ, T., TACK, B.F. und MCCRAY, P.B. JR. (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14961-14966.
- SMITH, C.W. und VALCARCEL, J. (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 381-388.
- SØRENSEN, O.E., FOLLIN, P., JOHNSEN, A.H., CALAFAT, J., TJABRINGA, G.S., HIEMSTRA, P.S. und BORREGAARD, N. (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951-3959.
- STEINBERG, D.A., HURST, M.A., FUJII, C.A., KUNG, A.H., HO, J.F., CHENG, F.C., LOURY, D.J. und FIDDES, J.C. (1997) Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1738-1742.
- STEINSTRÄESSER, L., KLEIN, R.D., AMINLARI, A., FAN, M.H., KHILANANI, V., REMICK, D.G., SU, G.L. und WANG, S.C. (2001) Protegrin-1 enhances bacterial killing in thermally injured skin. *Crit. Care Med.* **29**, 1431-1437.
- STENGER, S., HANSON, D.A., TEITELBAUM, R., DEWAN, P., NIAZI, K.R., FROELICH, C.J., GANZ, T., THOMA-USZYNSKI, S., MELIAN, A., BOGDAN, C., PORCELLI, S.A., BLOOM, B.R., KRENSKY, A.M. und MODLIN, R.L. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**, 121-125.
- STRYER, L. (1994) Biochemie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- SÜßMUTH, R., EBERSPÄCHER, J., HAAG, R. und SPRINGER, W. (1999) Mikrobiologisch-biochemisches Praktikum. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- TANG, Y.Q. und SELSTED, M.E. (1993) Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 6649-6653.
- TANG, Y.Q., YUAN, J., OSAPAY, G., OSAPAY, K., TRAN, D., MILLER, C.J., OUELLETTE, A.J. und SELSTED, M.E. (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* **286**, 498-502.
- TOSSI, A. (1999) Antimicrobial Sequences Database (AMSDb), <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>.
- TRAVIS, S.M., SINGH, P.K. und WELSH, M.J. (2001) Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 89-95.
- TROXLER, R.F., OFFNER, G.D., XU, T., VANDERSPEK, J.C. und OPPENHEIM, F.G. (1990) Structural relationship between human salivary histatins. *J. Dent. Res.* **69**, 2-6.

- TURNER, J., CHO, Y., DINH, N.N., WARING, A.J. UND LEHRER, R.I. (1998) Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2206-2214.
- VAN 'T HOF, W., VEERMAN, E.C., HELMERHORST, E.J. und AMERONGEN, A.V. (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.* **382**, 597-619.
- VALORE, E.V., PARK, C.H., QUAYLE, A.J., WILES, K.R., MCCRAY, P.B. JR. und GANZ, T. (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* **101**, 1633-1642.
- VOGELSTEIN, B. und GILLESPIE, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615-619.
- VORLAND, L.H. (1999) Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS* **107**, 971-981.
- WALKER, R.C. (1999) The fluoroquinolones. *MAYO CLIN. PROC.* **74**, 1030-1037.
- WALKER, E.M. JR. und WALKER, S.M. (2000) Effects of iron overload on the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **30**, 354-365.
- WHO (World Health Organisation)-Report on infectious diseases, <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000>.
- WILSON, C.L., OUELLETTE, A.J., SATCHELL, D.P., AYABE, T., LOPEZ-BOADO, Y.S., STRATMAN, J.L., HULTGREN, S.J., MATRISIAN, L.M. und PARKS, W.C. (1999) Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* **286**, 113-117.
- WU, M., MAIER, E., BENZ, R. und HANCOCK, R.E.W. (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 7235-7242.
- YANG, D., CHERTOV, O., BYKOVSKAIA, S.N., CHEN, Q., BUFFO, M.J., SHOGAN, J., ANDERSON, M., SCHRÖDER, J.M., WANG, J.M., HOWARD, O.M. und OPPENHEIM, J.J. (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-528.
- YANG, D., CHERTOV, O. und OPPENHEIM, J.J. (2001) Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.* **69**, 691-697.
- ZIMMERMANN, G.R., LEGAULT, P., SELSTED, M.E. UND PARDI, A. (1995) Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry* **34**, 13663-13671.
- ZUCHT, H.D., RAIDA, M., ADERMANN, K., MÄGERT, H.-J. und FORSSMANN, W.-G. (1995) Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* **372**, 185-188.
- ZUCHT, H.D., GRABOWSKY, J., SCHRADER, M., LIEPKE, C., JÜRGENS, M., SCHULZ-KNAPPE, P. und FORSSMANN, W.-G. (1998) Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur. J. Med. Res.* **3**, 315-323.

7. Anhang

Neben den in Abbildung 8, Abbildung 11 und Abbildung 18 dargestellten cDNA-Sequenzen können die entsprechenden Gensequenzen von LEAP-2 und hBD-4 sowie die Nukleotidsequenzen zu den in Abbildung 14 gezeigten LEAP-2-Homologen in *GenBank* eingesehen werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die benötigten Zugangsnummern (Acc.-No.) sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Datenbankeinträge für LEAP-1, LEAP-2 und hBD-4.

Titel des Eintrags	Acc.-No.
<i>Homo sapiens</i> mRNA for liver-expressed antimicrobial peptide (LEAP-1)	AJ277280
<i>Homo sapiens</i> mRNA for LEAP-2	AJ306405
<i>Homo sapiens</i> LEAP-2 gene	AJ409064
<i>Homo sapiens</i> LEAP-2 gene, including alternative promotor	AJ409065
<i>Bos taurus</i> mRNA for LEAP-2	AJ409014
<i>Cavia porcellus</i> mRNA for LEAP-2	AJ409054
<i>Macaca mulatta</i> LEAP-2 gene	AJ409056
<i>Mus musculus</i> mRNA for LEAP-2	AJ409055
<i>Mus musculus</i> LEAP-2 gene	AJ409063
<i>Sus scrofa</i> mRNA for LEAP-2.	AJ409013
<i>Homo sapiens</i> mRNA for beta-defensin 4	AJ314834
<i>Homo sapiens</i> DEFB4 gene for beta-defensin 4	AJ314835

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Knut Adermann für die stets engagierte, kompetente und freundschaftliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Korreferates.

Ich danke dem wissenschaftlichen Leiter von IPF PharmaCeuticals GmbH (bis 31.03.2000: Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH), Herrn Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann, ganz herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Defensine“ und für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen am Institut.

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

Bei Herrn Dr. Ulf Forssmann und Kolleginnen bedanke ich mich für die Durchführung des Chemotaxis-Assays. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Dr. Robert Bals von der Ludwig-Maximilians-Universität in München für die Durchführung der *air/liquid-interface*-Versuche und bei Frau Dr. Aleksandra Heitland und Kolleginnen für die Bereitstellung der hBD-4-Antikörper bedanken. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Markus Büchler und Herrn PD Dr. Helmut Friess vom Inselspital Bern sowie Herrn Prof. Dr. Christian Stief von der urologischen Abteilung der MHH für die Bereitstellung verschiedener Gewebeproben.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Erik Maronde und Herrn Dr. José-Ramón Conejo-García für die zahlreichen Diskussionen, Ideen und Hilfestellungen, die den Verlauf meiner Arbeit oft maßgeblich beeinflusst haben.

Ich möchte mich besonders bei der Defensingruppe um Rainer Schreeb, Sandra Schulz und Francisco-Javier Rodríguez-Jiménez für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie, insbesondere bei Dr. Peter Kreuzmann, Dr. Cornelia Liepke und Dr. Dirk Motzkus für die wertvollen praktischen Hilfestellungen im Laboralltag.

Außerdem danke ich allen Kollegen der Abteilung Peptidsynthese für die Bereitstellung der hier beschriebenen synthetischen Peptide sowie für die geduldige Beantwortung unzähliger „kurzer Fragen“.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Bewilligung des Doktorandenstipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“.

Bei den Kollegiaten und Betreuern des Graduiertenkollegs möchte ich mich für die interessanten und abwechslungsreichen Seminarveranstaltungen und Tagungen auf Gut Sunder bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht haben und die mir während der Erstellung dieser Arbeit in vielfältiger Weise zur Seite standen.

Publikationsliste

Originalarbeiten

Krause, A., Neitz, S., Mägert, H.-J., Schulz, A., Forssmann, W.-G., Schulz-Knappe, P. und Adermann, K. (2000) LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* **480**, 147-150.

Krause, A., Liepke, C., Meyer, M., Adermann, K., Forssmann, W.-G. und Maronde, E. (2001) Human natriuretic peptides exhibit antimicrobial activity. *Eur. J. Med. Res.* **6**, 215-218.

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

Conejo-García, J.R., Jaumann, F., Schulz, S., **Krause, A.**, Rodríguez-Jiménez, F.J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W.-G. und Bals, R. (2001) Identification of a novel, multifunctional β -defensin (hBD-3) with specific antimicrobial activity: its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* **306**, 257-264.

Krause, A., Sillard, R., Kleemeier, B., Klüver, E., Maronde, E., Conejo-García, J.R., Forssmann, W.-G., Schulz-Knappe, P., Nehls, M.C., Wattler, F., Wattler, S. und Adermann, K. (2001) LEAP-2: a novel mammalian antimicrobial peptide expressed in the liver, **eingereicht**.

Datenbankeinträge

Alle vorgenommenen öffentlichen Datenbankeinträge sind in Tabelle 14 auf Seite 105 zusammengefasst.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alexander Krause
Geburtsdatum / -ort: 19.01.1973 in Rinteln/Weser
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

1979 - 1983 Grundschule in Exten bei Rinteln
1983 – 1985 Orientierungsstufe Süd in Rinteln
1985 – 1992 Gymnasium Ernestinum in Rinteln
Schulabschluss Abitur

Wehrdienst

Juli 1992 – Juni 1993 Grundwehrdienst in Wolfenbüttel und Nienburg/Weser

Berufliche Ausbildung

WS 1993 – WS 1997 Pharmaziestudium an der TU Braunschweig
Dez. 1997 – Nov. 1998 Praktische Ausbildung zum Apothekerberuf in Celle
Dez. 1998 Erteilung der Approbation als Apotheker
Seit Jan. 1999 Durchführung der Doktorarbeit bei IPF PharmaCeuticals GmbH (bis 31.03.2000: Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH) Hannover als Stipendiat des Graduiertenkollegs „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“ (DFG)

Eidesstattliche Erklärung

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

Hannover, im November 2001

Alexander Krause